

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

“El silenciamiento de ZO-2 induce hipertrofia renal a través de un mecanismo dependiente del ciclo celular y mediante la activación de YAP y de la ruta de señalización mTOR”

TESIS

Que presenta

M EN C. ALAIDE DOMÍNGUEZ CALDERÓN

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE  
FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directora de la tesis:

Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel

Ciudad de México

JULIO, 2016

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 29 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección general de la Dra. Lorenza González Mariscal con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becaria No.233211) en el programa de Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Fisiología Celular y Molecular.

## Índice

Prólogo	I
Índice de abreviaturas	II
Resumen	IV
Abstract	V
I. Introducción	1
1.1 Hiperplasia	1
1.2 Hipertrofia	1
1.2.1 Hipertrofia inducida por estímulos hormonales y estrés mecánico	1
1.2.2 Hipertrofia compensatoria	2
1.3 Mecanismos celulares que inducen hipertrofia renal	3
1.3.1 Hipertrofia dependiente del ciclo celular	3
1.3.2 Hipertrofia generada por un desbalance entre las tasas de síntesis y degradación de proteínas	4
1.4 El ciclo celular	5
1.4.1 Reguladores del ciclo celular	5
1.4.2 Inhibidores de las cdks	6
1.5 La ruta de señalización de mTOR	6
1.5.1 S6K	7
1.6 La vía de señalización Hippo	9
1.6.1 YAP y la densidad celular	11
1.6.2 La ruta Hippo y su interacción con otras vías de señalización	11
1.6.2.1 Interacción entre las rutas Hippo y mTOR	11
1.6.2.2 Interacción entre las ruta Hippo y PI3K/PDK1	11
1.6.2.3 Interacción entre las ruta Hippo y Wnt	12

1.6.3	La ruta Hippo y el desarrollo de cáncer	14
1.7	Los epitelios	14
1.8	La unión estrecha	15
1.8.1	Estructura de la UE	15
1.8.2	Función de la UE	15
1.8.3	Composición de la UE	16
1.9	Proteínas MAGUK	17
1.10	ZO-2	18
1.10.1	Estructura de ZO-2	18
1.10.2	Las interacciones de ZO-2	20
1.10.3	Localización de ZO-2	21
1.10.4	Tránsito de ZO-2	22
1.10.5	Función de ZO-2	23
1.10.5.1	ZO-2 es crucial para el desarrollo del tejido extraembrionario	23
1.10.5.2	ZO-2 sella la barrera hemato-testicular	24
1.10.5.3	ZO-2 inhibe la transcripción genética	24
1.10.5.4	ZO-2 es necesaria para la polimerización de las claudinas	25
1.10.5.5	ZO-2 es fundamental en el oído	25
1.10.5.6	ZO-2 es crucial en el sellado de las UE de los hepatocitos	27
1.10.5.7	ZO-2 y el tamaño celular	28
II.	Objetivo	29
III.	Hipótesis	29
IV.	Material y métodos	29
4.1	Cultivo celular	29

4.2	Inmunofluorescencia	30
4.3	Determinación del área celular	30
4.4	Determinación del volumen celular	31
4.5	Determinación de la superficie de la membrana	31
4.6	Microscopía electrónica de barrido	32
4.7	Determinación del cociente proteína/DNA	33
4.8	Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	33
4.9	Inmunodetección en fase sólida	33
4.10	Transfección y ensayos de gen reportero	34
4.11	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	36
4.12	Determinación cuantitativa del PIP <sub>3</sub> en las células epiteliales	36
4.13	Nefrectomía unilateral (UNX)	37
4.14	Aislamiento de las fracciones nucleares y citoplásmicas a partir del tejido renal	38
V.	Resultados	39
5.1	El tamaño de las células epiteliales aumenta en ausencia de ZO-2	39
5.2	La ausencia de ZO-2 induce hipertrofia por un mecanismo dependiente del ciclo celular	42
5.3	El incremento en el tamaño observado en las células ZO-2 KD es también el resultado de la activación del complejo mTORC1 y de su blanco, la cinasa S6K1	45
5.4	En ausencia de ZO-2 se induce la actividad transcripcional de YAP que transactiva a la ruta Akt/mTOR e incrementa el tamaño celular	49
5.5	En la hipertrofia renal compensatoria la expresión de ZO-2 se apaga mientras que la proteína YAP se concentra en el núcleo de las células renales	55
VI.	Discusión	60
VII.	Referencias	66



## Prólogo

ZO-2 es una proteína plataforma que se localiza tanto en el núcleo como en el borde celular en la región de la unión estrecha (UE). Como se asocia a un gran número de proteínas surgió la hipótesis de que ZO-2 tuviera diversas funciones. Para estudiar esta posibilidad previamente en el laboratorio de la Dra. Lorenza González-Mariscal, la estudiante doctoral Sandra Hernández silenció a ZO-2 con un siRNA y observó que se alteraron las funciones de cerca y compuerta de la UE y las monocapas presentaron una citoarquitectura atípica. Sin embargo, el siRNA empleado sólo abatió en un 65% la expresión de ZO-2. Afortunadamente, tiempo después el Dr. Alan Fanning de la Universidad de Carolina del Norte, conociendo nuestro interés por la proteína ZO-2, nos regaló a las células ZO-2 KD, que al expresar de manera constitutiva a un shRNA abaten por completo la expresión de ZO-2. Estas células habían sido originalmente diseñadas por el Dr. Alan Fanning como herramienta para estudiar el efecto del silenciamiento simultáneo de las proteínas ZO 1 y ZO-2.

Nosotros al observar a las células ZO-2 KD, notamos que lucían de mayor tamaño con respecto a las células parentales. Por ello, después de cuantificar y verificar su mayor talla, nos propusimos como tema de esta tesis analizar el papel de ZO-2 en la regulación del tamaño celular.

El estudio del tamaño celular constituye un tema de frontera pues se sabe muy poco de los mecanismos y las proteínas que lo regulan. En esta tesis exploramos si la ausencia de ZO-2 impacta el tiempo que las células pasan en la fase G1 de ciclo celular y si se activa a la ruta de señalización mTOR, que promueve la síntesis de proteínas. Así mismo, analizamos a la vía Hippo, que regula río arriba a la ruta mTOR.

Finalmente estudiamos si los cambios observados en las células ZO-2 KD también estaban presentes en un sistema *in vivo* de hipertrofia. En conjunto, los resultados de esta tesis nos permitieron descubrir una función nueva e inesperada de la proteína ZO-2.

Ciudad de México, Julio 2016

## Índice de abreviaturas

ADNSHL Sordera no sindrómica autosómica dominante

ARN Ácido ribonucleico

BHT Barrera hemato-testicular

Cdk Cinasa dependiente de ciclina

G0 Intervalo 0

G1 Intervalo 1

G2 Intervalo 2

GK Cinasa de guanilato

IRS-1 Sustrato 1 del receptor de insulina

INK-4 Inhibidor de cdk4

KIP Proteína inhibidora de cinasas

M Mitosis

MAGUK Proteínas asociadas a membrana con homología a la cinasa de guanilato

mTOR Blanco de rapamicina en mamíferos

OGT Transferasa de la N-acetil- $\beta$ -glucosamina

OGA Acetilhidrolasa de la N-acetil- $\beta$ -glucosamina

PKC Proteína cinasa C

PIP2 (4,5)-bifosfato de fosfatidilinositol

PIP3 (3,4,5)-trifosfato de fosfatidilinositol

PDK1 Cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos

S Fase de Síntesis

SEN Señal de exportación nuclear

shRNA Pequeño ARN en horquilla

SH3 Homólogo a Src-3

siRNA Pequeño ARN de interferencia

SLN Señal de localización nuclear

S6K Cinasa de S6

TPJ2 Gen de ZO-2

UA Unión adherente

UE Unión estrecha

YAP Proteína asociada a la proteína Yes

ZO Zona occludens

## Resumen

La hipertrofia renal compensatoria se desarrolla para restablecer la función normal del riñón cuando ésta se afecta por una enfermedad o la pérdida del tejido renal. Se caracteriza por un incremento en el tamaño del riñón como consecuencia de un aumento en la talla de las células y no de la proliferación celular. En la línea epitelial renal MDCK, observamos que el silenciamiento de Zona occludens 2 (ZO-2), una proteína de las uniones estrechas (UE), mediante la transfección estable de un shRNA (ZO-2 KD), induce un incremento significativo en el tamaño celular. Mostramos, que la falta de ZO-2 induce hipertrofia por dos mecanismos, uno dependiente del ciclo celular que se origina por un incremento en el tiempo que las células ZO-2 KD pasan en la fase G1 del ciclo celular, y por otro mecanismo que provoca un aumento en la tasa de síntesis de proteínas. Este último ocurre porque la ausencia de ZO-2 induce la acumulación en el núcleo de YAP (del inglés, Yes-assoaciated protein), el blanco principal de la ruta Hippo (de fenotipo semejante a un hipopótamo), lo que estimula su actividad transcripcional y resulta en una disminución en la expresión de PTEN (del inglés, phosphatase and tensin homologue) y un incremento en la concentración de PIP<sub>3</sub> ((3,4,5)-trifosfato de fosfatidil-inositol). Este aumento en PIP<sub>3</sub> transactiva a la ruta de señalización Akt/mTOR (del inglés, mammalian target of rapamycin), lo que conduce a la activación de la cinasa S6K1, que promueve la síntesis de proteínas y el incremento del tamaño celular. De manera complementaria, en un modelo *in vivo* de hipertrofia renal compensatoria (HRC), generado en rata mediante uninefrectomía, se observó que disminuye la expresión de ZO-2 y se incrementa la expresión nuclear de YAP. Nuestros resultados revelan por primera vez, que ZO-2 juega un papel crucial en la modulación del tamaño celular y sugieren se le considere como un nuevo blanco terapéutico para el control de la hipertrofia renal.

## **Abstract**

Renal compensatory hypertrophy (RCH) restores normal kidney function after disease or loss of kidney tissue, and is characterized by an increase in organ size due to cell enlargement and not to cell proliferation. In renal epithelial cells MDCK, silencing of the tight junction protein Zona occludens 2 (ZO-2 KD), induces cell hypertrophy by two mechanisms: prolonging the time that cells spend at the G1 phase of the cell cycle, due to an increase in cyclin D1 level; and augmenting the rate of protein synthesis. The latter is triggered by the nuclear accumulation and increased transcriptional activity of YAP (Yes-associated protein), the main target of the Hippo pathway, which results in the decreased expression of PTEN (phosphatase and tensin homologue). This in turn, increased the level of PIP<sub>3</sub> [phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate] that transactivates the Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway, leading to the activation of the kinase S6K1 and to an increased synthesis of proteins and cell size. In agreement, in a rat model of uninephrectomy, RCH is accompanied by a decreased expression of ZO-2 and the nuclear expression of YAP. Our results reveal a novel role of ZO-2 as a modulator of cell size.

## I. Introducción

### 1.1 Hiperplasia

La palabra hiperplasia deriva de los vocablos griegos: ὑπέρ /hiper que significa "en exceso" y πλασία/plasia que se refiere a "formación". La hiperplasia es la multiplicación en exceso de las células normales en un órgano o tejido. Sucede de forma fisiológica, por ejemplo, durante la lactancia con el crecimiento de las glándulas mamarias y en el ciclo menstrual, cuando la hormona folículo estimulante (FSH) induce la proliferación de las células de la capa interna del endometrio [1]. La hiperplasia ocurre también como un proceso de regeneración tisular. Así, después de una resección parcial del hígado, la hiperplasia permite a este órgano recuperar su tamaño original. Por el contrario si se pierde el control de la proliferación celular, la hiperplasia celular se torna patológica y conduce a cáncer.

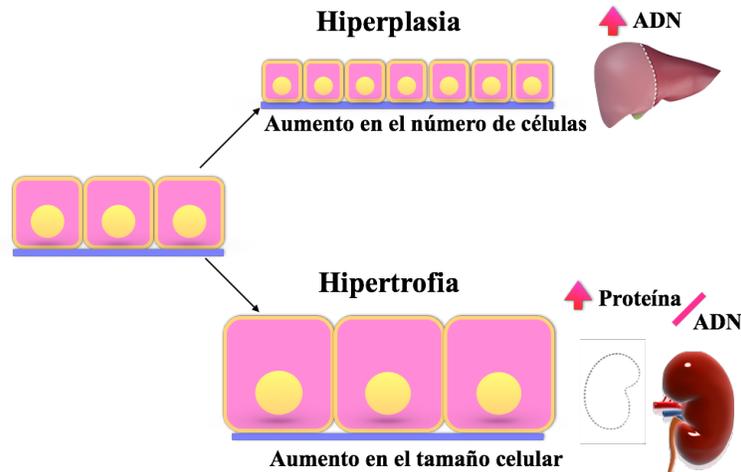
### 1.2 Hipertrofia

Hipertrofia proviene del griego ὑπέρ/hiper que como vimos es "en exceso" y τροφή/trofos que significa "alimento". La hipertrofia es un proceso donde el incremento excesivo en la masa tisular es el resultado de un aumento en el tamaño de las células, y no producto de una mayor proliferación celular, como sucede en la hiperplasia.

#### 1.2.1 Hipertrofia inducida por estímulos hormonales y estrés mecánico

El crecimiento adaptativo del útero durante el embarazo sucede en dos fases. Durante la primera mitad de la gestación, ocurre la fase proliferativa en la cual el útero aumenta de tamaño por la hiperplasia de los miocitos del miometrio. En cambio, en la segunda mitad de la gestación o fase sintética, aumenta el tamaño de las células del músculo liso. En las ratas gestantes el cociente proteína/ADN de los miocitos del miometrio incrementa durante este periodo, lo que confirma que se indujo un proceso hipertrófico [2]. La hipertrofia del miometrio se debe a la acción del estrógeno y la

progesterona sobre sus receptores [1] [3]. La interacción hormona-receptor induce un cambio conformacional que aumenta la afinidad del receptor a secuencias específicas en el ADN y le permite actuar como factor de transcripción. Esto incrementa la síntesis de proteínas y el tamaño celular. Además se comprobó que el estrés mecánico ejercido por el crecimiento del feto induce hipertrofia de los miocitos [3].



**Fig. 1. Hiperplasia vs hipertrofia.** El esquema ilustra la diferencia entre hipertrofia e hiperplasia. La hiperplasia se caracteriza por un incremento en la cantidad de ADN porque al aumentar el número de células aumenta la cantidad de núcleos y material genético. En cambio, en la hipertrofia aumenta el cociente proteína/ADN, ya que al aumentar el tamaño celular aumenta la cantidad de proteína por célula sin cambiar la cantidad de material genético.

### 1.2.2 Hipertrofia compensatoria

La hipertrofia compensatoria se presenta como respuesta a un incremento en la demanda funcional de un órgano. Por ejemplo, algunas enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, requieren que el corazón se contraiga a presiones aórticas más elevadas, lo que implica un mayor esfuerzo. Esto induce hipertrofia de las fibras musculares cardíacas y genera un corazón de mayor tamaño que tiene la fuerza de contracción requerida.

La hipertrofia compensatoria también ocurre en el ovario, en respuesta a la ovariectomía unilateral [4] y es el resultado del aumento del tamaño de las células

foliculares y del tejido lúteo [5]. Así, en la hipertrofia ovárica compensatoria (HOC) el ovario remanente compensa la pérdida de su contraparte.

En el riñón, el crecimiento del tejido renal residual, en respuesta a la pérdida de tejido renal, se denomina hipertrofia renal compensatoria (HRC) y se refleja en un incremento de la cantidad de proteínas/célula, de proteínas/ADN y por un aumento en el tamaño celular [6]. Como la mayor parte de la masa renal corresponde a los túbulos proximales, es esta sección de la nefrona la que más contribuye a la HRC [7].

La HRC se presenta en una gran variedad de condiciones, incluyendo la pérdida de la masa renal por la remoción de un riñón, proceso conocido como uninefrectomía (UNX), la destrucción de las nefronas por enfermedad, la diabetes mellitus, la acidosis metabólica crónica y la deficiencia crónica de potasio [8]. Aunque la HRC se desarrolla para restablecer la función renal, en algunos casos es excesiva y conduce a atrofia tubular, fibrosis intersticial y a una declinación progresiva de la función renal [9, 10]. Por lo tanto, es importante entender a profundidad cuáles son los factores que la modulan para tener la posibilidad de controlarla.

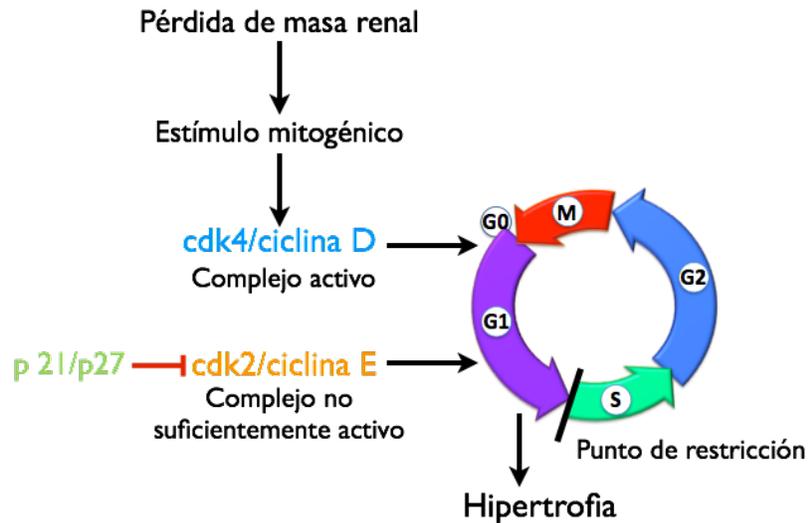
### **1.3 Mecanismos celulares que inducen hipertrofia renal**

Existen dos mecanismos que inducen hipertrofia en las células renales. El primero, depende del ciclo celular y el segundo se induce por un desbalance entre las tasas de síntesis y degradación de proteínas [11].

#### **1.3.1 Hipertrofia dependiente del ciclo celular**

La pérdida de la masa renal, activa estímulos mitogénicos como al factor de crecimiento epidérmico (EGF), que promueve la entrada a la fase G1 del ciclo celular, por activación del complejo cdk4/ciclina D. En esta fase se estimula la síntesis de proteínas. Ahora, si de manera experimental se usan agentes anti proliferativos como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [12-14] o se sobre-expresan miembros de la familia CIP/KIP como p21 y p27, que inhiben la actividad del complejo de cdk2/ciclina E, se

detiene la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S [15, 16]. En la fase temprana de G1 las células aumentan de tamaño, por ello al bloquear su paso a la fase S, las células se vuelven hipertróficas [11] (Ver figura 2).



**Fig. 2. Modelo de la hipertrofia renal dependiente del ciclo celular.** Ante la pérdida de la masa renal, los estímulos mitogénicos promueven la entrada al ciclo celular. Durante la fase G1 se activa el complejo cdk4/ciclina D y se estimula la síntesis de proteínas. Al sobre-expresar a p21 ó p27 se inhibe la activación del complejo cdk2/ciclina E por lo que se detiene la progresión del ciclo celular generando la hipertrofia.

### 1.3.2 Hipertrofia generada por un desbalance entre las tasas de síntesis y degradación de proteínas

Otra forma de generar hipertrofia es induciendo una disparidad entre las tasas de síntesis y degradación de proteínas. Experimentalmente esto se logra al exponer a las células a compuestos como el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  que al alcalinizar a las vesículas lisosomales, impiden la degradación de las proteínas [17 et al 1996]. Así, continua la síntesis de proteínas, pero disminuye la tasa de degradación, lo que incrementa el tamaño celular y conduce a la hipertrofia.

## 1.4 El ciclo celular

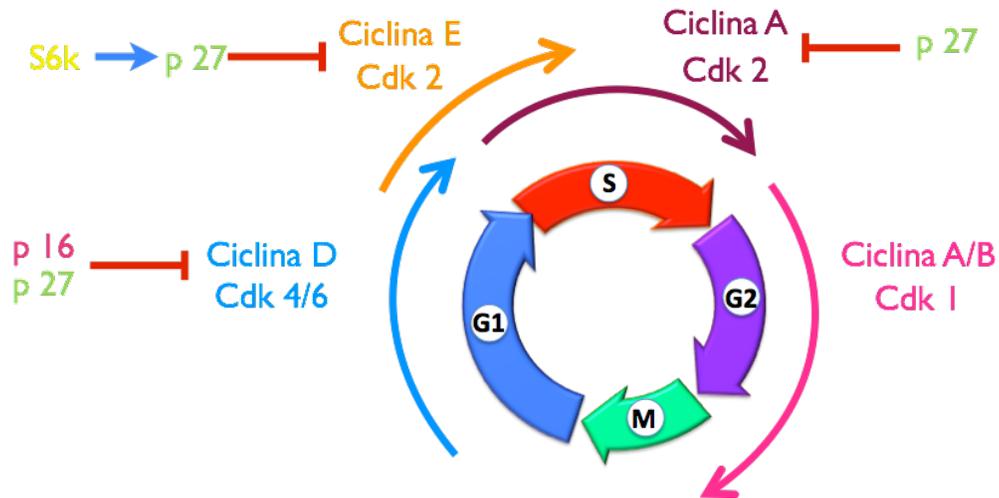
Ya que uno de los mecanismos que inducen hipertrofia renal depende del ciclo celular, detallaremos aquí en qué consiste este proceso. En las células eucariotas la división y el crecimiento se regulan mediante una secuencia de etapas ordenadas y repetitivas, denominada ciclo celular. Estas etapas son las siguientes (Figura 3):

- Fase G1. Del inglés Gap o intervalo 1. Es la fase más activa desde el punto de vista del metabolismo. En ella se sintetizan y preparan los elementos estructurales o reguladores que participarán en la síntesis de ADN y en la mitosis. Es una fase de revisión y control constante de la integridad del genoma. Dura entre 6 y 12 horas, y en este tiempo la célula duplica su tamaño y masa por la síntesis continua de proteínas.
- Fase S. En esta etapa se replica el material genético.
- Fase G2. Fase de crecimiento en la que continúa la síntesis de proteínas y el ARN y donde la célula se prepara para la división.
- Fase M. En esta etapa ocurren dos procesos importantes: la mitosis que se divide en profase, metafase, anafase, telofase; y la citocinesis donde se separa el citoplasma de las dos células en división.
- Fase G0: Las células que entran en esta fase se encuentran en un estado quiescente donde se diferencian para realizar su función específica.

### 1.4.1 Reguladores del ciclo celular

Las fases del ciclo celular se regulan por las ciclinas, unas proteínas que como su nombre lo indica se expresan de manera cíclica. Las ciclinas forman complejos con las cinasas dependientes de ciclinas (cdks). La unión de las ciclinas a las cdks activa la función de cinasas de estas últimas. Durante la fase G1 se expresa la ciclina D que al asociarse con la cdk4/6, fosforila a las proteínas inhibidoras de la ciclina E para activarla. La ciclina E se expresa en la fase G1 tardía y en complejo con cdk2 promueve la transición a la fase S y la expresión de la ciclina A. Por su parte, la ciclina A se asocia a cdk2 y cdk1 por lo que

participa tanto en la fase S como en la transición de la fase S a la fase M. La ciclina característica de la fase M es la ciclina B que al asociarse con cdk1 promueve la entrada a la mitosis (Figura 3).



**Fig. 3. El ciclo celular y sus reguladores.** En el esquema se ilustra la actividad de los complejos de cdk/ciclinas en la progresión del ciclo celular y sus inhibidores p27 y p16.

#### 1.4.2 Inhibidores de las cdk

Existen dos familias de inhibidores de las cdk que participan en la regulación del ciclo celular. La familia INK4 (del inglés Inhibitor of cdk4), conformada por p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>, p18<sup>INK4C</sup> y p19<sup>INK4D</sup> cuya función es inhibir a las cdk 4 y 6 [18]. La otra familia de inhibidores denominada KIP (del inglés, kinase inhibitor protein) está conformada por tres miembros, p21, p27<sup>kip1</sup> y p57<sup>kip2</sup> que inhiben a todas las cdk [19]. Por ejemplo, p27 se expresa en abundancia en la fase G0 y en el inicio de G1 donde se une al complejo cdk2/ciclina E y evita su activación (Figura 3).

#### 1.5 La ruta de señalización de mTOR

La vía de señalización de mTOR (del inglés mammalian target of rapamycin)

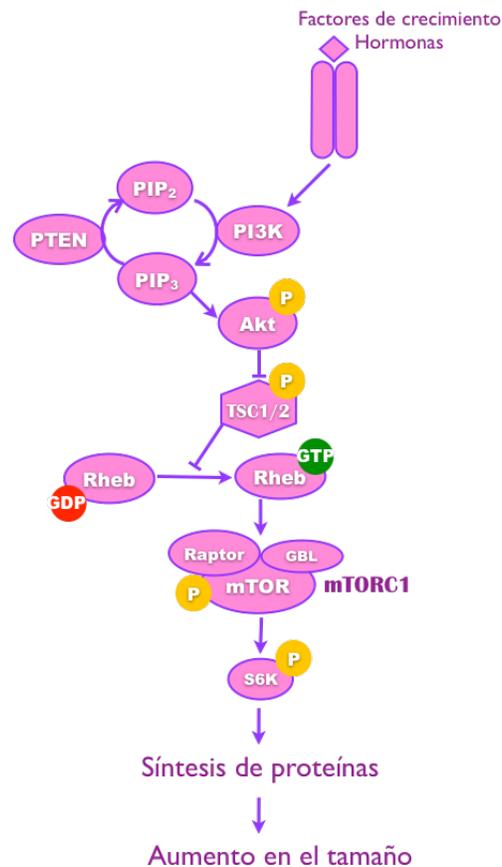
promueve el crecimiento celular al estimular la síntesis de proteínas mediante la activación de su blanco, la cinasa S6K (Figura 4). En respuesta a factores de crecimiento, hormonas, citocinas y quimiocinas, se activan receptores con actividad de cinasas de tirosinas (RTK) y receptores acoplados a proteínas G (GPCR), que río abajo, a través de diferentes mecanismos, activan a la cinasa 3 de fosfatidilinositol (PI3K). PI3K cataliza la formación del (3,4,5)-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>3</sub>) a partir del (4,5)-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>). El PIP<sub>3</sub> activa a la cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK1) que a su vez fosforila y activa a Akt, el principal regulador río arriba del complejo 1 de mTOR (mTORC1). Akt fosforila e inactiva a la proteína TSC2 del complejo de tubero-esclerosis (TSC por sus siglas en inglés). El complejo TSC1/TSC2, actúa como una GAP (del inglés, GTPase activating protein) que inactiva a Rheb (Rheb-GDP), por ello la fosforilación e inactivación del complejo TSC1/TSC2, favorece a la forma activa de Rheb (Rheb-GTP) que estimula la actividad de mTORC1. El complejo mTORC1 está integrado por mLST8/GβL (LST8/G-protein β-subunit like protein), Raptor (del inglés regulatory-associated protein of TOR) y mTOR. El complejo mTORC1 estimula la síntesis de proteínas a través de sus dos blancos principales, la cinasa de serinas y treoninas S6K y el factor de iniciación de la traducción 4E-BP1 (del inglés Ekaryotic translation initiation factor 4E-binding protein) [20].

### 1.5.1 S6K

La cinasa S6K (p70S6K), blanco efector del ruta mTOR, es una cinasa de serinas y treoninas codificada por el gen RPS6KB. S6K fosforila a la proteína ribosomal S6, que induce el reclutamiento y la traducción de ARNm con secuencia de oligo-pirimidinas en el extremo 5' (5'-TOP) [21]. Los transcritos 5'-TOP codifican para diferentes componentes de la maquinaria transcripcional facilitando así la génesis de ribosomas y con ello la síntesis de proteínas [22] [23] [21].

S6K participa en la regulación del tamaño celular. Así, en la mosca *Drosophila melanogaster* la mutación de S6K (ds6k) induce muerte en la etapa embrionaria y los

adultos sobrevivientes son más pequeños como consecuencia de una reducción en el tamaño celular y no por una disminución en el número de células. De forma correspondiente, la sobre-expresión de S6K aumenta el tamaño celular de las moscas [24]. En el ratón *Mus musculus* el noqueo de S6k provoca una disminución en el tamaño de los organismos. Además, los ratones presentan una reducción en el tamaño de las células  $\beta$ -pancreáticas [25]. En concordancia, la sobre-expresión de S6K en los islotes de Langerhans murinos provoca un incremento del 50% en el tamaño de las células  $\beta$ -pancreáticas y disminuye el número de células por islote [26].



**Fig. 4. Ruta de señalización de mTOR.** La ruta mTOR se activa por la presencia de hormonas y factores de crecimiento que a través de sus receptores activan a la PI3K que cataliza la formación de PIP<sub>3</sub> a partir de PIP<sub>2</sub>. Esto conduce a la activación de Akt que fosforila e inhibe al complejo TSC1/2. La inactivación de TSC1/2 favorece a la forma activa de Rheb (Rheb-GTP) que activa al complejo mTORC1 que mediante la activación de S6K promueve la síntesis de proteínas y el aumento del tamaño celular.

Con respecto al ciclo celular, la sobre-expresión de S6K reduce la expresión de cdk2, necesaria para la transición a la fase S del ciclo celular y provoca un aumento en la expresión de los inhibidores p27 y p16 [26]. También se ha descrito que la sobre-expresión de S6K, en fibroblastos de embriones murinos, bloquea la entrada a la fase S [27].

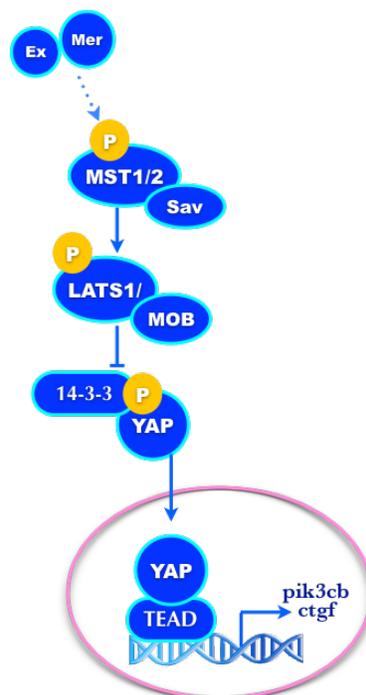
S6K es crucial para el desarrollo de la HRC ya que después de la UNX, se activa la ruta mTOR e incrementa la fosforilación de la ribonucleoproteína S6 en el riñón remanente de manera sensible a la rapamicina [28]. Como la depleción de S6K inhibe la HRC tras la UNX [29], se considera a esta cinasa como el regulador principal de la síntesis de proteínas que conduce a hipertrofia en el riñón remanente.

## 1.6 La vía de señalización Hippo

La ruta de señalización Hippo, originalmente descrita en *Drosophila*, es una vía que se ha conservado a lo largo de la evolución y que controla el tamaño de los órganos. Consta de una cascada de cinasas, co-activadores y proteínas plataforma asociadas. En los mamíferos, la cinasa MST1 (del inglés, macrophage stimulating 1/2 kinase), ortóloga de Hippo en *Drosophila*, forma un complejo con la proteína plataforma Sav1 (Salvadore homolog 1) fosforila a LATS (del inglés, large tumor supressor kinase) y a su proteína reguladora MOB1 (del inglés, Mps one binder kinase activator-like). La activación de LATS1/2, permite que esta a su vez fosforile e inactive al co-activador transcripcional YAP (del inglés, Yes associated protein 1). La fosforilación de YAP en la serina 127, la vuelve blanco de la proteína 14-3-3 que la secuestra y retiene en el citoplasma [30] [31], mientras que la fosforilación en otros residuos, convierte a YAP en blanco de degradación. Por ejemplo, la fosforilación de YAP mediada por LATS en la serina 381, la convierte en blanco de la cinasa CK1 $\delta/\epsilon$  (del inglés, casein kinase 1). Esto activa al motivo de degradación de YAP, denominado fosfodegron, e induce a la ligasa de ubiquitina SCF $\beta$ -TRCP a unirse a YAP, ubiquitinarla y marcarla para degradación [32]. Cuando la ruta Hippo se inactiva, YAP se acumula en el núcleo y al asociarse con diferentes factores de

transcripción, incluyendo a los de la familia TEAD (del inglés, TEA domain family) y Runx2 (del inglés, runt related transcription factor 2), promueve la transcripción de diversos genes [33] (ver Figura 5).

En *Drosophila*, la mutación de los componentes de la ruta Hippo aumenta el tamaño de los órganos, mientras que la expresión ectópica de estos componentes induce el fenotipo opuesto, al reducir el tamaño de los órganos a un nivel similar al reportado al mutar a Yorkie (Yki), el efector final de la ruta Hippo y ortólogo de YAP. La regulación del tamaño de los órganos a través de la ruta Hippo también se demostró en los mamíferos. Así, se encontró que al sobre-expresar a YAP en el hígado de un ratón, se incrementa cuatro veces el tamaño del órgano, mientras que al detener la sobre-expresión de YAP, el hígado regresa a su tamaño normal [31]. Por ello se concluyó que la ruta Hippo es la reguladora principal del tamaño de los órganos. Cabe aquí también mencionar que la sobre-expresión sostenida de YAP indujo la formación de tumores [34].



**Fig. 5. Ruta de señalización Hippo.** Las proteínas expanded y merlin activan río arriba a la ruta Hippo aunque se desconoce el mecanismo por el que lo hacen. La cinasa MST1/2, en asociación con la proteína plataforma Sav, fosforila a la cinasa LATS. Esta última cuando se une a la proteína reguladora MOB fosforila e inactiva a YAP. La inactivación de la ruta Hippo permite la

localización nuclear de YAP, que actúa como co-activador transcripcional y promueve la transcripción de los genes *ctgf* y *pik3cb*.

### **1.6.1 YAP y la densidad celular**

La ruta Hippo se activa en respuesta a la densidad celular, por ello, la localización de YAP depende del estado de confluencia de los cultivos. Así, en los cultivos confluentes donde la ruta Hippo está activa, YAP se fosforila y se retiene en el citoplasma por la proteína 14-3-3. De manera correspondiente, en los cultivos en proliferación, la ruta Hippo se inactiva y YAP viaja al núcleo donde activa la transcripción de genes involucrados en el crecimiento y la proliferación [30].

### **1.6.2 La ruta Hippo y su interacción con otras vías de señalización**

El desarrollo de un órgano es un proceso complejo que involucra un aumento en el tamaño y cambios en la morfogénesis. Por lo tanto, es de esperar que diferentes rutas de señalización se coordinen en el control del tamaño de los órganos.

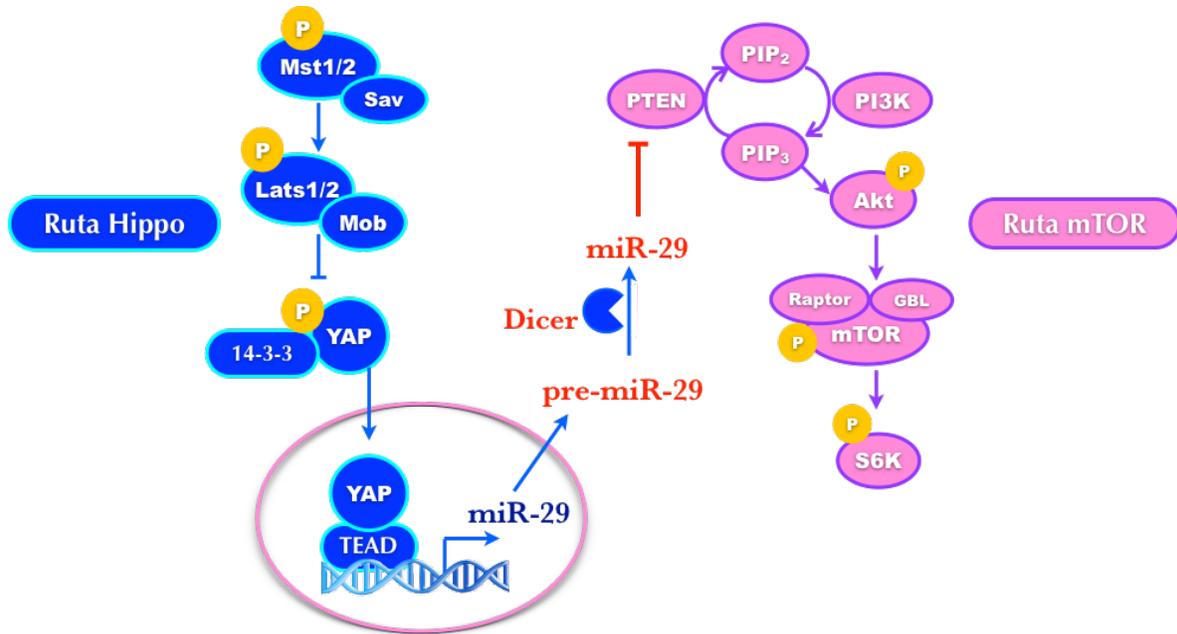
#### **1.6.2.1 Interacción entre las rutas Hippo y mTOR**

El tamaño celular se regula por la interacción entre las vías de señalización Hippo y mTOR [35]. La inactivación de la ruta Hippo induce la acumulación nuclear de YAP. Esto induce la expresión del miR-29, un microARN que inhibe la traducción de PTEN (del inglés, *phosphatase and tensin homologue*). Esta fosfatasa transforma el  $PIP_3$  en  $PIP_2$ , reduciendo así la activación de Akt, que activa a su vez a mTOR [36, 37] (Figura 6).

#### **1.6.2.2 Interacción entre la ruta Hippo y PI3K/PDK1**

Al tratar con EGF a las células mamarias immortalizadas, YAP se transloca al núcleo. Esto ocurre porque el EGF activa a la cinasa PI3K que a su vez fosforila a PDK1. Esta

última se asocia con la proteína adaptadora Sav1 de la ruta Hippo, evitando la activación de LATS y la subsecuente cascada de fosforilación de la ruta Hippo. Esto se traduce en la localización nuclear de YAP y la activación de su gen blanco canónico CTGF [38]. Por otra parte, se encontró que el gen *pik3cb*, que codifica para la subunidad catalítica p110 de la PI3K, es un blanco transcripcional directo de YAP [39].



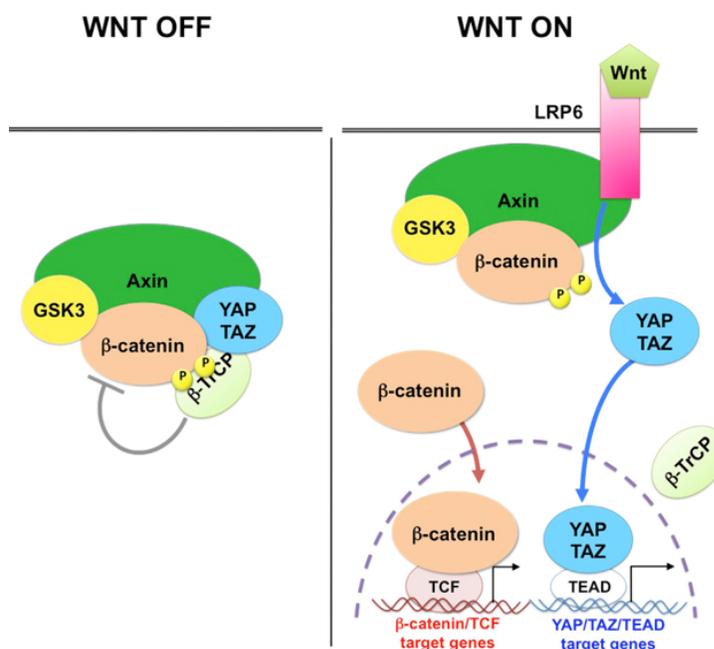
**Fig. 6. Las rutas de señalización Hippo y mTOR se comunican mediante el miRNA-29.** YAP, el efector final de la ruta Hippo, regula la expresión genética. Entre sus blancos está el miRNA-29, que inhibe la traducción de PTEN. La disminución de PTEN favorece la acumulación de PIP<sub>3</sub> y la activación de la ruta Akt/mTOR.

### 1.6.2.3 Interacción entre las ruta Hippo y Wnt

La ruta Wnt juega un papel importante en desarrollo tisular, pero la activación aberrante de la vía Wnt se relaciona con la formación de diversos cánceres, en particular, aquellos del tracto digestivo [40]. La estimulación de los receptores en la superficie celular por el ligando Wnt, causa el desensamble del complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina, conformado por axina, APC, GSK, CK1 $\alpha$  y  $\beta$ -catenina. Por lo tanto la  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma, viaja al núcleo y en asociación con el factor de transcripción

TCF/LEF activa la transcripción de diversos genes involucrados en la transición de epitelio a mesénquima. YAP y su parálogo TAZ son también componentes integrales del complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina, ya que funcionan como plataforma para reclutar a la ligasa de ubiquitina  $\beta$ -TrCP e inactivar a la  $\beta$ -catenina. De manera correspondiente, cuando la ruta Wnt está activa, YAP y TAZ se disocian del complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina y viajan al núcleo donde, al igual que la  $\beta$ -catenina, actúan como co-activadores transcripcionales [41] (Figura 7).

También se describió que la proteína APC (del inglés, adenomatous polyposis coli), que sirve como plataforma del complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina [42], facilita las fosforilaciones en cascada de la ruta Hippo, al favorecer la interacción entre la cinasa LATS y la proteína adaptadora Sav1. Esto explica porque en los adenomas intestinales deficientes de APC, YAP está activa y juega un papel crítico en el desarrollo de los tumores [43].



**Fig. 7. YAP es parte del complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina.** En el esquema se ilustra el papel de YAP como componente del complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina. Cuando la ruta Wnt se inactiva (WNT OFF), YAP sirve de plataforma para anclar a la ligasa de ubiquitina  $\beta$ -TrCP al complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina. Al activarse la ruta Wnt (WNT ON), YAP se libera

del complejo y al igual que la  $\beta$ -catenina viaja al núcleo donde actúa como co-activador transcripcional [Imagen tomada de (Azzolin L, et. al. 2014)].

### **1.6.3 La ruta Hippo y el desarrollo de cáncer**

La ruta Hippo no sólo regula el tamaño de los órganos si no también participa en el desarrollo del cáncer. Esto se debe probablemente a su papel en la regulación de la proliferación celular y en la apoptosis. La inactivación de la ruta Hippo es un fenómeno que se observa en una gran diversidad de carcinomas humanos, incluyendo el pulmonar, colorectal, de mama, ovario, páncreas, estómago e hígado [44-49]. Hoy se considera a YAP como una oncoproteína y en el cáncer de colón, hígado, pulmón, ovario y próstata el gen de YAP se amplifica y la proteína se sobre-expresa y localiza en el núcleo [48, 50-52]. Además, la sobre-expresión de YAP en la línea mamaria MCF10A induce proliferación celular y transformación oncogénica [50]. La expresión de YAP también se asocia con un mal pronóstico en el cáncer cervical. Al respecto, la expresión de YAP en el núcleo, favorece la transcripción del  $TGF\alpha$  y la amfiregulina, ligandos similares al EGF que activan al EGFR. Esto bloquea la fosforilación de LATS y MOB1, inhibe a la ruta Hippo y activa a YAP. Adicionalmente la expresión de la proteína E6 del papilomavirus humano (HPV, por sus siglas en inglés), la principal molécula etiológica del cáncer cervical, estabiliza a YAP, al evitar que se degrade en el proteosoma, favoreciendo así la progresión del cáncer cervical [53].

## **1.7 Los epitelios**

Los epitelios son los tejidos que recubren la superficie corporal y revisten los ductos y cavidades del organismo. Constituyen el límite entre los organismos y el medio que les rodea. Los epitelios son tejidos conformados por células poligonales polarizadas que presentan una distribución asimétrica de lípidos y proteínas entre los dominios apical y baso-lateral de la membrana plasmática. Funcionan como una barrera que permite el transporte vectorial de iones y moléculas, lo que permite regular la homeostasis de los

fluidos corporales. El intercambio de sustancias a través de los epitelios ocurre por dos rutas: 1) la transcelular, donde el transporte es mediante acarreadores, bombas, canales o transportadores específicos; y 2) la ruta paracelular, donde el tránsito se da a través del espacio entre dos células adyacentes y se regula por la unión estrecha (UE).

## **1.8 La unión estrecha**

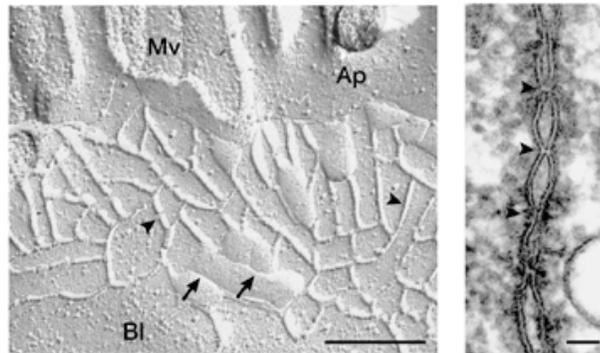
### **1.8.1 Estructura de la UE**

La UE, es un complejo de adhesión célula-célula que se localiza en el límite entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática en las células epiteliales. Por microscopía electrónica de transmisión en cortes ultra-finos, la UE se aprecia como puntos de contacto o “besos” donde las membranas de dos células adyacentes parecen fusionarse, obliterando por completo el espacio intercelular [54].

Empleando la técnica de criofractura, la UE se observa como una red que rodea a las células por debajo de las microvellosidades, constituida por filamentos que se entrecruzan en la cara protoplásmica (P) y por surcos complementarios en la cara exoplásmica (E) de la membrana plasmática [55] [56] [57] [58] (ver Figura 8).

### **1.8.2 Función de la UE**

Las funciones canónicas de la UE son: 1) establecer una compuerta que regula, por tamaño y carga, el tránsito de iones y moléculas a través de la ruta paracelular [59] [60] y 2) mantener la polaridad celular al actuar como una cerca que bloquea la libre difusión de lípidos y proteínas en el plano de la membrana, entre los dominios apical y basolateral [61].



**Fig. 8. Estructura de la UE.** A) Crio fractura de células epiteliales intestinales de ratón. La UE se observa como una red de filamentos que se anastomosan. Las puntas de flecha señalan la cara protoplásmica (P) y las flechas muestran la cara exoplásmica (E). Barra 200 nm. B) Vista de la UE en corte fino. En los sitios de contacto, la UE (cabezas de flecha) oblitera el espacio entre las membranas plasmáticas de las células adyacentes. Barra 50 nm. [Imagen modificada de (Tsukita S, et. al. 2001)]

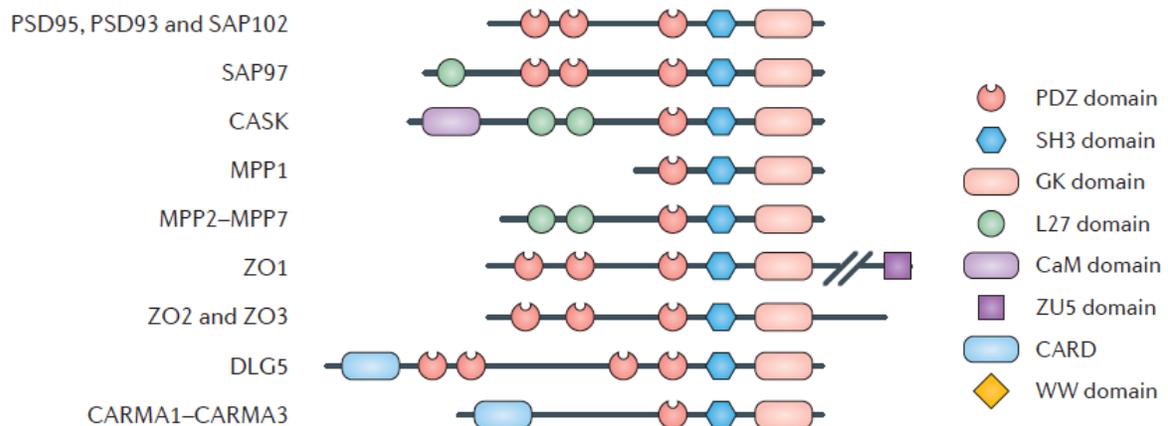
### 1.8.3 Composición de la UE

Las UE están compuestas por un grupo de proteínas integrales que incluye a proteínas que atraviesan una sola vez la membrana y son miembros de la súper-familia de las inmunoglobulinas como las proteínas JAM-A/-B/-C (del inglés, Junctional adhesion molecule) [62-64], la proteína CAR (del inglés, coxsackievirus and adenovirus receptor) [65, 66] y las angulinas 1, 2 y 3 [67]. Además están las proteínas que atraviesan cuatro veces la membrana como las claudinas y las TAMPs (del inglés, TJ associated Marvel proteins). Este último grupo de proteínas que incluye a la ocludina [68], la tricelulina [69] y marvel D3 [70], presenta un dominio MARVEL (del inglés, MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link) compuesto por cuatro pasos transmembranales que esta presente en proteínas que se asocian a microdominios especializados de membrana ricos en colesterol y que regulan la aposición de membranas y la biogénesis de vesículas.

Las proteínas integrales de la UE, que median la adhesión célula-célula, se asocian, a través de sus dominios citoplásmicos, con proteínas citoplásmicas que sirven de puente entre la UE y el citoesqueleto de actina [71].

### 1.9 Proteínas MAGUK

Las proteínas MAGUK (del inglés, membrane asociated guanilate kinase homologues) constituyen una familia que funciona como plataforma para la formación de complejos multiproteicos en las UE y sinápticas de los vertebrados y en las uniones septadas de los bilateria [72, 73]. Las proteínas MAGUK, contienen los siguientes dominios de interacción proteína-proteína: a) PDZ, llamados así por las iniciales de las proteínas en que fueron inicialmente descubiertos: Postsynaptic density 95, Disc large y Zonula occludens 1; b) SH3 del inglés Src Homology 3 y c) GK, dominio homólogo a las cinasas de guanilato (ver Figura 9). Los genes que codifican a las proteínas MAGUK dan origen a varias isoformas mediante procesamiento alternativo [72].



**Fig. 9. Miembros de la familia MAGUK.** Todos los miembros de la familia MAGUK presentan dominios PDZ-SH3-GK (PSG). Este módulo PSG permite la interacción de las MAGUK con sus proteínas blanco. [Imagen modificada de (Zhu J, et. al. 2016)]

Dentro de la familia de las proteínas MAGUK se encuentra la subfamilia ZO del latín *Zonula occludens*, que significa zona que ocluye. La subfamilia ZO, está compuesta por las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3 cuyo número corresponde al orden en que fueron descubiertas. Las proteínas ZO constituyen la plataforma fundamental de las UE y esta tesis se basa en el estudio de la proteína ZO-2.

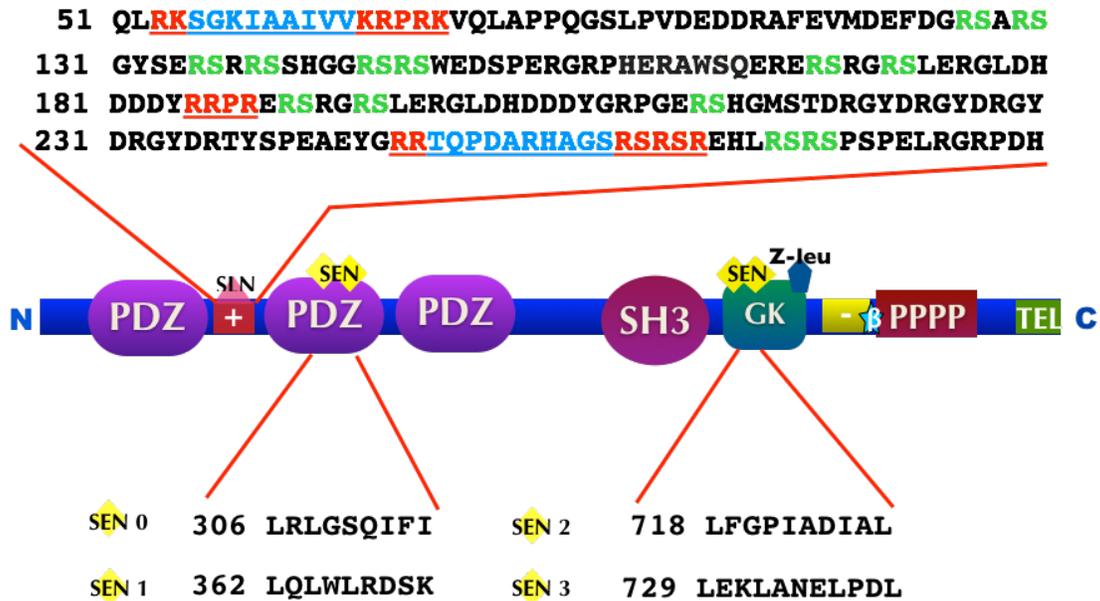


Fig. 10. Estructura modular de ZO-2. El esquema representa los dominios de ZO-2: 3 dominios PDZ seguidos del módulo SH3 y del dominio GK. Las regiones básica y ácida se representan con un (+) y un (-) respectivamente. Hacia el extremo carboxilo (C), se observa la región rica en residuos de prolina (PPPP) y el sitio de procesamiento alternativo ( $\beta$ ). Entre los PDZ 1 y 2 se encuentra la región que contiene las señales de localización nuclear (SLN) y en los dominios PDZ 2 y GK se localiza las señales de exportación nuclear (SEN). ZO-2 presenta también un motivo de dimerización del tipo cremallera de leucina (Z-leu) y un motivo TEL de unión a dominios PDZ.

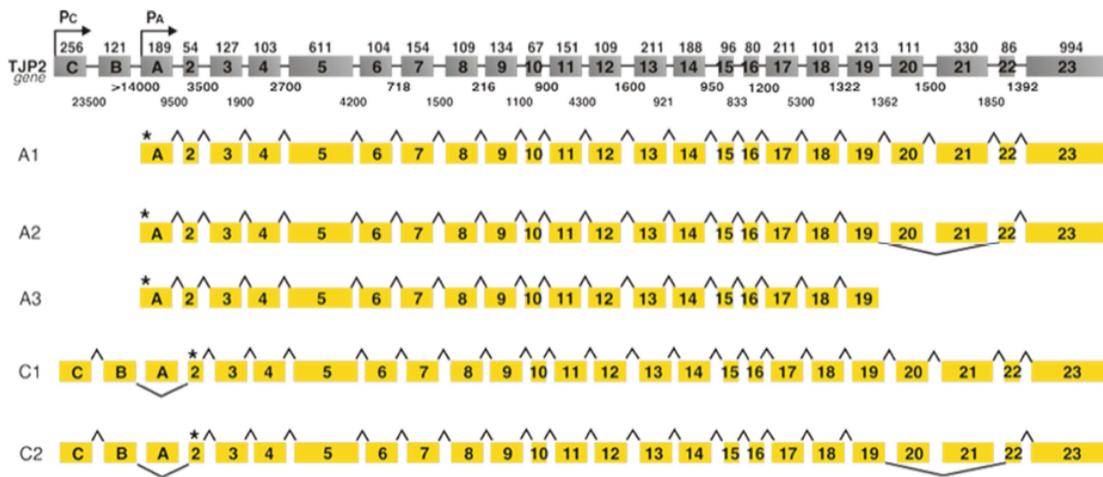
## 1.10 ZO-2

### 1.10.1 Estructura de ZO-2

ZO-2 es una proteína de 160 KDa que se identificó por primera vez en 1991 por Gumbiner porque co-inmunoprecipita con ZO-1 [74]. ZO-2 tiene tres dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio GK. En la región carboxilo, ZO-2 tiene una región acídica seguida de una zona rica en residuos de prolina que en conjunto forman el segmento AP.

Además en el extremo carboxilo terminal, ZO-2 posee un motivo TEL de unión a dominios PDZ [75]. ZO-2 cuenta también con un motivo de dimerización de tipo cremallera de leucinas y una región de procesamiento alternativo denominada motivo  $\beta$  [76]. Entre los dominios PDZ 1 y PDZ 2, ZO-2 tiene una región básica con 16 repetidos de serina y arginina (SR), así como dos señales de localización nucleares (SLN) bipartitas y otra monopartita. ZO-2 tiene también cuatro señales de exportación nuclear (SEN), dos localizadas en el segundo dominio PDZ y las dos restantes en el dominio GK [77-80] (ver Figura 10).

El gen de ZO-2 (*TJP2*) se presenta como copia única y contiene 25 exones. Se conocen cinco isoformas de ZO-2: la isoforma A1 que carece de los exones C y B; la A2 sin los exones C,B, 20 y 21; la A3 que carece de los exones C, B, 20, 21 y 23; la C1 que no tiene el exón A y la C2 sin los exones A, 20 y 21 (Figura 11). A nivel de ARNm, las isoformas A se expresan de forma abundante en el corazón y el cerebro, mientras que las isoformas C se expresan intensamente en el riñón, el páncreas, el corazón y la placenta.



**Fig. 11 Procesamiento alternativo de ZO-2.** Diagrama de los 25 exones del gen *TJP2* y las 5 isoformas de ZO-2 que se generan por procesamiento alternativo. El \* representa la posición del codón de inicio [Imagen modificada de (González-Mariscal L, et. al. 2010)].

### 1.10.2 Las interacciones de ZO-2

ZO-2 se asocia a través de su primer dominio PDZ con las claudinas [81], con la proteína de unión a ADN SAF-B [82], con el co-activador transcripcional YAP [83] y su parólogo TAZ [84] y con la conexina 36 [85]. Con el segundo dominio PDZ, ZO-2 se une a ZO-1 [86], al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) [87] y a la conexina 43 [88]. Con su tercer dominio PDZ, ZO-2 se asocia a la proteína de los moteados nucleares ZASP [89]. En el segmento ácido y rico en prolinas (AP), ZO-2 interactúa con lamina B1 [80] y con los factores de transcripción Jun, Fos y C/EBP. La región rica en prolinas de ZO-2 se asocia con el citoesqueleto de actina y la proteína 4.1 [90]. Con la región amino terminal y la porción media, ZO-2 se une a  $\alpha$ -catenina y ocludina [91], a las conexinas 30 y 32 [92] y a la miosina 2. ZO-2 interactúa también con la proteína adaptadora cingulina [93], las enzimas PKC [78, 94] y Src [95], así como con la proteína supresora de tumores hScrib [96] (ver Figura 12).

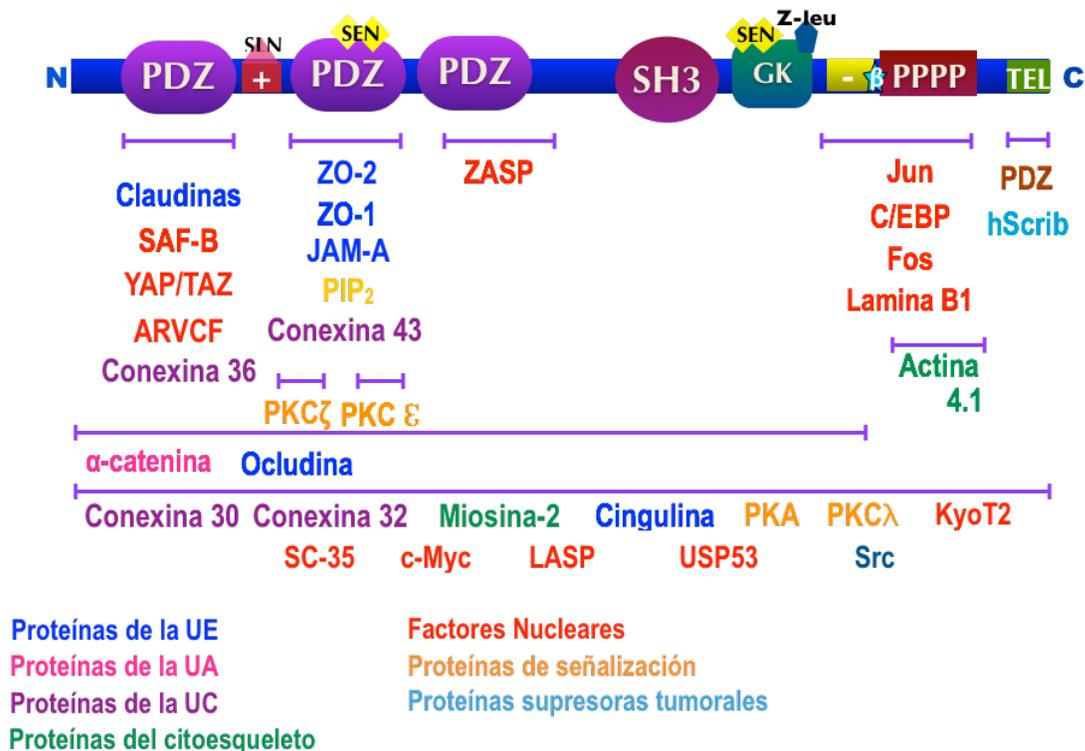
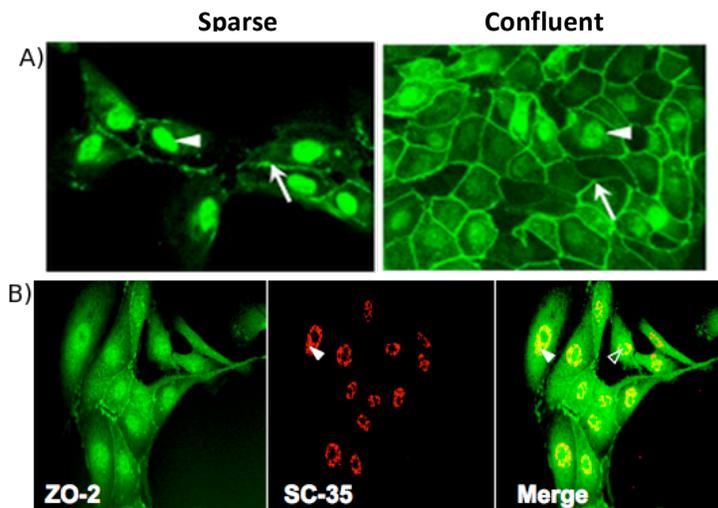


Fig. 12. Interacción de ZO-2 con diversas proteínas. El esquema ilustra las interacciones de diversas proteínas con ZO-2. En términos generales, la porción amino de la molécula se asocia

con proteínas de los contactos célula-célula, mientras que el segmento carboxilo se une a proteínas del citoesqueleto. ZO-2 también interactúa con factores de transcripción y moléculas de señalización.

### 1.10.3 Localización de ZO-2

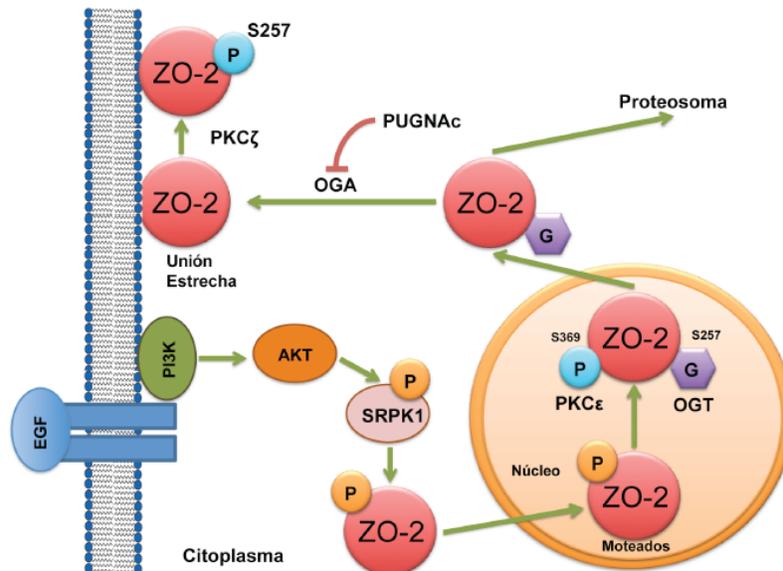
ZO-2 se localiza en las UE de los epitelios y endotelios y en las uniones adherentes (UA) de las células no epiteliales como los fibroblastos y las células del músculo cardíaco [91]. Las SLN y SEN de ZO-2 permiten a la proteína tener una localización dual (Figura 13). En los cultivos confluentes ZO-2 se localiza en los bordes celulares en la región de la UE, mientras que en los cultivos en proliferación, además de estar en la UE, ZO-2 se localiza el núcleo con un patrón de moteados donde co-localiza con la proteína de procesamiento del ARN mensajero SC-35 [97].



**Fig. 13. Localización sub-celular de ZO-2.** A) ZO-2 está presente conspicuamente en el núcleo de los cultivos epiteliales en proliferación. En los cultivos confluentes ZO-2 se observa principalmente en el borde celular. Las flechas indican a ZO-2 en el borde celular y las cabezas de flecha a ZO-2 en el núcleo. B) ZO-2 (verde) co-localiza en el núcleo con el factor de procesamiento alternativo SC-35 (rojo). En la imagen de sobre-posición se aprecian moteados amarillos (cabeza de flecha llena) donde ZO-2 y SC-35 co-localizan, también se aprecian agregados de ZO-2 que no co-localizan con SC-35 (cabeza de flecha vacía), lo que sugiere una co-localización parcial entre ZO-2 y SC-35. [Imagen tomada de (Islas S, et. al. 2002)].

#### 1.10.4 Tránsito de ZO-2

El tránsito intracelular de ZO-2 se regula por modificaciones post-traduccionales (Figura 14). La unión del EGF a su receptor, el EGFR, activa a través de la vía PI3K/Akt a la cinasa de los repetidos SR (SRPK por sus siglas en inglés) que fosforila a ZO-2 en los repetidos SR. Esta fosforilación, induce la entrada de ZO-2 al núcleo y su acumulación en los moteados nucleares. La exportación nuclear de ZO-2, depende de la activación de las SEN-1 por la fosforilación de la S369 por la PKC $\epsilon$ . Además se requiere que la transferasa de N-acetil- $\beta$ -glucosamina (OGT por sus siglas en inglés) O-N-acetil-glucosile a la S257 e inactive así a la SLNb2 de ZO-2. En el citoplasma, la hidrolasa de N-acetil- $\beta$ -glucosamina (OGA) des-glucosila la S257 de ZO-2 evitando así la degradación de la proteína. Finalmente, en la membrana plasmática la cinasa PKC $\zeta$  fosforila a ZO-2 en el residuo de S257. Este paso es crucial para que las UE maduren y se desarrolle correctamente la citoarquitectura epitelial [98].



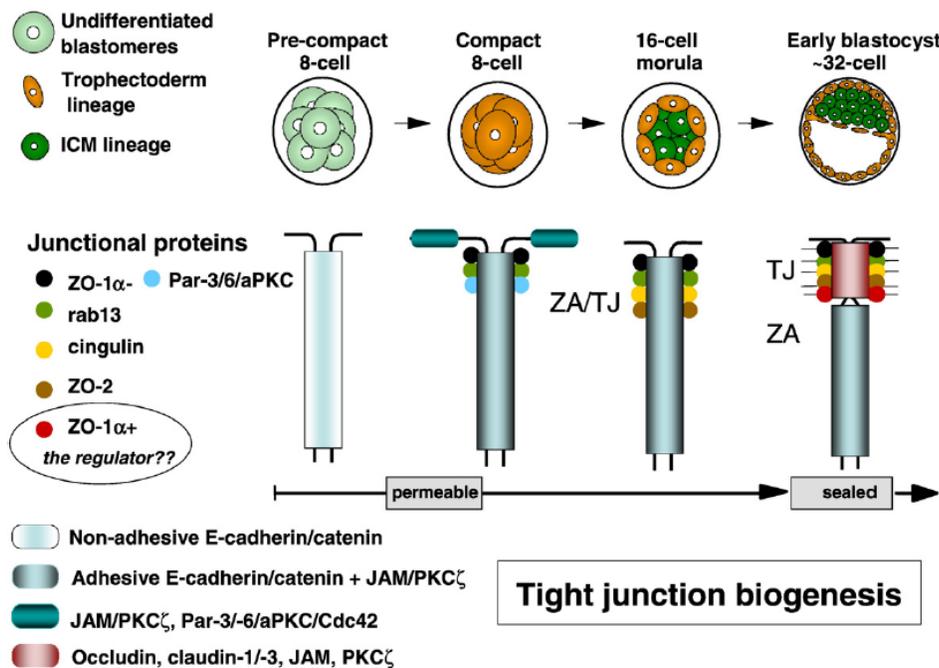
**Fig. 14. Esquema del tráfico intracelular de ZO-2.** En los cultivos subconfluentes, el tratamiento con EGF activa a Akt que induce la autofosforilación y activación de la cinasa de los repetidos SR (SRPK1). La SRPK1 fosforila a los residuos de serina presentes en los motivos SR de ZO-2 provocando la importación de la proteína al núcleo y su acumulación en los moteados nucleares. La fosforilación de ZO-2 en la S369 localizada dentro de la SEN-1, por PKC $\epsilon$  y la O-GlcNAc de la S257 ubicada dentro de la SLNb2, inducen la exportación nuclear de la proteína. La

estabilización de la OGlcNA con PUGNAc provoca la degradación de la proteína en el proteosoma. A la UE llega una forma no O-GlcNAc de ZO-2 que se fosforila en la S257 por PKC $\zeta$  a medida que la UE madura [Imagen tomada de (Quirós M, et. al. 2013)].

### 1.10.5 Función de ZO-2

#### 1.10.5.1 ZO-2 es crucial para el desarrollo del tejido extraembrionario

Durante el desarrollo embrionario murino, ZO-2 aparece por primera vez en la etapa de 16 células en los sitios de contacto apicolateral entre los blastómeros. Esto es después de la aparición de ZO-1 $\alpha$ -, rab13 y del complejo Par3/Par6/aPKC que aparecen durante la compactación, en la etapa de 8 células. En el estadio de 16 células, ZO-2 co-localiza con la E-cadherina en un complejo de unión que contiene tanto a proteínas de la UA como de la UE. En la etapa de 32 células estos complejos se separan formando dos estructuras distintas, la UE y la UA [99]. (Ver figura 15)



**Fig. 15. ZO-2 en el desarrollo embrionario.** Esquema de la formación de la UE en los blastómeros murinos en los estadios de 8 a 32 células. En la parte superior se esquematiza la etapa del embrión y en la parte inferior se ilustra la región apico-lateral entre dos células adyacentes donde se observa como cambia el complejo de proteínas hasta la maduración y separación de la UE y la UA. ZO-2 aparece en la etapa de 16 células, durante el desarrollo del embrión [Imagen tomada de (Eckert and Fleming. 2008)].

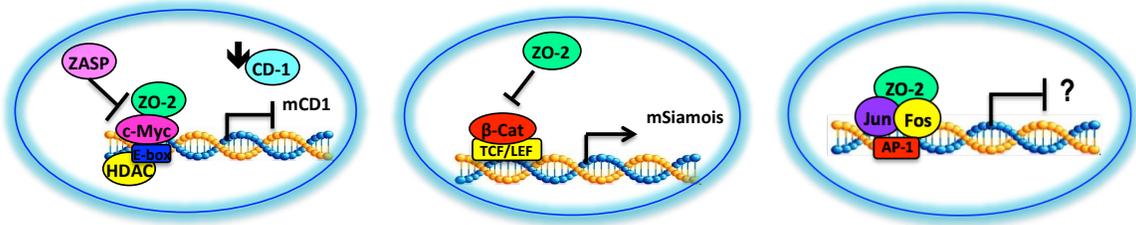
Para estudiar el papel de ZO-2 durante el desarrollo embrionario se anuló la expresión de ZO-2 en los embriones murinos y se observó que estos mueren entre los días embrionarios E 6.5 y E 8.5 debido a que disminuye la proliferación celular y aumenta la apoptosis [100]. Con el fin de discernir si la presencia de ZO-2 es crítica para el desarrollo del embrión o la formación de la placenta, Xu y colaboradores crearon ratones quiméricos al remplazar, en blastocitos silvestres, a las células de la masa celular interna (MCI) con células que no expresaban a ZO-2. Como las quimeras resultaron viables, nacieron y llegaron a la vida adulta, se concluyó que ZO-2 no era indispensable para el desarrollo del embrión *per sé* pero que si era fundamental para la formación del tejido extraembrionario [101].

#### **1.10.5.2 ZO-2 sella la barrera hemato-testicular**

Aunque las quimeras de ZO-2, descritas previamente, fueron viables, se observó que en los machos la fertilidad disminuye porque presentan una barrera hemato-testicular (BHT) permeable [101]. Esto indica que ZO-2 es crítica para la formación de la BHT.

#### **1.10.5.3 ZO-2 inhibe la transcripción genética**

Se dice que ZO-2 es un inhibidor transcripcional porque su sobre-expresión inhibe en las células epiteliales la transcripción del gen de la ciclina D1 (CD1) mediada por el factor de transcripción c-Myc [102]. ZO-2 también inhibe la transcripción de genes blanco de la ruta WNT, regulados por la  $\beta$ -catenina como axina y siamois [103], y de genes reporteros controlados por promotores artificiales con sitios de unión a AP-1 [104] (Figura 16).



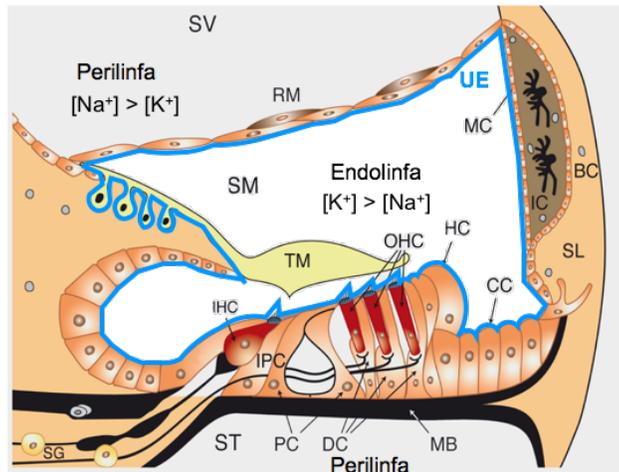
**Fig. 16. ZO-2 inhibe la transcripción** . A) ZO-2 junto con el factor de transcripción c-Myc y la enzima desacetilasa de histonas 1 (HDAC) se asocia a la caja E del promotor de la CD1 e inhibe su transcripción. B) La sobreexpresión de ZO-2 inhibe la transcripción de Siamois mediada por la  $\beta$ -catenina e inducida por la ruta Wnt. C) ZO-2 inhibe la actividad transcripcional de genes reporteros regulados por promotores artificiales con sitios AP-1 [Imagen modificada de (González-Mariscal L, et. al. 2014)]

#### 1.10.5.4 ZO-2 es necesaria para la polimerización de las claudinas

ZO-2, junto con su paróloga ZO-1, es esencial para la polimerización de las claudinas en filamentos de la UE. Esto se demostró en las células epiteliales Eph4 que no expresan a ZO-3, al anular la expresión de ZO-1 y silenciar a ZO-2 mediante siRNAs. Como al re-expresar a ZO-1 ó a ZO-2 se recuperó la formación de filamentos de la UE [105], se concluyó que ZO-1 y ZO-2 son redundantes en su papel de plataforma para la polimerización de las claudinas.

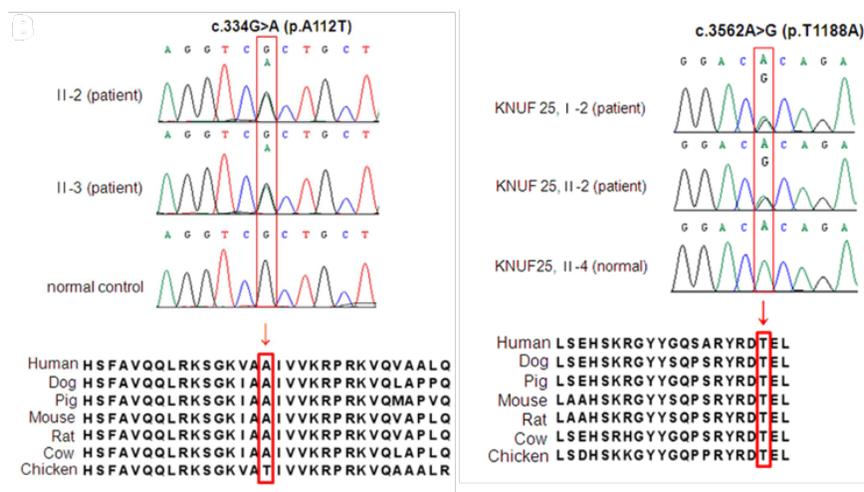
#### 1.10.5.5 ZO-2 es fundamental en el oído

En humanos, la duplicación del gen *TJP2* que codifica para ZO-2 causa sordera no síndrómica autosómica dominante (ADNSHL, por sus siglas en inglés). La sobre-expresión de ZO-2 disminuye la fosforilación inhibitoria de GSK-3 $\beta$  y aumenta la expresión de genes que promueven la apoptosis. Esto aumenta la apoptosis de las células ciliadas del órgano de Corti y ocasiona la sordera [106] (ver Figura 17).



**Fig. 17. Las UE del oído interno.** En el oído interno, las UE mantienen la compartimentación entre las escalas media (SM), timpánica (ST) y vestibular (SV) de la cóclea separando a la endolinfia, que es un líquido con alta concentración de potasio, de la perilinfia, un líquido con una alta concentración de sodio. El mantener separados a estos compartimentos es esencial para el funcionamiento adecuado del órgano de Corti. La línea azul representa la barrera que forman las UE del órgano de Corti para separar la endolinfia de la perilinfia. BC, células del borde; BsC, células basales; BM, membrana basilar; CC, células de Claudius; DC, células de Deiter; HC, células de Hensen; IC, células intermedias; IDC, células interdientales, IHC, células pilosas internas; IPC, células falángicas internas; IS, sáculo interno; Li, espiral límbico; MC, células marginales; OHC, células pilosas externas; PC, células pilares; RM, membrana de Reissner; SL, ligamento espiral; TM, membrana tectorial [Imagen modificada de (Kim MA, et. al. 2014)]

ZO-2 es una proteína crítica en las UE del órgano de Corti . Así, las mutaciones puntuales en el gen *TJP2* que provocan el cambio de la alanina 112 por una treonina (A112T) en el dominio PDZ1 o de la treonina 1188 por alanina (T1188A) en el motivo TEL (ver Figura 18), impiden que la proteína ZO-2 actúe como proteína plataforma y por lo tanto comprometen a las UE de las células del órgano de Corti, ocasionando sordera [107].



**Fig. 18. Mutaciones en ZO-2 que causan sordera.** En el panel superior se aprecia un segmento de la secuencia del gen *TJP2* de los pacientes con sordera. El rectángulo rojo marca la mutación puntual. En el panel inferior se observa la secuencia en aminoácidos de ZO-2 en diferentes especies. La flecha indica el cambio de aminoácido que aparece como resultado de la mutación puntual que provoca la sordera. [Imagen modificada de (Kim MA, et. al. 2014)]

#### 1.10.5.6 ZO-2 es crucial en el sellado de las UE de los hepatocitos

La hipercolanemia familiar, se caracteriza por una alta concentración de ácidos biliares en el suero, prurito y malabsorción de grasas. Esta enfermedad se asocia a la mutación de ZO-2, en la valina 48 por alanina (V48A). Esta mutación induce un cambio conformacional en el dominio PDZ-1 de ZO-2 que reduce su capacidad de unión a las claudinas 1, 2, 3, 5 y 7. En consecuencia, las UE de los hepatocitos se vuelven permeables lo que provoca la fuga de los ácidos biliares hacia el plasma. Sin embargo, es importante destacar que la manifestación clínica de la enfermedad requiere también de una mutación en la transferasa de aminoácidos BAAT, una enzima hepática que conjuga a los ácidos biliares [108].

Asimismo, las mutaciones en *TJP2* que impiden la expresión de la proteína inducen colestasis progresiva y cáncer hepático en la infancia. La deslocalización de las claudinas inducida por la ausencia de ZO-2, vuelve permeable a las UE del hígado y

produce el desarrollo de la enfermedad [109] [110]. Como la mutación de ZO-2 está presente no sólo en los hepatocitos sino en todos los epitelios, en los diversos órganos del cuerpo, podemos deducir que la presencia de ZO-2 es crítica en el hígado y que en los otros órgano alguna otra proteína, que tal vez sea ZO-1 o ZO-3, cubre la función de ZO-2 .

#### **1.10.5.7 ZO-2 y el tamaño celular**

Nosotros observamos que en la línea epitelial MDCK, derivada de riñón de perro, al silenciar la expresión de ZO-2 mediante la transfección estable de un shRNA, aumenta el tamaño de las células. Esta observación fue la base de esta tesis y nos impulsó a explorar los mecanismos que inducen hipertrofia por la ausencia de ZO-2.

## II. Objetivo

Identificar el mecanismo que induce el aumento del tamaño celular en ausencia de ZO-2.

## III. Hipótesis

La ausencia de ZO-2 altera a los mecanismos que regulan el tamaño celular: el ciclo celular y las rutas de señalización Hippo y mTOR.

## IV. Material y métodos

### 4.1 Cultivo celular

Las células MDCK, parentales y ZO-2 KD, donadas generosamente por el Dr. Alan Fanning (Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, NC), se cultivaron como se describió previamente [111]. Brevemente, las células se incubaron en medio DMEM bajo en glucosa (Gibco, Invitrogen, No. Cat. 31600-083, Carlsbad, CA) complementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen, No. Cat. 12483-020, Carlsbad, CA), 1% de una solución de penicilina/estreptomicina (InVitro S.A. No. Cat. 090442, CDMX, México) y 1% de insulina. Las tres clonas empleadas en este trabajo: IC5, IC6 y 2D1, expresan establemente a una mezcla de tres diferentes shRNA específicos contra ZO-2 en el vector pSuper. En cambio, las células parentales sólo contaron con el vector vacío. Las clonas estables de las células MDCK ZO-2 KD se seleccionaron con base en la resistencia al antibiótico Zeocina. La construcción pSuper shRNA, que se utilizó para generar a las células ZO-2 KD, se describió previamente [112]. Para revertir el fenotipo generado por la ausencia de ZO-2, las células ZO-2 KD se transfectaron con una construcción de ZO-2 humana que tiene mutados a los sitios de unión de los shRNA contra ZO-2. Esta construcción resistente a la degradación por los shRNA fue generosamente donada por el Dr. Alan Fanning.

## 4.2 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia de las células MDCK se realizó de acuerdo a los métodos estándar previamente descritos [98]. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: un anticuerpo monoclonal hecho en rata contra ZO-1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Cat. R26.4C, Iowa City, IA), y anticuerpos policlonales hechos en conejo contra ZO-2 (Invitrogen, Cat. 711400, dilución 1:100, Carlsbad, CA) y YAP (generosamente donado por el Dr. Marius Sudol del Instituto de Mecano-Biología de la Universidad Nacional de Singapur). Como anticuerpos secundarios se emplearon: un anti-IgG de rata policlonal hecho en burro acoplado a Alexa-Fluor 594 (Life Technologies, Cat. A21209, dilución 1:300 Eugene, OR) y un anti-IgG de conejo policlonal hecho en cabra acoplado a Alexa-Fluor 488 (Life Technologies, Cat. A11008, dilución 1:300, Eugene, OR). En los cortes congelados de riñón, extraídos de ratas control y ratas uninefrectomizadas de 11 semanas de edad, la inmunofluorescencia se realizó como se describió previamente [113], con los anticuerpos policlonales hechos en conejo contra ZO-2 y con los anticuerpo monoclonales hechos en ratón anti Dpp IV (Serotec, Cat. MCA924; dilución 1:50, North Carolina, NC) y anti  $\beta$ -Catenina (Invitrogen, Cat. 13-8400, dilución 1:100, Carlsbad, CA). Como anticuerpos secundarios se utilizaron: un anti-IgG de conejo policlonal hecho en burro acoplado a Alexa-Fluor 488 (Life Technologies, Cat. A21206, dilución 1:100, Eugene, OR) y un anti-IgG de ratón policlonal hecho en burro acoplado a Alexa-Fluor 594 (Life Technologies, Cat. A21203, dilución 1:100, Eugene, OR).

## 4.3 Determinación del área celular

El análisis del área de las células de los túbulos proximales teñidos con anticuerpos contra Dpp-IV y  $\beta$ -catenina se realizó convirtiendo con el programa Image J, la barra de la escala que mide una distancia lineal conocida, en su número equivalente de pixeles (e.g.  $20\mu = 288$  pixeles). Después, se trazó el perfil de cada célula de los túbulos proximales y el software automáticamente convirtió el número de pixeles a micrómetros cuadrados, como se describió previamente [114].

#### 4.4 Determinación del volumen celular

El tamaño de las células MDCK parentales y ZO-2 KD se determinó con el equipo de reactivos de calibración de tamaño para citometría de flujo que contiene a seis diferentes suspensiones de micro-esferas de poliestireno, cada una con un diámetro conocido (Molecular Probes, Cat. F-13838, Eugene, OR). El tamaño de las células, en la muestra experimental, se estimó mediante un ensayo de difusión frontal de la luz (FSC, del inglés *forward scatter*). Para este propósito, los cultivos confluentes de las células MDCK parentales y ZO-2 KD se despegaron y separaron con tripsina y se re-suspendieron en PBS y la FSC obtenida se comparó con la registrada con las esferas de poliestireno de distintos diámetros. La FSC de la luz se midió en el citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences, San José, CA)

#### 4.5 Determinación de la superficie de la membrana

La superficie de la membrana se calculó a partir de la corriente de capacitancia registrada en las células de las monocapas maduras mediante la técnica de fijación de voltaje de micro-áreas de membranas (en inglés, *Patch clamp*) en la modalidad de célula completa, como se describió previamente [115]. Las pipetas se fabricaron a partir de tubos de vidrio de borosilicato (Kimax-51, USA), en un estirador P87 Flaming/Brown (Sutter Instruments; CA, USA). Los parámetros de estiramiento se fijaron para obtener puntas con una resistencia de 3 a 5 M $\Omega$ . Previo al registro, las pipetas se llenaron con una solución salina compuesta de KCl 120 mM, NaCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, EGTA 2 mM, pH 7.4, y se anclaron a un micro-manipulador piezo-eléctrico (PCS-250, Burleigh. CA, USA). Los cubre-objetos de vidrio, en los cuales crecieron las monocapas de las células MDCK, se colocaron en una cámara de registro bañada con una solución de registro que contenía: NaCl 110 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 10 mM y glucosa 10 mM, a pH 7.4. El acercamiento y toque definitivo de la pipeta a las células se monitoreó con un microscopio Nikon Diaphot-300 (Nikon Corporation, Tokyo,

JPN). Los registros de la corriente eléctrica y los protocolos de control de voltaje se realizaron con un amplificador DAGAN 8900 (DAGAN Corporation. Minneapolis USA) y se controlaron con el programa para PC Clampex, de la plataforma PClamp 6.0 (Axon Instruments Inc. CA, USA). Se descartaron los ensayos con una resistencia de sellado menor a 3 GΩ. Una vez que se estableció la fijación de voltaje en las membranas en la configuración de célula completa, se indujeron corrientes capacitivas con pulsos de voltaje de -80 a -100 mV, que se pasaron través de un filtro de pasabajos a 30 MHz y se registraron a 10 MHz. Las medidas de la capacitancia de la membrana se obtuvieron al integrar el área bajo la curva de las corrientes transitorias capacitivas y después, al dividir dichas integrales entre la amplitud del pulso de voltaje (-20 mV). Este procedimiento se realizó fuera de línea con el programa Clampfit de Pclamp. Posteriormente la superficie de la membrana se calculó asumiendo una capacitancia específica de 1 μF/cm<sup>2</sup>.

#### **4.6 Microscopía electrónica de barrido**

Las monocapas de las células MDCK cultivadas en cubre-objetos de vidrio, previamente cubiertos con una delgada capa de colágeno, se fijaron durante 1 hora con glutaraldehído al 2.5% en una solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.2. Las muestras se lavaron con el mismo amortiguador y se deshidrataron con etanol, usando concentraciones crecientes hasta alcanzar una solución de etanol al 100%. Las monocapas se incubaron durante 20 min con hexametildisilazán (HMDS) (Polysciences Inc., Cat. 692 Warrington, P.A.). Después de una segunda incubación de 10 min con HMDS, se eliminó el exceso de reactivo y las muestras se dejaron secar al aire por 30 min. Las muestras se colocaron sobre soportes para el microscopio electrónico de barrido y se cubrieron con oro en un ionizador (JFC-1100, JEOL, Peabody, MA). Las muestras se examinaron en el microscopio de barrido de emisión de efecto de campo JSM-7100-FA (JEOL, Peabody, MA).

#### **4.7 Determinación del cociente proteína/DNA**

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron en cajas de 12 pozos ( $4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>), y 24 horas después, las monocapas se lavaron con PBS y se lisaron en 0.5 ml de una solución hipotónica (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) que contenía inhibidores de proteasas. La mitad de la suspensión resultante se diluyó en la solución de lisis a la que previamente se le adicionó EDTA 2 mM. Esta suspensión se utilizó para medir el contenido de ADN en un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, MA) a una longitud de onda de 260 nm. La otra mitad de la suspensión se empleó para medir la concentración de proteínas, usando el equipo de reactivos de BCA para ensayos de proteínas (Cat. 23227, Pierce, Rockford, IL).

#### **4.8 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo**

La sincronización de los cultivos celulares y el análisis del ciclo celular con yoduro de propidio se realizó como se reportó previamente [103]. Los cultivos subconfluentes de células MDCK parentales y ZO-2 KD se incubaron en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (cDMEM, medio DMEM completo) por 24 h. Posteriormente, los cultivos se transfirieron a DMEM con 0.1% de suero para que se detuvieran en la etapa G<sub>0</sub> del ciclo celular. Después de 48 h, se indujo la entrada al ciclo celular por la adición de cDMEM. Para determinar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, los cultivos sincronizados se despegaron y separaron con tripsina y se re-suspendieron en PBS. Enseguida, las células se fijaron con etanol frío al 70% (v/v) y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% (v/v). Para teñir el ADN se utilizó yoduro de propidio 0.02 mg/ml y las lecturas del contenido de ADN se realizaron en el citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciencias, San José, CA) con un laser de argón a una excitación de 480 nm. Los datos se analizaron con el software ModFitLT V2.0.

#### **4.9 Inmunodetección en fase sólida**

Las inmunodetecciones en fase sólida se realizaron de acuerdo a los procedimientos estándar previamente reportados [98]. Se utilizaron los siguientes

anticuerpos policlonales hechos en conejo contra: mTOR (Cell Signaling, Cat 2983, dilución 1:1000, Danvers, MA); P-mTOR S2448 (Cell Signaling, Cat 2971, dilución 1:1000, Danvers, MA); p70S6K1/p85S6K1 (Cell Signaling, Cat 9202, dilución 1:1000, Danvers, MA); P-p70S6K1 T389/ P-p85S6K1 T412 (Cell Signaling, Cat 9502, dilución 1:1000, Danvers, MA); P-p70S6K1 T421/S424 /P-p85S6K1 T444/S447 (Cell Signaling, Cat 9204, dilución 1:1000, Danvers, MA); GAPDH (Cell Signaling, Cat 2118, dilución 1:1000, Danvers, MA); p-YAP S127 (Assay Biotech, Cat. A0757, dilución 1:1000, Sunnyvale, CA), pAkt-T308 (Santa Cruz Biotechnology Cat. Sc-135650, dilución, 1:1000 Dallas, TX); pAkt-S473 (Santa Cruz Biotechnology, Cat. Sc-7985-R, dilución, 1:1000, Dallas, TX) y YAP2 (generosamente donado por el Dr. Marius Sudol del Instituto de Mecanobiología de la Universidad Nacional de Singapur); o los anticuerpos monoclonales hechos en ratón contra: PTEN (Santa Cruz Biotechnology, Cat. Sc-7974, dilución 1:1000, Dallas, TX) o Akt (BD Biosciencias, Cat. 610876, dilución 1:1000, San Jose, CA); o el anticuerpo monoclonal hecho en conejo contra Raptor (Cell Signaling, Cat. 2280, dilución 1:1000, Danvers MA). Enseguida, se emplearon los anticuerpos secundarios hechos en cabra acoplados a la peroxidasa de rábano contra: las IgG de conejo (Life Technologies, Cat. 62-6120, dilución 1:5000, South San Francisco, CA) o las IgG de ratón (Life Technologies, Cat. 26-6520, dilución 1:8000, South San Francisco, CA). Para revelar las membranas se empleó el sistema de quimioluminiscencia Inmobilon Western (Merck Millipore, Cat. WBKLS0500, Darmstadt, Germany).

#### **4.10 Transfección y ensayos de gen reportero**

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron en cajas de 24 pozos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pozo. Después de 24 horas, las células se transfectaron utilizando Lipofectamina 2000 (Life Technologies, Cat. 11668-019, Carlsbad, CA) con 1) 0.75  $\mu$ g de la construcción pTRE-hZO-2, (generosamente donada por el Dr. Alan Fanning de la Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, NC), que contiene la forma completa de ZO-2 humana con los sitios alterados de unión al shRNA; 2) 0.5  $\mu$ g del

plásmido pRZ21xdZ PTEN (generosamente donado por el Dr. Frank Furnari y el Dr. Webster Cavenee de la Universidad de California en San Diego, CA) y 3) 0.5 µg del plásmido 8xGTIIC-luciferasa (Addgene, plasmid 34615, Cambridge, MA), que se obtuvo a partir del plásmido 4XGTIIC-Lux generado por Ian Farrance, y al que después se le adicionaron cuatro sitios más de unión a TEAD [116]; 4) 0.8 µg de la construcción del promotor del gen CTGF humano que contiene tres sitios putativos de unión a TEAD, clonado en el vector reportero pGL3-6xOSE-Luc [117] (generosamente donada por el Dr. Kun-Liang Guan del Centro para cáncer Moors de la Universidad de California en San Diego, CA), y 5) 0.5 µg de la construcción reportera TOPFLASH (Merck Millipore, Cat. 21-170, Darmstadt, Germany) que posee 3 copias del sitio de unión a TCF río arriba del promotor mínimo de la cinasa de timidina (TK) y que precede al marco abierto de lectura de la luciferasa. Como control negativo, se transfectaron 0.5 µg de la construcción FOPFLASH (Merck Millipore, Cat. 21-169, Darmstadt, Germany) que tiene mutados a los sitios de unión a TCF.

En las transfecciones, después de 6 h, el medio de transfección se retiró y se reemplazó con medio de cultivo fresco. Cumplido el tiempo de tratamiento, las células se cosecharon y procesaron para medir la expresión del gen reportero. Para ello, las células se re-suspendieron en solución amortiguadora de lisis (Promega, Cat. E3971, Madison, WI) para reporteros. La obtención de las proteínas se realizó mediante un ciclo de lisis por choque térmico que consistió en 5 min a -70°C y enseguida, 1 min a 37°C y 3 min de agitación en el vortex. Finalmente, la actividad de la luciferasa se midió con el sistema Luciferase Reporter Assay System (Promega, Cat. E1500 Madison, WI) y la determinación se hizo en el equipo Infinite® M200 PRO series, TECAN. Los valores se ajustaron con respecto al contenido de la proteína determinada con el método de Bradford y se expresaron de manera relativa a la actividad de los controles de cada experimento.

Los siRNA contra raptor y dicer caninos diseñados y sintetizados por la compañía Thermo Scientific Dharmacon (Lafayette, CO), tienen las siguientes secuencias: 1) raptor: sentido, 5' AGGACAACGGUCACAAAUA 3'; antisentido, 5' UAUUUGUGACCGUUGUCCU 3'; 2) dicer: sentido, 5' GGGAAAGUGUGCAGAAUAAUU 3'; antisentido, 5'

UUUAUUCUGCAGACUUUCCCUU 3'. Estos siRNA se transfectaron en las células MDCK ZO-2 KD con Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Cat. 13778-150, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **4.11 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)**

El ARN total se extrajo de las células MDCK parentales y ZO-2 KD con el reactivo TRIzol (Invitrogen Cat. 15596-026, Carlsbad , CA). La qPCR se realizó siguiendo el método de dos pasos. El ADN complementario se generó a partir de 1 µg del ARN total con el sistema de transcripción reversa Improm-II (Promega Cat. A3800, Fitchburg, WI) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa, se realizó con el estuche QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN, Cat. 204143, Hilden, Germany) en un volumen de 25 µl. Las muestras, por triplicado, se sometieron a qPCR usando el sistema Step One plus Real Time PCR (Applied Biosystems Cat. 4376600, Carlsbad, CA). Las condiciones para la PCR fueron, después de un ciclo inicial de 10 min a 94°C, 40 ciclos de amplificación de 30 segundos a 94°C; 1 minuto a 60°C y 30 segundos a 72°C. El protocolo para la curva de disociación fue de 15 segundos a 95°C; 1 minuto a 60°C y 15 segundos a 95°C. Los iniciadores empleados en la amplificación fueron sentido: GACTTTAGGAACAGTGGGAGAGCACC; y antisentido: CCTCATGAAGAAGGCTGGAGAACAC. La abundancia relativa del ARNm de CTGF se normalizó con la cantidad del ARNm de GAPDH y se calculó usando el método de  $2\Delta Ct$ .

#### **4.12 Determinación cuantitativa del PIP<sub>3</sub> en las células epiteliales**

Las monocapas de las células parentales y ZO-2 KD, sembradas en cajas de 60 cm<sup>2</sup>, se trataron con 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 4°C antes de ser removidas con una espátula de plástico. La suspensión celular se centrifugó a 800xg durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió por 2 min en 3 ml de EDTA 1 mM en 5% de TCA. Enseguida se cuantificó la cantidad de proteína en dichas suspensiones. Posteriormente, se volvió a centrifugar la suspensión a 800xg por 5 min y nuevamente se

descartó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió durante 30 min, en 3 ml de una solución de etanol:cloroformo (2:1) con agitación constante. La cantidad de fósforo presente en los fosfolípidos se cuantificó después de una digestión con  $Mg(NO_3)_2$  y HCl, con molibdato de amonio, según el método de Ames [118]. Posteriormente, las muestras obtenidas se centrifugaron y se descartó el sobrenadante con los lípidos neutros. Los lípidos acídicos se extrajeron de la pastilla al añadir 2.25 ml de metanol:cloroformo:HCl (12 M) (80:40:1). Enseguida, las muestras se agitaron de manera constante durante 15 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 800xg por 5 min. Después se recuperó el sobrenadante que contenía a los lípidos acídicos y se le añadieron 0.75 ml de cloroformo y 1.35 ml de HCl 0.1 M. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 800xg por 5 min. Enseguida, se recuperó la fase orgánica superior y se colocó en un vial donde se secó con  $N_2$ . Finalmente, la cantidad de  $PIP_3$  presente en cada extracto de lípidos se cuantificó con un ensayo de ELISA de competencia de  $PIP_3$  (Echelon, Cat. K-2500s, Salt Lake City, UT).

#### 4.13 Nefrectomía unilateral (UNX)

Para el modelo de HRC explorado en esta tesis, se realizó una UNX. Como se describió previamente [119], las ratas macho adultas, de 8 semanas de edad, de la cepa Wistar y con un peso corporal entre 200 y 300 g se anestesiaron con isoflurano. Posteriormente, se hizo una incisión en la pared abdominal de los animales en condiciones estériles para exponer al riñón derecho. Se aisló el *hilum renale* y posteriormente se removió el riñón derecho. Después de la cirugía, las ratas regresaron a sus cajas y recibieron agua y comida *ad libitum*. Una a tres semanas después de la cirugía, se removió el riñón remanente y el animal se sacrificó con pentobarbital sódico (100 mg/kg ip). Los riñones se congelaron en nitrógeno líquido y la mitad de cada riñón se empleó para los experimentos de inmunodetección en fase sólida, mientras que el resto se utilizó para las inmunofluorescencia como se describió previamente [113].

#### 4.14 Aislamiento de las fracciones nucleares y citoplásmicas a partir del tejido renal

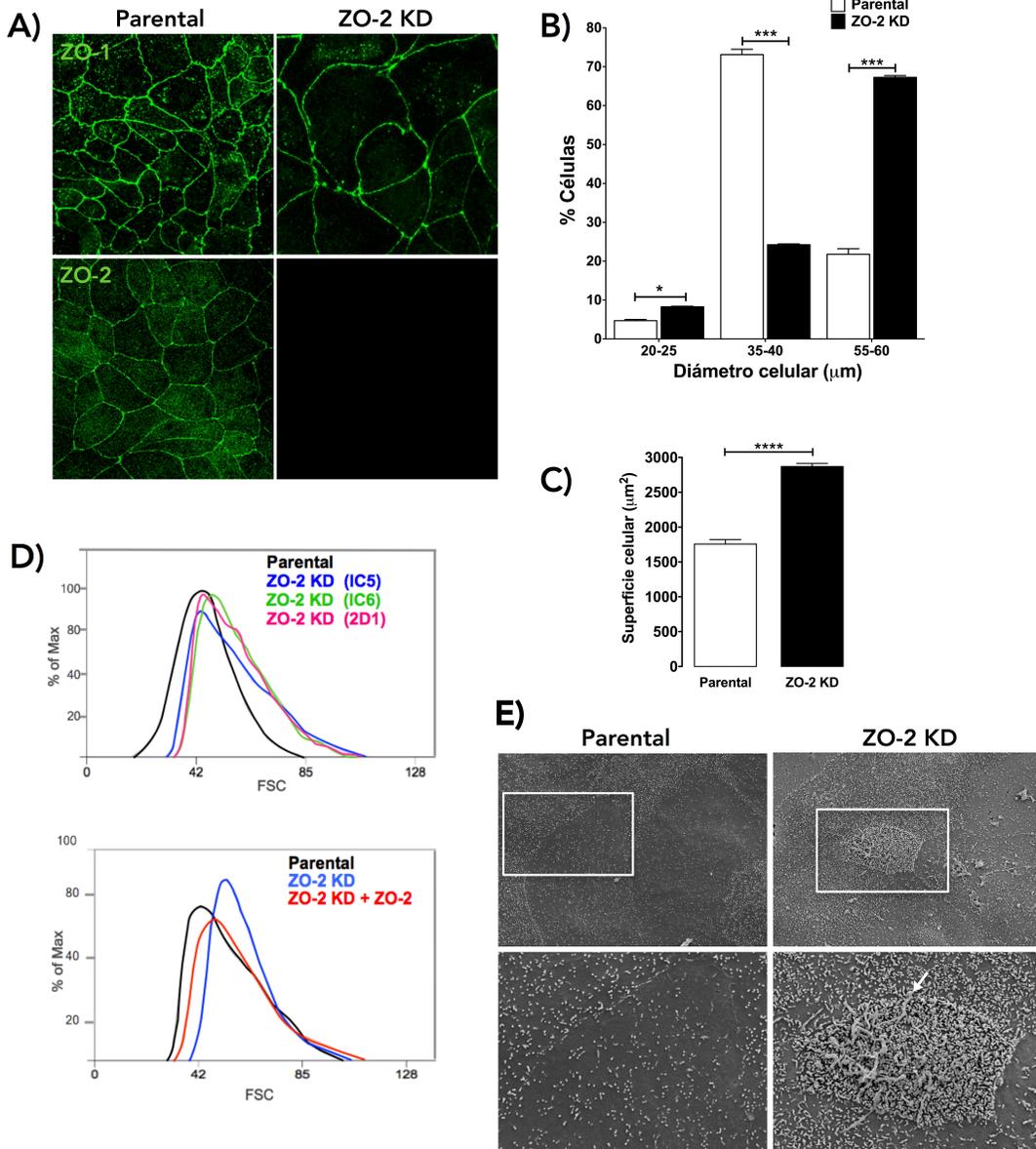
En el tejido renal, se adaptó la técnica previamente descrita para aislar a las fracciones citoplásmica y nuclear [120]. Brevemente, los riñones se descongelaron y se cortaron en rectángulos pequeños con una navaja puntiaguda. Las rebanadas se incubaron durante 30 min en una solución de PBS frío que contenía al cóctel de inhibidores Complete (Roche Applied Science, Cat. 04693132001, Madison, WI), 50 mM Tris-HCl (pH 8) y DNAsa al 0.1% (p/v). Posteriormente, las muestras se sonicaron durante 30 segundos y la concentración de proteína se determinó usando el método de Bradford, con BSA como estándar. Los homogenados, se incubaron en frío por 30 min en la solución amortiguadora I [sacarosa 0.32 M, Tris-HCl (pH 8) 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, acetato de magnesio 2 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, NP-40 0.5% (v/v) y Complete]. Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a 200xg por 10 min a 4°C. El sobrenadante, correspondiente a la fracción citoplásmica, se retiró y guardó a -70°C, mientras que la pastilla se re-suspendió en 200 µl de la solución amortiguadora I más 200 µl de la solución amortiguadora II [sacarosa 2M, Tris-HCl (pH 8) 10 mM, acetato de magnesio 5 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM y Complete] y se centrifugó a 30,000 g for 50 min at 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla que contenía a la fracción nuclear se re-suspendió en una solución con Complete, Triton X-100 3% (v/v), SDS 3% (w/v) y DNAsa I 0.5 % (w/v). Las muestras se sonicaron dos veces durante 30 segundos y las fracciones nucleares se mantuvieron congeladas a -70°C hasta su uso posterior.

#### IV.14.1 Resultados

##### 5.1 El tamaño de las células epiteliales aumenta en ausencia de ZO-2

En el microscopio confocal, las células MDCK ZO-2 KD de la clona IC5 aparentan ser más grandes que las células parentales (Figura 19A). Para confirmar esta observación, determinamos el tamaño celular analizando por citometría de flujo la dispersión frontal de la luz (FSC) de las células MDCK ZO-2 KD y parentales, y comparando estos valores con la FSC de micro esferas de referencia con un diámetro conocido. La figura 19B revela que el 73% de las células parentales tiene un diámetro de 35-40  $\mu\text{m}$ , mientras que el 67% de las células ZO-2 KD exhibe un diámetro de 55-60  $\mu\text{m}$ . Además, se determinó la superficie de la membrana plasmática de las células MDCK ZO-2 KD y parentales, al medir la capacitancia en ensayos de fijación de voltaje de célula entera, como previamente se describió [115]. La figura 19C muestra que en las células MDCK ZO-2 KD, la membrana plasmática es 63% mayor que en las células parentales.

Para excluir la probabilidad de que el cambio en el fenotipo observado en las células MDCK ZO-2 KD se deba a efectos inespecíficos del shRNA, analizamos el tamaño de dos clonas más de las células MDCK ZO-2 KD denominadas IC6 y 2D1. En la figura 19D (panel superior) se observa que al evaluar por citometría de flujo la FSC de las clonas IC5, IC6, y 2D1 de las células MDCK ZO-2 KD, éstas presentan el mismo fenotipo de aumento en el tamaño con respecto a las células parentales. Además, analizamos si en la clona IC5 de las células MDCK ZO-2 KD se revertía el fenotipo al re-expresar una construcción de ZO-2 insensible al shRNA. El panel inferior de la figura 19D muestra que la transfección de ZO-2 en las células MDCK ZO-2 KD revierte, de manera parcial, el tamaño de las células. La reversión del tamaño celular es parcial y no total porque probablemente la eficiencia de transfección en estas células no es del 100%. Todos los experimentos subsecuentes en esta tesis se realizaron con la clona IC5 por lo que nos referiremos a ellas sólo como células ZO-2 KD.



**Figura 19. La ausencia de ZO-2 altera la citoarquitectura de las células epiteliales.**

A) Las células MDCK ZO-2 KD son más grandes que las células parentales. Las células se fijaron y procesaron para inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos contra ZO-1 y ZO-2. B) Las células MDCK ZO-2 KD tienen un diámetro mayor que las células parentales. El diámetro de las células se estimó comparando la señal FSC que las células generan en un citómetro de flujo, con la señal de las micro esferas de referencia. Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de t de Student, \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . C) La superficie cubierta por la membrana plasmática es mayor en las células MDCK ZO-2 KD que en las células parentales. El área cubierta por la membrana se estimó mediante mediciones de capacitancia empleando la configuración de fijación de voltaje de célula entera. Se cuantificó la superficie ocupada por la membrana en 33 células parentales y 36 células ZO-2 KD. El análisis estadístico se hizo con la prueba t de Student, \*\*\* $p < 0.001$ . D) La FSC de la luz de las tres clonas

de células ZO-2 KD, indica que son de mayor tamaño que las células parentales (panel superior). El incremento en el tamaño celular observado en las células ZO-2 KD se revierte de manera parcial al transfectar una construcción de ZO-2 que tiene modificados los sitios de unión del shRNA contra ZO-2 (panel inferior). E) La cantidad de microvellosidades varía incluso entre las células MDCK de la clona parental (inserto izquierdo), pero en las células MDCK ZO-2 KD, la densidad de las microvellosidades es mayor que en las células parentales. Se observa también la presencia de extensiones membranosas, largas y delgadas que salpican la superficie de las células ZO-2 KD (flecha, inserto derecha).

Previamente mostramos que las monocapas formadas por las células transfectadas con un siRNA contra ZO-2, presentan un perfil citoarquitectónico atípico, con regiones donde la superficie apical se abulta y sobresale [121]. Por ello, analizamos mediante microscopía electrónica de barrido, la superficie de las monocapas de células MDCK ZO-2 KD y parentales. En la figura 19E se observa que, aún cuando existe variabilidad en la densidad de microvellosidades entre una célula y otra de las que constituyen una monocapa, es notorio que en las células MDCK ZO-2 KD aumenta la densidad de las microvellosidades en comparación con las células parentales. Adicionalmente, observamos que algunas células ZO-2 KD exhiben en la superficie apical extensiones de la membrana largas y delgadas (Figura 19E recuadro), que se asemejan a las descritas previamente en las células con el silenciamiento doble de ZO-1 y ZO-2 [122]. También analizamos si la ausencia de ZO-2 alteraba el número de cilios por célula y encontramos que, al teñir a los cilios y los núcleos con un anticuerpo contra tubulina acetilada y con DAPI respectivamente, el número de cilios por célula disminuye en las células ZO-2-KD (ver Tabla 1).

**Tabla 1. Cantidad de cilios detectados por inmunofluorescencia en las células parentales y ZO-2 KD**

Células	Número de células <sup>1</sup>	Número de cilios <sup>2</sup>	Cilios/ 100 células
Parentales	381	25	6.7
ZO-2 KD	614	22	3.4

<sup>1</sup> El número de células se determinó contando los núcleos que se tiñeron con DAPI.

<sup>2</sup> Los cilios se identificaron marcándolos con el anticuerpo contra la tubulina acetilada.

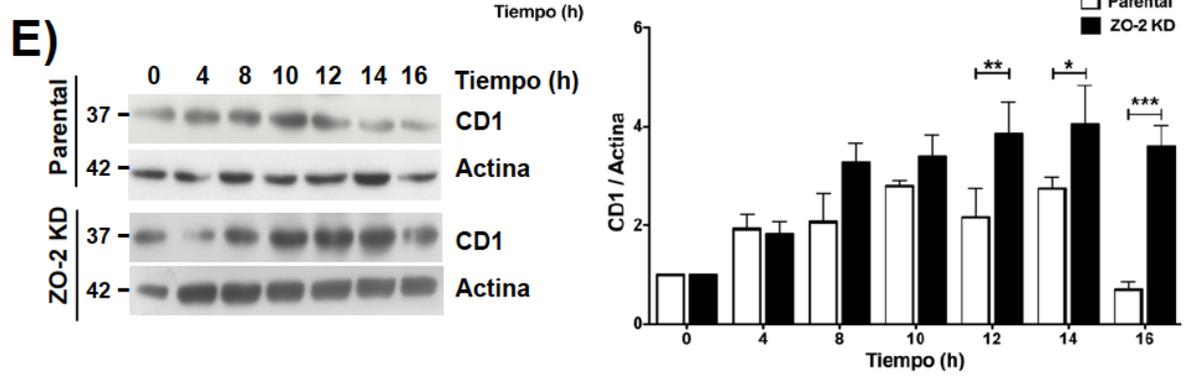
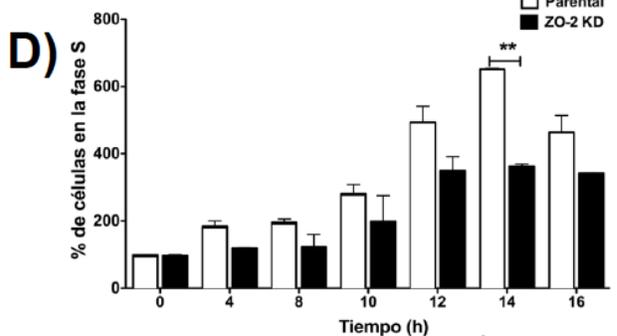
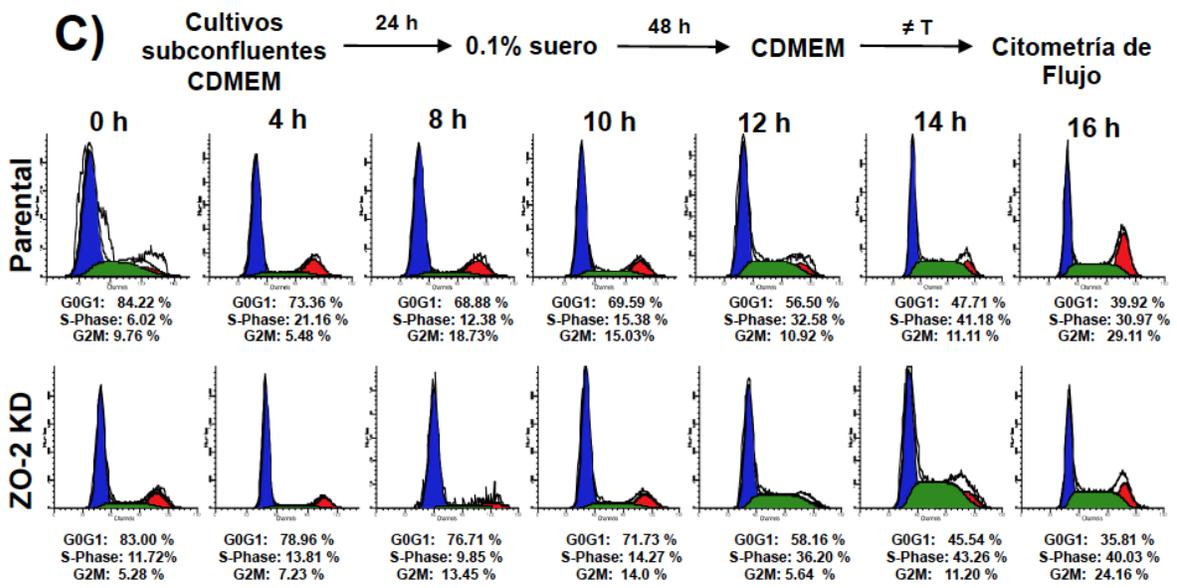
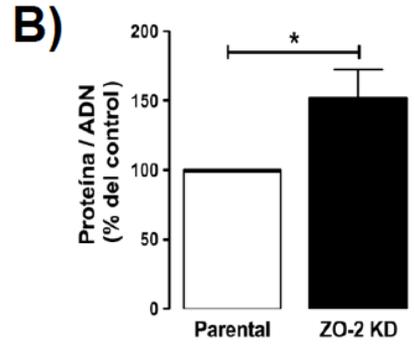
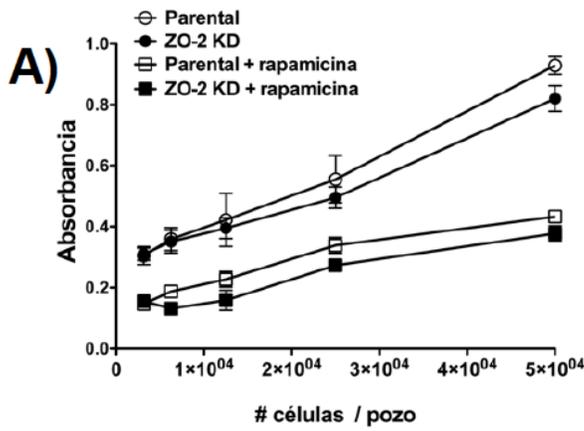
## 5.2 La ausencia de ZO-2 induce hipertrofia por un mecanismo dependiente del ciclo celular

A continuación analizamos si la falta de ZO-2 impacta la proliferación celular. La figura 20A muestra que no existe diferencia significativa en el número de células en proliferación entre las células MDCK ZO-2 KD y parentales. Esta observación hizo que sospecháramos que en las células ZO-2 KD ocurría un proceso de hipertrofia y no de hiperplasia. Para confirmar esta hipótesis, medimos el cociente de proteína/ADN y observamos que en efecto, es un 52% mayor en las células MDCK ZO-2 KD, que en las células parentales (Figura 20B).

Para estudiar si un mecanismo dependiente del ciclo celular participa en el aumento de tamaño observado en las células MDCK ZO-2 KD, analizamos, mediante citometría de flujo, cómo se distribuyen a lo largo del ciclo celular las células parentales y ZO-2 KD. Para ello, los cultivos subconfluentes de células MDCK ZO-2 KD y parentales se incubaron en medio DMEM (del inglés Dulbecco's minimal eencial medium) con 10% de suero (cDMEM, medio DMEM completo) por 24 h. Enseguida, los cultivos se transfirieron a DMEM con 0.1% de suero para que se detuvieran en la etapa G0 del ciclo celular. Después de 48 h, se indujo la entrada al ciclo celular por la adición de cDMEM, y el porcentaje de células presente en cada etapa del ciclo celular se determinó a diferentes tiempos mediante la incorporación de yoduro de propidio. La figura 20C muestra que tanto las células MDCK parentales como las ZO-2 KD progresan a través del ciclo celular, cuando las monocapas se transfieren de un medio con 0.1% a otro con 10% de suero. Sin embargo, las células ZO-2 KD se mueven a un ritmo más pausado. Esto resulta más evidente en la figura 20D donde se observa que hay un porcentaje menor de células ZO-2 KD en la fase S a diferentes tiempos después de la transferencia al medio con 10% de suero. Estos resultados sugieren que la hipertrofia de las células MDCK ZO-2 KD se genera por un retraso en el avance de las células de las fases G1 a S.

Previamente se mostró que ZO-2 inhibe la transcripción del gen de la ciclina D y promueve la degradación de la proteína [102, 123]. Además, el desarrollo de la hipertrofia renal se asocia a la activación de la ciclina D [11]. Por ello, analizamos la

expresión de ciclina D en las células ZO-2 KD y parentales. En la figura 20E se observa que en las células ZO-2 KD aumenta el nivel de ciclina D, con respecto a las células parentales, conforme avanza el tiempo después de la transferencia al medio con 10% de suero. En conjunto, estos resultados sugieren que la hipertrofia de las células ZO-2 KD se induce por un mecanismo dependiente del ciclo celular, en el que la ausencia de ZO-2 aumenta la cantidad de ciclina D que a su vez, incrementa el tiempo que las células pasan en la fase G1 del ciclo celular.



**Figura 20. La ausencia de ZO-2 no afecta la proliferación de las células epiteliales y en cambio aumenta el cociente proteína/ADN y retrasa la entrada a la fase S del ciclo celular.** A) El número de células que proliferan se determinó usando un ensayo con sales de tetrazolio. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes. La estadística se hizo con la prueba de ANOVA de una sola vía acompañada de una comparación de Bonferroni. B) El cociente de proteína/ADN en las células MDCK ZO-2 KD es 52% mayor que en las células parentales. En cada muestra se hizo un ensayo de BCA para la determinación de las proteínas y el ADN se cuantificó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm. La estadística se realizó con la prueba t de Student donde  $*p < 0.05$ . C) En comparación con las células MDCK parentales, las células ZO-2 KD se mueven de manera más pausada a lo largo del ciclo celular. Las células se incubaron con cDMEM por 24 h. Enseguida se transfirieron a DMEM con 0.1% de suero por 48 h. En ese momento se sincronizó la entrada de las células al ciclo celular con la adición de cDMEM. El porcentaje de células en cada etapa del ciclo celular se determinó mediante un ensayo de citometría de flujo, en células teñidas con yoduro de propidio, a diferentes tiempos después de la adición del cDMEM. D) En comparación con las células MDCK parentales, un porcentaje menor de células ZO-2 KD se encuentra en la fase S del ciclo celular a diferentes tiempos después de la transferencia al medio con 10% de suero. Los valores son relativos al porcentaje de células presentes al tiempo 0 en la fase S. E) Las células ZO-2 KD expresan más ciclina D que las células parentales, después de transferirlas al medio con 10% de suero. El panel izquierdo muestra la inmunodetección en fase sólida; el panel derecho representa la densitometría de tres experimentos independientes. La estadística se realizó con un análisis de varianza de dos vías seguido de una comparación múltiple de Bonferroni.  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ .

### **5.3 El incremento en el tamaño observado en las células ZO-2 KD es también el resultado de la activación del complejo mTORC1 y de su blanco, la cinasa S6K1**

La disparidad entre las tasas de síntesis y degradación de proteínas, constituye el segundo mecanismo hasta ahora conocido para inducir la hipertrofia renal [17, 124]. La síntesis de proteínas aumenta cuando el tamaño del riñón aumenta [125], por ello, analizamos si la ausencia de ZO-2 induce la activación de la ruta mTORC1 que promueve la síntesis de proteínas [28] mediante la activación de su blanco, la cinasa S6K1 [29].

La figura 21A muestra una fosforilación similar de mTOR en la Ser2448 entre las células MDCK ZO-2 KD y parentales. Enseguida, analizamos el estado de fosforilación de la diana de mTORC1, la cinasa S6K [126]. Estudiamos en particular a la cinasa S6K1 y no a

S6K2, porque la primera es esencial para el incremento del tamaño celular, mientras que ambas son irrelevantes para la proliferación celular [27]. Empleamos anticuerpos que detectan a las dos isoformas de S6K1: p70<sup>S6K</sup> y p85<sup>S6K</sup>, y anticuerpos que detectan a los sitios de fosforilación que activan a S6K1 al liberarla de la inhibición por pseudosubstrato (Ser421, Ser424) y que facilitan posteriores fosforilaciones para su completa activación (Thr389). La figura 21A muestra que en las células ZO-2 KD hay un incremento significativo en la fosforilación de S6K1 en los residuos de Ser421, Ser424 y Thr389, en comparación con las células parentales. Estos resultados sugieren que el incremento de tamaño celular que sucede en ausencia de ZO-2, involucra la activación de la cinasa S6K1.

Para confirmar esta observación, analizamos el efecto de la rapamicina, un inhibidor alostérico de mTORC1, sobre la proliferación y el tamaño celular. Nuestros resultados muestran que la proliferación de las células ZO-2 KD y parentales es igual de sensible a la rapamicina (Figura 20A), y que el tratamiento de las células ZO-2 KD con rapamicina, evaluado por la FSC de la luz en el citómetro, disminuye su tamaño y lo asemeja al de las células parentales (Figura 21B panel izquierdo). Para validar aún más estos resultados, silenciamos, mediante un siRNA, a la proteína raptor que es un componente esencial del complejo mTORC1. La inmunodetección en fase sólida en la figura 21C (panel superior) muestra que el siRNA contra raptor disminuye la expresión de raptor en las células ZO-2 KD, y al medir en el citómetro la FSC de la luz, detectamos que el silenciamiento de raptor induce una reversión en el tamaño de las células ZO-2 KD, a valores similares a los de las células parentales (Figura 21C, panel inferior). En conjunto, estos resultados indican que la ausencia de ZO-2 activa a la vía mTORC1/S6K la cual media el incremento en el tamaño de las células.

A continuación exploramos los posibles mecanismos que conducen a la activación de mTORC1 en las células ZO 2-KD. Para ello, analizamos si la inhibición de PI3K con LY294002 y de Akt con Akt VIII, revierte el incremento en el tamaño celular observado en las células ZO-2 KD. La figura 21B (paneles central y derecho) muestra que ambos inhibidores LY294002 y Akt VIII revierten el incremento en el tamaño de las células ZO-2

KD. Para confirmar la activación de Akt en las células ZO-2 KD, se evaluó la fosforilación de GSK-3 $\beta$  en el residuo de Ser9, un blanco conocido de Akt [127]. La figura 21D muestra que en las células ZO-2 KD esta fosforilación aumenta 5 veces, lo que confirma la activación de Akt ante la ausencia de ZO-2.

En conjunto, estos resultados sugieren que el silenciamiento de ZO-2 enciende la activación consecutiva de PI3K-Akt y de mTORC1, que finalmente activa a S6K1 que induce el aumento en el tamaño celular.

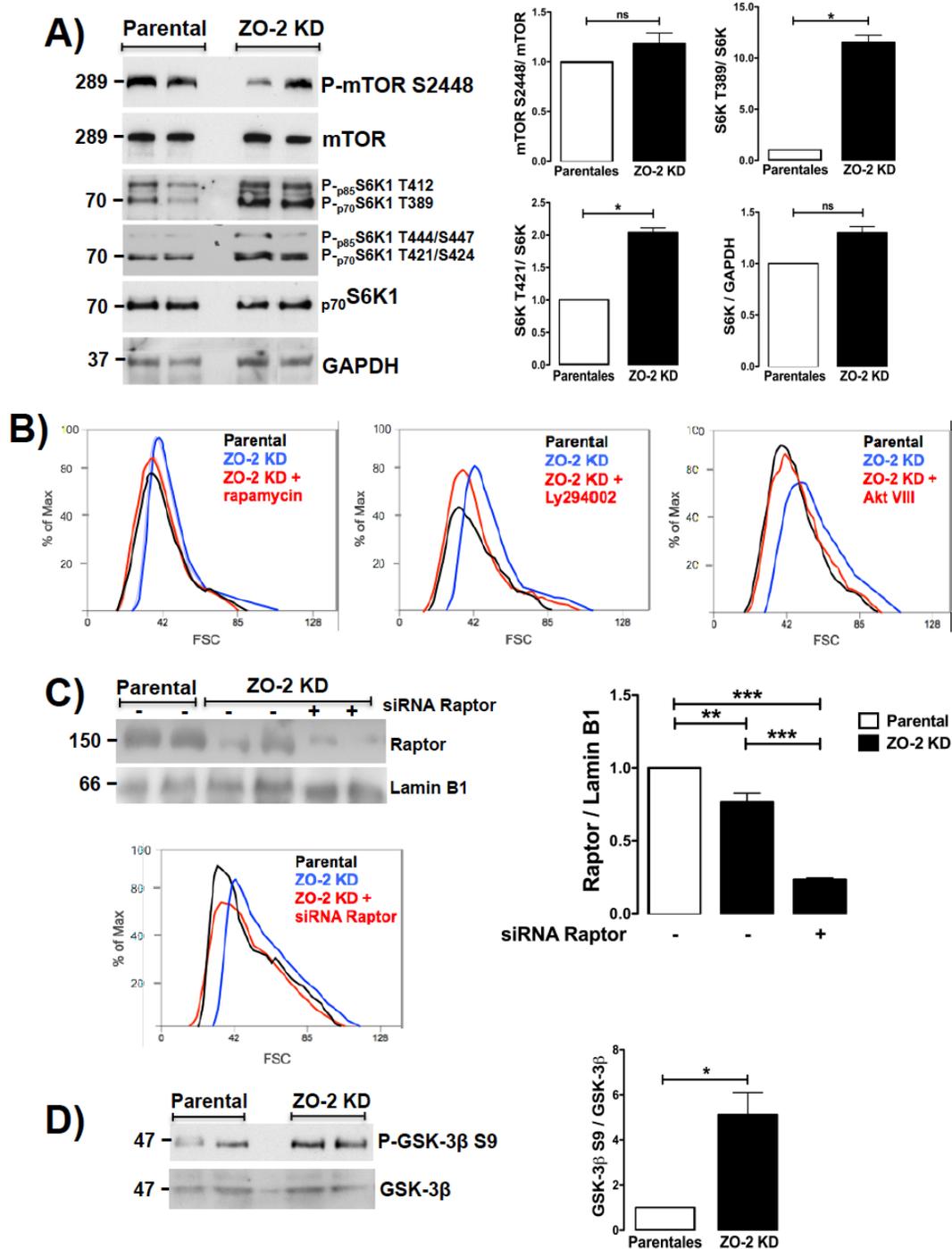


Figura 21. La ausencia de ZO-2 activa a la ruta PI3K-Akt que transactiva al complejo mTORC1 y a su efector final S6K1 que controla el tamaño celular. A) En ausencia de ZO-2, se activa el efector final del complejo mTORC1, la cinasa S6K1. Inmunodetección en fase sólida de células MDCK parentales y ZO-2 KD hecha con anticuerpos específicos contra mTOR; P-mTOR S2448; p70S6K1/p85S6K1; P-p70S6K1 T389/ P-p85S6K1 T421/S424; P-p70S6K1 T421/S424 /P-p85S6K1 T444/S447 y GAPDH como control de carga. La

estadística se hizo con la prueba t de Student donde  $*p < 0.05$ . B) La inhibición del complejo mTORC1 con rapamicina (panel izquierdo), de la PI3K con LY294002 (panel central) y de Akt con Akt VIII (panel derecho), revierte el incremento en el tamaño celular observado en las células ZO-2 KD. El tamaño de las células MDCK ZO-2 KD y parentales se determinó analizando por citometría de flujo, la FSC de luz de las células después de 12 h de incubación con rapamicina (100 nM), LY294002 (50 mM) y Akt VIII (2.12  $\mu$ M). C) Al silenciar a raptor con un siRNA específico, disminuye el tamaño de las células ZO-2 KD a un valor similar al de las células parentales. En el panel superior izquierdo, la inmunodetección en fase sólida de células tratadas con o sin el siRNA contra raptor. Se utilizó lamina B1 como control de carga. En el panel superior derecho, la densitometría de 3 experimentos independientes. La estadística se hizo con un ANOVA de dos vías y enseguida se hizo una comparación múltiple de Bonferroni donde  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$  D) GSK-3 $\beta$ , un blanco conocido de Akt, se encuentra fuertemente fosforilada en la Ser 9 en las células MDCK ZO-2 KD en comparación con las células parentales. La estadística se hizo con la prueba t de Student donde  $*p < 0.05$ .

#### **5.4 En ausencia de ZO-2 se induce la actividad transcripcional de YAP que transactiva a la ruta Akt/mTOR e incrementa el tamaño celular**

Como la ruta Hippo regula río arriba a la vía mTOR, analizamos la funcionalidad de YAP en las células MDCK parentales y en las tres clonas de las células ZO-2 KD. La figura 22A muestra que, en concordancia con lo previamente reportado [30], la densidad celular regula la localización de YAP, ya que la proteína está presente en el núcleo de las células en los cultivos subconfluentes, pero no en los confluentes. Sin embargo, es importante destacar que la ausencia de ZO-2 induce la acumulación de YAP en el núcleo y la región perinuclear en ambas condiciones de cultivo. El patrón de localización de YAP es similar en las tres clonas de las células ZO-2 KD.

Enseguida evaluamos la fosforilación de YAP para determinar si en ausencia de ZO-2 se inactiva la ruta Hippo y se activa YAP. La inmunodetección en fase sólida de la figura 22B muestra que en las células MDCK ZO-2 KD, la fosforilación de YAP disminuye 70% en la Ser127 en comparación con las células parentales, mientras que no se detectó cambio alguno en la cantidad total de YAP. Por lo tanto, estos resultados sugieren que en las células ZO-2 KD la ruta Hippo se inactiva.

En el núcleo, YAP funciona como un co-activador de los factores de transcripción TEAD que promueven la transición de epitelio a mesénquima [128]. Por ello, analizamos el impacto de la ausencia de ZO-2 en un ensayo de gen reportero donde la expresión de la luciferasa se regula por un promotor con ocho sitios artificiales de unión a los factores TEAD. La figura 22C muestra que en ausencia de ZO-2, la actividad del promotor aumenta al doble en comparación a las células parentales, y que la sobre-expresión de ZO-2 disminuye 63% la actividad del promotor. El gen del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) es un blanco directo de YAP [128], por lo que, exploramos si ZO-2 afecta la actividad del promotor de CTGF. La figura 22D muestra que en las células ZO-2 KD, el promotor de CTGF está más activo que en las células parentales, y que la co-transfección de ZO-2 reduce la actividad del promotor tanto en las células parentales como en las ZO-2 KD. Para profundizar más en este punto, analizamos por RT-qPCR si la expresión endógena de CTGF se altera por la falta ZO-2. La figura 22E muestra que la ausencia de ZO-2 incrementa la cantidad de ARNm de CTGF relativa al mensajero endógeno GAPDH, y que la sobre-expresión de ZO-2 disminuye la cantidad de CTGF en las células parentales. En conjunto, estos resultados indican que YAP se activa transcripcionalmente en ausencia de ZO-2.

Recientemente se describió que cuando la ruta de señalización Wnt está inactiva, YAP ancla a la ligasa de ubiquitina al complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina. Así mismo se mostró que, el tratamiento con el ligando Wnt desaloja a YAP de este complejo y produce su acumulación nuclear [41]. Como las células ZO-2 KD muestran acumulación nuclear de YAP, determinamos si estas células presentan una mayor actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina que las células parentales. Para ello realizamos un ensayo de gen reportero en las células MDCK parentales y ZO-2 KD, con la construcción reportera TOPFLASH/FOPFLASH regulada por 3 sitios artificiales de unión al factor de transcripción TCF/LEF. La figura 22F muestra que en las células MDCK ZO-2 KD, la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina es significativamente mayor que en las células parentales. Este resultado confirma que la ausencia de ZO-2 induce la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina y concuerda con experimentos previos en los que

mostramos que la sobre-expresión de ZO-2 abate la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina [103].

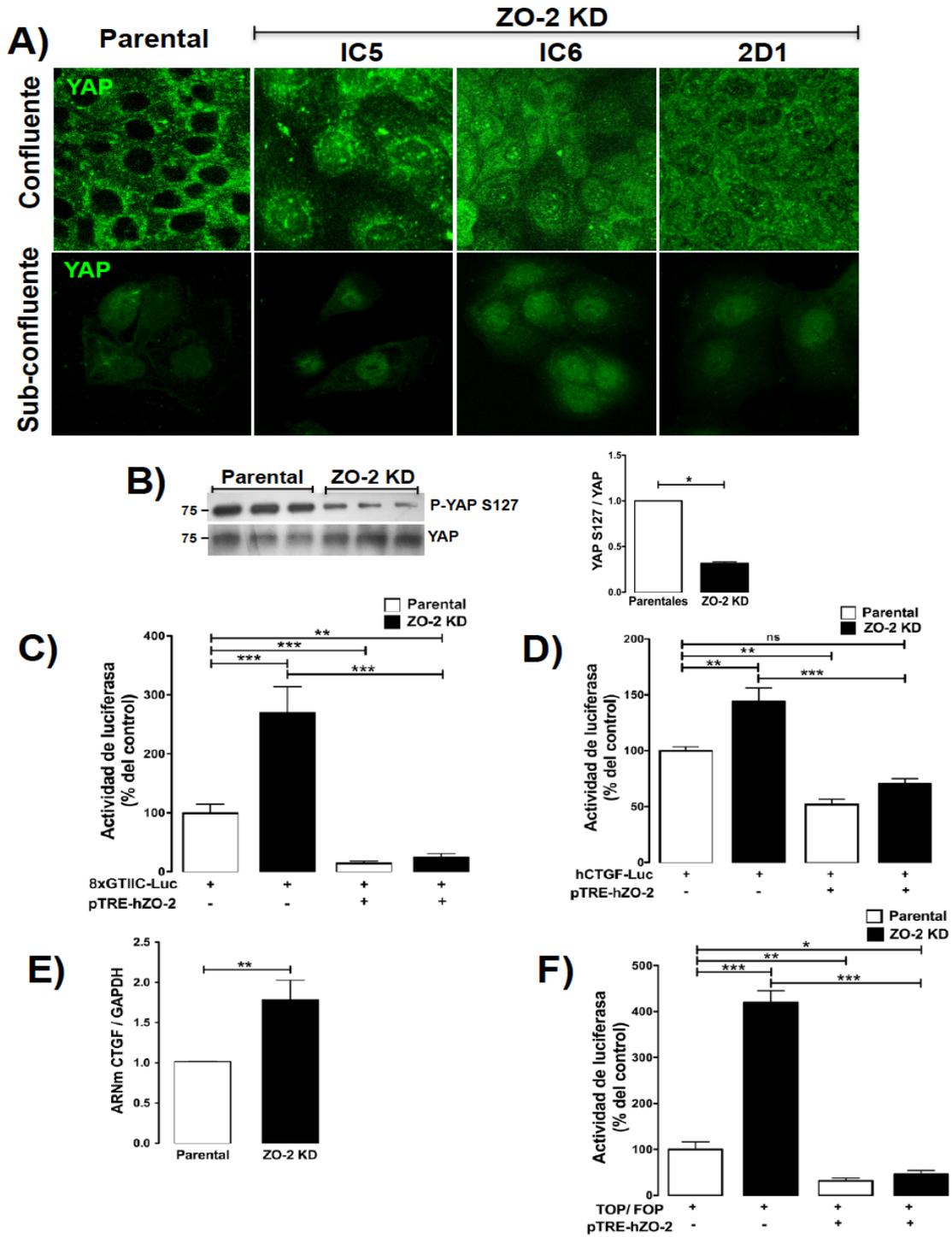


Figura 22. La ausencia de ZO-2 favorece el reclutamiento nuclear de YAP y promueve su actividad transcripcional. A) La presencia de YAP en el núcleo es más

notoria en las células MDCK ZO-2 KD que en las parentales, especialmente en la condición de subconfluencia. Las células MDCK ZO-2 KD y parentales se sembraron a confluencia y subconfluencia, y la distribución de YAP se observó por inmunofluorescencia empleando un anticuerpo específico contra YAP. B) En las células ZO-2 KD, YAP se encuentra menos fosforilado en la Ser127 que en las células parentales. La inmunodetección en fase sólida se hizo empleando lisados de las células MDCK ZO-2 KD y parentales, y anticuerpos contra YAP2 y p-YAP S127. El anticuerpo anti actina se utilizó como control de carga. El análisis estadístico se hizo con la prueba de t de Student,  $*p < 0.05$ . C) La falta de ZO-2 aumenta la actividad de un promotor artificial regulado por 8 sitios de unión al factor de transcripción TEAD, mientras que la sobreexpresión de ZO-2 reprime la actividad del promotor. El ensayo de gen reportero se hizo al transfectar células MDCK parentales y ZO-2KD con 0.5  $\mu\text{g/pozo}$  (200  $\text{mm}^2$ ) de la construcción 8xGTIIC-Luc con o sin la co-transfección de 0.8  $\mu\text{g/pozo}$  de pTRE-hZO-2. D) La ausencia de ZO-2 aumenta la actividad del promotor de hCTGF, mientras que la co-transfección de ZO-2 reduce la actividad del promotor tanto en las células parentales como en las ZO-2 KD. Las células MDCK se transfectaron transitoriamente con hCTGF-Luc a una concentración de 0.5  $\mu\text{g/pozo}$  (200  $\text{mm}^2$ ) con o sin la co-transfección de pTRE-hZO-2 a una concentración de 0.8  $\mu\text{g/pozo}$ . E) ZO-2 disminuye la cantidad de ARNm de CTGF presente en las células MDCK. Para analizar la expresión del ARNm de CTGF por RT-qPCR, se aisló ARN total y se usaron sondas específicas. La expresión del ARNm de CTGF se normalizó con la de GAPDH. Las células parentales se transfectaron o no con 0.5  $\mu\text{g/pozo}$  de pTRE-hZO-2. F) En las células MDCK ZO-2 KD la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina es mayor que en las células parentales. El ensayo de gen reportero se hizo en las células MDCK parentales y ZO-2 KD empleando a la construcción reportera Topflash/Fopflash con y sin la co-transfección de la construcción pTRE-hZO-2. En C, D y F se hizo un análisis estadístico de variancia de una sola vía, seguido por una comparación múltiple de Bonferroni,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$ .

En el núcleo, YAP induce la producción del miR-29 que se une a la región 3' no traducida del ARNm de PTEN impidiendo su traducción [37]. Por ello analizamos si en las células ZO-2 KD, la acumulación de YAP en el núcleo, disminuye la cantidad de PTEN, ya que esto podría explicar la activación mTORC1 y el incremento en el tamaño de las células. Los resultados de los ensayos de la inmunodetección en fase sólida, que se muestran en la figura 23A, indican que en comparación con las células parentales, las células ZO-2 KD exhiben un 62% menos de PTEN, así como un incremento en la

fosforilación de Akt en los residuos de Ser473 y Thr308. Para probar experimentalmente la importancia de la intercomunicación entre YAP y la ruta PTEN/Akt/mTOR en el incremento del tamaño de las células ZO-2 KD, utilizamos un siRNA contra dicer, una ribonucleasa de la familia de la ARNasa III, crucial en la maduración de los miRNAs. La figura 23B (panel derecho) muestra que el tratamiento de las células ZO-2 KD con un siRNA contra dicer aumenta la expresión de PTEN. Posteriormente analizamos si al silenciar a dicer se reduce el tamaño de las células ZO-2 KD. En el histograma de la figura 23B (panel izquierdo) se observa que el tratamiento de las células ZO-2 KD con el siRNA contra dicer disminuye el tamaño celular a un valor similar al de las células parentales. Para explorar aún más el papel del microRNA en la disminución de PTEN y el aumento de tamaño observado en las células ZO-2 KD, transfectamos a estas células con PTEN y encontramos que no hay un aumento en el nivel de PTEN (Figura 23B) y que tampoco disminuye su tamaño (Figura 23B panel derecho). Sin embargo, cuando se co-transfecta a las células ZO-2 KD con PTEN y al siRNA contra dicer, la expresión de PTEN es similar al valor que presentan las células parentales. Estos resultados, están en concordancia con la evidencia que muestra que PTEN disminuye por acción del miRNA-29 en las células que sobre-expresan a YAP [37]. Además, indican que el aumento del tamaño en las células que no expresan a ZO-2 se debe a que la acumulación nuclear de YAP activa a la ruta Akt/mTOR a través de un microRNA que inhibe la traducción de PTEN.

Como se sabe que el gen *Pik3cb*, que codifica para la subunidad catalítica p110 de la PI3K, es un blanco transcripcional directo de YAP [39] y nosotros observamos que la cantidad de PTEN disminuye en las células ZO-2 KD, exploramos el contenido de PIP<sub>3</sub> de las células MDCK ZO-2 KD. La figura 23C, muestra que las células MDCK ZO-2 KD tienen 78% más PIP<sub>3</sub> que las células parentales.

En resumen, nuestros resultados indican que la ausencia de ZO-2 estimula la actividad transcripcional de YAP lo que conduce a un aumento en la concentración de PIP<sub>3</sub> y a la subsecuente activación de la ruta Akt/mTOR, que genera un aumento del tamaño celular.

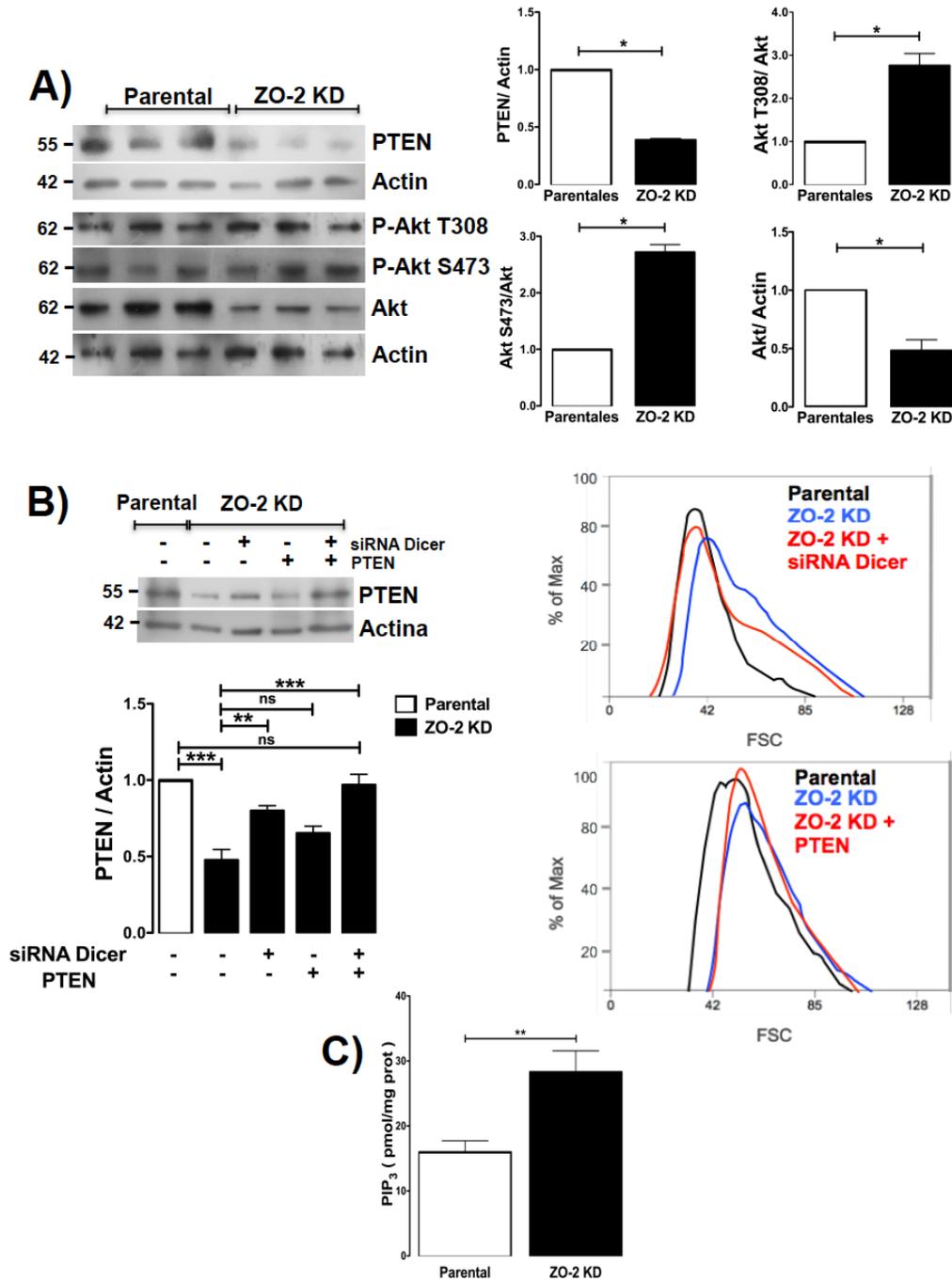


Figura 23. La ausencia de ZO-2 estimula la comunicación entre las rutas de señalización Hippo y mTOR. A) Las células MDCK exhiben una menor cantidad de PTEN y Akt que las células parentales, y en cambio muestran un aumento en la fosforilación de Akt en la Ser473 y la Thr308. Izquierda, inmunodetección en fase sólida representativa de tres experimentos independientes hechos con anticuerpos específicos anti PTEN, Akt, pAkt-T308 y pAkt-S473. Derecha, análisis densitométrico. La estadística se hizo con la prueba t de Student donde  $*p < 0.05$ . B) La intercomunicación entre las vías Hippo y mTOR se regula por un miRNA. En el panel superior izquierdo se observa que la expresión de PTEN se recupera al silenciar a dicer y transfectar a PTEN

y no con la sola transfección de PTEN. En el panel inferior izquierdo se muestra la densitometría. La estadística se hizo con un análisis de varianza de una sola vía seguido de una comparación múltiple de Bonferroni  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ . En el panel superior derecho, se observa el tamaño celular por citometría de flujo. La transfección de PTEN no revierte el aumento observado. El tratamiento con un siRNA contra *Dicer* seguido de la transfección de PTEN revierte el aumento en el tamaño (panel inferior derecho). C) En las células MDCK ZO-2 KD la cantidad de PIP<sub>3</sub> es mayor que en las parentales. El PIP<sub>3</sub> se midió en las células MDCK ZO-2 KD y parentales usando un ensayo competitivo de ELISA. Resultado de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student  $**p<0.01$

### **5.5 En la hipertrofia renal compensatoria la expresión de ZO-2 se apaga mientras que la proteína YAP se concentra en el núcleo de las células renales**

Nuestros resultados muestran que la ausencia de ZO-2 induce un incremento en el tamaño celular debido a la acumulación de YAP en el núcleo y a la subsecuente activación de la ruta mTOR. Para confirmar estos resultados en un sistema *in vivo*, estudiamos la expresión de ZO-2 y YAP en el modelo de hipertrofia inducida por UNX. Escogimos este sistema porque se ha demostrado que la remoción unilateral de un riñón induce hipertrofia compensatoria en el riñón remanente, que sirve para restaurar la función normal del riñón y que se manifiesta con un aumento en el tamaño de las células renales [129]. La figura 24A muestra el incremento en el tamaño del riñón remanente proveniente de una rata de 11 semanas de edad, 3 semanas después de la UNX, en comparación con el riñón de una rata control de 11 semanas de edad. Adicionalmente, la tabla 2 muestra el incremento de peso de los riñones remanentes, 1, 2 y 3 semanas después de la UNX, en comparación con el peso de los riñones removidos. Enseguida, confirmamos por microscopía confocal, en ratas de 11 semanas de edad, el incremento en el tamaño de los túbulos renales en los riñones remanentes después de 3 semanas de la UNX en comparación con los riñones control de ratas de 11 semanas de edad. En la figura 24B, para facilitar la observación del incremento de tamaño de las células de los túbulos proximales, se marcó el borde en cepillo de la superficie apical con un anticuerpo

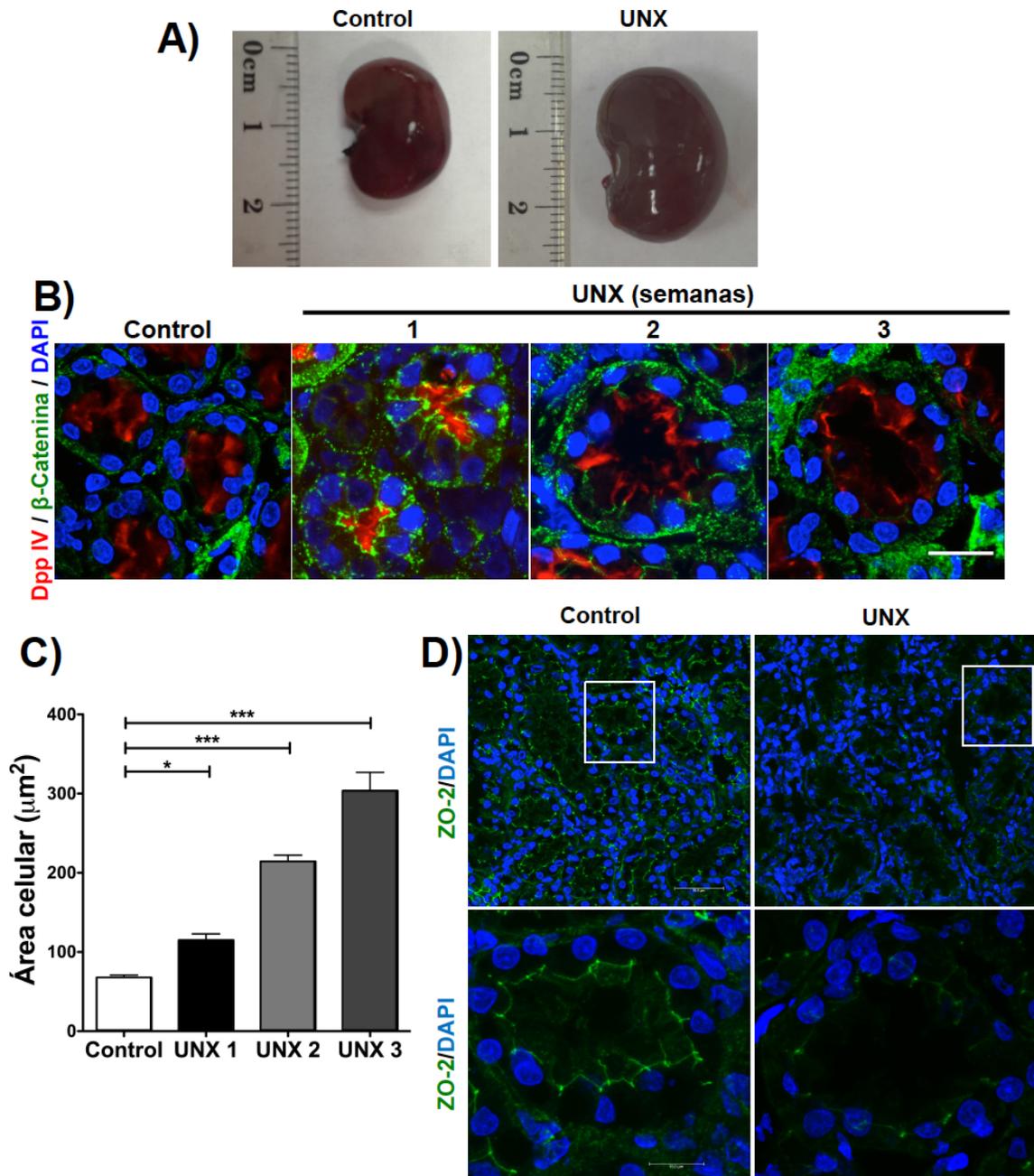
específico contra la peptidasa IV de dipeptidos (Dpp IV) [130] y a la membrana basolateral con un anticuerpo contra la  $\beta$ -catenina. La figura 24C muestra el incremento en el área de las células de los túbulos proximales en función del tiempo post-nefrectomía.

**Tabla 2. Peso de los riñones de rata antes y después de la UNX**

Peso del riñón removido (g)	Peso del riñón remanente (g)	
	Tiempo post-UNX (semanas)	Peso (g)
0.78±0.11 (n=10)	1	1.02±0.16 (n=10)
	2	1.46±0.06 ** (n=10)
	3	1.89±0.11 *** (n=10)

Análisis de varianza de una sola vía seguida de una prueba de Dunnett \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001

Una vez que confirmamos la hipertrofia de las células proximales del riñón remanente después de la UNX, exploramos si ésta se acompaña de cambios en la expresión de YAP y ZO-2. Observamos por medio de una inmunodetección en fase sólida, que la cantidad total de YAP (Figura 25A), así como la de YAP citosólica y nuclear (Figura 25B) presente en los homogenados del riñón remanente, aumenta con el tiempo después de la UNX y en comparación con la cantidad presente en los riñones derivados de ratas control de 11 semanas de edad. Así mismo observamos por inmunofluorescencia que en las ratas uninefrectomizadas, ZO-2 disminuye drásticamente tres semanas después de la UNX (Figura 24C).



**Figura 24. La uninefrectomía (UNX) aumenta el tamaño del riñón remanente.** A) Imagen de riñones provenientes de ratas de 11 semanas de edad. Izquierda, riñón de un animal control; derecha, riñón proveniente de una rata donde el riñón contralateral se removió 3 semanas antes. B) Cortes de riñón de ratas de 11 semanas de edad en la condición control o que experimentaron una UNX en el riñón contralateral 3 semanas antes. El borde en cepillo de la membrana apical de los túbulos renales, se tiñó con un anticuerpo específico contra Dpp IV y la superficie basolateral se marcó con un anticuerpo anti  $\beta$ -catenina. C) Cuantificación del área de las células de los túbulos proximales de ratas de 11 semanas de edad, en la condición control o que experimentaron una UNX en el riñón contralateral 3 semanas antes. Se evaluó un mínimo de 53

células para cada condición. La estadística se realizó con un análisis de varianza y enseguida se hizo una prueba de Dunnett donde  $*p < 0.05$ ,  $*** p < 0.001$  D) La expresión de ZO-2 disminuye significativamente en los riñones remanentes después de la UNX. Los riñones provinieron de ratas control de 11 semanas de edad (control) o corresponden a los riñones remanentes de las ratas sometidas a una UNX tres semanas antes (UNX). Cortes congelados procesados por inmunofluorescencia con un anticuerpo contra ZO-2. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

En resumen, estos resultados indican que la hipertrofia renal compensatoria correlaciona con una disminución en la expresión de ZO-2 y un incremento en la expresión nuclear de YAP. Estas observaciones, junto con los resultados obtenidos en la línea epitelial renal MDCK, indican que ZO-2 tiene una función crucial como modulador del tamaño celular a través de la inhibición de la ruta Hippo y la relocalización de YAP en el núcleo que dispara la activación de mTORC1 y de su efector final, la cinasa S6K.

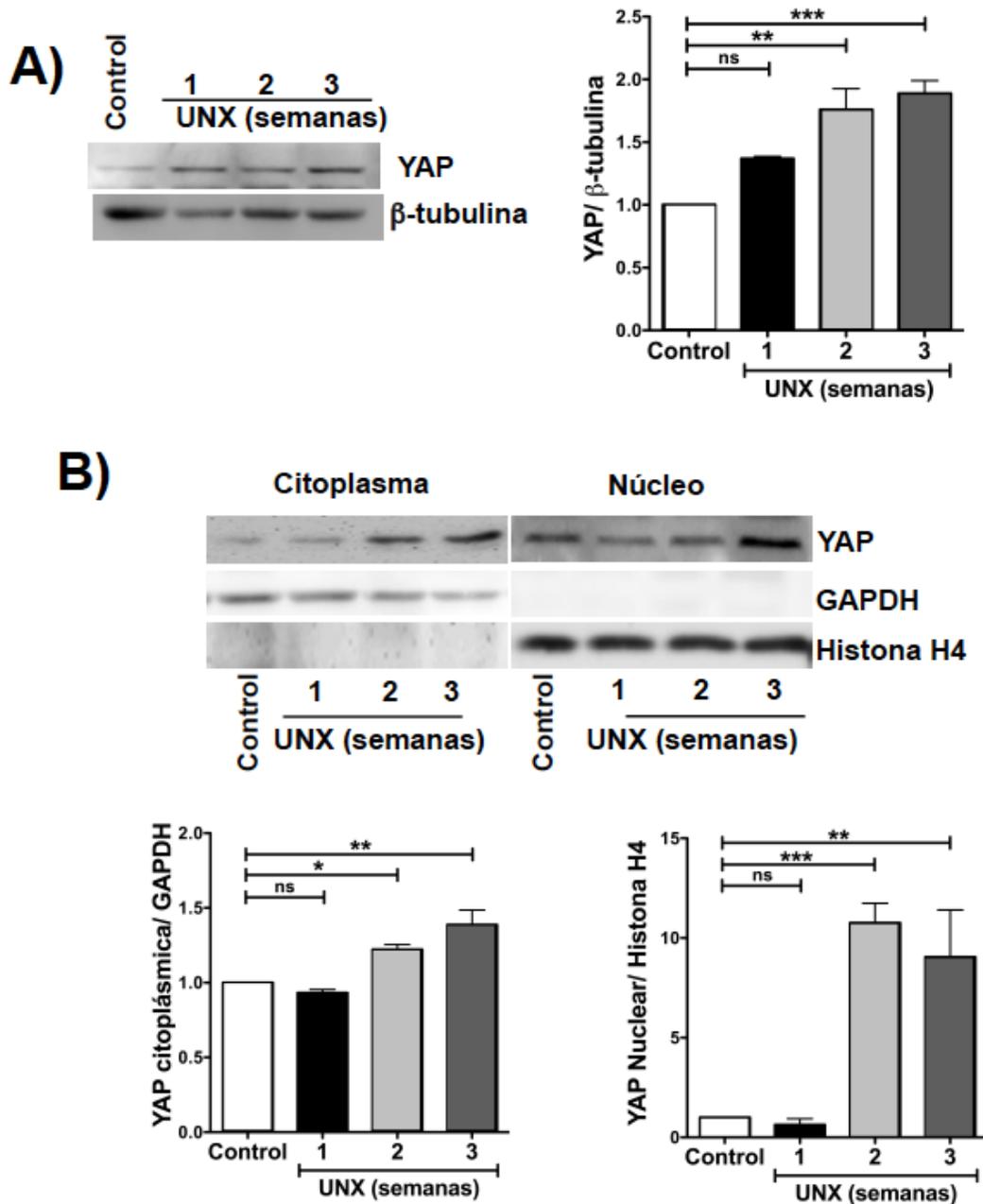


Figura 25. En un modelo *in vivo* de hipertrofia renal, la expresión de YAP aumenta y la proteína se concentra en el núcleo. Conforme avanza el tiempo después de la UNX, en el riñón remanente aumentan la cantidad total de YAP (A) y la fracción citosólica y nuclear de YAP (B). Los homogenados de riñón provinieron de ratas control de 11 semanas de edad (control); o de ratas en las que se removió el riñón contralateral a las 8 semanas de edad y el análisis se hizo 1, 2 o 3 semanas después de la UNX en el riñón remanente. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes y análisis densitométrico correspondiente. El análisis estadístico se hizo con la prueba Dunnett \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## V. Discusión

En este trabajo encontramos que el silenciamiento de la proteína ZO-2 de las UE induce un aumento en el tamaño celular. Este aumento se acompaña de un cociente de proteína/ADN significativamente mayor en las células ZO-2 KD que en las células parentales, lo que sugiere que la falta de ZO-2 induce un proceso de hipertrofia.

Se conocen dos mecanismos que inducen hipertrofia en las células renales: uno dependiente del ciclo celular y otro resultado del desequilibrio entre las tasas de síntesis y degradación de las proteínas. El primero postula que las células se hipertrofian si al salir de la fase G0 del ciclo celular, se inhibe su tránsito en algún punto de la fase G1 antes de entrar a la fase S. A este respecto, encontramos que la falta de ZO-2 aumenta la expresión de CD que en consecuencia, incrementa el tiempo que las células pasan en la fase G1 del ciclo celular. Estas observaciones revelan por primera vez que la falta de ZO-2 induce hipertrofia por un mecanismo dependiente del ciclo celular. El aumento en la expresión de la CD concuerda con datos previos de nuestro laboratorio que indican que la sobre expresión de ZO-2, en las células MDCK, disminuye el nivel de expresión de la ciclina D (CD), al inhibir la transcripción del gen de CD y promover la degradación de la proteína [102, 103]. Esto además concuerda con observaciones previas que muestran que la hipertrofia renal se induce por un desbalance en la activación de las ciclinas D vs E [11].

Con respecto al segundo mecanismo generador de hipertrofia, se ha observado que la amoniagénesis renal [124] o la exposición experimental de las células a compuestos como el  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , que alcalinizan a los lisosomas, inducen hipertrofia al reducir la degradación de proteínas [17]. En contraste, aquí analizamos si la ausencia de ZO-2 induce hipertrofia al promover la activación del complejo mTORC1, que aumenta la tasa de síntesis de proteínas al activar a la cinasa S6K1, que en *Drosophila* [24] y en mamíferos [25, 27] regula el tamaño celular. En este trabajo, encontramos una mayor fosforilación de S6K1 en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales, y mostramos que el tratamiento de las células ZO-2 KD con rapamicina o con un siRNA contra raptor revierte el incremento observado en el tamaño celular. Por lo tanto, concluimos que el incremento en la tasa de síntesis de proteínas ocasionado por la activación de mTORC1 y

su efector final, la cinasa S6K1, constituye el segundo mecanismo a través del cual se dispara la hipertrofia en las células ZO-2 KD.

Para comprender por qué la falta de ZO-2 activa a la ruta mTOR, analizamos a la vía de señalización Hippo, que regula río arriba a la ruta mTOR [37]. Observamos que en las células MDCK ZO-2 KD, YAP se encuentra menos fosforilada en la Ser127, que en las células parentales y que se acumula en el núcleo. Por lo tanto concluimos que la falta de ZO-2 inactiva a la ruta de señalización Hippo.

La proteína APC, que forma parte del complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina, facilita la interacción entre la cinasa LATS y su proteína adaptadora Sav activando así a la ruta Hippo. Esta función de APC depende de la cinasa GSK-3 $\beta$ , ya que la inhibición de la actividad de GSK-3 $\beta$  disminuye la fosforilación de LATS y en consecuencia se reduce la interacción LATS/YAP/APC [42]. Al respecto, observamos que en las células ZO-2 KD aumenta la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  en la Ser9. Esta observación sugiere que en ausencia de ZO-2 la fosforilación inhibitoria de GSK-3 $\beta$  aumenta, lo que reduce la fosforilación de YAP y favorece su acumulación nuclear.

Como YAP es un co-activador de los factores de transcripción TEAD, demostramos que en las células MDCK ZO-2 KD, en comparación con las células parentales, aumenta la actividad de un promotor artificial regulado por sitios de unión a TEAD, y la actividad del promotor de CTGF, un promotor natural regulado también por sitios TEAD. Así mismo observamos, que la sobre-expresión de ZO-2 abole la actividad de estos promotores y disminuye la cantidad de ARNm de CTGF en las células parentales, mientras que la ausencia de ZO-2 incrementa la cantidad de ARNm de CTGF. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la falta de ZO-2 facilita la actividad transcripcional de YAP, y muestran por primera vez que ZO-2 modula la transcripción mediada por sitios TEAD.

Por otro lado, YAP también se une a sitios AP-1 cercanos a sitios TEAD y forma un complejo que activa sinérgicamente la transcripción de genes. Por ejemplo, el promotor de CTGF tiene dos sitios AP-1 río arriba de los sitios TEAD, que en conjunto aumentan la actividad transcripcional de YAP [131]. Aquí, nosotros utilizamos un promotor de CTGF

que sólo tiene sitios TEAD y no AP-1 y mostramos que la actividad del promotor aumenta en las células ZO-2 KD y que la sobre-expresión de ZO-2 abole su actividad. Por lo tanto, nuestros datos indican que ZO-2 inhibe la actividad transcripcional de promotores con sitios TEAD de manera independiente a la regulación transcripcional por sitios AP-1. Al respecto cabe mencionar que previamente demostramos que ZO-2 inhibe la transcripción de genes reporteros regulados por sitios AP-1 [104].

En este trabajo, también demostramos que en las células MDCK ZO-2 KD la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina es mayor que en las células parentales. Como la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina tiene como consecuencia el encendido de genes que inducen la transformación de epitelio a mesénquima (para una revisión ver [132]), nuestros resultados podrían explicar por qué cuando la hipertrofia es excesiva, lleva al desarrollo de fibrosis [9, 10].

En el núcleo, YAP induce la expresión de miR-29, que inhibe la traducción de PTEN que es un regulador negativo de la ruta de señalización PI3K-Akt [133]. YAP también promueve la transcripción del gen *Pik3cb*, que codifica para la subunidad catalítica de la PI3K [39]. En las células MDCK ZO-2 KD observamos una disminución en la cantidad de PTEN que va acompañada de un incremento en la fosforilación de Akt en la Ser473 y la Thr308 como previamente se reportó que sucede cuando YAP se sobre-expresa. Adicionalmente, mostramos que esto correlaciona con un incremento significativo en la cantidad de PIP<sub>3</sub> en las células MDCK ZO-2 KD, y que la inhibición de la PI3K con LY294002 y de Akt con Akt VIII, así como el tratamiento con un siRNA contra dicer, revierten el incremento en el tamaño celular observado en las células MDCK ZO-2 KD. En conjunto estos datos nos permiten concluir que la ausencia de ZO-2 estimula la actividad transcripcional de YAP que resulta en la transactivación de la ruta de señalización Akt/mTOR que induce el incremento del tamaño celular.

La relación entre YAP y ZO-2 se había estudiado previamente, mostrando que la sobre-expresión de YAP incrementa la proliferación celular, mientras que ZO-2 inhibe este efecto [83]. Estos resultados coinciden con resultados previos de nuestro laboratorio que muestran que la sobre-expresión de ZO-2 arresta a las células en la fase G0/G1 [103].

En esta tesis no observamos un cambio en la proliferación de las células ZO-2 KD en cambio, vimos que las células progresan en el ciclo celular con un retraso en la entrada a la fase S. Se sabe que ZO-2 se asocia a YAP a través de su primer dominio PDZ, facilitando así la entrada de YAP al núcleo [83]. Aquí observamos que la ausencia de ZO-2 promueve la localización nuclear de YAP, por lo que podemos concluir que la interacción ZO-2/YAP no es fundamental para que YAP viaje al núcleo.

Para confirmar los resultados que señalan que la ausencia de ZO-2 promueve un incremento en el tamaño celular por la acumulación de YAP en el núcleo y la subsecuente activación de la ruta mTOR, estudiamos en un modelo *in vivo* de hipertrofia, la expresión de ZO-2 y YAP. Escogimos a la hipertrofia generada por UNX porque cumple con el criterio de inducir un incremento en el tamaño de las células, en la síntesis de ARNm y proteínas, y porque se acompaña de cambios mínimos en el número de células y en la replicación del ADN. Así mismo, seleccionamos a la UNX como modelo, porque en contraste con la hiperplasia observada en el hígado en regeneración [134], la hipertrofia renal induce la expresión de genes que se requieren para la síntesis de ribosomas [135], que como se dijo anteriormente, se inducen durante la activación del complejo mTORC1. Adicionalmente, se optó por el modelo de UNX porque en éste, el complejo mTORC1 [28] y la cinasa S6K1 [29] desempeñan un papel crítico en el desarrollo de la hipertrofia.

La UNX se hizo en ratas adultas de 8 semanas de edad, porque en ellas el contenido total de ADN sube sólo de manera marginal, mientras que en los animales neonatos, el crecimiento renal compensatorio que induce la UNX ocurre por hiperplasia [136]. Observamos, como esperábamos, un incremento en el tamaño y peso del riñón remanente, tres semanas después de la UNX, y notamos que estos cambios se acompañaron de un incremento en la expresión de YAP y de su relocalización en el núcleo, así como de una reducción en el nivel de ZO-2. Estas observaciones hechas en un modelo *in vivo*, confirman y resaltan el papel de ZO-2 como modulador del tamaño celular. Aunque la hipertrofia renal compensatoria surge como respuesta para restablecer la función renal tras la enfermedad o el daño experimental, también puede conducir, cuando es excesiva, a la fibrosis y a un decaimiento progresivo de la función renal [9] [10].

Por ello, nuestros resultados sugieren que ZO-2 podría emplearse como nuevo blanco terapéutico para regular la hipertrofia renal.

Aunque nuestros resultados muestran la importancia de YAP para el desarrollo de la hipertrofia renal, otros estudios revelan el papel crucial de YAP para la proliferación de los miocitos cardiacos. Por ejemplo, se ha visto que la expresión de YAP constitutivamente activa, en el corazón adulto, estimula la proliferación de los miocitos cardiacos y mejora la contracción del corazón después de un infarto al miocardio [137], y esto es suficiente para estimular la proliferación de los miocitos cardiacos en cultivo y en los corazones fetales o infantiles, sin generar crecimiento hipertrófico [138]. En cambio, la eliminación de YAP impide la regeneración del corazón neonatal [137] y disminuye la proliferación de los miocitos cardiacos [138]. Por lo tanto podemos concluir que los mecanismos a través de los cuales YAP regula el tamaño de los órganos varían dependiendo del tejido. Así, en el corazón YAP promueve la proliferación celular o hiperplasia, mientras que en el riñón, YAP induce un incremento en el tamaño celular o hipertrofia.

En resumen, los resultados del presente trabajo indican que la ausencia de ZO-2 aumenta el tamaño celular por dos mecanismos: un incremento en el nivel de CD que prolonga el tiempo que las células pasan en la fase G1 del ciclo celular, y la acumulación de YAP en el núcleo que promueve su actividad transcripcional e induce la transactivación de mTORC1 y de su efector final, la cinasa S6K1, que aumenta la síntesis de proteínas (Figura 25).

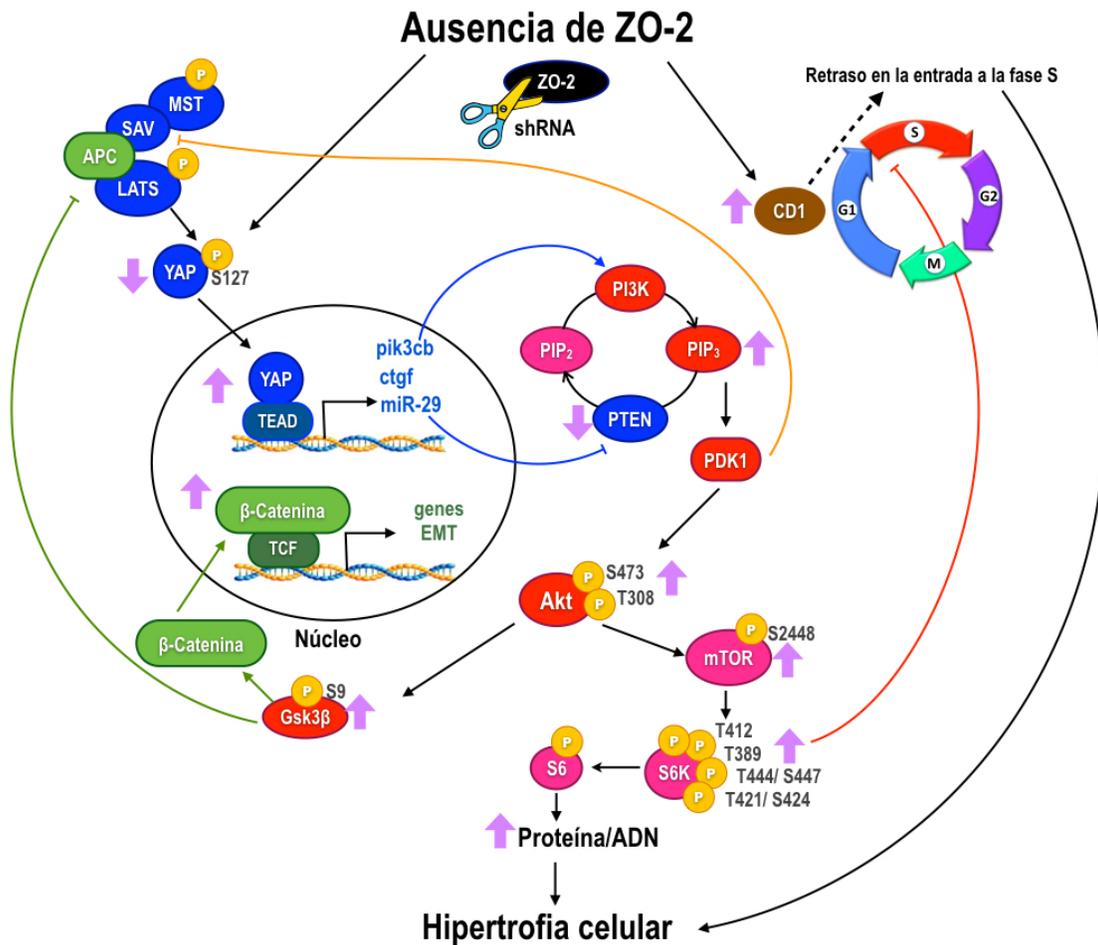


Figura 25. Esquema de los mecanismos por los que la falta de ZO-2 induce hipertrofia celular. La ausencia de ZO-2 induce un aumento en el tamaño celular por dos mecanismos: un incremento en el tiempo que las células pasan en la fase G1 del ciclo celular, y la acumulación de YAP en el núcleo que promueve su actividad transcripcional que induce la activación subsecuente de PI3K/Akt/mTORC1 y su blanco río abajo S6K1 que promueve la síntesis de proteínas. Las flechas moradas, indican los cambios observados en esta tesis, en las células MDCK ZO-2 KD; las líneas azules, señalan la transactivación de la ruta de señalización PI3K/AKT mediada por YAP; las líneas verdes, muestran la regulación de la  $\beta$ -catenina y la ruta Hippo a través de GSK-3 $\beta$ ; la línea roja indica la inhibición ejercida por S6K sobre la progresión del ciclo celular y la línea amarilla señala la inhibición de la ruta Hippo mediada por PDK1.

## VI. Referencias

1. Martin, L., C.A. Finn, and G. Trinder, *Hypertrophy and hyperplasia in the mouse uterus after oestrogen treatment: an autoradiographic study*. J Endocrinol, 1973. **56**(1): p. 133-44.
2. Shynlova, O., et al., *Myometrial apoptosis: activation of the caspase cascade in the pregnant rat myometrium at midgestation*. Biol Reprod, 2006. **74**(5): p. 839-49.
3. Shynlova, O., R. Kwong, and S.J. Lye, *Mechanical stretch regulates hypertrophic phenotype of the myometrium during pregnancy*. Reproduction, 2010. **139**(1): p. 247-53.
4. Staigmiller, R.B., N.L. First, and L.E. Casida, *Ovarian compensatory hypertrophy following unilateral ovariectomy in hysterectomized and early pregnant gilts*. J Anim Sci, 1972. **35**(4): p. 809-13.
5. Rathmacher, R.P., et al., *Compensatory ovarian function during pregnancy in the pig*. Endocrinology, 1967. **81**(3): p. 430-4.
6. Fine, L.G. and J. Norman, *Cellular events in renal hypertrophy*. Annu Rev Physiol, 1989. **51**: p. 19-32.
7. Hayslett, J.P., M. Kashgarian, and F.H. Epstein, *Functional correlates of compensatory renal hypertrophy*. J Clin Invest, 1968. **47**(4): p. 774-99.
8. Fine, L.G.N., J.; Kujubu, D.; Knecht, A., *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. 2nd ed, ed. D.W. Seldin. 1992.
9. Fogo, A. and I. Ichikawa, *Evidence for a pathogenic linkage between glomerular hypertrophy and sclerosis*. Am J Kidney Dis, 1991. **17**(6): p. 666-9.
10. Hostetter, T.H., *Progression of renal disease and renal hypertrophy*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 263-78.
11. Liu, B. and P.A. Preisig, *Compensatory renal hypertrophy is mediated by a cell cycle-dependent mechanism*. Kidney Int, 2002. **62**(5): p. 1650-8.
12. Liu, B. and P. Preisig, *TGF-beta1-mediated hypertrophy involves inhibiting pRB phosphorylation by blocking activation of cyclin E kinase*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 2): p. F186-94.
13. Franch, H.A., et al., *Involvement of pRB family in TGF beta-dependent epithelial cell hypertrophy*. J Cell Biol, 1995. **129**(1): p. 245-54.
14. Wolf, G., et al., *Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1366-72.
15. Wolf, G., et al., *Angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells requires p27Kip1*. Kidney Int, 2003. **64**(1): p. 71-81.
16. Monkawa, T., et al., *The hypertrophic effect of transforming growth factor-beta is reduced in the absence of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21 and p27*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(5): p. 1172-8.

17. Ling, H., et al., *Role of lysosomal cathepsin activities in cell hypertrophy induced by NH<sub>4</sub>Cl in cultured renal proximal tubule cells*. J Am Soc Nephrol, 1996. **7**(1): p. 73-80.
18. Roussel, M.F., *The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer*. Oncogene, 1999. **18**(38): p. 5311-7.
19. Lloyd, R.V., et al., *p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers*. Am J Pathol, 1999. **154**(2): p. 313-23.
20. Fingar, D.C., et al., *Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E*. Genes Dev, 2002. **16**(12): p. 1472-87.
21. Dufner, A. and G. Thomas, *Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 100-9.
22. Jefferies, H.B., et al., *Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k*. EMBO J, 1997. **16**(12): p. 3693-704.
23. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *mTOR signaling to translation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2004. **279**: p. 169-97.
24. Montagne, J., et al., *Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size*. Science, 1999. **285**(5436): p. 2126-9.
25. Shima, H., et al., *Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase*. EMBO J, 1998. **17**(22): p. 6649-59.
26. Elghazi, L., et al., *Decreased IRS signaling impairs beta-cell cycle progression and survival in transgenic mice overexpressing S6K in beta-cells*. Diabetes, 2010. **59**(10): p. 2390-9.
27. Ohanna, M., et al., *Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(3): p. 286-94.
28. Chen, J.K., et al., *Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal hypertrophy*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(5): p. 1384-91.
29. Chen, J.K., et al., *S6 kinase 1 knockout inhibits uninephrectomy- or diabetes-induced renal hypertrophy*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **297**(3): p. F585-93.
30. Zhao, B., et al., *Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control*. Genes Dev, 2007. **21**(21): p. 2747-61.
31. Dong, J., et al., *Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals*. Cell, 2007. **130**(6): p. 1120-33.
32. Zhao, B., et al., *A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP)*. Genes Dev, 2010. **24**(1): p. 72-85.
33. Chen, L., et al., *Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the hippo pathway*. Genes Dev, 2010. **24**(3): p. 290-300.
34. Camargo, F.D., et al., *YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells*. Curr Biol, 2007. **17**(23): p. 2054-60.
35. Csibi, A. and J. Blenis, *Hippo-YAP and mTOR pathways collaborate to regulate organ size*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(12): p. 1244-5.

36. Tumaneng, K., R.C. Russell, and K.L. Guan, *Organ size control by Hippo and TOR pathways*. *Curr Biol*, 2012. **22**(9): p. R368-79.
37. Tumaneng, K., et al., *YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29*. *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(12): p. 1322-9.
38. Fan, R., N.G. Kim, and B.M. Gumbiner, *Regulation of Hippo pathway by mitogenic growth factors via phosphoinositide 3-kinase and phosphoinositide-dependent kinase-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(7): p. 2569-74.
39. Lin, Z., et al., *Pi3kcb links Hippo-YAP and PI3K-AKT signaling pathways to promote cardiomyocyte proliferation and survival*. *Circ Res*, 2015. **116**(1): p. 35-45.
40. Barker, N. and H. Clevers, *Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(12): p. 997-1014.
41. Azzolin, L., et al., *YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response*. *Cell*, 2014. **158**(1): p. 157-70.
42. Markowitz, S.D. and M.M. Bertagnolli, *Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(25): p. 2449-60.
43. Cai, J., et al., *beta-Catenin destruction complex-independent regulation of Hippo-YAP signaling by APC in intestinal tumorigenesis*. *Genes Dev*, 2015. **29**(14): p. 1493-506.
44. Wang, Y., et al., *Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis of non-small-cell lung cancer*. *Cancer Sci*, 2010. **101**(5): p. 1279-85.
45. Avruch, J., D. Zhou, and N. Bardeesy, *YAP oncogene overexpression supercharges colon cancer proliferation*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(6): p. 1090-6.
46. Hergovich, A., *YAP-Hippo signalling downstream of leukemia inhibitory factor receptor: implications for breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2012. **14**(6): p. 326.
47. Hall, C.A., et al., *Hippo pathway effector Yap is an ovarian cancer oncogene*. *Cancer Res*, 2010. **70**(21): p. 8517-25.
48. Kang, W., et al., *Yes-associated protein 1 exhibits oncogenic property in gastric cancer and its nuclear accumulation associates with poor prognosis*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(8): p. 2130-9.
49. Lee, K.P., et al., *The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(18): p. 8248-53.
50. Overholtzer, M., et al., *Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(33): p. 12405-10.
51. Muramatsu, T., et al., *YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous cell carcinoma*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(3): p. 389-98.
52. Fernandez, L.A., et al., *YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation*. *Genes Dev*, 2009. **23**(23): p. 2729-41.

53. He, C., et al., *The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression*. EMBO Mol Med, 2015. **7**(11): p. 1426-49.
54. Farquhar, M.G. and G.E. Palade, *Junctional complexes in various epithelia*. J Cell Biol, 1963. **17**: p. 375-412.
55. Chalcraft, J.P. and S. Bullivant, *An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze-fracture replicas of both sides of the fracture*. J Cell Biol, 1970. **47**(1): p. 49-60.
56. Staehelin, L.A., *Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions*. J Cell Sci, 1973. **13**(3): p. 763-86.
57. Staehelin, L.A., *Structure and function of intercellular junctions*. Int Rev Cytol, 1974. **39**: p. 191-283.
58. van Deurs, B. and J.K. Koehler, *Tight junctions in the choroid plexus epithelium. A freeze-fracture study including complementary replicas*. J Cell Biol, 1979. **80**(3): p. 662-73.
59. Gumbiner, B., *Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions*. Am J Physiol, 1987. **253**(6 Pt 1): p. C749-58.
60. Cereijido, M., et al., *The making of a tight junction*. J Cell Sci Suppl, 1993. **17**: p. 127-32.
61. van Meer, G. and K. Simons, *The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells*. EMBO J, 1986. **5**(7): p. 1455-64.
62. Martin-Padura, I., et al., *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration*. J Cell Biol, 1998. **142**(1): p. 117-27.
63. Palmeri, D., et al., *Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(25): p. 19139-45.
64. Ebnet, K., et al., *The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 19): p. 3879-91.
65. Carson, S.D., et al., *Expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in cultured human umbilical vein endothelial cells: regulation in response to cell density*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 7077-9.
66. Cohen, C.J., et al., *The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15191-6.
67. Iwamoto, N., T. Higashi, and M. Furuse, *Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo*. Cell Struct Funct, 2014. **39**(1): p. 1-8.
68. Furuse, M., et al., *Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions*. J Cell Biol, 1993. **123**(6 Pt 2): p. 1777-88.

69. Ikenouchi, J., et al., *Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells*. J Cell Biol, 2005. **171**(6): p. 939-45.
70. Steed, E., et al., *Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family*. BMC Cell Biol, 2009. **10**: p. 95.
71. Gonzalez-Mariscal, L., et al., *Tight junction proteins*. Prog Biophys Mol Biol, 2003. **81**(1): p. 1-44.
72. Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, and A. Avila-Flores, *MAGUK proteins: structure and role in the tight junction*. Semin Cell Dev Biol, 2000. **11**(4): p. 315-24.
73. Bachmann, A., et al., *On the role of the MAGUK proteins encoded by Drosophila varicose during embryonic and postembryonic development*. BMC Dev Biol, 2008. **8**: p. 55.
74. Gumbiner, B., T. Lowenkopf, and D. Apatira, *Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3460-4.
75. Jesaitis, L.A. and D.A. Goodenough, *Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein*. J Cell Biol, 1994. **124**(6): p. 949-61.
76. Beatch, M., et al., *The tight junction protein ZO-2 contains three PDZ (PSD-95/Discs-Large/ZO-1) domains and an alternatively spliced region*. J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 25723-6.
77. Islas, S., et al., *Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells*. Exp Cell Res, 2002. **274**(1): p. 138-48.
78. Chamorro, D., et al., *Phosphorylation of zona occludens-2 by protein kinase C epsilon regulates its nuclear exportation*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(18): p. 4120-9.
79. Gonzalez-Mariscal, L., et al., *The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals*. Exp Cell Res, 2006. **312**(17): p. 3323-35.
80. Jaramillo, B.E., et al., *Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells*. Exp Cell Res, 2004. **297**(1): p. 247-58.
81. Itoh, M., et al., *Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins*. J Cell Biol, 1999. **147**(6): p. 1351-63.
82. Traweger, A., et al., *The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2692-700.
83. Oka, T., et al., *Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling*. Biochem J, 2010. **432**(3): p. 461-72.
84. Remue, E., et al., *TAZ interacts with zonula occludens-1 and -2 proteins in a PDZ-1 dependent manner*. FEBS Lett, 2010. **584**(19): p. 4175-80.
85. Li, X., S. Lu, and J.I. Nagy, *Direct association of connexin36 with zonula occludens-2 and zonula occludens-3*. Neurochem Int, 2009. **54**(5-6): p. 393-402.

86. Wittchen, E.S., J. Haskins, and B.R. Stevenson, *Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3.* J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 35179-85.
87. Meerschaert, K., et al., *The PDZ2 domain of zonula occludens-1 and -2 is a phosphoinositide binding domain.* Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(24): p. 3951-66.
88. Singh, D., et al., *Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner.* J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30416-21.
89. Lechuga, S., et al., *Identification of ZASP, a novel protein associated to Zona occludens-2.* Exp Cell Res, 2010. **316**(19): p. 3124-39.
90. Mattagajasingh, S.N., et al., *Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton.* J Biol Chem, 2000. **275**(39): p. 30573-85.
91. Itoh, M., K. Morita, and S. Tsukita, *Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin.* J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5981-6.
92. Talhouk, R.S., et al., *Heterocellular interaction enhances recruitment of alpha and beta-catenins and ZO-2 into functional gap-junction complexes and induces gap junction-dependant differentiation of mammary epithelial cells.* Exp Cell Res, 2008. **314**(18): p. 3275-91.
93. Cordenonsi, M., et al., *Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin.* J Cell Biol, 1999. **147**(7): p. 1569-82.
94. Avila-Flores, A., et al., *Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C.* Biochem J, 2001. **360**(Pt 2): p. 295-304.
95. Saito, K., et al., *Proteomic identification of ZO-1/2 as a novel scaffold for Src/Csk regulatory circuit.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **366**(4): p. 969-75.
96. Metais, J.Y., et al., *hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells.* FEBS Lett, 2005. **579**(17): p. 3725-30.
97. International Society on Oxygen Transport to Tissue. Meeting (39th : 2011 : Georgetown University) and W.J. Welch, *Oxygen transport to tissue XXXIV. Advances in experimental medicine and biology,*. 2013, New York: Springer. xxx, 385 p.
98. Quiros, M., et al., *The intracellular fate of zonula occludens 2 is regulated by the phosphorylation of SR repeats and the phosphorylation/O-GlcNAcylation of S257.* Mol Biol Cell, 2013. **24**(16): p. 2528-43.
99. Eckert, J.J. and T.P. Fleming, *Tight junction biogenesis during early development.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 717-28.
100. Xu, J., et al., *Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(5): p. 1669-78.
101. Xu, J., et al., *Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility.* Mol Biol Cell, 2009. **20**(20): p. 4268-77.

102. Huerta, M., et al., *Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(12): p. 4826-36.
103. Tapia, R., et al., *Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(3): p. 1102-17.
104. Betanzos, A., et al., *The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells*. Exp Cell Res, 2004. **292**(1): p. 51-66.
105. Umeda, K., et al., *ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation*. Cell, 2006. **126**(4): p. 741-54.
106. Medici, M., et al., *Identification of novel genetic Loci associated with thyroid peroxidase antibodies and clinical thyroid disease*. PLoS Genet, 2014. **10**(2): p. e1004123.
107. Kim, M.A., et al., *Genetic analysis of genes related to tight junction function in the Korean population with non-syndromic hearing loss*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95646.
108. Carlton, V.E., et al., *Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT*. Nat Genet, 2003. **34**(1): p. 91-6.
109. Sambrotta, M., et al., *Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease*. Nat Genet, 2014. **46**(4): p. 326-8.
110. Zhou, S., et al., *Hepatocellular carcinoma associated with tight-junction protein 2 deficiency*. Hepatology, 2015. **62**(6): p. 1914-6.
111. Van Itallie, C.M., et al., *ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(17): p. 3930-40.
112. Van Itallie, C.M., et al., *The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 3): p. 298-305.
113. Gonzalez-Mariscal, L., E. Garay, and M. Quiros, *Identification of claudins by western blot and immunofluorescence in different cell lines and tissues*. Methods Mol Biol, 2011. **762**: p. 213-31.
114. Agle, C.C., et al., *An image analysis method for the precise selection and quantitation of fluorescently labeled cellular constituents: application to the measurement of human muscle cells in culture*. J Histochem Cytochem, 2012. **60**(6): p. 428-38.
115. Gonzalez-Mariscal, L., et al., *Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells*. Am J Physiol, 1990. **259**(6 Pt 1): p. C978-86.
116. Dupont, S., et al., *Role of YAP/TAZ in mechanotransduction*. Nature, 2011. **474**(7350): p. 179-83.
117. Zhao, B., et al., *TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control*. Genes Dev, 2008. **22**(14): p. 1962-71.
118. Ames, B.N., *Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases*. In: *Methods in Enzymology. Complex Carbohydrates.*, ed. N.Y. Academic Press, NY. Vol. VIII. 1966. 115-118.

119. Jaramillo-Juarez, F., et al., *Acidosis and weight loss are induced by cyclosporin A in uninephrectomized rats*. *Pediatr Nephrol*, 2000. **14**(2): p. 122-7.
120. Fuentes-Mera, L., et al., *Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(16): p. 3023-35.
121. Hernandez, S., B. Chavez Munguia, and L. Gonzalez-Mariscal, *ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(8): p. 1533-47.
122. Fanning, A.S., C.M. Van Itallie, and J.M. Anderson, *Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia*. *Mol Biol Cell*, 2012. **23**(4): p. 577-90.
123. Gonzalez-Mariscal, L., et al., *The tight junction protein ZO-2 blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 expression*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1165**: p. 121-5.
124. Jurkowitz, C.T., et al., *Influence of ammonia and pH on protein and amino acid metabolism in LLC-PK1 cells*. *Kidney Int*, 1992. **42**(3): p. 595-601.
125. Rabkin, R. and D.C. Dahl, *Factors controlling intracellular protein turnover in the kidney*. *Semin Nephrol*, 1990. **10**(5): p. 472-80.
126. Copp, J., G. Manning, and T. Hunter, *TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2*. *Cancer Res*, 2009. **69**(5): p. 1821-7.
127. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. *Nature*, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
128. Li, L., et al., *A new triterpenoid saponin from Artemisia sphaerocephala*. *Nat Prod Res*, 2008. **22**(18): p. 1633-6.
129. Brenner, B.M. and F.C. Rector, *Brenner & Rector's the kidney*. 8th ed. 2008, Philadelphia: Saunders Elsevier.
130. Girardi, A.C., et al., *Association of Na(+)-H(+) exchanger isoform NHE3 and dipeptidyl peptidase IV in the renal proximal tubule*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(49): p. 46671-7.
131. Zanconato, F., et al., *Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth*. *Nat Cell Biol*, 2015. **17**(9): p. 1218-27.
132. Gonzalez, D.M. and D. Medici, *Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition*. *Sci Signal*, 2014. **7**(344): p. re8.
133. Smyth, A.W. and Gamgee John 1931-1894. [from old catalog], *Interpretations of the structure and function of the kidney*. 1880, New Orleans,: Printed at the Eureka book and job office. 22 p.
134. Friedman, J.M., E.Y. Chung, and J.E. Darnell, Jr., *Gene expression during liver regeneration*. *J Mol Biol*, 1984. **179**(1): p. 37-53.
135. Ouellette, A.J., *Messenger RNA in compensatory renal hypertrophy*. *Yale J Biol Med*, 1978. **51**(3): p. 413-8.

136. Celsi, G., B. Jakobsson, and A. Aperia, *Influence of age on compensatory renal growth in rats*. *Pediatr Res*, 1986. **20**(4): p. 347-50.
137. Xin, M., et al., *Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(34): p. 13839-44.
138. von Gise, A., et al., *YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(7): p. 2394-9.