

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

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica Y Neurociencias

**“ZO-2 se asocia a LATS, una cinasa de la vía Hippo
responsable de la fosforilación de YAP”**

T E S I S

Que presenta

LBM Laura González González

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias con Especialidad en Fisiología Celular y
Molecular**

Directora de la Tesis

Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel

Ciudad de México

Agosto, 2016

Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel profesora titular del laboratorio 29 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV y con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becaria de CONACYT No. 340209)

Agradecimientos

A la Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel por aceptarme en su equipo de trabajo y por darme la oportunidad de aprender de ella. Es un gran ejemplo de excelencia y pasión por la ciencia.

A la Dra. Martha Robles Flores y el Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño por su apoyo y dedicación en la revisión de esta tesis. Por las correcciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Alaide, Arturo, Christian, Elida, Gaby, Helios, Jael, Mario, Misael, Orlando y Perla. Por su apoyo y amistad.

A la Q.F.B María de Lourdes Alarcón Mortera y a la M. en C. Dolores Martín Tapia por el profesionalismo con el que hacen su trabajo y por el apoyo en el aprendizaje de las técnicas empleadas en el laboratorio y su amistad. Al Biol. Miguel Ángel Rojas Sierra por brindarme siempre a tiempo y en perfectas condiciones todo el material que necesito en mi trabajo. A Alicia Teudosio Díaz por su invaluable trabajo.

A mis compañeros de maestría, generación 2014-2016 por el compañerismo y el aprendizaje que tuve de cada uno de ustedes. En especial a Nicolás Aguirre, Luis Muñoz y Omar Fernández por su amistad

A mis padres

M.I.A Godofredo González Fuentes y Carmina González Rodríguez, por apoyarme incondicionalmente en todo lo que emprendo. Gracias por la confianza infinita que ponen en mí y por todo el amor con el que me educaron. Todo lo que soy y seré es por y para ustedes. Los amo.

A mis hermanos

Alberto y Andrea, por ser los mejores compañeros de vida. Gracias por hacer mi vida tan divertida y por siempre tener palabras de aliento para mí cuando las necesito.

A mis tíos y primos

Por todas las muestras de cariño y los buenos momentos. En especial a mi tío Juan Hernández, porque todos los días cumple su promesa.

A mis amigos

Por ser mi segunda familia y ayudarme a ser mejor persona. Alejandro Herrera, Saúl León, Hugo García y Eduardo Sánchez. A Pily Acevo, Angélica Luna y Cristina Muñoz, porque a pesar de la distancia, siempre están para mí cuando las necesito. A Mary Flores por ser incondicional, gracias por enseñarme el significado de amistad.

Índice

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 2 |
| Abstract..... | 3 |
| I) Introducción..... | 4 |
| 1) ZO-2..... | 6 |
| 1.1) Organización molecular de ZO-2..... | 6 |
| 1.2) Localización y tráfico intracelular de ZO-2..... | 7 |
| 1.3) Funciones de ZO-2..... | 8 |
| a) Función en la membrana..... | 8 |
| b) Función en el núcleo..... | 9 |
| c) Papel de ZO-2 en la regulación del tamaño celular..... | 10 |
| 2) Vía Hippo..... | 11 |
| II) Planteamiento del problema..... | 14 |
| III) Hipótesis..... | 14 |
| IV Objetivo general..... | 14 |
| 4.1 Objetivo particular..... | 14 |
| V Metodología..... | 15 |
| 5.1) Cultivo celular..... | 15 |
| 5.2) Inmunoprecipitación de ZO-2 y LATS..... | 15 |
| 5.3 Inmunodetección de proteínas..... | 15 |
| 5.4)Inmunofluorescencia..... | 16 |
| VI Resultados..... | 17 |
| 6.1) ZO-2 se asocia a la cinasa LATS | 17 |
| 6.2) En las células MDCK que carecen de ZO-2, el nivel de fosforilación de LATS no cambia..... | 17 |
| 6.3) ZO-2 no se asocia a MST..... | 18 |
| 6.4) La ausencia de ZO-2 no cambia la localización de <u>SAV</u> | 19 |
| 6.5) ZO-2 se asocia con APC..... | 19 |
| VII Discusión..... | 20 |
| VIII Perspectivas..... | 21 |
| IX Bibliografía..... | 22 |

Resumen

ZO-2 es una proteína de 160 kDa que conecta a las proteínas integrales de la unión estrecha (UE) con el citoesqueleto de actina y es crucial para la polimerización de las claudinas en filamentos de UE. ZO-2 tiene doble localización: en cultivos confluentes se ubica en la UE, mientras que en los cultivos subconfluentes esta presente también en los moteados nucleares. El silenciamiento de ZO-2 induce hipertrofia celular por la acumulación nuclear de YAP y su consecuente actividad transcripcional. YAP es la proteína efectora de la vía Hippo y cuando se fosforila en la serina127 por la cinasa LATS se convierte en blanco de la proteína 14.3.3, que la secuestra en el citoplasma inhibiendo así su ingreso al núcleo. El objetivo de esta tesis fue investigar que causa la acumulación de YAP en el núcleo cuando ZO-2 está ausente. Encontramos que ZO-2 se asocia a la cinasa LATS, un componente clave de la vía Hippo. Sin embargo, no observamos diferencia en la fosforilación de la cinasa LATS entre las células parentales y sin ZO-2 (ZO-2 KD). También, encontramos que ZO-2 no interactúa con la cinasa MST que fosforila a LATS, y que la ausencia de ZO-2 no altera la distribución de SAV, una proteína plataforma que se une a MST. Nuestros resultados por lo tanto sugieren que ZO-2 actúa como una plataforma en la porción final de la vía Hippo que facilita la interacción de la cinasa LATS con YAP.

Abstract

ZO-2 is a 160-kDa protein that links integral TJ proteins to the actin cytoskeleton and is crucial for the polymerization of claudins into TJ strands. ZO-2 has dual localization: in confluent cultures it is found at TJs, whereas in sparse cultures it is also present at the nuclei distributed in speckles. ZO-2 silencing triggers cell hypertrophy by inducing the nuclear accumulation of YAP and its transcriptional activity. YAP is the main target of Hippo pathway and when YAP is phosphorylated at serine127 by the kinase LATS, it is sequestered by protein 14.3.3 in the cytoplasm and can no longer move into the nucleus. The aim of this thesis has been to study what causes the accumulation of YAP at the nucleus when ZO-2 is absent. We found that ZO-2 associates with kinase LATS, a core component of the Hippo pathway. We did not find a difference in the phosphorylation status of LATS between parental and ZO-2 KD cells, and observed that ZO-2 does not bind kinase MST that phosphorylate LATS. In addition, we observed that the absence of ZO-2 had no effect on the localization of SAV, a scaffold protein that binds to MST. Our results hence suggest that ZO-2 acts as a platform downstream in the Hippo pathway facilitating LATS-YAP interaction.

I) Introducción

En los organismos multicelulares, los epitelios cubren al cuerpo, a las cavidades y los ductos y constituyen la barrera entre el individuo y el medio externo. Su función es proteger al organismo de microorganismos, toxinas, trauma mecánico, evitar la evaporación de agua y regular el intercambio de sustancias entre el contenido de las cavidades y ductos con los tejidos subyacentes. En las áreas con alto estrés mecánico o químico como la piel, el esófago, la córnea y la vagina, los epitelios son estratificados, mientras que en el resto del cuerpo se organizan en monocapas (González-Mariscal et al., 2012).

Las células epiteliales polarizan su membrana en dos regiones: apical y basolateral. En el límite apico-lateral se localiza el complejo de unión apical constituido por la unión adherente (UA) y la unión estrecha (UE). La UA establece los contactos iniciales célula-célula, mientras que la UE regula el tránsito de iones, moléculas y células a través de la ruta paracelular (Fanning and Anderson., 2009).

Las UE son estructuras de contacto célula-célula que se localizan en la porción superior de la membrana lateral, por encima de la UA. Mediante microscopía electrónica de transmisión, la UE se observa como un conjunto de puntos donde las membranas exoplásmicas de las células adyacentes parecen fusionarse (Farquhar and Palade, 1963). Por crío-fractura las UE se observan como una red de filamentos que rodea a las células por debajo de las microvellosidades apicales. Por inmunofluorescencia, las proteínas de la UE rodean el borde celular semejjando un patrón que asemeja a una malla de gallinero (Gonzalez-Mariscal et al., 2012).

Las UE tienen dos funciones canónicas: de compuerta y de cerca. La función de compuerta regula el paso de iones, moléculas y agua a través de la vía paracelular, y la de cerca restringe el movimiento de lípidos y proteínas en el plano de la membrana, entre los dominios apical y basal. Esta última función mantiene la polaridad de la membrana plasmática, lo que permite el tránsito vectorial de moléculas y iones a través de los epitelios (González-Mariscal et al., 2012). Las UE están constituidas por un complejo grupo de moléculas que incluye a proteínas integrales y periféricas. Las primeras establecen las interacciones que cierran el espacio intercelular y son responsables de la selectividad iónica paracelular (Gonzalez-Mariscal et al., 2014). Existen dos clases de proteínas integrales en la UE: las de cuatro dominios transmembranales o tetraspan y las de sólo uno. Las tetraspan incluyen a las claudinas, y a la familia TAMP que agrupa a ocludina, tricelulina y MarvelD3. Las que cruzan una sola vez la

membrana son las JAM y las angulinas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Estas proteínas no forman a los filamentos de la UE, pero son las primeras en arribar a los sitios donde se establecen las UE, por lo que se considera que actúan como marcadoras de sitio (González-Mariscal et al., 2012).

Las proteínas periféricas funcionan como un puente entre las proteínas integrales de la UE y el citoesqueleto de actina, y como plataformas citoplasmáticas que concentran en la UE a una gran variedad de proteínas de señalización (Gonzalez-Mariscal et al., 2014). La función de plataforma obedece a que estas proteínas poseen múltiples dominios de unión proteína-proteína, como los módulos PDZ, que establecen interacciones homotípicas con otros dominios PDZ y asociaciones heterotípicas con motivos específicos presentes en el extremo carboxilo terminal de algunas proteínas. Otros dominios de interacción proteína-proteína que poseen las proteínas periféricas de la UE son: los módulos SH3, guanilato cinasa (GK) y WW.

En la **figura 1** se muestra a las proteínas de la UE con dominios PDZ, entre las que se encuentran los miembros de la familia MAGUK (membrane associated guanylate kinase homologue), ZO-1, ZO-2, ZO-3 y Pals1, así como las MAGI (MAGUK invertidas), que poseen la mayoría de sus dominios PDZ orientados hacia la región carboxilo de la proteína y tienen en lugar de un dominio SH3 a un módulo WW. En la UE también se encuentran PATJ y MUPP1 que no pertenecen a las familias MAGUK o MAGI y se caracterizan por poseer 10 y 13 dominios PDZ respectivamente. Otras proteínas de la UE que no pertenecen a las familias antes mencionadas pero que tienen dominios PDZ son PAR-3, PAR-6 y AF-6 (González-Mariscal et al., 2012).

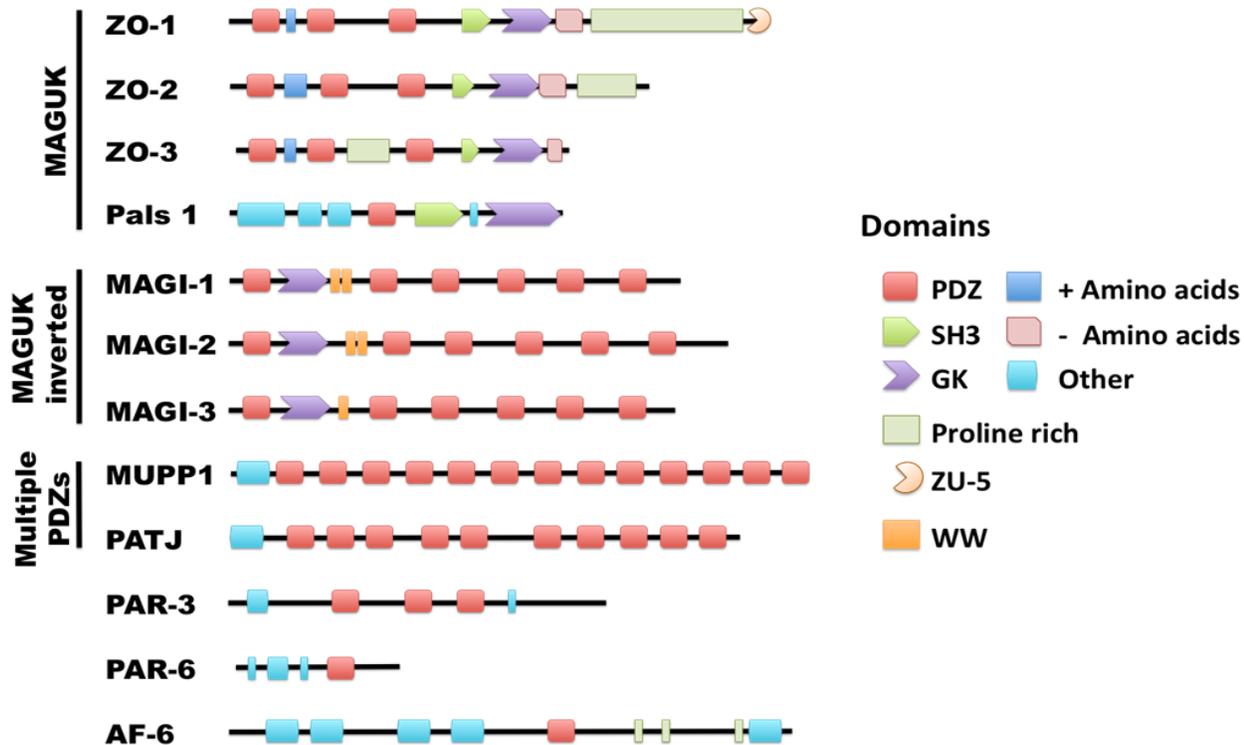


Figura 1. Representación esquemática de las proteínas periféricas de la UE con dominios PDZ. Las proteínas pertenecientes a la familia MAGUK contienen dominios PDZ, SH3 y GK. Las proteínas MAGI tienen una organización invertida y en vez de dominios SH3 tienen módulos WW. En la UE también se localizan proteínas con múltiples dominios PDZ tales como MUPP1 y PATJ (Imagen tomada de González-Mariscal et al., 2012).

1) ZO-2

ZO-2 (Zonula occludens 2) es una proteína de 160 kDa que se identificó inicialmente porque co-inmunoprecipita con ZO-1 en extractos de células MDCK (Gumbiner et al., 1991).

1.1) Organización molecular de ZO-2

En la porción amino de ZO-2 se localizan los 3 dominios PDZ; la sección media contiene a los dominios SH3 y GuK que forman un módulo que se pliega como bisagra; y en la región carboxilo se ubica un dominio ácido y otro rico en prolinas, que en conjunto constituyen una región de unión a actina (ABR). En el extremo carboxilo terminal se encuentra un motivo TEL de unión a dominios PDZ.

ZO-2 funciona como una plataforma que mantiene unidas a múltiples proteínas en las UE. Así, el primer dominio PDZ se asocia con las claudinas; el segundo a ZO-1, a otras moléculas de ZO-2, a conexina 43 y a las JAMs. La región SH3-GUK se asocia con la α catenina y la región

ABR se une a actina y cingulina. El motivo TEL se asocia a la proteína Scribble, un miembro del complejo de polaridad lateral (Quiros et al., 2013).

1.2) Localización y tráfico intracelular de ZO-2

En las células epiteliales la distribución de ZO-2 cambia de acuerdo al grado de confluencia del cultivo. Así, en los cultivos subconfluentes ZO-2 además de estar presente en los bordes celulares como ocurre en los cultivos confluentes, también se localiza en el núcleo (Islas et al., 2002). ZO-2 entra al núcleo al final de la fase G1 y sale de éste durante la fase M. Esto explica porqué ZO-2 no se encuentra en el núcleo de los cultivos confluentes y sólo se concentra en ellos en los cultivos subconfluentes en proliferación (Tapia et al., 2009).

ZO-2 excede el límite de tamaño para poder difundir pasivamente a través de los poros nucleares. Por ello, el tráfico intracelular de ZO-2 se basa en señales de localización (NLS) y exportación nuclear (NES). ZO-2 canina posee cuatro NES funcionales, dos localizadas en el PDZ-2 y el resto en el dominio GK (González-Mariscal et al., 2006).

ZO-2 tiene además dos NLS bipartitas (bNLS) y una monopartita, en la región U2 presente entre los dominios PDZ-1 y PDZ-2. Las NLS se basan en secuencias de cargas positivas dadas por los residuos R o K. Sin embargo, la bNLS-2 posee además tres residuos de serina (S257, S259 y S261) que al fosforilarse neutralizan las cargas positivas de la señal y retardan la importación de ZO-2 al núcleo (Quiros et al., 2013).

ZO-2 posee en la región U2 dieciséis repetidos de serina y arginina (SR) (Jaramillo et al., 2004), que son blancos potenciales de la cinasa SRPK, que se activa por AKT ante la presencia de factor de crecimiento epidérmico (EGF). La fosforilación de ZO-2 por SRPK induce la entrada de ZO-2 al núcleo y su acumulación en moteados (Quiros et al., 2013). La fosforilación en la S369 de la NES-1 por la PKCε activa a esta señal y permite la salida de ZO-2 del núcleo (Chamorro et al., 2009). Así mismo, la O-GlcNAcilación de la S257 en la bNLS-2 apaga esta señal y permite (Quiros et al., 2013) la exportación de ZO-2 del núcleo (**Figura 2**).

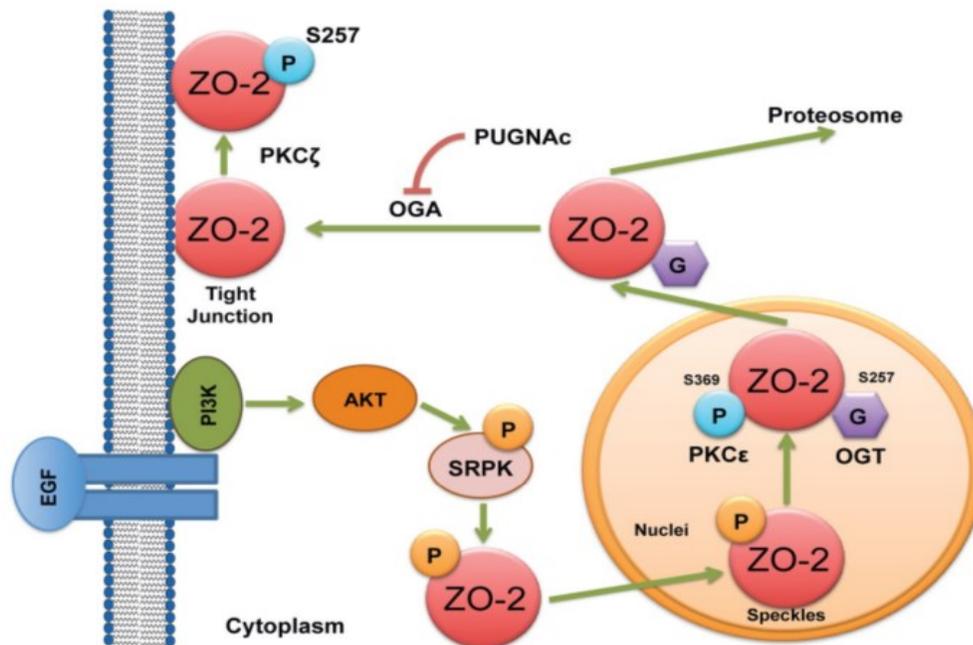


Figura 2. Modelo esquemático del tráfico intracelular de ZO-2. En los cultivos subconfluentes el EGF activa a AKT, que fosforila a la cinasa SRPK1. Esta enzima, fosforila a los residuos SR de ZO-2 induciendo la entrada de esta proteína al núcleo. La fosforilación de ZO-2 en el núcleo por la PKCε en la S369 ubicada en la NES-1 activa a esta señal, mientras que la O-GlcNAcilación en la S257 localizada en la bNLS-2 apaga a esta señal. En conjunto estos eventos permiten la exportación de ZO-2 del núcleo (Imagen tomada de Quiros et al., 2013).

1.3) Función de ZO-2

ZO-2 es una proteína plataforma con múltiples dominios de unión proteína-proteína. En la membrana celular ZO-2 se une a proteínas de la UE, la UA, la unión comunicante y del citoesqueleto; mientras que en el núcleo se asocia con diversos factores nucleares e inhibe la transcripción de genes. Por ello podemos decir que la función de ZO-2 depende de su localización.

a) Función en la membrana

En las células epiteliales donde la expresión de ZO-1 y ZO-2 se suprimió por recombinación homóloga y un ARN de interferencia (ZO-1 KO/ZO-2 KD) no se forman los filamentos de la UE. Por ello se concluye que ZO-2 y ZO-1 tienen un papel fundamental en la polimerización de las claudinas en filamentos de la UE. La función de ZO-1 y ZO-2 es redundante puesto que, la reintroducción de cualquiera de las dos proteínas provoca la reaparición de los filamentos de la UE (Umeda et al., 2006).

ZO-1 y ZO-2 son esenciales durante el desarrollo, pues los embriones KO de estas proteínas no son viables. Los embriones que carecen de ZO-1, mueren en la etapa embrionaria 10.5 y tienen alteraciones en la angiogénesis (Katsuno et al., 2008). Los ratones que carecen de ZO-2 mueren en la etapa 7.5 y manifiestan un aumento de la apoptosis y una disminución en la proliferación celular (Xu et al., 2008). Las quimeras de ZO-2, que se obtienen después de sustituir en blastocistos silvestres a las células silvestres de la masa celular interna, que darán origen al embrión por células KO son viables. Esto indica que ZO-2 no es crucial para el desarrollo del embrión, pero si es indispensable para el desarrollo del tejido extra-embriónico que proviene del trofoblasto. Sin embargo, los machos quimeras son infértiles porque la barrera hematotesticular no se sella, lo que indica que ZO-2 es indispensable y para la formación de las UE entre las células de Sertoli en el testículo (Xu et al., 2009).

Por otra parte, la hipercolanemia familiar (HCF) que se caracteriza por altas concentraciones séricas de ácidos biliares, picazón y mala absorción de grasas, se asocia con: 1) la sustitución de la valina⁴⁸ por alanina en el dominio PDZ-1 de ZO-2 y 2) una deficiente función de la coenzima A que cataliza la transformación de los ácidos biliares a sales biliares. La presencia de estas dos condiciones correlacionan con UE permeables en el hígado lo que ocasiona la fuga de los ácidos biliares a la sangre (Carlton et al., 2003).

La colestasis intrahepática familiar progresiva (CIFP) es una enfermedad que se caracteriza por una falla en la secreción de las sales biliares y otros componentes de la bilis que conduce a falla hepática, cirrosis o cáncer en los primeros años de vida (Jaquotot et al., 2013). En la CIFP, están presentes mutaciones puntuales en el gen de ZO-2 que hacen que este no se traduzca. La falta de ZO-2 impide la correcta localización de la claudina-1 en los bordes de los canalículos biliares. Así las UE no se sellan y la bilis se fuga hacia la superficie basolateral, dañando de manera irreversible a los hepatocitos.

b) Función en el núcleo

ZO-2 se localiza en los moteados nucleares, donde se asocia al factor esencial de procesamiento del pre-ARNm SC-35 (Islas et al., 2002), a las proteínas ZASP (Lechuga et al., 2010) y SAF-B (Traweger et al., 2003) y al PI- 4-5 bifosfato (Meerschaert et al., 2009). ZO-2 también se asocia con proteínas de la matriz nuclear como lamina B1 y actina (Jaramillo et al., 2004), y a los factores de transcripción Jun, Fos, C/EBP (Betanzos et al., 2004), c-myc (Huerta et al., 2007) y KyoT2 (Huang et al., 2002). En los cultivos subconfluentes los factores de

transcripción Jun, Fos y C/EBP se concentran en el núcleo, mientras que en las monocapas confluentes son abundantes en la membrana plasmática, donde se asocian a ZO-2. La retención de los factores de transcripción fuera del núcleo y en las UE es un mecanismo mediante el cual ZO-2 regula la transcripción de genes (Betanzos et al., 2004).

La sobreexpresión de ZO-2 inhibe la transcripción de genes reporteros bajo el control de promotores con sitios AP-1 (Betanzos et al., 2004) y la transcripción de la ciclina D1 (CD1) mediante la interacción con el factor de transcripción c-myc (Huerta et al., 2007) que reconoce a la caja E en el promotor de la CD1. La desacetilasa de histona 1 (HDAC1) coopera con ZO-2 y c-myc para reprimir la transcripción de la CD1 y la proteína ZASP bloquea la actividad inhibitoria de ZO-2 en el promotor de la CD1.

ZO-2 también bloquea la ruta Wnt, pues su sobreexpresión, reprime la transcripción de un gen reportero controlado por los sitios TCF/LEF, así como la transcripción de *axina1*, un gen blanco de la ruta Wnt (Tapia et al., 2009).

c) Papel de ZO-2 en la regulación del tamaño celular

En las células MDCK derivadas de riñón de perro, el silenciamiento de ZO-2 por un shRNA induce hipertrofia celular mediante dos mecanismos: 1) elevación del nivel de ciclina D1 que prolonga el tiempo que las células permanecen en la fase G1 del ciclo celular, y 2) aumento en la síntesis de proteínas, por la activación de la ruta mTORC1 en consecuencia de la acumulación nuclear de YAP, la proteína blanco de la vía Hippo (Domínguez et al., 2016).

En el núcleo, YAP induce la transcripción del miRNA29 que se une a la región 3'UTR de PTEN e inhibe su traducción (Tumameng et al., 2012). YAP también activa la transcripción del gen *Pik3cb*, que codifica para la subunidad catalítica p110 de PI3K (Lin et al., 2015). La disminución de la expresión de PTEN y el aumento de PI3K trae como consecuencia el aumento de PIP₃ que activa a la vía Akt/mTORC1 que fosforila a la cinasa S6K e induce un incremento en la síntesis de proteínas. La activación de la cinasa S6K provoca el aumento de p16 y p27, inhibidores de la progresión del ciclo celular, por lo que las células quedan arrestadas en la fase G1 (Elghazi, et al., 2010). La activación de Akt también incrementa la fosforilación inhibitoria de GSK-3 β que conduce a la acumulación nuclear de la β -catenina y promueve la expresión de genes relacionados con la transición epitelio mesénquima (TEM) (**Figura 3**).

2) Vía Hippo

La vía Hippo se definió por primera vez en *Drosophila melanogaster*, donde se observó que, la inactivación de los genes *Warts (WTS)*, *Hippo (Hpo)*, *Salvador (Sav)* y *Mats* generaba un fenotipo similar, caracterizado por el crecimiento excesivo de los tejidos. Posteriormente, se identificó a Yorkie (Yki) como el efector final de la vía Hippo que interactúa con el factor de transcripción *Scalloped (Sd)*. La vía Hippo se conserva en los mamíferos, siendo MST1/2 el ortólogo de Hpo; LATS1/2 (large tumor suppressor) los ortólogos de Wts; Mob1 el ortólogo de MOBKL1A, MOBKL1B y Mats; y YAP/TAZ los ortólogos de Yki (Yu and Guan, 2013).

Cuando la vía Hippo se activa, las cinasas MST1/2 y LATS1/2 se reclutan a la membrana plasmática por las proteínas plataforma SAV1 y NF2/Merlin respectivamente. Ahí MST1/2 fosforila a LATS1/2 (Yu and Guan, 2013), y LATS1/2 a su vez fosforila a YAP en la Ser127 (Zhao et al, 2007) para crear sitios de unión a 14.3.3 (Basu et al., 2003). Esto promueve la localización citoplasmática de YAP (Zhao et al., 2007) y su posterior fosforilación por la caseína cinasa (CK 1 δ/ϵ). Esto recluta a la ubiquitin ligasa *SCF E3* y conduce a la ubiquitinación y posterior degradación de YAP (Liu et al., 2010; Zhao et al., 2010). En cambio, cuando YAP no se fosforila, entra al núcleo, se une al factor de transcripción TEAD y promueve la transcripción de genes involucrados en la proliferación y el crecimiento. YAP/TAZ también interactúa con otros factores de transcripción como: Smad, Runx1/2, p73, ErbB4, Pax3 y TBX5 (Mo et al., 2014) **(Figura 4)**.

LATS también se regula a nivel transcripcional y es un gen blanco de YAP/TAZ. La regulación de LATS constituye un mecanismo de retroalimentación negativo para mantener la homeostasis de la vía hippo y prevenir la sobre activación de YAP y TAZ (Chen et al. 2015; Moroishi et al. 2015).

Por otra parte, también se sabe que la proteína APC que forma parte del complejo de destrucción de la β -catenina co-inmunoprecipita con la cinasa LATS y la proteína plataforma SAV1. Por ello se piensa que APC sirve como una plataforma que facilita la interacción entre estas proteínas y que promueve la activación de LATS y la fosforilación de YAP (Figura 5). Esta función se regula por GSK-3 β , pues la inhibición de GSK-3 β disminuye la fosforilación de LATS y YAP debido a una menor interacción física entre APC/SAV1 y LATS(Cai et al., 2015).

Se ha descrito que la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK1) se asocia con la proteína SAV. El tratamiento con EGF induce la disrupción del complejo SAV-PDK1 y del complejo de

cinastas de la vía Hippo y; por lo tanto, la inactivación de LATS y la acumulación nuclear de YAP (Fan et al., 2012).

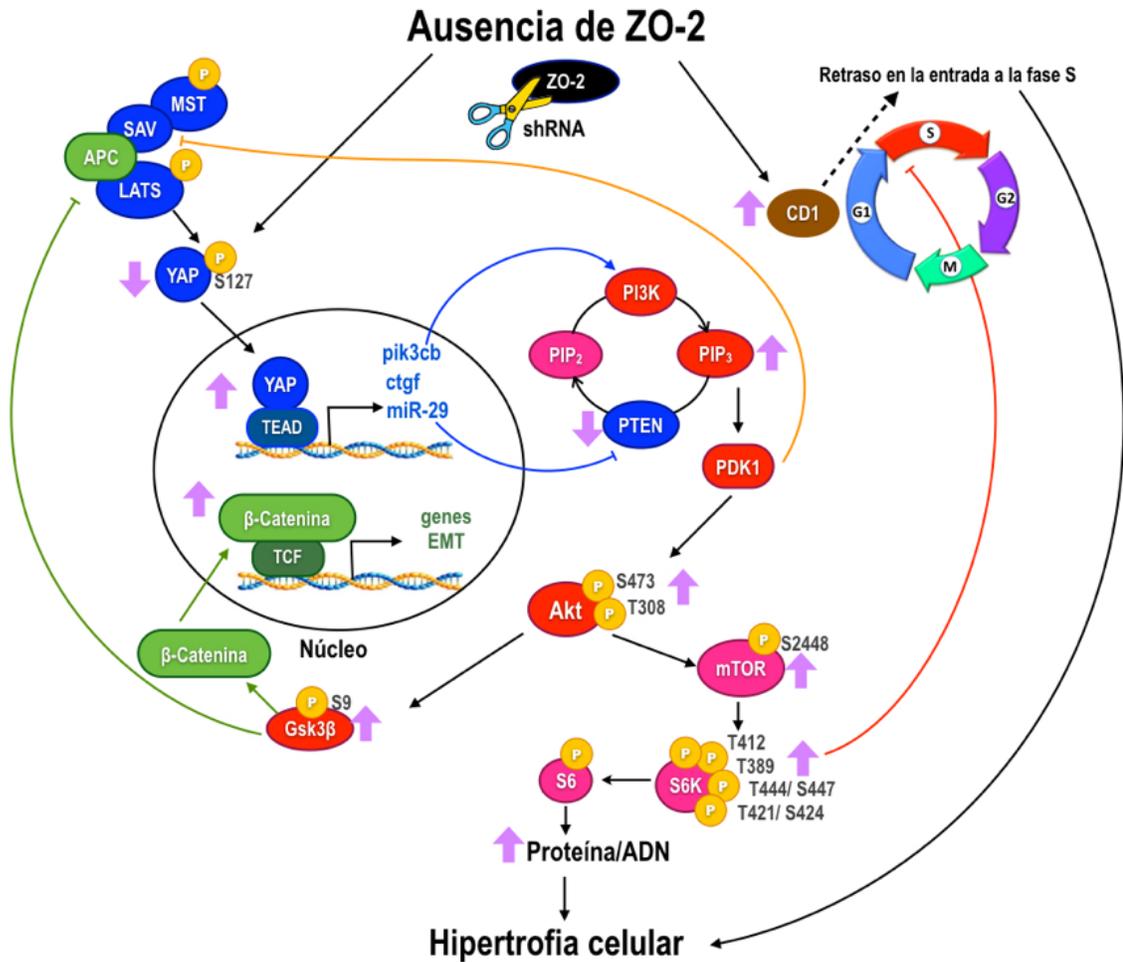


Figura 3. Esquema del mecanismo que induce hipertrofia celular por ausencia de ZO-2. La ausencia de ZO-2 induce hipertrofia por dos mecanismos: Incrementa el tiempo que las células pasan en la fase G1 del ciclo celular e induce la acumulación de YAP en el núcleo que promueve su actividad transcripcional y activa a la vía PI3K/Akt/mTORC1, lo que conduce a la fosforilación de S6K1 que incrementa la síntesis de proteínas y a su vez retrasa el tránsito de las células de la fase G1 a S. La fosforilación inhibitoria de GSK3β ocasionada por la activación de Akt, inhibe la formación del complejo SAV/APC/LATS1 en la vía Hippo y en consecuencia reduce la fosforilación de YAP y promueve su actividad transcripcional. Las flechas moradas, representan los cambios en las células MDCK en las que se silenció ZO-2; las líneas azules la conexión entre YAP y el complejo PI3K/Akt; con líneas verdes se señala la regulación de la actividad transcripcional de la β-catenina y la vía Hippo por GSK-3β; con líneas rojas se representa la inhibición de la progresión del ciclo celular por la S6K y en líneas amarillas la inhibición de SAV por la activación de PDK1 (Tomado de: Domínguez et al., 2016)

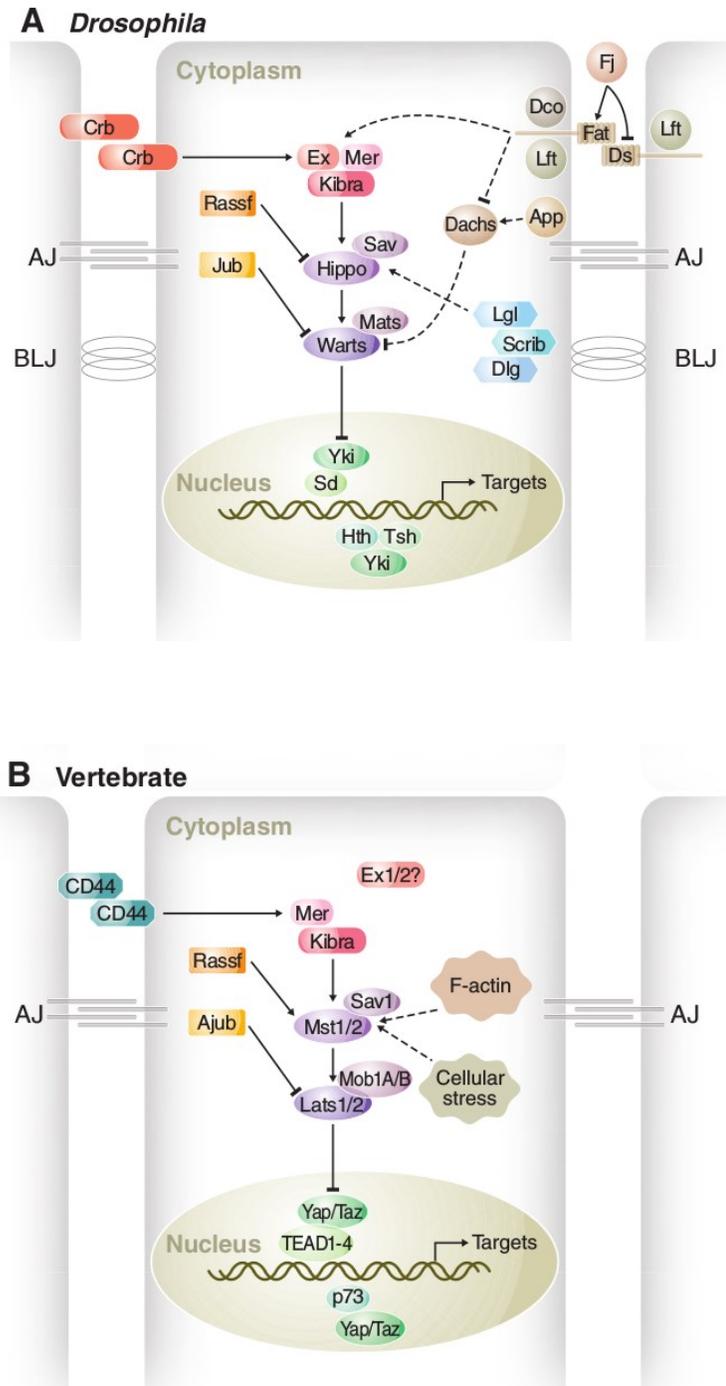


Figura 4. Modelo esquemático de la vía Hippo en *Drosophila* y los vertebrados. En este esquema los componentes de la vía Hippo en *Drosophila* (A) y los vertebrados (B) se muestran en varios colores. Las flechas y los guiones indican activación e inhibición respectivamente. Las líneas continuas representan a las interacciones conocidas y las líneas punteadas indican mecanismos aún no descritos (Imagen tomada de: Halder and Johnson., et al 2011).

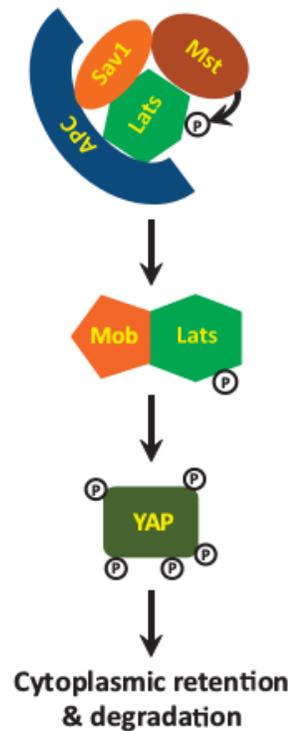


Figura 5. Modelo esquemático de la regulación de la vía Hippo por APC. APC interactúa físicamente con LATS y SAV. Así, funciona como una plataforma que facilita la fosforilación y activación de LATS por MST. LATS activa en complejo con Mob1 fosforila a YAP, lo que induce su retención en el citoplasma y su degradación (Tomado de: Cai et al., 2015).

II) Planteamiento del problema

El silenciamiento de ZO-2 induce hipertrofia celular mediada por la acumulación nuclear de YAP. APC es una proteína plataforma que facilita la interacción de LATS con MST y se requiere para que YAP fosforilada se secuestre en el citoplasma. En esta tesis se quiere averiguar si ZO-2 actúa como plataforma del complejo APC/LATS/SAV/MST y facilita la fosforilación de YAP por LATS.

III) Hipótesis

ZO-2 forma parte del complejo APC/LATS/SAV/MST que fosforila a YAP.

IV Objetivo general

Analizar si ZO-2 forma parte del complejo APC/LATS/SAV/MST que fosforila a YAP.

4.1 Objetivo particular

Analizar si ZO-2 co-inmunoprecipita con APC, LATS, SAV o MST.

V Metodología

5.1) Cultivo celular

Las células epiteliales de riñón de perro MDCK (Madin Darby canine kidney), se cultivaron en medio Dulbeco modificado por Eagle (DMEM) bajo en glucosa (31600-083, GibcoTM Invitrogen Corporation) complementado con 10% de suero bovino con hierro (10371-029, GibcoTM Invitrogen), 10000 U/ μ g/ml de solución de penicilina/estreptomicina (InVitro) y 1% de insulina. Las células MDCK parentales y KD fueron donadas por el Dr. Alan Fanning (Universidad de California del Norte, Chapel Hill, NC) y cultivadas de acuerdo a lo reportado anteriormente (Van Itallie et al., 2008).

5.2) Immunoprecipitación de ZO-2 y LATS

Para inmunoprecipitar a ZO-2 y LATS se lisaron las células MDCK con 80 μ l de solución amortiguadora RIPA (Tris 20mM, NaCl 137mM, NP-40 1%, y el inhibidor de proteasas). En seguida, el lisado celular se transfirió a tubos eppendorf y se pasó 8 veces a través de una jeringa de 1 ml. Después, los extractos celulares se centrifugaron a 13,000 rpms durante 20 minutos a 4°C, se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo eppendorf. Los extractos celulares se clarificaron con 5 μ l de perlas de proteína A-agarosa (No. catálogo 11134515001; Roche) por 30 minutos a 4°C. Después, los lisados se centrifugaron a 13,000 rpm durante 3 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a otros tubos eppendorf. En un tubo se agregó 1 μ l de anticuerpo anti ZO-2 (No. catálogo, 71-1400, Invitrogen. Camarillo, CA) o 1 μ l de anticuerpo anti LATS (No. catálogo, C66B5, Cell Signaling. Denver, MA) y a otro, considerado como control, se le añadió 1 μ l de suero preimmune. Los tubos se dejaron en agitación continua toda la noche a 4°C. Posteriormente, se agregaron a los tubos 10 μ l de perlas de proteína A-agarosa y se dejaron en agitación toda la noche a 4°C. En seguida, los tubos se centrifugaron a 13, 000 rpms por 3 minutos a 4° C y se descartó el sobrenadante. Las pastillas se diluyeron en solución amortiguadora de carga (150 mM Tris-Hcl; 5% SDS; glicerol 30% y 2-mercaptoetanol a pH:6.8). Los inmunoprecipitados se corrieron en geles de poliacrilamida en gradiente del 4% al 12% y se transfirieron a membranas de PVDF.

5.3) Inmunodetección de proteínas

La inmunodetección se realizó con anticuerpos policlonales contra: ZO-2 (No. de catálogo, 71-1400, dilución 1:1000, Invitrogen. Camarillo, CA); APC (Número de catálogo. MAB3785, dilución 1:100, MerckMillipore. Darmstadt, Alemania); LATS1(No. catálogo,

C66B5, dilución 1:1000, Cell Signaling. Denver, MA) y MST1/2 (No. catálogo B0667, dilución 1:500, AssaybyoTech. Sunnyvale, CA). Se utilizaron anticuerpos secundarios anti igGs de conejo y anti IgGs de ratón (número de catálogo, 62-6520, Invitrogen) acoplados a peroxidasa de rábano. Para revelar las membranas se empleó el sistema de quimioluminiscencia Immobilion Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore Corporation).

5.4) Inmunofluorescencia

Las monocapas sembradas sobre cubreobjetos de vidrio se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% por 30 minutos a 4°C y se permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 al 0.5% por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las monocapas se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon por 1 hora con albúmina de suero bovino libre de inmunoglobulinas (Ig) (Research Organics, 1331-A; Cleveland, OH) al 1% (p/v) en PBS. Las monocapas se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo de conejo anti-SAV (No. catálogo, 3507, dilución 1:50, Cell Signaling. Denver, MA). Después de 3 lavados con PBS, las monocapas se incubaron con el anticuerpo de burro anti-conejo acoplado a Alexa Fluor 488. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Sigma-Aldrich, DUO-82040; St. Lois, MO). Las observaciones se hicieron en un microscopio Leica SP8 TCS.

VI Resultados

6.1) ZO-2 se asocia a la cinasa LATS

Para investigar si ZO-2 interactúa con las proteínas de la ruta Hippo, se inmunoprecipitó a ZO-2 en las células MDCK y se inmunodetectó a la cinasa LATS. Como se observa en la **figura 6**, ZO-2 co-inmunoprecipita con LATS.

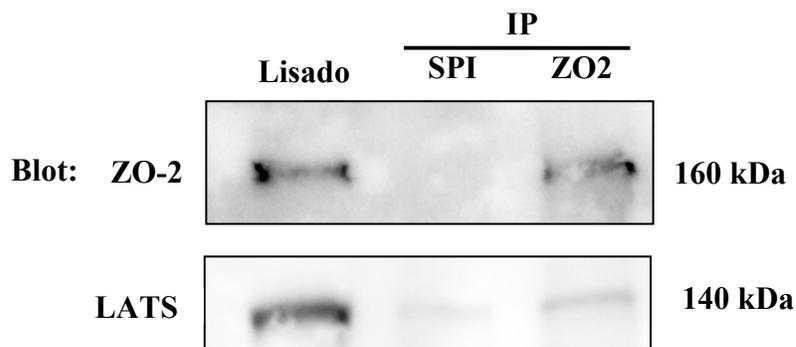


Figura 6. ZO-2 co-inmunoprecipita con LATS en las células MDCK. SPI, suero pre-inmune.

Para confirmar la interacción de ZO-2 con la cinasa LATS, en seguida se inmunoprecipitó a LATS y se inmunodetectó a ZO-2. Como se observa en la **figura 7**, LATS co-inmunoprecipita con ZO-2.

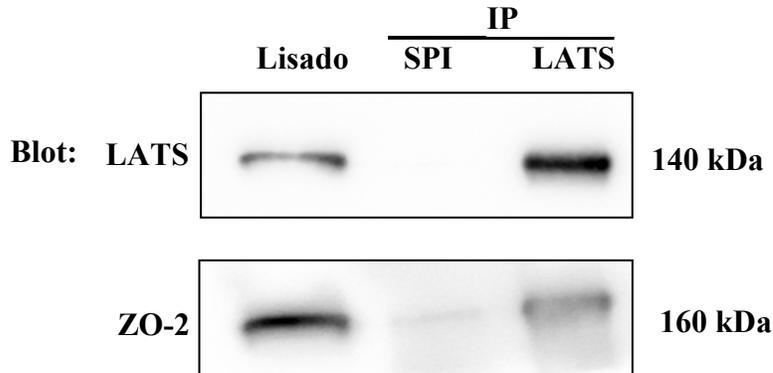


Figura 7. LATS co-inmunoprecipita con ZO-2 en las células MDCK. SPI, suero pre-inmune.

6.2) En las células MDCK que carecen de ZO-2, el nivel de fosforilación de LATS no cambia

Para estudiar si ZO-2 funciona como una proteína plataforma que favorece la fosforilación de LATS por la cinasa MST, se analizó la fosforilación de LATS mediante el sistema Phos-Tag. Este ensayo se basa en un SDS-PAGE en el cual, al gel de poliacrilamida se le añade 1,3-bis[bis(piridin-2-metil)amino]propan-2-olato dizinc. Este compuesto tiene una alta

afinidad por los grupos fosfato de las proteínas, de manera que en función de su grado de fosforilación retarda el corrimiento de las proteínas en los geles de acrilamida.

Como se observa en el panel izquierdo de la **figura 8**, no hay diferencia en la altura a la que aparece la banda de LATS entre las células MDCK parentales y las ZO-2 KD en un gel Phos-Tag al 10%. Como la fosforilación de LATS por la cinasa MST ocurre únicamente en el residuo Ser909, cabe la posibilidad de que el corrimiento de la banda sea muy leve y por lo tanto no se detecte en un gel al 10%. Por ello, repetimos el experimento en un gel Phos-Tag al 6%. Como se observa en el panel derecho de la **figura 8**, aún en este gel no se detecta un desplazamiento de la banda de LATS inducido por la ausencia de ZO-2.

Estos resultados por lo tanto, sugieren que ZO-2 funciona como una proteína plataforma que favorece la fosforilación de YAP por la cinasa LATS y no como un soporte o tarima que facilite la fosforilación de LATS por la cinasa MST.

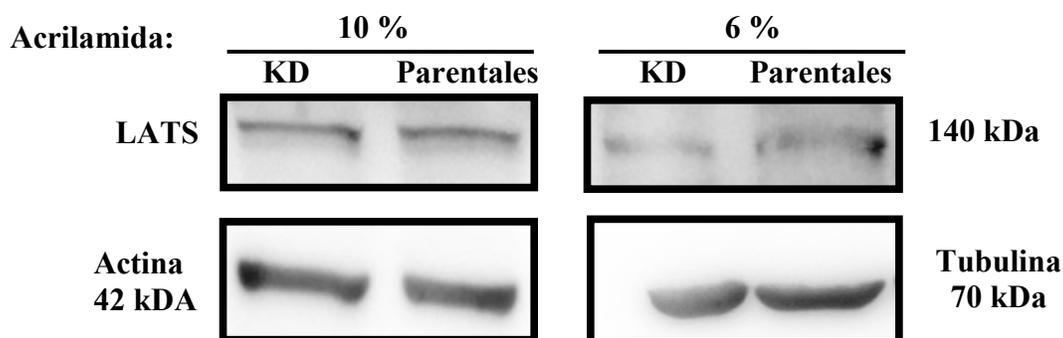


Figura 8. La fosforilación de LATS no cambia entre las células MDCK parentales y ZO-2 KD

6.3) ZO-2 no se asocia a MST

Ya que ZO-2 co-inmunoprecipita con LATS pero no modifica su nivel de fosforilación, hipotetizamos que no se asocia a la cinasa MST. Para probar esto, inmunoprecipitamos a ZO-2 e inmunodetectamos a la cinasa MST. Como se muestra en la **figura 9**, ZO-2 no co-inmunoprecipita con MST.

}

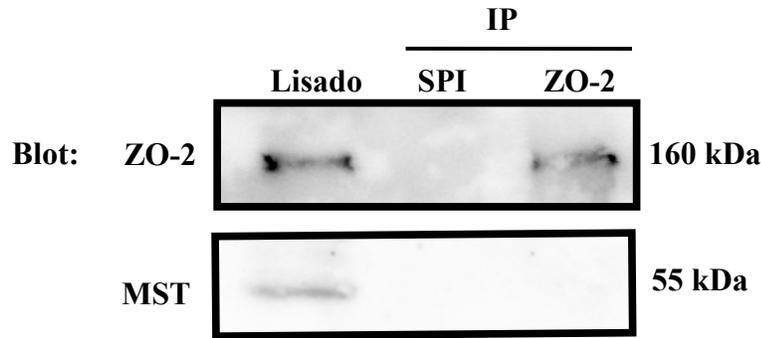


Figura 9. ZO-2 no coimmunoprecipita con MST. SPI, suero pre-inmune.

6.4) La ausencia de ZO-2 no cambia la localización de SAV

En seguida, se analizó si la ausencia de ZO-2 en las células MDCK induce la deslocalización de las proteínas de la ruta Hippo. En la **figura 10** se muestra que la distribución de SAV (verde) en el borde celular de las células MDCK no cambia ante la ausencia de ZO-2. Lo que corrobora que la ausencia de ZO-2 no afecta a las proteínas de la porción inicial de la ruta Hippo.

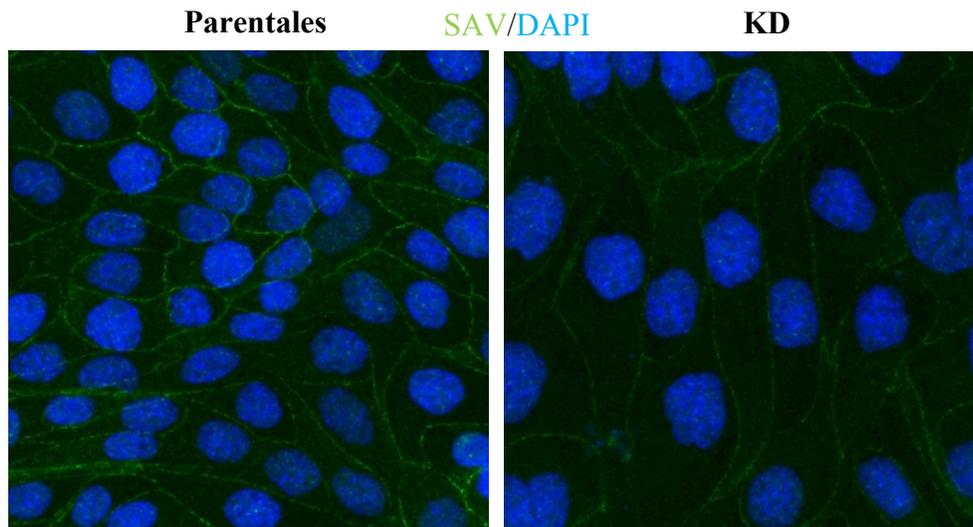


Figura 10. La distribución de SAV en el borde celular no cambia por la ausencia de ZO-2. Ensayo de inmunofluorescencia en las células MDCK parentales y ZO-2 KD. SAV se observa en verde y los núcleos se tiñeron en azul con DAPI.

6.5) ZO-2 se asocia con APC

APC es una proteína plataforma que participa tanto en la ruta Wnt como en la vía Hippo. En esta última se une a SAV y LATS, y favorece la interacción de la cinasa MST con su blanco LATS. Nosotros nos preguntamos si ZO-2 se asocia a APC y como se observa en la **figura 11**,

encontramos que APC coimmunoprecipita con ZO-2.

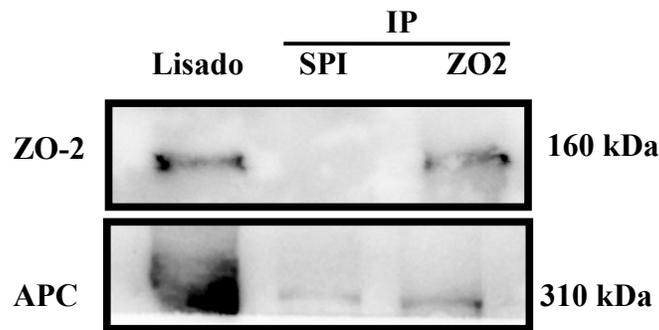


Figura 11. En las células MDCK ZO-2 co-inmunoprecipita con APC.

VII) Discusión

Previamente se demostró que el silenciamiento de ZO-2 induce hipertrofia celular mediada por la acumulación nuclear de YAP, la proteína efectora de la vía Hippo (Domínguez, et al., 2016). Sin embargo, se desconoce porque la ausencia de ZO-2 impide la fosforilación de YAP en la Ser127, que promueve la retención de YAP en el citoplasma por la proteína 14.3.3. Por esta razón, en este trabajo se estudió si ZO-2 funciona como una proteína plataforma que facilita la fosforilación de YAP por la cinasa LATS de la vía Hippo.

Mediante inmunoprecipitación se demostró que ZO-2 se asocia con la cinasa LATS, lo que sugiere que ZO-2 actúa como una proteína plataforma que favorece la interacción de la cinasa LATS con su blanco YAP.

Enseguida analizamos si ZO-2 también funciona como una proteína plataforma para la interacción de la cinasa MST con su blanco, la cinasa LATS. Para ello, utilizamos el sistema Phos-Tag, que permite comparar la fosforilación de las proteínas en función del retraso que se genera en el corrimiento de las bandas en los geles de poliacrilamida. Encontramos que la fosforilación de LATS no cambia en las células ZO-2 KD en comparación con las parentales, lo que sugiere que ZO-2 no funciona como plataforma río arriba en la ruta Hippo.

Como ZO-2 no ejerce efecto alguno sobre la fosforilación de LATS, esperábamos que, no se asociara a la cinasa MST y efectivamente, ZO-2 no co-inmunoprecipitó con MST. Este resultado confirma que ZO-2 no media la interacción MST-LATS.

En seguida exploramos si la presencia de ZO-2 es necesaria para la localización del complejo Hippo en el borde celular. Comenzamos este estudio analizando por inmunofluorescencia la localización de la proteína plataforma SAV. Esta proteína permite que

MST se localice en el borde celular. Nuestras observaciones de microscopía confocal muestran que SAV se localiza en el borde celular independientemente de la presencia de ZO-2. En conjunto estos resultados sugieren que ZO-2 actúa río abajo en la ruta Hippo como plataforma que facilita la interacción de LATS con YAP.

Se sabe que ZO-2 se une a YAP través de su primer dominio PDZ. Incluso, se ha sugerido que ZO-2 facilita la localización nuclear de YAP (Oka et al., 2010). Sin embargo los resultados recientes de nuestro laboratorio demuestran que en ausencia de ZO-2, YAP se acumula en el núcleo (Domínguez et al., 2016), lo que sugiere que existen otras proteínas capaces de facilitar la entrada de YAP al núcleo en ausencia de ZO-2. Tal vez éstas sean las otras proteínas ZO-1 y ZO-3.

Por otra parte, se sabe que la proteína APC, que participa en la vía Wnt canónica, funciona también como una plataforma en la ruta Hippo, ya que se une a las proteínas SAV y LATS, favoreciendo la interacción de MST con LATS. Por ello, en esta tesis exploramos si ZO-2 interactúa con APC. Por co-inmunoprecipitación demostramos que ZO-2 y APC interactúan. Este resultado además coincide con observaciones previas del estudiante doctoral Helios Gallego, que muestran mediante un ensayo de Duo-Link, la asociación entre APC y ZO-2.

En resumen, encontramos que ZO-2 funciona como una proteína plataforma a la que se asocian APC y LATS. Esto podría explicar porque en ausencia de ZO-2, YAP no se fosforila y se acumula en el núcleo, iniciando la transcripción de genes que conducen a la hipertrofia.

VIII) Perspectivas

Sabemos por la técnica de co-inmunoprecipitación que ZO-2 y LATS interactúan. En el futuro mediante la técnica de Duo-Link podríamos corroborar esta interacción y descubrir en que sitio ocurre.

APC funciona como plataforma para LATS, y ambas proteínas se asocian a ZO-2. Por ello, sería importante evaluar si la interacción entre APC y LATS así como su localización subcelular se mantiene en las células ZO-2-KD.

Sería también conveniente explorar si la interacción de LATS con YAP se pierde en ausencia de ZO-2.

IX) Bibliografía

Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M., and Downward, J.(2003). Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction 14.3.3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Molecular cell* 11, 11-23.

Betanzos, A., Huerta, M., Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J. And González-Mariscal L.(2004). The tight junction protein ZO-2 associates with Jun Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res*;292(1):51–66.

Cai, J., Maitra, A., Anders, R., Taketo, M and Pan D. (2015). β -Catenin destruction complex-independent regulation of Hippo-YAP signaling by APC in intestinal tumorigenesis. *GENES & DEVELOPMENT* 29:1493–1506.

Carlton, V., Harris, B., Puffenberger, E., Batta, A.K., Knisely, A.S., Robinson, L., Strauss, K., Shneider, B., Lim, W., Salen, G., Morton, H. and Bull, L. (2003). Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nature genetics*, 34: 91-96.

Chamorro, D. et al. (2009). Phosphorylation of zona occludens-2 by protein kinase C epsilon regulates its nuclear exportation. *Mol. Biol. Cell* 20, 4120–4129.

Chen Q, Zhang N, Xie R, Wang W, Cai J, Choi KS, David KK, Huang B, Yabuta N, Nojima H, et al. (2015). Homeostatic control of Hippo signaling activity revealed by an endogenous activating mutation in YAP. *Genes Dev* 29: 1285–1297.

Domínguez, A., Ávila, A., Ponce, A., López, E., Calderón, J.V., Reyes, J.L., Chávez, B., Segovia, J., Angulo, C., Ramírez, L., Gallego, H., Alarcón, L., Martín, D., Bautista, P. and Lorenza González-Mariscal. (2016). ZO-2 silencing induces renal hypertrophy through a cell cycle mechanism and the activation of YAP and the mTOR pathway. *MboC, Vol 27; 1581-1595*.

Fan, R., Kim, G.N and Gumbiner B. Regulation of Hippo pathway by mitogenic growth factors via phosphoinositide 3-kinase and phosphoinositide-dependent kinase-1. (2013). *PNAS, vol 110;2569–2574*.

Elghazi, L., Balcazar, N., Blandino-Rosano, M., Cras-Me'neur, C., Fatrai, S., Gould, A., Chi, M., Moley, K. Y Bernal-Mizrachi, E. (2010). Decreased IRS Signaling Impairs β -Cell Cycle Progression and Survival in Transgenic Mice Overexpressing S6K in β -Cells. *Diabetes*, 29; 2390-2399.

Fanning, A. S., and Anderson, J. M. (2009). Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165, 113–120.

Farquhar MG, Palade GE. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17:375–412.

González-Mariscal, L., Ponce, A., Alarcón, L., and Jaramillo, B. E. (2006). The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Exp. Cell Res.* 312, 3323–3335.

González-Mariscal, L., Quirós, M., Díaz-Coránguez, M., and Bautista, P. (2012). Tight Junctions. In: *Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology*, ed. P. S. Najman, InTech, 4–30.

Gonzalez-Mariscal, L. et al., (2014). Tight junctions and the regulation of gene expression. *Seminars in Cell and Developmental Biology*.

Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3460-3464.

Halder, G. and Johnson, R.L.(2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 138, 9-22.

Huang HY, et al. (2002). LIM protein KyoT2 interacts with human tight junction protein ZO-2-i3. *Yi Chuan Xue Bao*;29(11):953–8.

Huerta M, et al. (2007). Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Mol Biol Cell*;18(12):4826–36.

Islas, S., Vega, J., Ponce, L., and González-Mariscal, L. (2002). Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 274, 138–148.

Jaquotot, M., Casanova, L., Olveira, A., Castillo, P., Álvarez, L., Jara, P. and Gea, F. (2013). Clinical variability of mutations in the ABCB11 gene: A case report. *REV ESP ENFERM DIG.* Vol. 105, N.º 1, pp. 52-54, 2013

Jaramillo BE, et al. (2004) Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Exp Cell Res*;297(1):247–58.

Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., Tsukita, S and Tsukita S. (2008). Deficiency of Zonula Occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected Yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 19, 2465–2475.

Lechuga S, et al. Identification of ZASP, a novel protein associated to Zona occludens-2. (2010). *Exp Cell Res* ;316(19):3124–39.

Lin, Z., Zhou, P., von Gise, A., Gu, F., Ma, Q., Chen, J., Guo, H., van Gorp, P.R., Wang, D.Z., and Pu, W.T. (2015). Pi3kcb links Hippo-YAP and PI3K-AKT signaling pathways to promote cardiomyocyte proliferation and survival. *Circulation research* 116, 35- 45.

Liu CY, Zha ZY, Zhou X, Zhang H, Huang W, Zhao D, Li T, Chan SW, Lim CJ, Hong W, et al. (2010). The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF β -TrCP E3 ligase. *J Biol Chem* 285: 37159–37169.

- Meerschaert K, et al (2009). The PDZ2 domain of zonula occludens-1 and -2 is a phosphoinositide binding domain. *Cell Mol Life Sci*;66(24):3951–66.
- Mo, J.S., Park, H., and Guan, K. (2014) .The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. EMBO reports. *Vol 15, no 6*.
- Moroishi T, Park HW, Qin B, Chen Q, Meng Z, Plouffe SW, Taniguchi K, Yu FX, Karin M, Pan D, et al. (2015). A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes Dev* 29: 1271–1284.
- Quiros, M., Alarcón, L., Ponce, A., Giannakouros, T., and González-Mariscal, L. (2013). 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* 24, 2528–2543.
- Sambrotta, M., Strautnieks, S., Papouli, E., Rushton, P., Clark, B., Parry, D., Logan, C., Newbury, L., Kamath, B., Ling, S., Grammatikopoulos, T., Wagner, B., Magee, C., Sokol and R., Mieli-Vergani, G Thompson R. (2014). Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease. *Nat Genet* ; 46(4): 326–328.
- Tapia, R., Huerta, M., Islas, S., Avila-Flores, A., Lopez-Bayghen, E., Weiske, J., Huber, O., and González-Mariscal, L. (2009). Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. *Mol. Biol. Cell* 20, 1102–1117.
- 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):2692–700.
- Tumaneng, K., Schlegelmilch, K., Russell, R.C., Yimlamai, D., Basnet, H., Mahadevan, N., Fitamant, J., Bardeesy, N., Camargo, F.D., and Guan, K.L. (2012).YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nature cell biology* 14, 1322-1329.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in Tight-Junction strand formation. *Cell* 126, 741–754.
- Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A, Anderson JM (2009). ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 20, 3930–3940
- Xu, J., Kausalya, J., Phua, D., Mohamed Ali, S., Hossain, Z. And Hunziker, W. (2008). Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but not ZO-3, reveals critical and non redundant roles for individual Zonula Occludens proteins in mammalian development. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 28, No.5 p. 1669–1678

Xu, J., Anuar, F., Mohamed, S., Yong, M., Phua, D and Hunzike W. (2009). Zona Occludens-2 Is Critical for Blood–Testis Barrier Integrity and Male Fertility. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 20, 4268 – 4277

Yu FX and Guan KL(2013). The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev* 27, 355-371.

Zhao, B., Wei,X., Li,W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L.,et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & development* 21, 2747-2761.

Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. 2010. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(β -TRCP). *Genes Dev* 24: 72–85.