



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

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**“Papel de STAT3 en la apertura y degradación de las uniones estrechas inducida por ouabaína”**

**T E S I S**

Que presenta

**Q.F.I. ALAN ARTURO PEDRAZA RAMÍREZ**

Para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE  
FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Director de la Tesis:  
Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño

Este trabajo se realizó gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), en el laboratorio 3 del departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional.

A mi familia, a Diana y a los integrantes del laboratorio No. 3 del departamento de  
FBN por su apoyo incondicional.

# Índice

<i>Prologo</i>	1
Resumen .....	1
Abstract.....	2
<i>Introducción</i>	3
Epitelios.....	3
Uniones estrechas .....	5
Las claudinas .....	7
La permeabilidad paracelular se ajusta a las condiciones del medio .....	11
La permeabilidad paracelular y el EGF .....	12
STAT3 .....	13
La permeabilidad paracelular y la ouabaína.....	17
La Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPasa .....	17
La ouabaína y la adhesión celular .....	18
Las vías de señalización del EGF y la ouabaína .....	19
<i>Planteamiento del problema</i>	20
<i>Hipótesis</i>	21
<i>Objetivos</i>	21
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares .....	21
<i>Materiales y métodos</i>	22
<i>Resultados</i>	25
Objetivo 1.....	25
Objetivo 2.....	29
Objetivo 3.....	30
<i>Discusión</i>	31
<i>Conclusión</i>	33
<i>Referencias</i>	34

# Prologo

## **Resumen**

Desde que la ouabaína se identificó como hormona, se realizaron diferentes estudios para averiguar su papel fisiológico. En estudios previos se demostró que la ouabaína 10 nM (concentración dentro del rango fisiológico) modula el contacto célula-célula ejerciendo su efecto sobre la unión oclusora y la polaridad apical/basolateral, y al incrementar la concentración de ouabaína  $\geq 300$  nM se activa la endocitosis de moléculas de adhesión celular que están asociadas con, o forman parte de la membrana plasmática ocasionando el despegue (p. ej., las células MDCK) del sustrato, así como de sus vecinas. Es por eso que en este estudio la ouabaína es un regulador clave de la permeabilidad de los epitelios. Esta propiedad depende de las uniones estrechas (UE) y puede ser medida mediante la resistencia eléctrica transepitelial (RET). La ouabaína  $\geq 300$  nM disminuye la RET de células MDCK mediante la activación de Src, ERK1/2 que regulan negativamente a la claudina-2 (CLDN-2) y a la CLDN-4. En este trabajo, investigamos el papel de STAT3 en la apertura y degradación de la UE inducida por ouabaína 300 nM. Nosotros encontramos que la ouabaína 300 nM induce la inactivación y degradación proteosomal de STAT3 en un proceso que conlleva a la endocitosis y degradación de la CLDN-2 y CDLN-4, por consecuencia la apertura y desensamble de la UE.

En conclusión, la ouabaína 300 nM inactiva y degrada a STAT3 provocando la apertura y degradación de la UE.

## **Abstract**

Since ouabain was identified as a hormone, different studies were conducted to find out its physiological role. Previous studies have demonstrated that 10 nM ouabain (concentration within the physiological range) modulates cell-cell contact exerting its effect on the tight junction and apical/basolateral polarity, and increasing the concentration of ouabain  $\geq 300$  nM activates endocytosis of cell adhesion molecules that are associated with, or are part of, the plasma membrane causing detachment (eg, MDCK cells) from the substrate, as well as between each other. That is why in this study ouabain is a key regulator of the permeability of epithelia. This property depends from the tight junction (TJ) and can be measured by the transepithelial electrical resistance (TER). The ouabain 300 nM decreases the TER of MDCK cells by activating Src, ERK 1/2 that negatively regulates claudin-2 (CLDN-2) and CLDN-4. In this work, we investigate the role of STAT3 in the disassembly and degradation of the TJ induced by ouabain 300 nM. We found that ouabain 300 nM induces inactivation and proteasomal degradation of STAT3 as a part of a process that leads to the endocytosis and degradation of CLDN-2 and CLDN-4, resulting in disassembly and degradation of the TJ.

In conclusion, ouabain 300 nM, induces cellular takeoff through inactivation and proteasomal degradation of STAT3. The STAT3 protein is necessary to maintain cell adhesion.

# Introducción

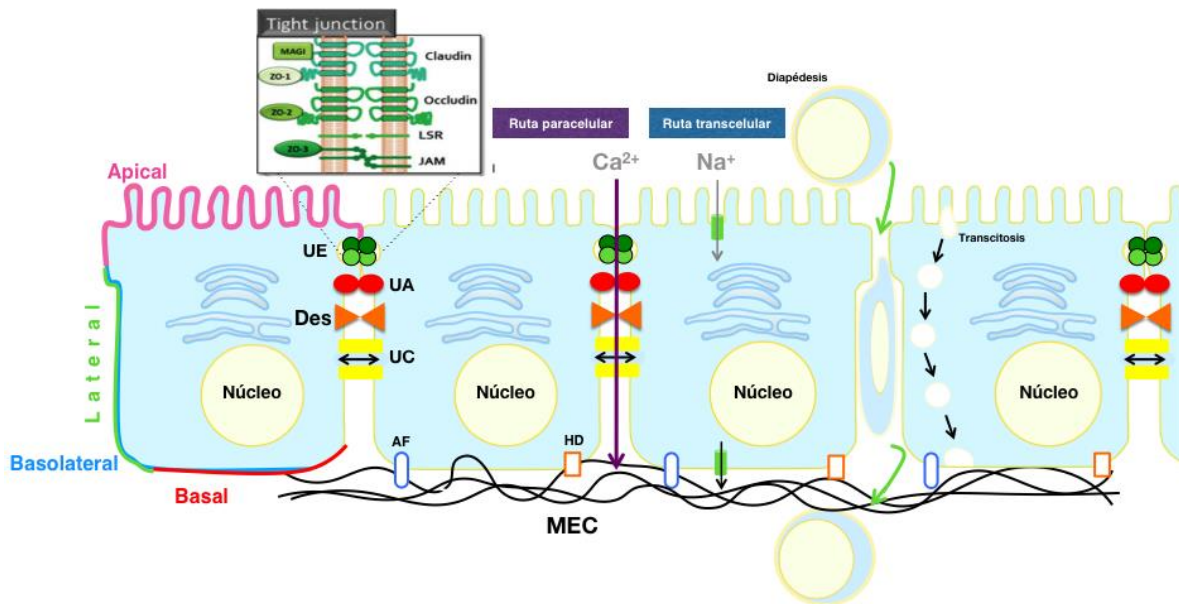
## Epitelios

Cuando los organismos multicelulares abandonaron el mar para conquistar el medio terrestre, se seleccionaron estructuras y mecanismos que mantenían el medio interno constante, como el que dejaron atrás. Los nuevos organismos terrestres debían evitar la muerte por deshidratación, tomar nutrientes, eliminar desechos y protegerse de patógenos y sus toxinas<sup>1</sup>. Así surgieron los epitelios, tejidos formados de una capa de células unidas entre sí y al sustrato por uniones intercelulares y capaces de transportar vectorialmente iones y otras sustancias. Los epitelios no solo separan compartimentos biológicos de composiciones diferentes, sino que, mediante el transporte vectorial, generan y regulan la composición específica de los fluidos que bañan dichos compartimentos (Figura 1). Por ejemplo, el epitelio del aparato gastrointestinal separa los alimentos en proceso de digestión del medio interno seroso, absorbe nutrientes y elimina productos del metabolismo y el epitelio de la nefrona modifica el fluido tubular, convirtiéndolo en orina y separa al fluido y la orina del líquido intersticial.

La función de los epitelios depende de dos características básicas de las células que los constituyen: **polaridad de la membrana plasmática** y las **uniones estrechas** (UE). La polaridad de la membrana consiste en la división de esta estructura en los dominios apical, lateral y basal, cada uno con una estructura, composición y función distinta (Figura 1)<sup>2,3</sup>; debido a su continuidad, los dominios lateral y basal a menudo se denominan dominio basolateral. La segunda característica del epitelio es que desarrolla **uniones estrechas** (UEs), un tipo de uniones intercelulares que, además de adherir a células vecinas, sella el espacio intercelular y convierte a los epitelios en barreras selectivas entre los compartimentos biológicos que estos tejidos separan (Figura 2A, B). Las UEs pertenecen al **complejo de unión** junto con las uniones adherentes (UA), los desmosomas (Des) y las uniones comunicantes o GAP (UC)<sup>4</sup>. Las células epiteliales,

además, se unen al sustrato mediante dos uniones celulares adicionales: la adhesión focal (AF) y los hemidesmosomas (HD) (Figura 1).

Una sustancia determinada puede cruzar las capas epiteliales a través de la **vía transcelular**, usando canales, transportadores y bombas polarizados<sup>7,8</sup>, y a través de la **vía paracelular**, constituida por las UE y el espacio intercelular<sup>9</sup>, o a través de ambas vías (Figura 1).



**Figura 1. Características de los epitelios y las células epiteliales.** UE, unión estrecha; UA, unión adherente; Des, desmosoma; UC, unión comunicante; HD, hemidesmosoma; AF, adhesión focal, todas ellas uniones celulares en las células epiteliales. El cruce de sustancias a través del epitelio puede llevarse a cabo a través de la ruta paracelular (flecha morada), la ruta transcelular (flechas delgadas y pequeñas gris y negro), transcitosis (flechas negras pequeñas) y la diapédesis (flechas verdes). El esquema superior izquierdo ilustra los principales componentes moleculares de las uniones estrechas y su organización en la membrana. Las MAGI son proteínas MAGUK invertidas asociadas a membrana, ZO-1, -2 y -3 son *Zonula Occludens* -1, -2 y 3, Src es una proteína homóloga a la cinasa del virus del sarcoma de Rous y FAK es la cinasa de adhesión focal. LSR, angulina; JAMS, moléculas de adhesión de las uniones.

La elección de la vía de transporte depende del tipo de sustancia a transportar, del tejido que ejecuta el transporte y del estado fisiológico de la célula que transporta. En el intestino y los riñones de los mamíferos, la glucosa se



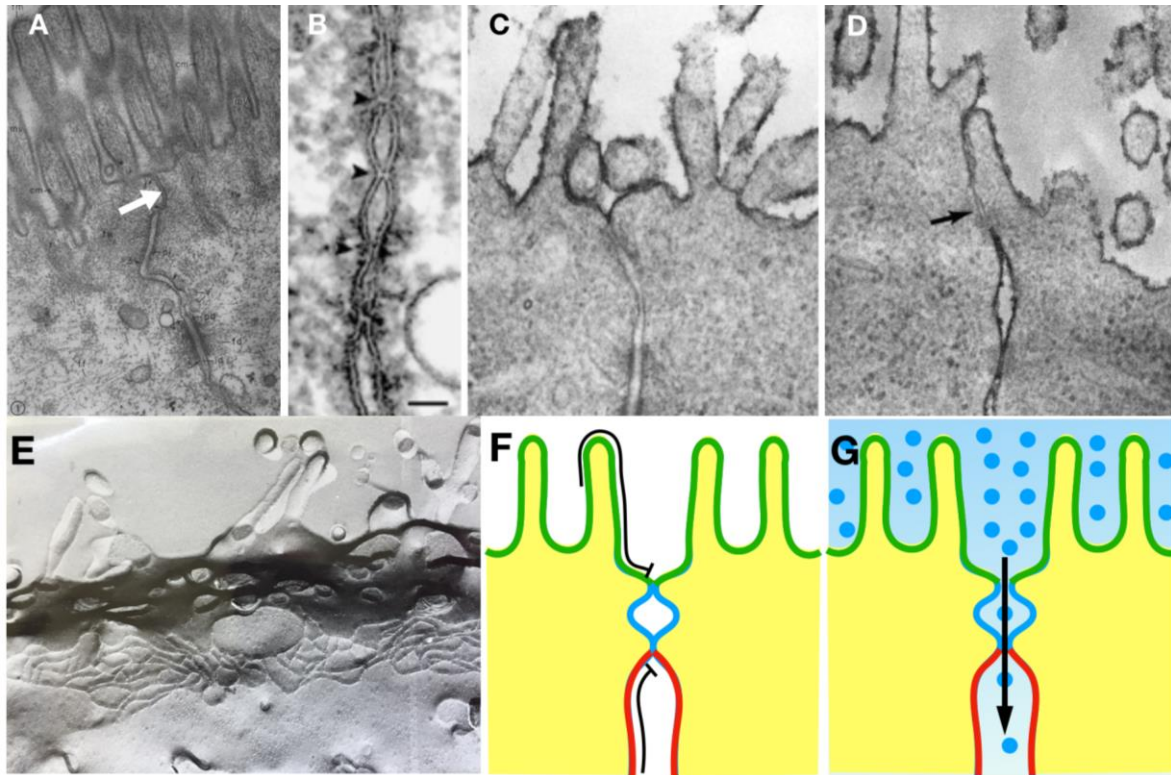
transporta principalmente a través de la vía transcelular<sup>7</sup>, mientras que en los vertebrados voladores, tal vez porque tienen intestinos más cortos que otros vertebrados, el transporte paracelular es mayoritario<sup>10</sup>. En el riñón de los mamíferos, la mayoría del  $\text{Ca}^{2+}$  del fluido tubular se reabsorbe en la rama ascendente gruesa del asa de Henle a través de la vía paracelular, mediante un tipo específico de **claudina** (cldn), la cldn-16, una proteína de la UE que forma poros paracelulares selectivos a  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ <sup>11</sup>, mientras que la glucosa se transporta predominantemente a través de la ruta transcelular por los transportadores apicales de glucosa dependiente de  $\text{Na}^+$  (SGLT) y el uniport basolateral de glucosa (GLUT)<sup>2,7</sup>.

### Uniones estrechas

También conocidas como *zonula occludens* (ZO), esta unión rodea a cada célula como un cinturón y la une con sus células vecinas a la vez que oblitera el espacio intercelular (Figura 2A, B). Si se aplica, marcadores electrodenso como rojo de rutenio o lantano, ya sea por la cara apical o basolateral de una monocapa epitelial, se observa en el microscopio electrónico de transmisión que las UEs impiden el paso de dichos marcadores (Figura 2C,D), poniendo en evidencia que el epitelio es una barrera para la difusión libre de iones y otras sustancias a través de la ruta paracelular<sup>20</sup>. En réplicas de criofractura las UEs aparecen debajo de las microvellosidades a manera de una red continua de filamentos que se entrecruzan<sup>4</sup> (Figura 2E). Sin embargo, como se mencionó antes, las UEs no son completamente impermeables, pues transportan iones y sustancias con una afinidad y selectividad determinada por su composición molecular.

Las UEs tienen dos funciones principales: una es que establecen una **cerca** (Figura 2F) que impide la difusión de proteínas integrales y lípidos de membrana, del dominio apical al basolateral y viceversa, en el plano de la membrana<sup>24,25</sup>. En el caso de los lípidos, el impedimento se restringe a los de la hoja exoplásmica de la membrana plasmática. La propiedad de cerca contribuye al mantenimiento de la

polaridad celular<sup>26</sup>. La segunda función de las UEs es formar una **compuerta** (Figura 2G) que permite o impide el paso de iones y otras sustancias a través de la vía paracelular<sup>21-23</sup>.



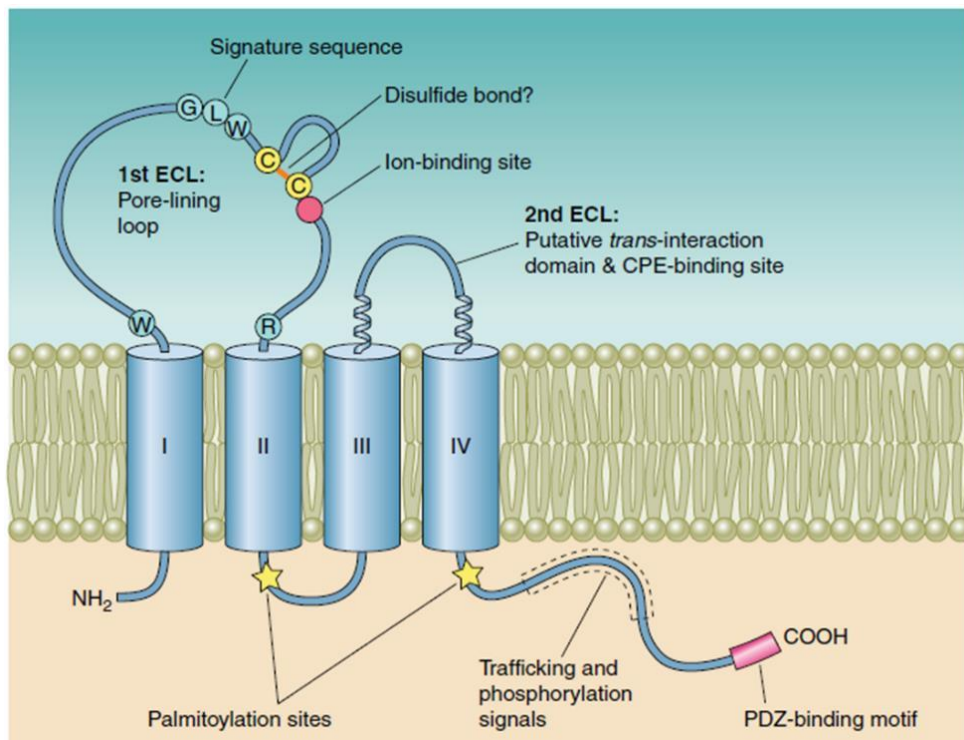
**Figura 2. Estructura de la unión estrecha.** (A) Micrografía de un corte fino del intestino de la rata, observado por microscopía electrónica de transmisión. La Unión Estrecha (UE, flecha blanca) es el punto donde se fusionan las membranas y se oblitera el espacio intercelular (modificado de <sup>4</sup>). (B) La UE se aprecia como uno o varios puntos de fusión de las membranas plasmáticas entre las células vecinas (cabezas de flecha negras; modificado de<sup>31</sup>). (C) La UE impide la difusión del rojo de rutenio del compartimento apical al basolateral; esta sustancia es un marcador extracelular electrodenso que se une a las cabezas polares de los lípidos de la membrana plasmática provocando la marca negra. Dado que en este caso se agregó al compartimento apical, solo marca la membrana apical. (D) Cuando la UE desaparece, aquí como resultado de la expresión de una forma dominante negativa de la E-cadherina, el rojo de rutenio apical accede al compartimento basolateral (modificado de <sup>115</sup>). (E) Filamentos de la UE según se observa por criofractura (Imagen obtenida por Flores-Maldonado C.). Los filamentos de la UE resultan de la polimerización en cis y unión en trans de las proteínas que los componen. (F) La UE es una **barrera** que impide la difusión de los componentes de la membrana apical a la basolateral y viceversa. (G) La UE es también una **compuerta** que permite el paso de iones y otras sustancias de un compartimento al otro.

Las UEs están constituidas por dos tipos principales de proteínas integrales: **1)** las de cuatro dominios transmembranales que incluyen a las claudinas (cldns)<sup>27</sup> y las proteínas MARVEL asociadas a la UE (TAMP), grupo que incluye a la ocludina, tricelulina y la proteína MARVEL D3<sup>28</sup>, **2)** las proteínas de un solo dominio transmembranal que incluyen a las moléculas de adhesión de la unión (JAM) y a las angulinas (LSR) (Figura 1)<sup>29-34</sup>. Las cldns constituyen la barrera paracelular contra iones y agua<sup>11,21,35</sup> y confieren a las UE y al epitelio su permeabilidad y selectividad paracelular específica, dependiendo del tipo de cldn expresado<sup>11,21,35-38</sup>. Las proteínas integrales de membrana de las UE se unen a un grupo de tres proteínas citoplasmáticas llamadas ZO-1, ZO-2 y ZO-3, que pertenecen a la familia de las proteínas asociadas a la membrana semejantes a la guanilato cinasa (MAGUK) y son plataformas para la interacción proteína-proteína que unen el complejo proteico al citoesqueleto de actina<sup>39-41</sup>. Hay varias otras proteínas integrales y asociadas que no son esenciales o residen transitoriamente en las UEs, pero que son importantes para el tráfico vesicular y la señalización intracelular<sup>42</sup>, entre otras funciones.

### **Las claudinas**

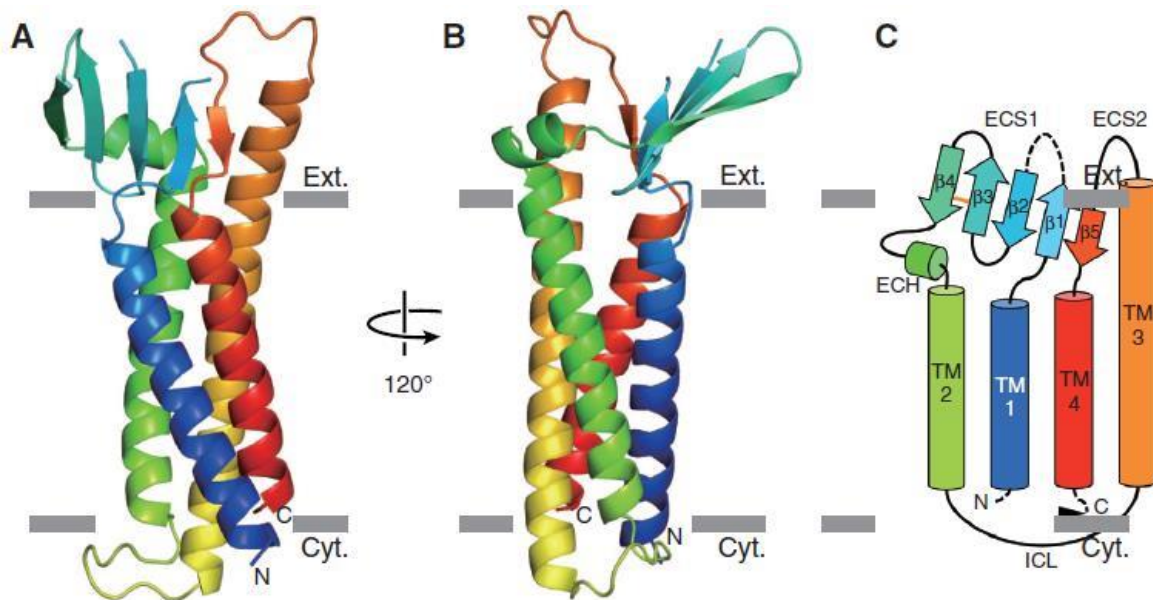
Las cldns forman parte de la superfamilia cl15676, junto con la proteína periférica de los oligodendrocitos (PMP-21), la proteína intrínseca de membrana de las fibras de cristalino (MP20)<sup>38</sup> y la proteína integral de membrana de 39 kDa (IP39) de *Euglena gracilis*, un unicelular fotosintético que nada en aguas de todo el mundo<sup>118</sup>. Las cldns contienen entre 207 a 305 aminoácidos, cuatro dominios transmembranales (TM1 a 4), un asa extracelular de al rededor de 40 aminoácidos (ECL1) entre las TMs 1 y el 2 y otra de al rededor de 20 residuos (ECL2) entre los TMs 3 y 4. El extremo amino como el carboxilo terminal son citoplásmicos (Figura 3). Los mamíferos expresan 27 cldns de manera espacio-temporal específica, que son codificadas en genes distintos<sup>126,127</sup>. El ECL1 contiene los residuos que confieren la selectividad iónica<sup>128</sup> y la secuencia altamente conservada W-G/NLW-C-C cuyas cisteínas forman un puente disulfuro necesario para el plegamiento

correcto de las claudinas 1 a 24<sup>116</sup>. ECL1 también delinea el poro iónico paracelular y es determinante en la selectividad según la carga de los residuos que exprese. El ECL2 es necesario para la unión con la claudina de la célula vecina<sup>117</sup>. El carboxilo terminal citoplásmico contiene sitios importantes para el tráfico vesicular de la proteína a la membrana y su alteración provoca la retención en el retículo endoplásmico y la degradación proteosómica de la proteína, además, en esa región de la proteína hay diferentes sitios de fosforilación y palmitoilación. Al final del carboxilo terminal se encuentra un motivo de unión a dominios PDZ con el que la claudina interactúa con ZO1, ZO2, ZO3 y MUPP1 (Figura 3).



**Figura 3. Estructura y plegamiento de las claudinas.** Las claudinas son proteínas tetraspan con un asa extracelular grande que contiene la secuencia conservada GLWCC y los aminoácidos que confieren la selectividad del canal paracelular. Las claudinas se palmitoilan cerca de los dominios transmembranales II y IV. El carboxilo terminal tiene sitios de regulación de expresión de la proteína

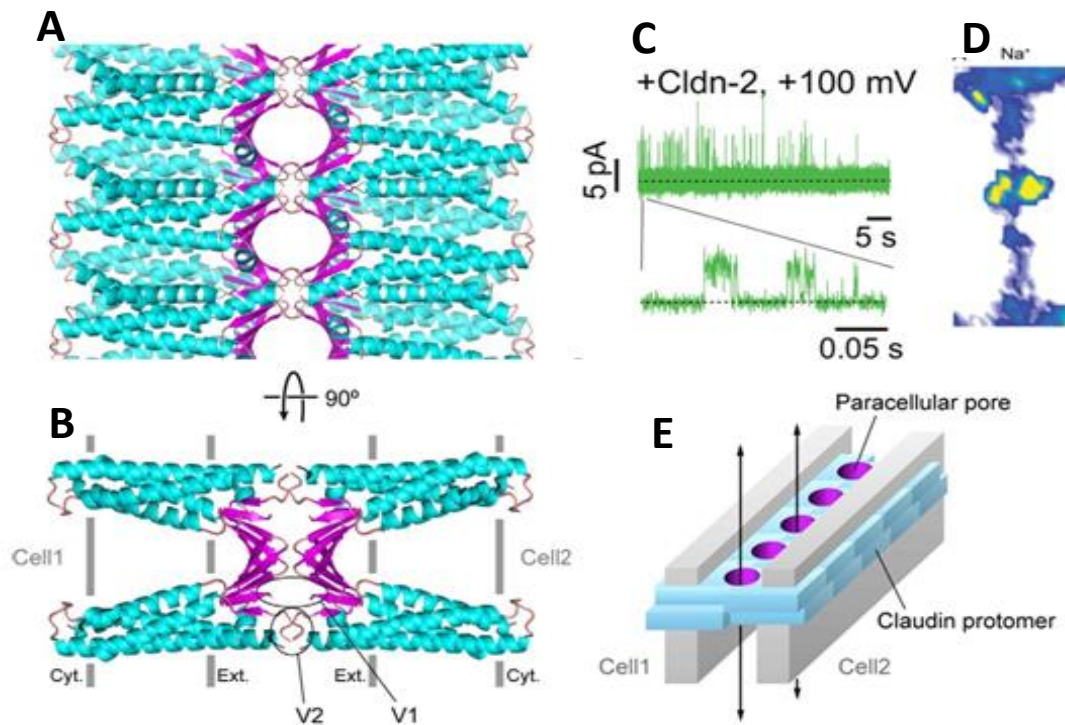
La estructura cristalina de la cldn 15 muestra a los segmentos transmembranales empacados estrechamente en un arreglo característico. Los TMs I, II y IV son hélices alfa hidrofóbicas con una longitud equivalente al grosor de una bicapa lipídica y ricas en aminoácidos con cadenas laterales pequeñas, como glicina y alanina. El TM III sobresale en el espacio extracelular. Los segmentos EC1 y EC2 extracelulares forma una estructura  $\beta$ -plegada de 5 cadenas  $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 5), 4 correspondientes al ECL1 y la 5 al ECL2. Además hay una  $\alpha$ -hélice corta en el EC1, antes de la beta plegada (Figura 4)<sup>118</sup>.



**Figura 4. Estructura de la claudina-15 cristalizada.** (A) y (B) La cldn-15 monomérica se representa como listones en una vista lateral, con cambios de color desde el extremo amino (azul) hasta el carboxilo terminales (rojo). El límite externo (Ext.) y citoplásmico (Cyt.) de la bicapa lipídica se indican con las barras grises. (C) Diagrama de la estructura secundaria de la cldn-15<sup>118</sup>.

Con base en la disposición tridimensional de las moléculas de cldn-15 cristalizadas, se ha propuesto un modelo de los canales paracelulares de la UE en el que dos cldns vecinas, en la misma célula, se asocian en *cis* y que este dímero luego se une en *trans* a otro de la célula vecina, mediante residuos conservados en el dominio  $\beta$ -plegado (Figura 5A, B)<sup>119</sup>. Con este arreglo, se genera un poro

paracelular (Figura 5A, B morado) y las cadenas laterales de algunos aminoácidos delinean el poro y le confieren su selectividad. En el caso de la cldn-2, el poro paracelular conduce  $\text{Na}^+$  y fluctúa entre estados abiertos y cerrados que pueden detectarse eléctricamente, como sucede con los canales iónicos (Figura 5C)<sup>35</sup> y las simulaciones de la cldn-15 muestran una vía de permeación del  $\text{Na}^+$  en la que los residuos D55 y E64, cargados negativamente, explican la selectividad de esta cldn por el  $\text{Na}^+$  (Figura 5D)<sup>120</sup>.



**Figura 5. Propiedades del poro formado por la claudina-15.** (A) Modelo cristalográfico del poro paracelular (estructura beta-plegada en morado) de la cldn-15 visto desde el compartimento apical y (B) de lado<sup>119</sup>. (C). Fluctuaciones de la corriente unitaria que fluye a través del canal paracelular de la cldn-2 según se detecta por el registro de microáreas de membrana. (D) Simulación de la vía de transporte del  $\text{Na}^+$ . La parte superior corresponde al compartimento apical y la inferior al basal. En azul se muestra la ruta de paso del  $\text{Na}^+$  y en amarillo el filtro de selectividad. (E) Esquema de la organización de los poros paracelulares. Las barras grises corresponden a las membranas de las células vecinas unidas, las azules a las cldns en las que se resaltan los poros en morado.

## **La permeabilidad paracelular se ajusta a las condiciones del medio**

Los epitelios ajustan la permeabilidad paracelular en respuesta a los requerimientos fisiológicos, las condiciones patológicas y los desafíos farmacológicos. Una manera de estudiar la permeabilidad epitelial es evaluar la resistencia eléctrica transepitelial (RET)<sup>43</sup>. Cuanto mayor es el valor de RET, menor es la permeabilidad paracelular. El sistema renal es muy ilustrativo del papel del control de la permeabilidad paracelular en el funcionamiento del órgano. Los riñones humanos filtran 170 l de plasma pero secretan solo 1.7 l de orina. El agua, las proteínas, los azúcares y los iones del filtrado glomerular se reabsorben y el filtrado se concentra progresivamente a lo largo de la nefrona. Los epitelios que recubren esta superficie tubular en especies de vertebrados aumentan gradualmente su RET de aproximadamente 10  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  en el túbulo contorneado proximal<sup>44,45</sup>, a varios miles en el conducto colector<sup>46,47</sup> y hasta cientos de miles en la vejiga<sup>48,49</sup>. Varias adaptaciones de las células epiteliales explican este gradiente de RET: incrementos en el tamaño celular, reducción de la tortuosidad de la membrana de unión, un aumento progresivo en la complejidad estructural de los filamentos de la UE y la expresión de un conjunto específico de cln en cada segmento de la nefrona<sup>9,21</sup>. La cln-2 induce valores bajos de RET del orden de 200  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  en células de MDCK renales<sup>50</sup> y exhibe selectividad a cationes y agua<sup>35,51,52</sup>. También se expresa en los túbulos proximales<sup>53-55</sup>, donde es necesaria para la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , agua y, probablemente,  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>56</sup>. Por el contrario, la cln-4 induce un fenotipo de alta RET (400-600  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) como resultado de bloquear el transporte de  $\text{Na}^+$  y permitir el de  $\text{Cl}^-$  en las células epiteliales que lo expresan<sup>57-59</sup>, incluidas las del epitelio del segmento distal de la nefrona<sup>54,55,60</sup>.

Los líquidos que bañan las membranas apicales, como la orina, el semen y la leche, son radicalmente diferentes entre sí, pero el medio intersticial que entra en contacto con las membranas basolaterales tiene una composición constante mantenida por mecanismos homeostáticos poderosos. Esta diferencia sugiere que las sustancias en los medios apicales regulan propiedades epiteliales específicas. Varias sustancias presentes en el medio extracelular inducen cambios de RET en

las células caninas MDCK<sup>61</sup>, entre ellas destaca el factor de crecimiento epidérmico (EGF)<sup>53</sup> la proteína más prominente de la orina. Se sabe desde hace tiempo, que el EGF aumenta el RET de las células renales de cerdo-LL-CPK1<sup>62</sup>.

Las señales que regulan el grado de sellado de la UE y los mecanismos implicados son complejos. Además, está claro que las uniones celulares son estaciones de señalización que informan el estado de adherencia célula-célula al interior celular e inducen respuestas del citoesqueleto y nucleares<sup>18,19</sup>. Por ejemplo, la polaridad de la membrana plasmática y las uniones se influyen una a otra ya que la formación de una unión intercelular específica depende de la expresión polarizada de proteínas y lípidos y recíprocamente, la polaridad de la membrana plasmática requiere la adhesión, inicialmente a la matriz extracelular y después a las células vecinas<sup>5,6</sup>. Varias proteínas asociadas a las uniones celulares, especialmente la  $\beta$ -catenina<sup>15</sup>, una proteína de la UA, y la *zonula occludens-2* (ZO-2), una proteína de la UE, son cofactores transcripcionales que regulan la expresión de genes relacionados con la proliferación, como ciclina D1<sup>133</sup> y myc. Notablemente, los factores de transcripción como Jun, Fos y ZONAB residen transitoriamente en la región citoplásmica de la UE<sup>16,17</sup> y, al menos ZONAB, regula positivamente la permeabilidad paracelular<sup>18</sup>.

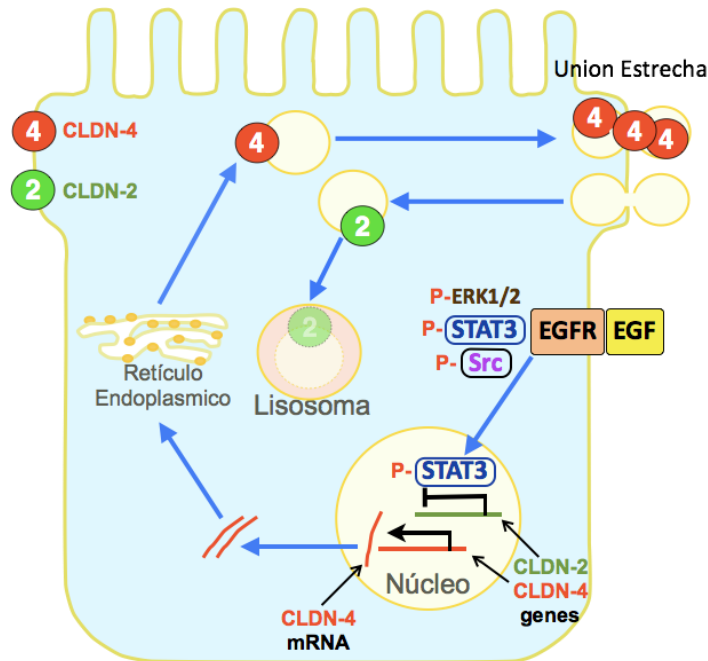
## Antecedentes

### **La permeabilidad paracelular y el EGF**

El EGF urinario incrementa la RET en monocapas de células MDCK al reducir la expresión de la *cln-2* y sobre expresar a la *cln-4*<sup>53</sup>. Ambos procesos son dependientes de la activación de la cinasa de tirosinas Src y de la cinasa regulada extracelularmente ERK1/2 e implican: la inhibición de la transcripción del gen *cln-2* y de la síntesis de la proteína respectiva, así como el retiro de la proteína *cln-2* de la UE mediante la inducción de su endocitosis, dependiente de clatrina, y su degradación lisosomal<sup>63</sup>. Implican también la activación de la transcripción de la *cln-4* a través del factor de transcripción Sp1<sup>64</sup>, el aumento de síntesis de *cln-4* y



su incorporación a la UE<sup>65</sup>. Como resultado del cambio de cldn -2 y 4, aumenta la RET y disminuye la permeabilidad paracelular<sup>65</sup>. EGF induce la activación de la proteína transductora de señales y activadora de la transcripción 3 (STAT3) y esta activación es necesaria en la respuesta al EGF<sup>65</sup> (Figura 6).

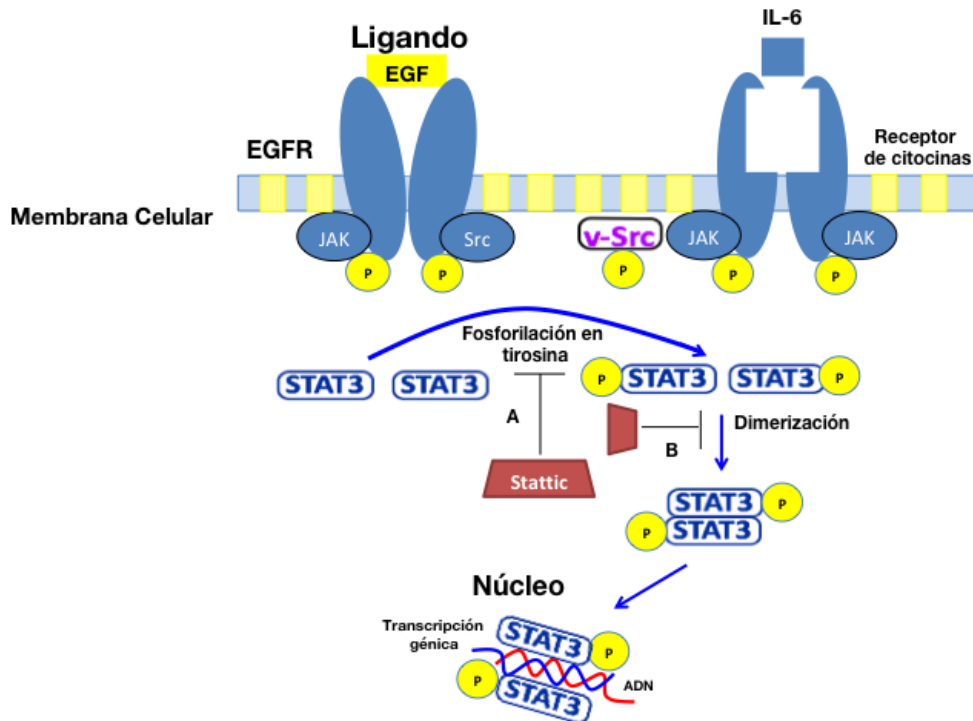


**Figura 6. El EGF reduce la expresión de la cldn-2 y sobre expresa a la cldn-4 a través de una vía de señalización que involucra a Src y STAT3.** Después de unirse a su receptor, el EGF activa la vía de señalización que involucra la fosforilación de Src, ERK 1/2 y la translocación al núcleo de STAT3 fosforilada que reduce la expresión de cldn-2 (círculo verde) y sobre expresa a la cldn-4 (círculo rojo). pSTAT3 puede bloquear la transcripción del RNAm de cldn-2 y simultáneamente promueve la de cldn-4. La cldn-4 sintetizada de novo se inserta en la UE mientras que la cldn-2 disminuye debido al recambio normal de la proteína<sup>65</sup>.

## STAT3

Las proteínas STAT regulan el crecimiento, supervivencia, diferenciación y la muerte celular. Son críticas para procesos biológicos como la hematopoyesis, la respuesta inmune, el desarrollo de la glándula mamaria, la adipogénesis y la

diferenciación sexual, por mencionar las más importantes. Inicialmente, las STATs fueron descritas como factores de transcripción, pero hoy se sabe que tienen otras funciones que hay que describir. En mamíferos la familia STAT se constituye de 7 miembros: STAT-1, -2, -3, -4, -5a, 5b y -6, cada una con la capacidad de unirse a una secuencia de ADN específica<sup>66,67</sup>. Mientras que STAT-4, es exclusiva de células mieloides y testículos<sup>68</sup>, el resto de las STATs son ubicuas. En su estado inactivo residen en el citoplasma, en una forma predominantemente desfosforilada en la Y705 y fosforilada en la S727. La unión de varias citosinas a sus receptores respectivos induce la activación de las STATs en una secuencia estereotipada que inicia con la autofosforilación del receptor, la exposición de sitios de unión para la cinasa de tirosinas JAK, la asociación de las JAK a los nuevos sitios y su autofosforilación, condición en la que las JAKs unen a las STATs. Los dominios SH2 de las STATs son los sitios de interacción con las JAK activadas. Ya unidas, las JAKs fosforilan la Y705 de las STATs, mientras que unas fosfatasas específicas, defosforilan la S727 de las mismas STATs. Las STATs fosforiladas se dimerizan y translocan al núcleo, ya sea como homodímeros o heterodímeros<sup>66,67,69</sup>. En el núcleo, las STATs se acumulan y unen a las secuencias de ADN respectivas, activando así la transcripción de sus genes blanco (Figura 7)<sup>70</sup>.

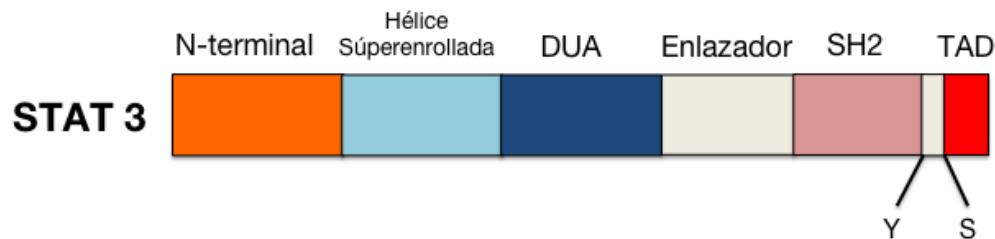


**Figura 7. Ruta de activación JAK-STAT.** Cuando ligandos como el EGF e IL-6 se unen sus receptores, inducen constitutivamente que las tirosin quinazas (e.g., v-Src, c-Src) fosforilen a STAT3 en la tirosina 705, y promueven su dimerización y translocación al núcleo. Stattic inhibe la activación de STAT3 (mecanismo de inhibición A) y su dimerización (mecanismo de inhibición B, la inhibición es indicada por el símbolo  $\perp$ ).

Las STATs también pueden activarse como resultado de la unión de los factores de crecimiento a sus receptores con actividad de cinazas de tirosinas (RTKs). Por ejemplo, los receptores de los factores de crecimiento epidérmico (EGF), de fibroblastos (FGF), derivado de plaquetas (PDGF), CSF-1R, c-kit y c-met así como el receptor a la insulina, entre otros<sup>71-81</sup>, o por la activación de algunos receptores acoplados a proteínas G, como el de la angiotensina II<sup>68,82</sup>.

STAT-3 se identificó originalmente como el “factor de respuesta de fase aguda”, en la inflamación<sup>83</sup>. Tiene la estructura ilustrada en la figura 8 y se activa por una amplia variedad de citocinas, en particular aquellas que reconocen a gp130, como la IL-6, IL-11, oncostatina M (OSM), el factor inhibidor de leucemia (LIF) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF), así como por las citocinas que participan en la cadena común ( $\gamma c$ ) incluidas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. También se activa por

RTKs, como EGFR y VEGFR, cinasas citoplasmicas, como Src, así como por la radiación ionizante usada en la terapia contra el cáncer. La señalización de STAT-3 se controla por varios inhibidores de retroalimentación endógenos, como los supresores de la señalización de citocinas (SOCS), las proteínas inhibidoras de STATs activadas (PIAS) y fosfatasas como la SHP-2<sup>84</sup>.



**Figura 8. Estructura esquemática de STAT3.** STAT3 tiene dos sitios de fosforilación en los residuos de tirosina (Y705) y serina (S727) entre los dominios SH2 y TAD. DUA, dominio de unión a ADN; TAD, dominio de transactivación; Enlazador, dominio de unión.

STAT3 es un blanco para el tratamiento de los tumores en humanos. En varias células cancerosas y en tumores humanos, una serie de cinasas de tirosinas anormales activan constitutivamente a STAT3. La inhibición de STAT3, mediante mutantes dominantes negativos, secuencias antisentido y siRNAs, suprimen el crecimiento tumoral e inducen apoptosis en las células cancerosas. Una variedad de sustancias inhiben directamente la señalización de STAT3, sin embargo, la molécula pequeña no peptídica denominada stattic, se une al dominio SH2 (del inglés Src Homology 2) de STAT3, independientemente de su estado de fosforilación, bloqueando su dimerización y translocación al núcleo e induciendo su apoptosis<sup>69</sup>.

La señalización por STATs es crucial para el control de la permeabilidad epitelial paracelular por el EGF, pero también para mantener la RET basal, tal como lo evidencia el hecho de que la incubación de células epiteliales renales de perro MDCK con 20  $\mu$ M de stattic, en presencia de EGF, disminuye la RET a valores por debajo del control<sup>65</sup>.

## **La permeabilidad paracelular y la ouabaína**

El EGF no es el único factor extracelular que regula la permeabilidad epitelial también están los esteroides cardiotónicos (ECs). Estas sustancias aumentan la fuerza del latido cardiaco y, por ello, desde hace tiempo se usa como agentes terapéuticos en la insuficiencia y arritmias cardiacas<sup>85,86</sup>. Los ECs son sintetizados en plantas y animales y la ouabaína, el EC mas estudiado, se considera una hormona que normalmente se encuentra a una concentración plasmática y urinaria de entre 0.05-3.70 nM<sup>87,88</sup>. Esta hormona interviene en múltiples procesos fisiológicos tales como la regulación de la natriuresis<sup>89</sup> y la presión arterial<sup>90,91</sup> y la sobrevivencia celular. En los cultivos celulares la ouabaína induce proliferación e hipertrofia<sup>92-94</sup>. El receptor de todos los ECs es la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa.

## **La Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa**

Esta enzima se conoce ampliamente por su papel en el transporte iónico: intercambia tres Na<sup>+</sup> intracelulares por dos K<sup>+</sup> extracelulares, a través de la membrana plasmática, por cada molécula de ATP que degrada en el interior celular<sup>95</sup>. De esta manera, la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa genera las diferencias de concentración de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> a través de la membrana plasmática que, a su vez, son necesarias para impulsar el transporte transmembranal de otros iones<sup>96</sup>. Sin embargo, la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa no solo funciona como molécula transportadora de iones a través de la membrana sino que también transduce señales del exterior hacia el interior de celular ya que activa una cascada de moléculas señalizadoras que cambian el comportamiento celular cuando los ECs están presentes en el medio.

La Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa se constituye de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La  $\alpha$  es la subunidad catalítica que realiza el transporte, une a los iones y al ATP, y a través de su porción extracelular, a los ECs. La subunidad  $\beta$  tiene múltiples funciones: es necesaria para el transporte iónico, es una chaperona que asegura el arribo de la ATPasa a la membrana, es una molécula de adhesión en epitelios y glía y es

también un cofactor transcripcional. La subunidad  $\gamma$  regula el transporte y en células cancerosas, promueve el despegue de las células del sustrato y la metástasis<sup>96</sup>.

La consecuencia más conocida de la unión de los ECs a la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa es la inhibición del bombeo de iones<sup>96,97</sup>. Los ECs extracelulares se insertan en la membrana, entre varios dominios transmembranales de la ATPasa<sup>98</sup>, con una selectividad y afinidad que dependen de la isoforma  $\alpha$  involucrada y del tipo de EC<sup>96,99</sup>. Esta interacción induce, entre otros fenómenos, la asociación de la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa con Src, lo que induce la transactivación del receptor EGFR que resulta en hipertrofia de los miocitos cardiacos<sup>100</sup>. La activación de esta ruta en ocasiones es independiente de la actividad transportadora de la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa<sup>101-103</sup> y modifica el estado diferenciado, la proliferación y el transporte transmembranal y transepitelial<sup>104,105</sup>. La incubación de las células epiteliales con la OUA a altas concentraciones induce la endocitosis de la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa<sup>102,106,107</sup> y del transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup><sup>103</sup>, disminuyendo así el transporte transepitelial de Na<sup>+</sup><sup>108</sup>.

### **La ouabaína y la adhesión celular**

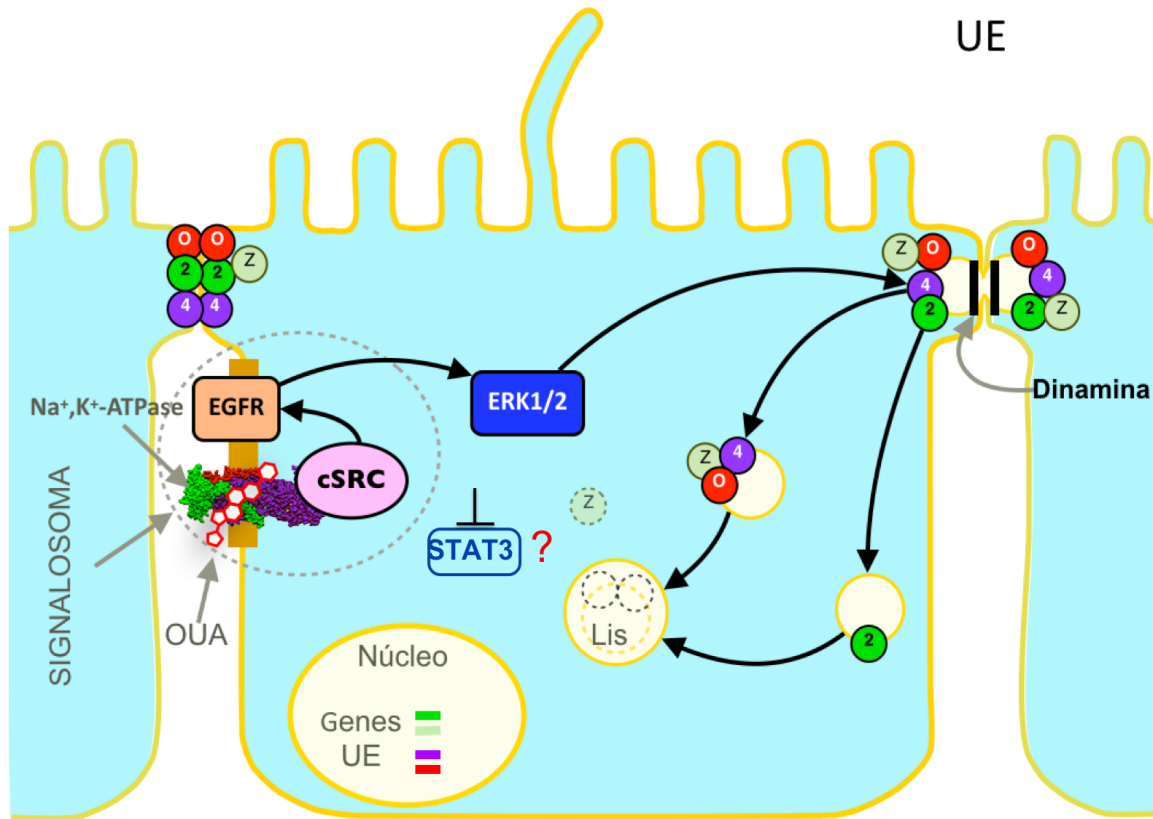
Altas concentraciones de ouabaína ( $\geq 300$  nM) activan la endocitosis de moléculas de adhesión celular que están asociadas con, o forman parte de la membrana plasmática y este proceso causa que las células se despeguen (p. ej., las células MDCK) del sustrato, así como de sus vecinas. Por ello, se ha propuesto que un papel fisiológico de la ouabaína es la modulación de los contactos celulares. También se ha demostrado que concentraciones bajas de ouabaína (10 nM), aumentan la hermeticidad de la UE al inducir la transcripción, traducción y expresión de las cldns en la UE<sup>109</sup>, aceleran la ciliogenesis, una de las etapas finales del desarrollo de la polaridad celular<sup>110</sup> y aumentan la comunicación celular mediada por las uniones comunicantes<sup>111</sup>. Tanto los efectos tóxicos como los hormonales están mediados por la activación de las cinasas Src y ERK1/2<sup>102,109-114</sup> e inducen la translocación de la  $\beta$ -catenina, una proteína citosólica de la UA, al núcleo<sup>1,102,106</sup>.

## **Las vías de señalización del EGF y la ouabaína**

Llama la atención la similitud entre las rutas de señalización que controlan a la UE en respuesta al tratamiento con EGF y ouabaína: en ambas participa el EGFR y las cinasas Src y ERK1/2. Mientras que el EGF activa la ruta EGFR-Src-ERK1/2 directamente, la ouabaína, a través de Src, induce una transactivación de ERK 1/2. También queda claro que el EGF controla a la UE a través de STAT3 al fosforilarlo en la Y705 y enviarlo al núcleo para favorecer la transcripción de la cldn-4 y bloquear la de cldn-2, disminuyendo la permeabilidad de la UE e incrementando la RET. Cabe preguntarse si la señalización desatada por la ouabaína también depende de esta molécula central. Es posible que la ouabaína induzca el desensamble de la UE a través de la inactivación y aún más, de la degradación de STAT3. En este proyecto nos enfocaremos a investigar el papel de STAT3 en el desensamble de la UE inducido por 300 nM de ouabaína, por lo que planteamos el siguiente problema.

## Planteamiento del problema

¿Altas concentraciones de ouabaína inducen el desensamblaje de la UE a través de la inactivación de STAT3?



**Figura 9. La ouabaína disminuye la presencia de STAT3, cldn-2 y cldn-4.** El tratamiento con ouabaína induce la degradación de las proteínas de la UE conforme pasa el tiempo de exposición. Al unirse a su receptor, la ouabaína activa una nueva vía de señalización que involucra la fosforilación de Src, ERK1/2 y la degradación y/o inactivación de STAT3 para regular a la baja el contenido de cldn-2 (círculo verde con el número 2) y -4 (círculo morado con el número 4).



## Hipótesis

La ouabaína (300 nM) induce la apertura y desensamble de las uniones estrechas debido a la inactivación y/o degradación de STAT3.

## Objetivos

### **Objetivo general**

- Averiguar si STAT3 participa en el desensamble de la UE inducido por ouabaína.

### **Objetivos particulares**

- Investigar si la ouabaína (300 nM) inactiva a STAT3 en las células MDCK.
- Investigar mediante qué mecanismo la ouabaína induce la degradación de STAT3.
- Investigar si la inhibición de STAT3 con stattic acelera el desensamble de la UE inducido por la ouabaína.

## Material y métodos

### **Cultivo de células MDCK**

Las células renales epiteliales MDCK (Madin-DarbyCanineKidney), fueron obtenidas del American Type Culture Collection. Se cultivaron en cajas de Petri de plástico a 37°C y en una mezcla de aire/CO<sub>2</sub> en las proporciones de 95:5 respectivamente. Las células crecieron utilizando Medio Esencial de Eagle modificado por Dulbeco (GIBCO Lab. LifeTechnologies, Inc. Chagrin Falls, Ohio USA), al que se le adicionaron 50,000 U/ug/mL de una mezcla de penicilina-estreptomicina en solución salina de NaCl al 0.85% (In Vitro S.A. MéxicoD.F.) y SFB (Suero Fetal Bovino) certificado al 10%. Para sembrar a las células, una vez descongeladas, primero se les dejó crecer hasta cubrir toda la superficie de cultivo (confluencia). Posteriormente se lavaron dos veces con solución salina amortiguadora (PBS) sin Ca<sup>2+</sup> (GIBCO 450-1300) y se les adicionó tripsina-EDTA (In Vitro S.A. México D.F.) y durante 10 minutos para que se formara una suspensión celular concentrada que se utilizó para sembrar en cajas de Petri de 100 mm de diámetro para su adaptación.

El tratamiento de células con OUA se realizó de la siguiente manera: se sembraron monocapas de células a confluencia en multicámaras de 24 pozos, para medir adhesión al sustrato, sobre cubre objetos para inmunofluorescencia y en insertos Costar de 0.33 cm<sup>2</sup> de área para medir RET. Un día después las células fueron depletadas de suero por 24 horas. Enseguida se incubaron en condiciones control o con 300 nM de ouabaína a diferentes tiempos (0, 4, 8, 12 y 16 horas) en medio sin suero y se procedió a hacer el análisis correspondiente.

### **Cultivo de células MDCK sobre cubre objetos para inmunofluorescencia**

Una vez adaptadas las células sobre las cajas de Petri de 100 mm, en estado de confluencia deben ser transferidas a una caja de 100 mm con cubre objetos de 1 cm<sup>2</sup>. Los cubre objetos deben estar inmersos en medio de cultivo (DMEM) a 37°C en condiciones de asepsia perfectamente fijados en el fondo de la caja, de tal

manera que al verter la suspensión celular concentrada de células se fijen sobre los cubre objetos. Los cubre objetos de 1 cm<sup>2</sup> para cultivo celular deben ser enjuagados con agua desionizada en repetidas ocasiones y posteriormente esterilizados por medio de calor seco.

### **Extracción de proteínas y Western blot**

Las células se sembraron en multicámaras de 24 pozos de 6.5 mm de diámetro y 0.33 cm<sup>2</sup> de área. Después de alcanzar el punto de confluencia las células se lavaron 2 veces con PBS+Ca<sup>2+</sup>, y se les agregaron 120 µl de solución amortiguadora de lisis (20 mM Tris pH:7.0, 2 mM EGTA, 5mM EDTA, 30 mM benzanmidina, 0.5% Nonidet P-40), suplementada con un coctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche AppliedScience). Posteriormente, las muestras se congelaron a -70°C por dos noches. Los pozos se rasparon de forma individual con la punta de una micropipeta. En seguida se recuperó la suspensión con una micropipeta y luego se homogenizó pasándola 17 veces a través de una jeringa de insulina. Se midió la concentración de proteínas con el estuche BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Posteriormente se tomaron 60 µl de los extractos proteicos (para proteínas fosforiladas), y se agregaron 20 µl de solución amortiguadora Laemmli. Las muestras se fraccionaron por electroforesis en geles (SDS-PAGE), para luego ser transferidos a membranas de PVDF (Transblot, Bio-rad, Hercules, CA, USA). Posteriormente, se usó el sistema SNAP i.d. ® 1.0 para inmunodetectar a las proteínas deseadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente: las membranas se incubaron por 20 minutos con el anticuerpo primario a temperatura ambiente, se lavaron en una ocasión con TBS-Tween al 0.05%, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente por 15 minutos y se lavaron una vez más. Las bandas inmunoreactivas se detectaron con el sustrato quimioluminiscente ECL (GE, HealthcareLifeSciences, Pittsburg, PA, USA) y se analizaron densitométricamente con el programa Kodak 1 D v.3.5.4 (Eastman Kodak Company, New Haven, Ct, USA). Las membranas se desnudaron con una solución de 2-Mercaptoetanol (Bio-Rad Laboratories 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 954547) por 30 minutos a 56°C, se lavaron 5 veces con agua miliQ y

posteriormente 3 veces con TBS-Tween 0.05% y se hicieron detecciones de otras proteínas. La cantidad de cada proteína se calculó dividiendo la densidad óptica de la banda en cuestión entre la de GAPDH o la de la proteína fosforilada sobre la de la proteína total.

### **Inmunofluorescencia**

Las células crecieron sobre cubre objetos y se trataron con los diferentes medios experimentales. Al tiempo correspondiente se retiró el medio experimental y se lavaron 3 veces con PBS+Ca<sup>2+</sup>. En seguida se fijaron con metanol puro a -20°C durante 10 min a temperatura -20°C: Se lavaron 3 veces como se indica arriba y se les incubó con PBS+Ca<sup>2+</sup> a 10°C. Se bloquearon con BSA al 3% por 30 min. Luego se incubaron por 2 h a TA con el anticuerpo primario, se lavaron 3 veces más y se trataron con el anticuerpo secundario correspondiente otros 30 min a TA en obscuridad. Finalmente se lavaron 2 veces con PBS+Ca<sup>2+</sup> y 2 veces con agua miliQ para posteriormente ser montados sobre una gota de Vectashield (Vector Laboratories, Inc., CA, USA). Las preparaciones se observaron con un microscopio confocal (leica SP8) y las imágenes obtenidas se procesaron usando los programas Leica Confocal Software Lite (Las AF) y Fiji (Fijiisjust imagen J). Finalmente, las figuras se construyeron con el programa Image J.

### **Resistencia eléctrica transepitelial (RET)**

Este ensayo evalúa el grado de sellado de la UE celular a través de la medición de la resistencia que opone la monocapa de células, cultivadas en insertos, al paso de un pulso de corriente eléctrica. La resistencia de la célula (RC) está formada por la resistencia de la membrana apical (RA) en serie con la resistencia de la membrana basolateral (RB), mientras que la resistencia paracelular (RP) por la resistencia de la UE (RUE) y por la resistencia del espacio intracelular (RIC). La medición de RET se realizó con un sistema EVOM-EndOhm-6 (World Precision Instruments, Sarasota, FL).

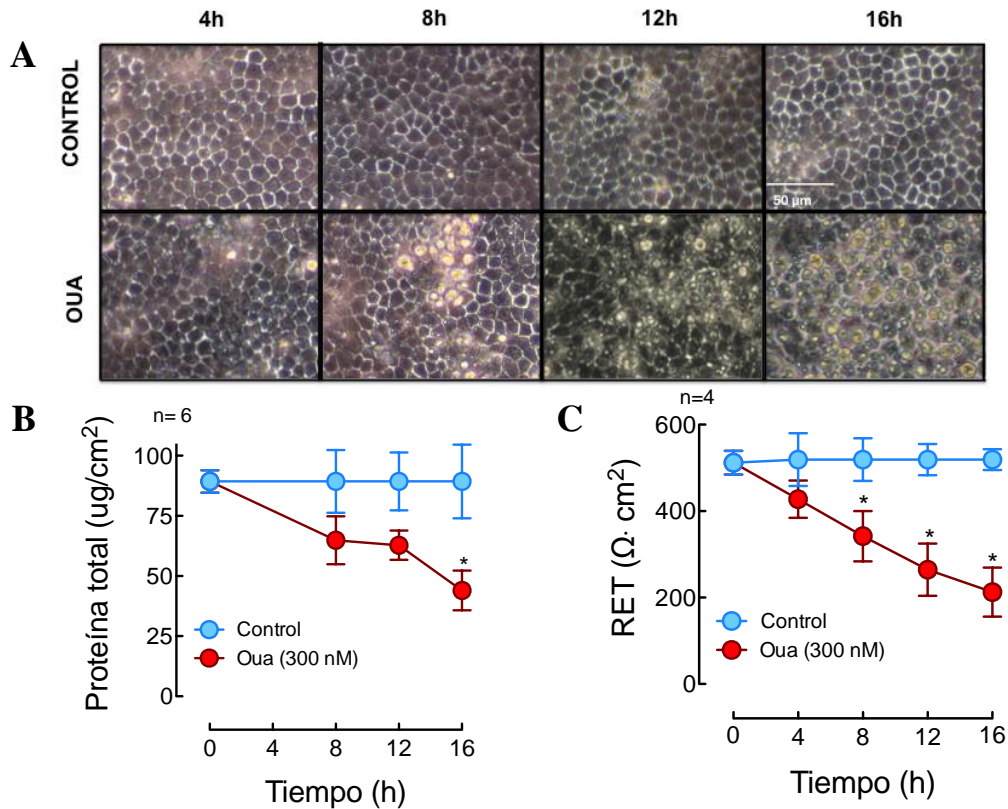
## **Análisis estadístico**

Los tratamientos se analizaron mediante anova de dos vías, comparando grupos con la postprueba de Bonferroni. Se utilizó el programa GraphPad 4.0 de Prisma. Se calcula la media y el error estándar, por lo menos 3 experimentos independientes. “n” representa el número de experimentos independientes. \* p<0.05.

## **Resultados**

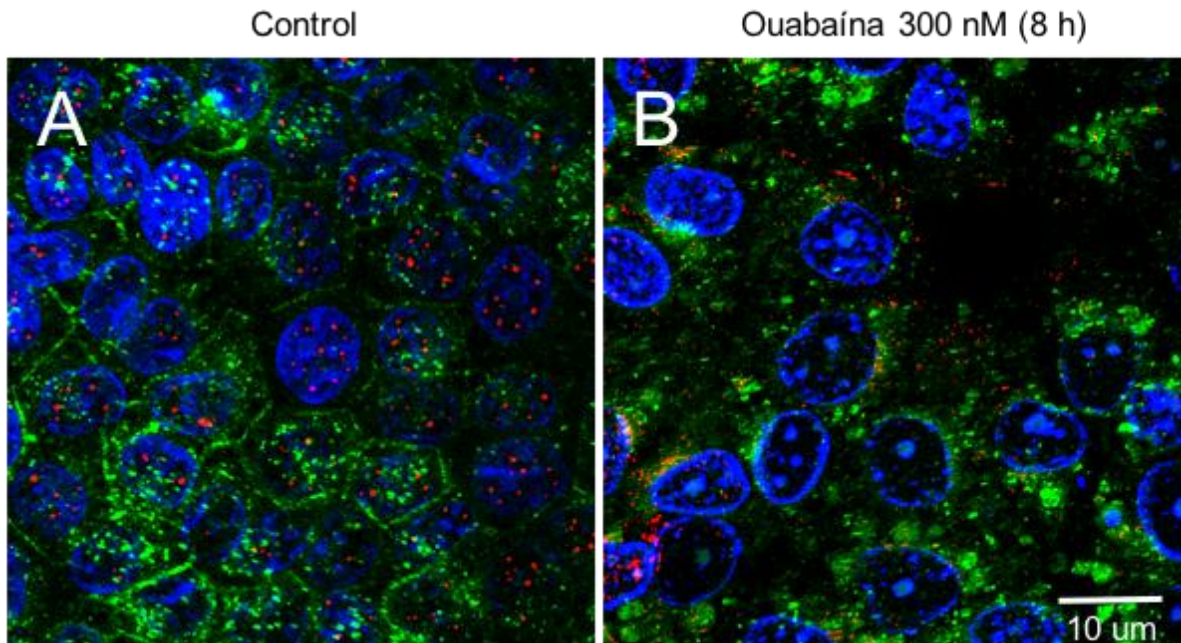
### **Objetivo 1**

Para investigar si la ouabaína disminuye la cantidad y/o activación de STAT3, primero se confirmó que 300 nM de OUA induce el despegue de las células del sustrato y la apertura de la UE<sup>112,113</sup>. Tal como se esperaba, la OUA induce el redondeo y aumento de refringencia progresivos en las células cultivadas en multicamaras de 24 pozos (Figura 10A), lo que indica el despegue de las células entre sí y del sustrato. La proteína adherida al pozo disminuye significativamente a partir de 16 horas de tratamiento con OUA (Figura 10B) lo que indica que conforme aumenta el tiempo de exposición con OUA el contenido total de proteína disminuye. La disminución del contenido total de proteína se puede atribuir a la pérdida de adhesión al sustrato de las células en cultivo. La RET disminuye aún antes y es significativa a partir de las 8 horas lo que demuestra que la OUA induce la apertura de las UE, unas horas antes de inducir el despegue celular (Figura 10C).



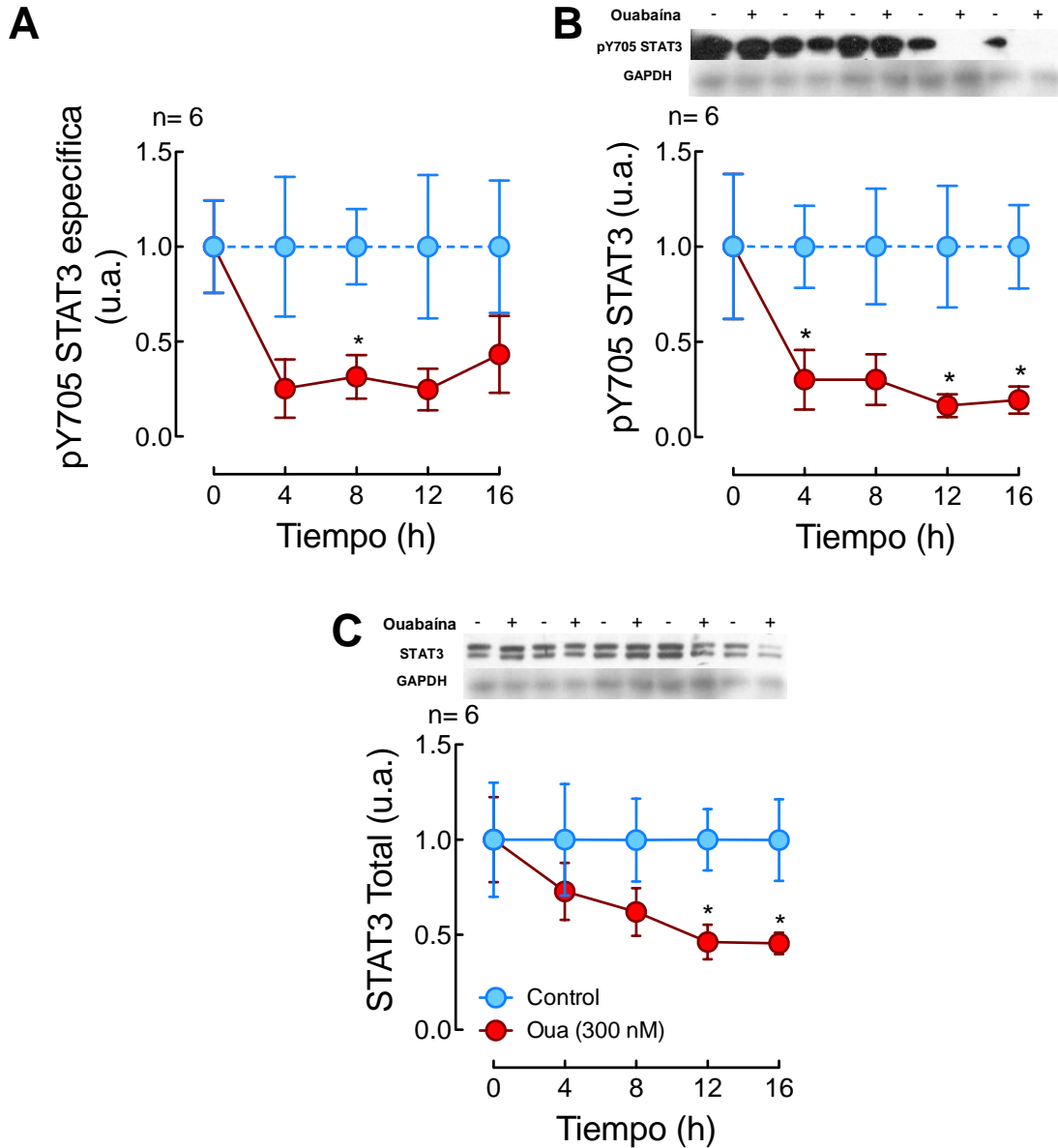
**Figura 10. La ouabaína induce el desensamble de las UEs.** Las células MDCK se cultivaron en multicámaras de 24 pozos con y sin 300 nM de ouabaína en función del tiempo. (A) Imágenes de contraste de fase de las monocapas tomadas a los tiempos en las horas indicadas. (B) Cantidad de proteína remanente adherida al sustrato y (C) Resistencia eléctrica transepitelial, en condiciones control (círculos azules) y con ouabaína (círculos rojos).

Para investigar si la ouabaína cambia la localización y/o cantidad de STAT3 total teñimos la proteína con anticuerpos fluorescentes. En la condición control STAT3 total se localiza principalmente en el núcleo y la OUA reduce la cantidad de STAT3 nuclear (Figura 11). En las células control la cldn-2 se localiza en la UE en un patrón semejante a una malla de gallinero y en el interior celular. La OUA induce la endocitosis y degradación de la cldn-2 como se ha demostrado<sup>117</sup>.



**Figura 11. La ouabaína reduce el STAT3 nuclear y aumenta el citoplásmico.** Las células MDCK se cultivaron con y sin 300 nM de ouabaína. En verde se muestra a la cldn-2, en rojo a STAT3 total y en azul los núcleos.

Para confirmar que STAT3 total disminuye e investigar su estado de activación se midió por electrotransferencia, inmunoblot e inmunodetección el contenido celular de STAT3 P(Y705) y STAT3 total. La fosforilación específica disminuye a partir de las 4 horas, lo que indica que la OUA induce la inactivación de STAT3 (Figura 12 A). Estos resultados indican que STAT3 primero se inactiva y luego se degrada, pues el contenido celular de STAT3 P(Y705) disminuye a partir de las 4 horas y el de STAT3 total hasta las 12 horas (Figura 12B,C).



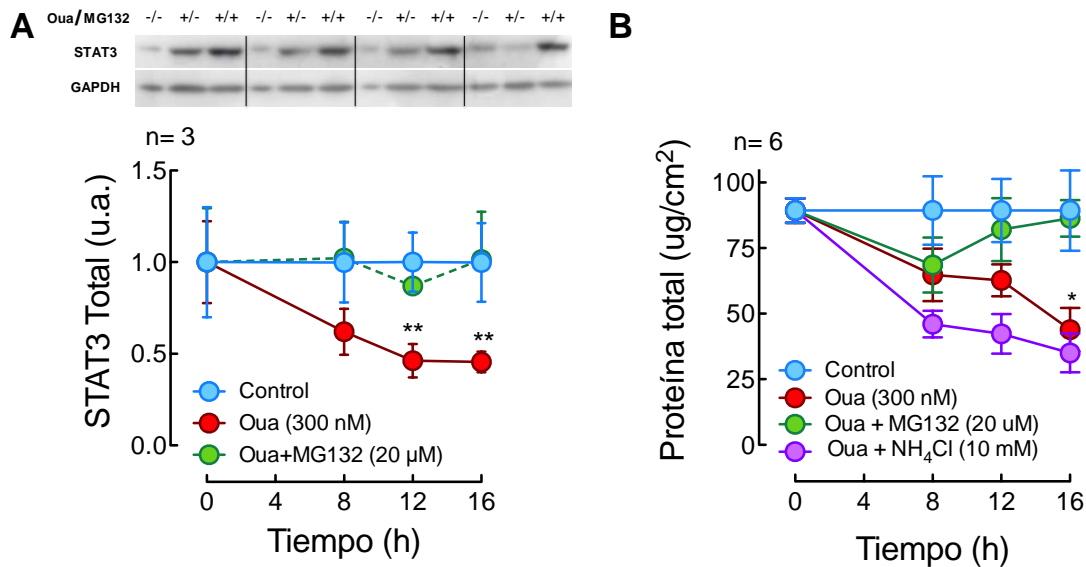
**Figura 12. La ouabaína a una concentración de 300 nM inactiva a STAT3 y disminuye su contenido celular.** Análisis densitométrico de 6 experimentos independientes. (A) Fosforilación específica en la Y705, obtenida a partir de la relación entre pY705 STAT3 y STAT3 total, en función del tiempo con OUA, en condiciones control (círculos azules) y con OUA (círculos rojos). (B) Fosforilación en Y705 en función del tiempo con OUA, símbolos como en A, sobre la gráfica se muestra un ejemplo del inmunoblot. (C) Contenido celular de STAT3 total. \* $p < 0.05$ .

Sabemos que la cldn-2 se degrada en los compartimentos lisosomales<sup>63</sup>, sin embargo, desconocemos cómo se degrada STAT3. Por esta razón es necesario investigar ahora cómo se degrada STAT3



## Objetivo 2

STAT3 es una proteína citosólica. Este tipo de proteínas suele degradarse en el proteosoma. Para demostrar esta posibilidad se cultivaron células MDCK de la manera ya descrita, pero en presencia de MG132, un inhibidor del proteosoma y se midió la cantidad de STAT3 total. El MG132 bloquea el efecto de la OUA sobre STAT3, demostrando que la OUA a altas concentraciones induce la degradación de STAT3 en el proteosoma (Figura 13 A). En seguida se investigó si STAT3 es necesario para la adhesión celular en un experimento análogo al anterior, pero midiendo la proteína total que permanece adherida al sustrato, en presencia tanto de MG132 como de NH<sub>4</sub>Cl, un inhibidor del lisosoma, que inhibe la degradación de las moléculas de adhesión en general y de cldn-2 en particular. La OUA induce el despegue celular del sustrato, fenómeno que bloquea el MG132, pero no el NH<sub>4</sub>Cl, lo que indica que la adhesión al sustrato depende de una cantidad normal de STAT3 en la célula (Figura 13B).

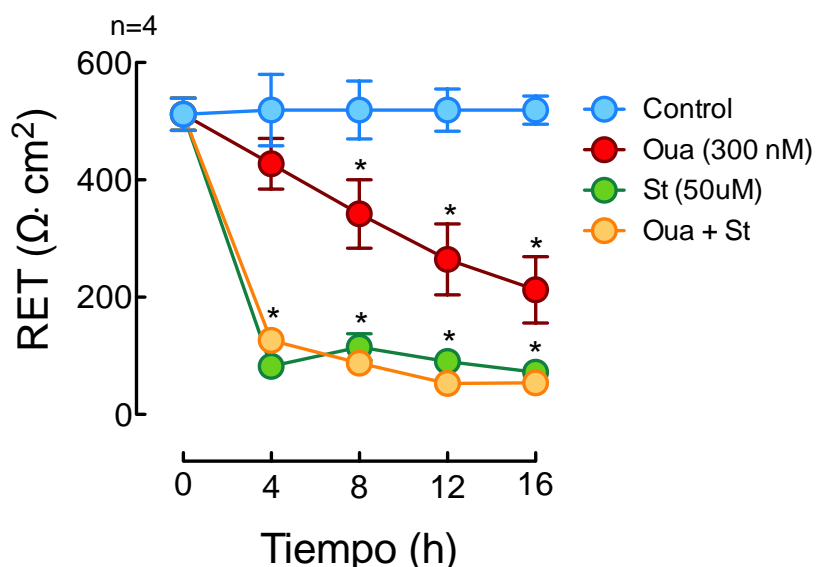


**Figura 13. La OUA a una concentración de 300 nM induce la degradación proteosomal de STAT3.** (A) Análisis densitométrico de STAT3 total en función del tiempo, en condiciones control (círculos azules), con OUA (círculos rojos) y con OUA + MG132 (círculos verdes). Sobre la gráfica se muestra un ejemplo del inmunoblot. (B) Proteína total que permanece adherida al sustrato en función del tiempo en condiciones control (círculos azules), con OUA 300 nM (círculos rojos), con OUA + MG132 (círculos verdes) y con OUA + NH<sub>4</sub>Cl (círculos morados).

El hecho de que la OUA inactive transitoriamente y degrade permanentemente a STAT3 durante el despegue de las células del sustrato, sugiere que además de su contenido celular, es necesaria su actividad. Para investigar esta posibilidad disponemos de static, un inhibidor de STAT3 altamente específico, que impide su fosforilación en la Y705 y su dimerización. Esta sustancia debería actuar como la OUA y potenciar su efecto.

### **Objetivo 3**

Dado que la apertura de la UE es el primer efecto que se observó, se investigó el papel de la actividad de STAT3 en monocapas sembradas sobre filtros y se midió la RET. Como se mostró en la figura 10C, la OUA induce la disminución progresiva de la RET. Los resultados muestran que static acelera la disminución de la RET que inducen las concentraciones altas de ouabaína y que a una concentración de 50  $\mu$ M, por si solo, es capaz de reducir la RET más eficientemente que la OUA 300 nM (Figura 14). Estos resultados demuestran que las UE normalmente requieren de la actividad de STAT3 para mantenerse selladas.



**Figura 14. La inhibición de STAT3 con static acelera la apertura de la UE inducida con OUA.** La RET, un parámetro eléctrico que refleja el grado de hermeticidad de la UE, se midió en células sembradas en insertos, en condiciones control (círculos azules), en presencia de OUA 300 nM (círculos rojos), de static (círculos verdes) o de ambas sustancias (círculos amarillos). Static provoca un efecto similar a la OUA y lo potencia.

## Discusión

Las uniones celulares, en particular las UEs, se regulan por sustancias del exterior celular y/o del ambiente. Dos de esas sustancias son el EGF y la ouabaína<sup>122</sup>. La OUA tiene efectos contrarios dependiendo de la concentración: mientras que a 10 nM, una concentración cercana a la hormonal, aumenta el sellado de la UE<sup>109</sup> y la comunicación intercelular mediada por GAPs<sup>111</sup>, y se acelera la ciliación<sup>110</sup>, a altas concentraciones ( $\geq 300$  nM) induce el despegue de las células vecinas y del sustrato<sup>123,113</sup>. En esta tesis se estudió el efecto sobre la adhesión de altas concentraciones de OUA y se demostró que el despegue inducido por OUA depende de la inactivación y degradación proteasomal de STAT3.

No resulta extraño que STAT3 se degrade en el proteasoma, la vía de degradación más común de las proteínas citosólicas y muy común en las asociadas a la membrana por ejemplo la  $\beta$ -catenina<sup>15</sup> o ZO-2<sup>124</sup>, pero es notable que la inhibición del proteasoma sea suficiente para bloquear el despegue de las células del sustrato (Figura 13B). Este resultado indica que la presencia de una cantidad normal de STAT3 total es crucial para mantener la adhesión. Falta investigar aún si la apertura de la UE también es dependiente de la inactivación y degradación de STAT3. En este sentido, se sabe que el EGF induce un aumento de la RET provocado por la endocitosis y degradación de la cldn-2, al mismo tiempo que la síntesis y fusión exocítica de la cldn-4 a la membrana mediante la activación de STAT3<sup>65</sup>.

Es común que las uniones celulares se degraden en módulos ensamblados que se internalizan como resultado de una señal, como la disminución drástica del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular o por procesos como la migración celular, y que arriben por la ruta endocítica o por el autofagosoma al lisosoma y se degraden<sup>124</sup>. Así, en el laboratorio se ha observado que el EGF induce la colocalización de la cldn-2 con p62, una proteína del autofagosoma, demostrando que esta cldn se degrada por autofagia (Resutados no publicados, Jessica Campos Blazquez). También se ha observado que la inhibición de STAT3 con stattic impide la endocitosis y degradación de la cldn-2 que desencadena el EGF<sup>65</sup>. Si la activación de STAT3 es crucial para la

adhesión celular esperamos que el tratamiento prolongado de las monocapas de células MDCK cultivadas sobre filtros, con altas concentraciones de stattic y la expresión de dominantes negativos de STAT3, promuevan la apertura de la UE. Aún más, considerando que STAT3 es crucial para la sobrevivencia celular, es muy probable que dichas manipulaciones experimentales provoquen finalmente la muerte celular.

La serine/treonin cinasa Akt y la proteína diana de rapamicina en células de mamífero mTOR, son un nodo crucial en vías de señalización que regulan la supervivencia celular y proliferación<sup>129,130</sup>. Actualmente se ha demostrado que la OUA a altas concentraciones inactiva a Akt y mTOR en células tumorales en un proceso que conlleva a la disminución de la viabilidad, y a una reducción en el número de células adheridas al sustrato y la motilidad celular<sup>131</sup>. Ya que la vía de señalización de Akt/mTOR regula la expresión de STAT3 cabe esperar que la OUA 300 nM también regule la vía Akt/mTOR<sup>132</sup>.

La OUA a altas concentraciones primero inactiva a STAT3 y luego la degrada (Figura 12B y C). La inactivación específica de STAT3 no puede atribuirse a que el número de células vaya disminuyendo pues, además de que se cargó la misma cantidad de proteína en los geles, a las 16 h de tratamiento con OUA aún permanece la mayor parte de la monocapa celular (Figura 10 A). Al utilizar mutantes de STAT3 que no se pueden fosforilar en la Y705 y/o la S727, podríamos confirmar que la inactivación es necesaria para la degradación de STAT3, si dichas mutantes se degradan más rápidamente con y aún sin OUA. Por el contrario, cabe esperar que las mutantes fosfomiméticas se degraden más lentamente con OUA. Ya disponemos de dichas mutante y las probaremos en el futuro.

STAT3 parece actuar a varios niveles para regular la adhesión celular. En primer lugar, la OUA se une a la subunidad  $\alpha$  de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa, activa a la c-Scr unida y ésta fosforila o promueve la autofosforilación del receptor al EGF<sup>100</sup>. Aparecen entonces sitios de unión para JAK que unen y fosforilaran a STAT<sup>36,66,67,69</sup>. También STAT3 podría participar en la endocitosis y/o como factor de transcripción. STAT3 seguramente tiene un papel bloqueando o promoviendo directamente la transcripción de reguladores de la estabilidad de los mensajeros de las cldn, como

el siRNA para miR-497<sup>121</sup>. Los promotores de las cldns -2 y -4 albergan secuencias de unión para las proteínas STAT y el EGF inhibe la expresión de un reportero bajo el control del promotor de la cldn-2 en células MDCK (Resultados no publicados, Catalina Flores-Maldonado).

## Conclusión

En conclusión, en esta tesis se demuestra que la ouabaína, a altas concentraciones, induce el despegue celular a través de la inactivación y degradación proteasomal de STAT3. La proteína STAT3 es necesaria para mantener la adhesión celular.

## Referencias

1. Cereijido, M., Contreras, R. G. & Shoshani, L. Cell Adhesion, Polarity, and Epithelia in the Dawn of Metazoans. *Physiol. Rev.***84**, 1229–1262 (2004).
2. Koefoed-Johnsen, V. & Ussing, H. H. The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol. Scand.***42**, 298–308 (1958).
3. Cereijido, M., Contreras, R. G., Shoshani, L. & García-Villegas, M. R. Membrane targeting. *Prog. Biophys. Mol. Biol.***81**, 81–115 (2003).
4. Farquhar, M. G. & Palade, G. E. Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.***17**, 375–412 (1963).
5. Cereijido, M., Valdés, J., Shoshani, L. & Contreras, R. G. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu. Rev. Physiol.***60**, 161–177 (1998).
6. Yeaman, C., Grindstaff, K. K., Hansen, M. D. & Nelson, W. J. Cell polarity: Versatile scaffolds keep things in place. *Curr. Biol.***9**, R515-7 (1999).
7. Poulsen, E. *et al.* New Insights to Clathrin and Adaptor Protein 2 for the Design and Development of Therapeutic Strategies. *Int. J. Mol. Sci.***16**, 29446–29453 (2015).
8. Chen, L., Tuo, B. & Dong, H. Regulation of Intestinal Glucose Absorption by Ion Channels and Transporters. *Nutrients***8**, 43 (2016).
9. Cereijido, M. *et al.* in 3–21 (Springer, Boston, MA, 1993). doi:10.1007/978-1-4615-2898-2\_1
10. Price, E. R., Rott, K. H., Caviedes-Vidal, E. & Karasov, W. H. Claudin gene expression patterns do not associate with interspecific differences in paracellular nutrient absorption. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.***191**, 36–45 (2016).
11. Simon, D. B. *et al.* Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science***285**, 103–6 (1999).
12. Cheng, C. Y. & Mruk, D. D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol. Rev.***82**, 825–74 (2002).
13. Brazil, J. C. & Parkos, C. A. Pathobiology of neutrophil-epithelial interactions. *Immunol. Rev.***273**, 94–111 (2016).
14. Thuenauer, R., Müller, S. K. & Römer, W. Pathways of protein and lipid receptor-mediated transcytosis in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.***14**, 341–351 (2017).
15. Clevers, H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell***127**, 469–480 (2006).
16. 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.***292**, 51–66 (2004).
17. Balda, M. S. & Matter, K. Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.***13**, 310–8 (2003).
18. Balda, M. S., Garrett, M. D. & Matter, K. The ZO-1-associated Y-box factor

- ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J. Cell Biol.***160**, 423–32 (2003).
19. Broussard, J. A., Getsios, S. & Green, K. J. Desmosome regulation and signaling in disease. *Cell Tissue Res.***360**, 501–12 (2015).
  20. Cereijido, M., González-Mariscal, L. & Contreras, R. G. Epithelial tight junctions. *Am. Rev. Respir. Dis.***138**, S17-21 (1988).
  21. Claude, P. & Goodenough, D. A. Fracture faces of zonulae occludentes from “tight” and “leaky” epithelia. *J. Cell Biol.***58**, 390–400 (1973).
  22. Diamond, J. M. Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist***20**, 10–8 (1977).
  23. Mandel, L. J., Bacallao, R. & Zampighi, G. Uncoupling of the molecular ‘fence’ and paracellular ‘gate’ functions in epithelial tight junctions. *Nature***361**, 552–555 (1993).
  24. Dragsten, P. R., Blumenthal, R. & Handler, J. S. Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature***294**, 718–22 (1981).
  25. van Meer, G. & Simons, K. 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.***5**, 1455–64 (1986).
  26. Cereijido, M., Contreras, R. G. & Gonzalez-Mariscal, L. Development and alteration of polarity. *Annu. Rev. Physiol.***51**, 785–95 (1989).
  27. Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. & Tsukita, S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.***141**, 1539–50 (1998).
  28. Haseloff, R. F., Dithmer, S., Winkler, L., Wolburg, H. & Blasig, I. E. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood–brain barrier: Structural and functional aspects. *Semin. Cell Dev. Biol.***38**, 16–25 (2015).
  29. Cereijido, M. *et al.* New diseases derived or associated with the tight junction. *Arch. Med. Res.***38**, 465–78 (2007).
  30. González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. & Jaramillo, B. E. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.***81**, 1–44 (2003).
  31. Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***2**, 285–93 (2001).
  32. Anderson, J. M. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol. Sci.***16**, 126–30 (2001).
  33. Cereijido, M. & Anderson, J. *Tight junctions*. (CRC Press, 2001).
  34. Gonzalez-Mariscal, L. *Tight Junctions*. (Springer US, 2006). doi:10.1007/0-387-36673-3
  35. Weber, C. R. *et al.* Claudin-2-dependent paracellular channels are dynamically gated. *Elife* **4**, (2015).
  36. Rawlings JS<sup>1</sup>, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004 Mar 15;**117**(Pt 8):1281-3.
  37. Kottra, G. & Frömter, E. Functional properties of the paracellular pathway in some leaky epithelia. *J. Exp. Biol.***106**, 217–29 (1983).
  38. Günzel, D. & Yu, A. S. L. Claudins and the modulation of tight junction

- permeability. *Physiol. Rev.***93**, 525–69 (2013).
39. Anderson, J. M., Stevenson, B. R., Jesaitis, L. A., Goodenough, D. A. & Mooseker, M. S. Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.***106**, 1141–9 (1988).
  40. González-Mariscal, L., Betanzos, A. & Avila-Flores, A. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin. Cell Dev. Biol.***11**, 315–24 (2000).
  41. González-Mariscal, L. *et al.* Molecular Characterization of the Tight Junction Protein ZO-1 in MDCK Cells. *Exp. Cell Res.***248**, 97–109 (1999).
  42. González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. & Jaramillo, B. E. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.***81**, 1–44 (2003).
  43. Cereijido, M., Robbins, E. S., Dolan, W. J., Rotunno, C. A. & Sabatini, D. D. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell Biol.***77**, 853–80 (1978).
  44. Boulpaep, E. L. & Seely, J. F. Electrophysiology of proximal and distal tubules in the autoperfused dog kidney. *Am. J. Physiol.***221**, 1084–96 (1971).
  45. Lutz, M., Cardinal, J. & Burg, M. Electrical resistance of renal proximal tubule perfused in vitro. *Am. J. Physiol. Content***225**, 729–734 (1973).
  46. Helman, S. I., Grantham, J. J. & Burg, M. B. Effect of vasopressin on electrical resistance of renal cortical collecting tubules. *Am. J. Physiol.***220**, 1825–32 (1971).
  47. Rau, W. S. & Frömter, E. Electrical properties of the medullary collecting ducts of the golden hamster kidney. II. The transepithelial resistance. *Pflugers Arch.***351**, 113–31 (1974).
  48. Lavelle, J. P. *et al.* Urothelial pathophysiological changes in feline interstitial cystitis: a human model. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.***278**, F540-53 (2000).
  49. Lewis, S. A., Eaton, D. C., Clausen, C. & Diamond, J. M. Nystatin as a probe for investigating the electrical properties of a tight epithelium. *J. Gen. Physiol.***70**, 427–40 (1977).
  50. Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. & Tsukita, S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J. Cell Biol.***153**, 263–72 (2001).
  51. Amasheh, S. *et al.* Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.***115**, 4969–76 (2002).
  52. Rosenthal, R. *et al.* Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J. Cell Sci.***123**, 1913–1921 (2010).
  53. Flores-Benítez, D. *et al.* Control of tight junctional sealing: role of epidermal growth factor. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.***292**, F828-36 (2007).
  54. Kiuchi-Saishin, Y. *et al.* Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J. Am. Soc. Nephrol.***13**, 875–86 (2002).
  55. Reyes, J. L. *et al.* The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int.***62**, 476–87 (2002).
  56. Muto, S. *et al.* Claudin-2–deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proc.*



- Natl. Acad. Sci.***107**, 8011–8016 (2010).
57. Colegio, O. R., Van Itallie, C., Rahner, C. & Anderson, J. M. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.***284**, C1346-54 (2003).
  58. Colegio, O. R., Van Itallie, C. M., McCrea, H. J., Rahner, C. & Anderson, J. M. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am. J. Physiol. Physiol.***283**, C142–C147 (2002).
  59. Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K. & Tsukita, S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***96**, 511–6 (1999).
  60. Gonzalez-Mariscal, L., Namorado, M. D. C., Martin, D., Sierra, G. & Reyes, J. L. The tight junction proteins claudin-7 and -8 display a different subcellular localization at Henle's loops and collecting ducts of rabbit kidney. *Nephrol. Dial. Transplant***21**, 2391–8 (2006).
  61. Gallardo, J. M. *et al.* Tight junctions are sensitive to peptides eliminated in the urine. *J. Membr. Biol.***188**, 33–42 (2002).
  62. Mullin, J. M. *et al.* Increased tight junction permeability can result from protein kinase C activation/translocation and act as a tumor promotional event in epithelial cancers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.***915**, 231–6 (2000).
  63. Ikari, A., Takiguchi, A., Atomi, K. & Sugatani, J. Epidermal growth factor increases clathrin-dependent endocytosis and degradation of claudin-2 protein in MDCK II cells. *J. Cell. Physiol.***226**, 2448–2456 (2011).
  64. Ikari, A. *et al.* Epidermal growth factor increases claudin-4 expression mediated by Sp1 elevation in MDCK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***384**, 306–310 (2009).
  65. García-Hernández, V. *et al.* EGF Regulates Claudin-2 and -4 Expression Through Src and STAT3 in MDCK Cells. *J. Cell. Physiol.***230**, 105–115 (2015).
  66. Leaman, D. W., Leung, S., Li, X. & Stark1, G. R. Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. *FASEB J.* 1996 Dec;**10**(14):1578-88.
  67. David, M. *et al.* STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. *J. Biol. Chem.***271**, 9185–8 (1996).
  68. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.***334 ( Pt 2)**, 297–314 (1998).
  69. Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T. U. & Berg, T. Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem. Biol.***13**, 1235–42 (2006).
  70. Levy, D. E. & Darnell, J. E. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***3**, 651–62 (2002).
  71. García-Hernández, V. *et al.* EGF Regulates Claudin-2 and -4 Expression Through Src and STAT3 in MDCK Cells. *J. Cell. Physiol.***230**, 105–115 (2015).
  72. Briscoe, J., Kohlhuber, F. & Müller, M. JAKs and STATs branch out. *Trends Cell Biol.***6**, 336–40 (1996).

73. Park, O. K., Schaefer, T. S. & Nathans, D. In vitro activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***93**, 13704–8 (1996).
74. Novak, U., Nice, E., Hamilton, J. A. & Paradiso, L. Requirement for Y706 of the murine (or Y708 of the human) CSF-1 receptor for STAT1 activation in response to CSF-1. *Oncogene***13**, 2607–13 (1996).
75. Yamamoto, H., Crow, M., Cheng, L., Lakatta, E. & Kinsella, J. PDGF receptor-to-nucleus signaling of p91 (STAT1 alpha) transcription factor in rat smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.***222**, 125–30 (1996).
76. Novak, U., Mui, A., Miyajima, A. & Paradiso, L. Formation of STAT5-containing DNA binding complexes in response to colony-stimulating factor-1 and platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.***271**, 18350–4 (1996).
77. Deberry, C., Mou, S. & Linnekin, D. Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor. *Biochem. J.***327 ( Pt 1)**, 73–80 (1997).
78. Ceresa, B. P. & Pessin, J. E. Insulin stimulates the serine phosphorylation of the signal transducer and activator of transcription (STAT3) isoform. *J. Biol. Chem.***271**, 12121–4 (1996).
79. Chen, X. H. *et al.* Jak1 expression is required for mediating interleukin-4-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate and Stat6 signaling molecules. *J. Biol. Chem.***272**, 6556–60 (1997).
80. Chuang, L. M., Wang, P. H., Chang, H. M. & Lee, S. C. Novel pathway of insulin signaling involving Stat1alpha in Hep3B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***235**, 317–20 (1997).
81. Schaper, F. *et al.* Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) signals via the STAT3/APRF transcription factor in human hepatoma cells and hepatocytes. *FEBS Lett.***405**, 99–103 (1997).
82. Bhat, G. J., Thekkumkara, T. J., Thomas, W. G., Conrad, K. M. & Baker, K. M. Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT1A receptor activates transcription factor-Stat91 and/or a related protein. *J. Biol. Chem.***269**, 31443–9 (1994).
83. Itoh, Y., Saitoh, M. & Miyazawa, K. Smad3-STAT3 crosstalk in pathophysiological contexts. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 1–9 (2017). doi:10.1093/abbs/gmx118
84. Cacalano, N. A. Regulation of Natural Killer Cell Function by STAT3. *Front. Immunol.***7**, 128 (2016).
85. Prassas, I. & Diamandis, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat. Rev. Drug Discov.***7**, 926–935 (2008).
86. Altamirano, E. & Drut, R. Arrhythmogenic cardiomyopathy in a patient with noonan syndrome. *Fetal Pediatr. Pathol.***29**, 158–164 (2010).
87. Bauer, N. *et al.* Ouabain-Like Compound Changes Rapidly on Physical Exercise in Humans and Dogs: Effects of -Blockade and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Hypertension***45**, 1024–1028 (2005).
88. Gottlieb, S. S. *et al.* Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation***86**, 420–5 (1992).
89. Nesher, M., Dvela, M., Igbokwe, V. U., Rosen, H. & Lichtstein, D. Physiological roles of endogenous ouabain in normal rats. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.***297**,

- H2026–H2034 (2009).
90. Dvela, M., Rosen, H., Ben-Ami, H. C. & Lichtstein, D. Endogenous ouabain regulates cell viability. *Am. J. Physiol. Physiol.***302**, C442–C452 (2012).
  91. Fedorova, O. V., Shapiro, J. I. & Bagrov, A. Y. Endogenous cardiotonic steroids and salt-sensitive hypertension. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.***1802**, 1230–1236 (2010).
  92. Kometiani, P. *et al.* Multiple signal transduction pathways link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.***273**, 15249–56 (1998).
  93. Rayson, B. M. Calcium: a mediator of the cellular response to chronic Na<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase inhibition. *J. Biol. Chem.***268**, 8851–4 (1993).
  94. Tian, J. *et al.* Changes in sodium pump expression dictate the effects of ouabain on cell growth. *J. Biol. Chem.***284**, 14921–9 (2009).
  95. SKOU, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta***23**, 394–401 (1957).
  96. Blanco, G. & Mercer, R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.***275**, F633-50 (1998).
  97. Schatzmann, H. J. & Räss, B. [Inhibition of the active Na-K-transport and Na-K-activated membrane ATP-ase of erythrocyte stroma by ouabain]. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta***65**, C47-9 (1965).
  98. Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F. & Toyoshima, C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci.***106**, 13742–13747 (2009).
  99. Fedorova, O. V., Shapiro, J. I. & Bagrov, A. Y. Endogenous cardiotonic steroids and salt-sensitive hypertension. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.***1802**, 1230–1236 (2010).
  100. Wang H<sup>1</sup>, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S, Xie Z. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem.* 2004 Apr 23;**279**(17):17250-9.
  101. Akimova, O., Tremblay, J., Hamet, P. & Orlov, S. N. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> sensor: Role in cardiovascular disease pathogenesis and augmented production of endogenous cardiotonic steroids. *Pathophysiology***13**, 209–216 (2006).
  102. Contreras, R. G. *et al.* Ouabain Binding to Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Relaxes Cell Attachment and Sends a Specific Signal (NACos) to the Nucleus. *J. Membr. Biol.***198**, 147–158 (2004).
  103. Oweis, S. *et al.* Cardiac glycoside downregulates NHE3 activity and expression in LLC-PK<sub>1</sub> cells. *Am. J. Physiol. Physiol.***290**, F997–F1008 (2006).
  104. Tian, J. *et al.* Binding of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Forms a Functional Signaling Complex. *Mol. Biol. Cell***17**, 317–326 (2005).
  105. Contreras, R. G. *et al.* Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and hormone ouabain: new roles for an old enzyme and an old inhibitor. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)***52**, 31–40 (2006).
  106. Larre, I. *et al.* Contacts and cooperation between cells depend on the hormone ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci.***103**, 10911–10916 (2006).

107. Yang, L., Yang, J., Huang, Y. & Liu, Z. R. Phosphorylation of p68 RNA helicase regulates RNA binding by the C-terminal domain of the protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***314**, 622–30 (2004).
108. Cai, T. *et al.* Regulation of caveolin-1 membrane trafficking by the Na/K-ATPase. *J. Cell Biol.***182**, 1153–69 (2008).
109. Larre, I. *et al.* Ouabain modulates epithelial cell tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci.***107**, 11387–11392 (2010).
110. Larre, I. *et al.* Ouabain modulates ciliogenesis in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.***108**, 20591–20596 (2011).
111. Ponce, A. *et al.* Ouabain Increases Gap Junctional Communication in Epithelial Cells. *Cell. Physiol. Biochem.***34**, 2081–2090 (2014).
112. Contreras, R. G., Shoshani, L., Flores-Maldonado, C., Lázaro, A. & Cereijido, M. Relationship between Na(+),K(+)-ATPase and cell attachment. *J. Cell Sci.***112 ( Pt 23)**, 4223–32 (1999).
113. Rincon-Heredia, R. *et al.* Ouabain induces endocytosis and degradation of tight junction proteins through ERK1/2-dependent pathways. *Exp. Cell Res.***320**, 108–118 (2014).
114. Ponce, A. *et al.* Ouabain Modulates the Distribution of Connexin 43 in Epithelial Cells. *Cell. Physiol. Biochem.***39**, 1329–38 (2016).
115. Troxell ML, Gopalakrishnan S, McCormack J, Poteat BA, Pennington J, Garringer SM, Schneeberger EE, Nelson WJ, Marrs JA. Inhibiting **cadherin** function by dominant mutant E-**cadherin** expression increases the extent of tight junction assembly. *J Cell Sci.* **2000** Mar;113 ( Pt 6):985-96. PMID:10683147.
116. Cukierman L , Meertens L , Bertaux C , Kajumo F , Dragic T .Residues in a highly conserved claudin-1 motif are required for hepatitis C virus entry and mediate the formation of cell-cell contacts.*J Virol* **83**: 5477-5484 (2009).
117. Blasig IE , Winkler L , Lassowski B , Mueller S.L , Zuleger N , Krause E , Krause G , Gast K , Kolbe M , Piontek J .On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins.*Cell Mol Life Sci* **63**: 505-514 (2006).
118. Suzuki, H., K. Tani, A. Tamura, S. Tsukita, and Y. Fujiyoshi. Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. *J. Mol. Biol.* **427**:291–297. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.10.020>
119. Suzuki, H., T. Nishizawa, K. Tani, Y. Yamazaki, A. Tamura, R. Ishitani, N. Dohmae, S. Tsukita, O. Nureki, and Y. Fujiyoshi. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science.* **344**:304–307. (2014). <https://doi.org/10.1126/science.1248571>
120. Samanta, P., Wang, Y., Fuladi, S., Zou, J., Li, Y., Shen, L., et al. Molecular determination of claudin-15 organization and channel selectivity. *The Journal of General Physiology,* **150(7)**, jgp.201711868–968. (2018). <http://doi.org/10.1085/jgp.201711868>
121. Hichino A<sup>1</sup>, Okamoto M<sup>1</sup>, Taga S<sup>1</sup>, Akizuki R<sup>1</sup>, Endo S<sup>1</sup>, Matsunaga T<sup>1</sup>, Ikari A<sup>2</sup>. Down-regulation of Claudin-2 Expression and Proliferation by Epigenetic Inhibitors in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *J Biol Chem.* 2017 Feb 10;**292(6)**:2411-2421.
122. Shoshani, L., Flores-Benitez, D., Gonzalez-Mariscal, L., & Contreras, R. G.

- (2006). Regulation of Tight Junctions' Functional Integrity. In *Tight Junctions* (pp. 146–163). Boston, MA: Springer US.
- 123 Contreras, R. G., Shoshani, L., Flores-Maldonado, C., Lazaro, A., & Cereijido, M. (1999). Relationship between Na(+),K(+)-ATPase and cell attachment. *Journal of Cell Science*, **112** ( Pt 23), 4223–4232.
  - 124 Flores-Maldonado, C., to, O. V.-T. A. M., 2017. (2017). Lysosomal degradation of junctional proteins. In *Lysosomes* (1st ed., pp. 93–126). InTech.
  - 125 Quiros M<sup>1</sup>, Alarcón L, Ponce A, Giannakouros T, González-Mariscal L. 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*. Aug;**24**(16):2528-43. (2013).
  126. Furuse M<sup>1</sup>, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol*. 1999 Nov 15;**147**(4):891-903.
  127. Morita K<sup>1</sup>, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jan 19;**96**(2):511-6.
  128. Van Itallie CM<sup>1</sup>, Fanning AS, Anderson JM. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Dec;**285**(6):F1078-84. Epub 2003 Sep 16.
  129. Anna Joy,<sup>1,5</sup> Manisha Kapoor,<sup>1</sup> Joseph Georges,<sup>1</sup> Lacy Butler,<sup>1</sup> Yongchang Chang,<sup>1</sup> Chaokun Li,<sup>1</sup>Acacia Crouch,<sup>1</sup> Ivan Smirnov,<sup>2</sup> Mitsitoshi Nakada,<sup>3</sup> James Hepler,<sup>1</sup> Max Marty,<sup>1</sup> and Burt G. Feuerstein<sup>4</sup> The role of AKT isoforms in glioblastoma: AKT3 delays tumor progression *J Neurooncol*. 2016 Oct; **130**(1): 43–52.
  130. Laura C. Kim,<sup>1</sup> Rebecca S. Cook,<sup>1,3</sup> and Jin Chen<sup>1,2,3,4,5,#</sup> mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene*. 2017 Apr 20; **36**(16): 2191–2201.
  - 131 Xiao-Sa Yang,<sup>1,\*</sup> Zhong-Wei Xu,<sup>2,\*</sup> Tai-Long Yi,<sup>1,\*</sup> Rui-Cheng Xu,<sup>3,\*</sup> Jie Li,<sup>1</sup> Wen-Bin Zhang,<sup>1</sup> Sai Zhang,<sup>1</sup> Hong-Tao Sun,<sup>1</sup> Ze-Qi Yu,<sup>1</sup> Hao-Xiang Xu,<sup>1</sup> Yue Tu,<sup>1</sup> and Shi-Xiang Cheng<sup>1</sup> Ouabain suppresses the growth and migration abilities of glioma U-87MG cells through inhibiting the Akt/mTOR signaling pathway and downregulating the expression of HIF-1 $\alpha$  *Mol Med Rep*. 2018 Apr; **17**(4): 5595–5600.
  132. Dai Z<sup>1</sup>, Wang L<sup>2</sup>, Wang X<sup>2</sup>, Zhao B<sup>2</sup>, Zhao W<sup>2</sup>, Bhardwaj SS<sup>2</sup>, Ye J<sup>2</sup>, Yin Z<sup>2</sup>, Zhang J<sup>2</sup>, Zhao S<sup>2</sup>. Oxymatrine induces cell cycle arrest and apoptosis and suppresses the invasion of human glioblastoma cells through the EGFR/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and STAT3. *Oncol Rep*. 2018 Aug;**40**(2):867-876.
  133. Huerta M<sup>1</sup>, Muñoz R, Tapia R, Soto-Reyes E, Ramírez L, Recillas-Targa F, González-Mariscal L, López-Bayghen E. Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Mol Biol Cell*. 2007 Dec;**18**(12):4826-36. Epub 2007 Sep 19.

