



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y
NEUROCIENCIAS

**La proteína ZO-2 regula la citoarquitectura epitelial modulando la
actividad de las proteínas Rho**

Tesis que presenta

M. en C. José Arturo Raya Sandino

para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

en la Especialidad de

Fisiología Celular y Molecular

Directora de Tesis:

Dra. Lorenza González-Mariscal

Ciudad de México

Diciembre, 2017

Prólogo

Esta tesis se hizo porque previamente en el laboratorio de la Dra. Lorenza González Mariscal se había visto que al silenciar parcialmente a ZO-2, una proteína de las uniones estrechas, se alteraba la citoarquitectura epitelial. Entonces, cuando el Dr. Alan Fanning de la Universidad de Carolina del Norte, desarrolló una línea de células epiteliales que no expresan a ZO-2, surgió la oportunidad ideal para estudiar el mecanismo a través del cual esta proteína regula la forma de las células. Este trabajo muestra que ZO-2 modula la actividad de las proteínas Rho y cambia la manera como se organiza el citoesqueleto. En particular, llama la atención la proliferación de las fibras de estrés que aparece como resultado de la ausencia de ZO-2, dado que este cambio ahora se asocia con el desarrollo de las metástasis. Por ello podemos concluir que las observaciones hechas en esta tesis nos refuerzan la idea de que ZO-2 es una nueva proteína supresora tumoral.

Ciudad de México, diciembre de 2017

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), en el laboratorio 29 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-IPN bajo la dirección de la Dra. Lorenza González-Mariscal.

Lista de Abreviaturas	6
Resumen	9
Abstract	10
I) Introducción	11
1) Los epitelios.....	11
2) La unión estrecha.....	11
3) Proteínas MAGUK y MAGI.....	15
3.1) Los dominios PDZ.....	16
3.2) El dominio GuK.....	17
3.3) El dominio SH3.....	17
3.4) La región carboxilo terminal.....	18
3.5) Las regiones únicas.....	19
3.6) Los macrodominios.....	19
4) Evolución de los genes para las proteínas ZO.....	20
5) ZO-2.....	22
5.1) Interacción de ZO-2 con otras proteínas.....	24
5.2) Tránsito intracelular de ZO-2.....	25
5.3) Función de ZO-2.....	26
5.3.1) Función de ZO-2 en la membrana.....	29
5.3.2) Función de ZO-2 en núcleo.....	31
5.3.3) ZO-2 como promotor de la apoptosis.....	33
5.3.4) ZO-2 como proteína supresora tumoral.....	33
5.3.5) ZO-2 como blanco de los oncogenes virales.....	34
5.3.6) ZO-2 como regulador del tamaño celular.....	34
5.3.7) ZO-2 como regulador de la arquitectura celular.....	35
6) El citoesqueleto de actomiosina.....	35
6.1) La actina.....	35
6.2) La miosina.....	36
6.3) El anillo cortical de actomiosina.....	37
6.4) Las fibras de estrés.....	38
7) La familia Rho.....	40
II) Objetivo	43
III) Hipótesis	43
IV) Material y Métodos	43
4.1 Las células MDCK ZO-2 KD.....	43
4.2 Ensayo de cambio a calcio.....	44
4.3 Transfección celular.....	44
4.4 Inmunofluorescencia.....	44
4.5 Western blot.....	45
4.6 Cortes semifinos.....	46

4.7 Ensayo de activación de las proteínas Rho	47
4.8 Localización de RhoA activa	47
4.9 Inmunoprecipitación	48
4.10 Ensayo de ligación por proximidad <i>in situ</i> Duolink	49
4.11 Fraccionamiento celular	49
4.12 Ensayo para evaluar la fortaleza de la adhesión célula-célula	50
4.13 Ensayo de desprendimiento de las células del sustrato	50
4.14 Ensayo de migración celular	50
4.15 Ensayo de movimiento celular	51
4.16 Formación de quistes	51
4.17 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-qPCR)	52
4.18 Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET)	53
4.19 Medición del flujo paracelular	53
4.20 Fármacos	54
V) Resultados	55
5.1 La ausencia de ZO-2 altera la citoarquitectura en induce la proliferación de las fibras de estrés	55
5.2 La falta de ZO-2 induce el reclutamiento de la vinculina a las adhesiones focales, disminuye la adhesión célula-célula y la expresión de claudina-7 e integrina β 1 y facilita la separación de las células del sustrato	55
5.3 La ausencia de ZO-2 induce la activación de Rac1 y la defosforilación de la cofilina, lo que promueve la formación de múltiples lamelipodios y reduce el movimiento con dirección, pero acelera el cierre de las heridas	60
5.4 La pérdida de ZO-2 promueve la activación de RhoA y de su efector ROCK II	66
5.5 El factor intercambiador de guanina GEF-H1 promueve la formación de fibras de estrés y se recluta al borde celular por la cingulina	79
5.6 La ausencia de ZO-2 disminuye la fosforilación de la cingulina y la asociación de los microtúbulos a la UE	84
5.7 ZO-2 regula la función de barrera de la UE y la expresión de la claudina-2	86
5.8 La falta de ZO-2 activa a Cdc42, desorienta al huso mitótico e induce la formación de quistes con múltiples lúmenes	91
VI) Discusión	92
VII) Bibliografía	99

Lista de abreviaturas

UE: Unión estrecha

UA: Unión adherente

CUA: Complejo de unión apical

MAGUK: Cinasa de guanilato asociada a la membrana

MAGI: MAGUK invertida

DLG: Disc Large

MPP: Proteína palmitoilada membranal

ZO: Zonula occludens

ZOO-1: Ortólogo de ZO-1

Pyd: Polychaetoid

PDZ: PSD-95/SAP-90; Dlg-A; ZO-1

SH3: homóloga 3 de Src

GuK: Cinasa de guanilato

U: Único

PBM: Motivo de unión al dominio PDZ

KO: Knock out

KD: Knock down

SLN: Señal de localización nuclear

SEN: Señal de exportación nuclear

SRPK: Cinasa de los repetidos de serina y arginina

ARVCF: Gen con “repetidos armadillo” ausente en el síndrome “Velo-cardio-facial”

MDCK: Madin-Darby de riñón de perro

WB: Western blot

IF: Inmunofluorescencia

Co-IP: Co-inmunoprecipitación

RET: Resistencia eléctrica transepitelial.

PLA: Ensayo de ligación por proximidad.

shARN: ARN pequeño en forma de horquilla

ARNm: ARN mensajero

RBD: Dominio de unión a RhoA-GTP

LPA: Ácido lisofosfatídico

BC: Bajo calcio

CN: Calcio normal

FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster

CFP_{em}: Emisión de la proteína cian fluorescente

CUA: Complejo de unión apical

GEF: Factor intercambiador del nucleótido guanina

PAK4: Cinasa activada por p21

AMPK: Cinasa activada por AMP

PFA: Paraformaldehído

CDMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco complementado con suero fetal bovino, insulina y penicilina/estreptomicina.

ANOVA: Análisis de varianza

ROCK: Cinasa activada por RhoA

p-MLC2: Cadena ligera fosforilada de la miosina 2

ABR: Región de unión a la actina

pb: pares de bases

Resumen

Zonula occludens 2 (ZO-2) es una proteína periférica de las uniones estrechas (UE). Esta proteína se localiza tanto en el borde celular como en el núcleo y contiene múltiples dominios de asociación a diversas proteínas. Por ello, es importante explorar cuáles son todas las funciones de ZO-2. En esta tesis, seguimos la estrategia de silenciar a ZO-2 en las células epiteliales renales MDCK y observar qué cambios se generan, para descubrir así en qué procesos es crucial la participación de esta proteína. Observamos que la ausencia de ZO-2: 1) Disminuye la adhesión de las células al sustrato, que se acompaña de una caída en la expresión de claudina-7 e integrina $\beta 1$, de un mayor reclutamiento de vinculina a las adhesiones focales y de la formación de fibras de estrés; 2) Reduce la agregación celular y provoca la aparición de espacios intercelulares más amplios; 3) Activa a la vía de señalización RhoA/ROCK, a través del reclutamiento de GEF-H1 a los bordes celulares por la cingulina; 4) Aumenta la actividad de Cdc42, desorienta al huso mitótico e induce la aparición de quistes con múltiples lúmenes; 5) Aumenta la actividad de Rac1 y cofilina, la formación de múltiples lamelas, la migración celular aleatoria, y la velocidad de cierre de las heridas; 6) Disminuye la fosforilación de la cingulina y produce la desaparición de la red planar de microtúbulos que se asocia a la UE; y 7) Aumenta la resistencia eléctrica transepitelial en las monocapas en estado estacionario, y esto se acompaña de un aumento en la expresión de ZO-1 y claudina-4 y una disminución en la expresión de claudina-2 y paracingulina. En conjunto, estos resultados indican que ZO-2 además de modular la función de barrera, es un regulador clave de la actividad de las proteínas Rho y la citoarquitectura epitelial.

Abstract

Zonula occludens 2 (ZO-2) is a peripheral tight junction (TJ) protein that localizes both at the cell borders and the nucleus. ZO-2 is a scaffold protein that associates to a wide variety of proteins. Here, our aim was to discover novel functions of ZO-2. For this purpose, we worked with renal epithelial cells MDCK where the expression of ZO-2 had been silenced. We observed that the lack of ZO-2: 1) Decreased cell to substratum attachment, accompanied by reduced expression of claudin-7 and integrin β 1, and increased vinculin recruitment to focal adhesions and stress fibers formation; 2) Lowered cell-cell aggregation and appearance of wider intercellular spaces; 3) Increased RhoA/ROCK activity, mediated by GEF- H1 recruitment to cell borders by cingulin; 4) Increased Cdc42 activity, mitotic spindle disorientation and the appearance of cysts with multiple lumens; 5) Increased Rac1 and cofilin activity, multiple lamellipodia formation and random cell migration but increased wound closure; 6) Diminished cingulin phosphorylation and disappearance of planar network of microtubules at the TJ region; and 7) Increased transepithelial electrical resistance at steady state, coupled to an increased expression of ZO-1 and claudin-4 and a decreased expression of claudin-2 and paracingulin. Hence, ZO-2 is a crucial regulator of Rho proteins activity and the development of epithelial cytoarchitecture and barrier function.

I) Introducción

1) Los epitelios

Los epitelios constituyen la frontera entre el individuo y el medio externo. En los organismos pluricelulares los epitelios recubren la superficie corporal (e.g. piel), así como los túbulos (e.g. intestino, túbulos renales y esófago) y cavidades (e.g. estómago, útero, próstata y vejiga) del organismo. Los epitelios están formados por células estrechamente unidas entre sí que modulan selectivamente el paso de iones y moléculas del exterior al interior del organismo y viceversa. El tránsito de sustancias ocurre por dos vías, la paracelular, entre las células adyacentes, y la transcelular, a través de la célula.

Las células epiteliales se organizan en múltiples estratos cuando se encuentran sometidas a alta presión mecánica. Tal es el caso por ejemplo de la piel, la boca, el esófago, la vagina y la córnea. En el resto de los tejidos los epitelios se organizan en monocapas.

Las células epiteliales son poligonales pero su forma puede variar. De esta manera hay células epiteliales cilíndricas como las del intestino, escamosas como las del pulmón o tubulares como en los túbulos renales. Sin embargo, todas las células epiteliales tienen en común dos características distintivas. La primera es que están polarizadas en dos dominios de membrana plasmática: el apical que se orienta hacia el exterior o la luz de los túbulos y las cavidades, y el basolateral en contacto con el parénquima y el medio interno subyacente. Cada dominio tiene una composición química y estructura particular. La segunda característica de los epitelios es que poseen uniones estrechas (UEs) (Cereijido et al., 2004).

2) La unión estrecha

La UE es una estructura de adhesión célula-célula que se localiza en la porción más apical de la membrana lateral, arriba de las uniones adherentes (UA) y los desmosomas. Por microscopía electrónica de transmisión la UE se observa como una región donde parecen fundirse las caras exoplásmicas de la membrana plasmática de las células adyacentes en puntos denominados “besos” que obliteran

el espacio intercelular (Fig. 1A). Mediante la técnica de crio-fractura la UE aparece en la cara protoplásmica (P) de la membrana como una red de filamentos continuos entrelazados que se localiza por debajo de las microvellosidades apicales (Fig. 1B). En la cara exoplásmica (E), la UE se observa como una red de zurcos complementarios (Staehelin et al., 1969).

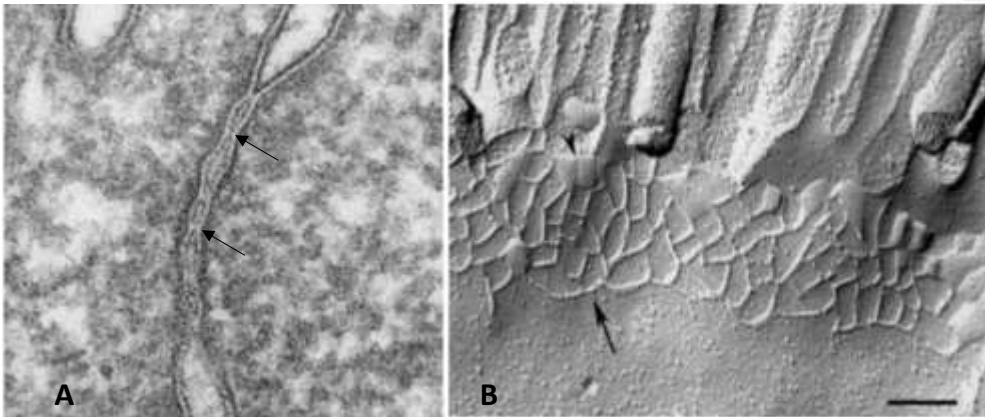


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de la UE en las células epiteliales. A) Imagen de microscopía electrónica de la UE. La UE se observa en la porción más apical de la membrana lateral como una zona donde se oblitera el espacio entre las células adyacentes en los llamados “besos” (flechas) [Imagen tomada de (Furuse, 2010)]. B) Imagen de microscopía electrónica de una crio-fractura de la UE. La UE aparece como una red de filamentos continuos que se entrelazan por debajo de las microvellosidades de la cara apical. Se observan filamentos en la cara protoplásmica (P) (flecha) y zurcos en la cara exoplásmica (E) (cabeza de flecha). [Imagen adaptada de (Furuse, 2010)].

La UE funciona como una compuerta ya que regula el paso de iones y moléculas por la ruta paracelular. Además, tiene actividad de cerca pues evita la libre difusión de lípidos y proteínas entre los dominios apical y basolateral en el plano de la membrana (Diamond, 1977; Mandel et al., 1993). Sin embargo, esta última percepción se ha cuestionado ya que las células EpH4 que no desarrollan UEs porque no expresan a las proteínas ZO mantienen la distribución polarizada de lípidos (Ikenouchi et al., 2007) y proteínas (Umeda et al., 2006) entre la membrana apical y basolateral. Además, se ha visto que cuando las células epiteliales se siembran de manera individual, se polarizan si se activa a la cinasa LKB1 a través

de la proteína adaptadora STRAD (Baas et al., 2004). LKB1 es una proteína que participa en la formación y el establecimiento de la polaridad celular (Nakano and Takashima, 2012).

La UE está constituida por diversas proteínas transmembranales tales como las proteínas tetraspán de la familia MARVEL, como ocludina, tricelulina y MarvelD3; la familia de las claudinas, responsables de la selectividad iónica del tejido, y las proteínas que atraviesan una sola vez la membrana que pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas, como las angulinas y las JAMs (Fig. 2). Estas proteínas integrales establecen el contacto célula-célula en la región de la UE.

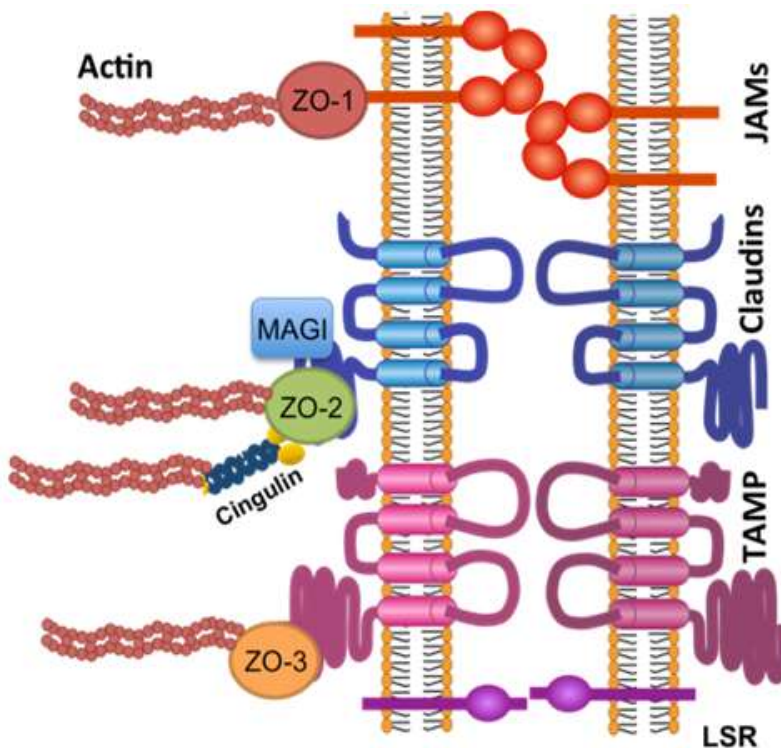


Figura 2. La UE se compone de un complejo de proteínas integrales y periféricas. Las proteínas integrales de la UE se clasifican en aquellas que cruzan una sola vez la membrana, como las angulinas (LSR) y la familia de las JAMs, así como las proteínas tetraspán, que incluyen a la familia de las claudinas y a las proteínas TAMP (occludina, tricelulina y marvelD3). En la imagen se muestran dímeros de JAMs que se asocian por su porción extracelular. En la cara citoplásmica, la UE presenta

proteínas periféricas tales como las ZO, las proteínas MAGIs, la cingulina y la paracingulina. Las proteínas integrales establecen los contactos célula-célula en el espacio intercelular, mientras que las proteínas periféricas forman un puente entre las proteínas integrales y el citoesqueleto de actina (Gonzalez-Mariscal et al., 2012).

En la porción citoplásmica de la UE también se localizan múltiples proteínas que funcionan como un puente entre las proteínas integrales y el citoesqueleto de actina (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Entre ellas destacan las proteínas cingulina y paracingulina, cuya organización se asemeja a la de la miosina II ya que tienen una estructura de homodímeros paralelos con cabeza, un cilindro intermedio y una cola globular (Fig. 3). Sin embargo, las proteínas que más abundan en la región submembranal de la UE son las que poseen dominios PDZ. Estas se clasifican en los siguientes grupos: 1) MAGUK, como ZO-1, -2 y -3 y Pals1; 2) MAGUK invertidas como MAGI-1, -2 y -3; 3) Con múltiples dominios PDZ como PATJ y MUPP1; y 4) Con dominios PDZ pero que no pertenecen a las familias anteriores como afadina, PAR-3 y PAR-6 (Fig. 4).

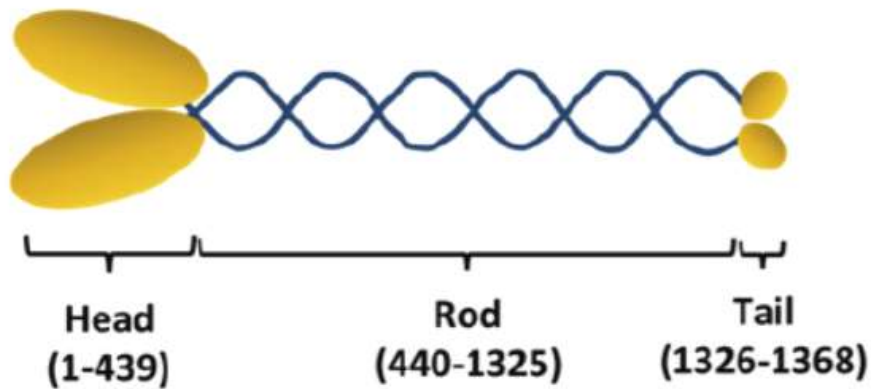


Figura 3. La cingulina se organiza formando homodímeros paralelos. Cada subunidad de la cingulina posee un dominio globular en forma de cabeza en la región amino terminal, un cilindro en la porción media y una cola globular en la porción carboxilo terminal. La estructura de la cingulina es similar a la de la miosina II.

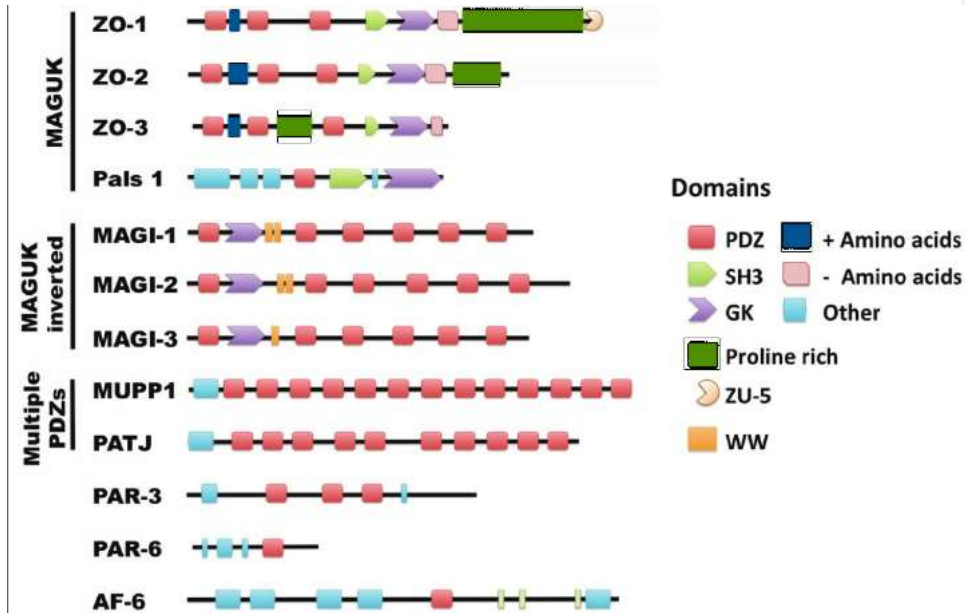


Figura 4. Esquema de las proteínas con dominios PDZ que se localizan en la UE. Las proteínas que pertenecen a la familia MAGUK presentan además de los dominios PDZ, a los dominios SH3 y GuK. Las proteínas ZOs tienen 3 dominios PDZ, mientras que Pals1 solo tiene uno. Las proteínas MAGIs poseen una organización invertida, ya que el dominio GuK se localiza antes de la mayoría de los dominios PDZ. Además, las proteínas MAGIs tienen dominios WW en lugar de SH3. Las proteínas con múltiples dominios PDZ incluyen a MUPP1 y PATJ, las cuales presentan 13 y 10 dominios PDZ respectivamente (Gonzalez-Mariscal et al., 2012).

3) Proteínas MAGUK y MAGI

Las proteínas de la familia MAGUK se localizan en las UEs y UAs (Bossinger et al., 2001; Firestein and Rongo, 2001; Gonzalez-Mariscal et al., 2000), en las uniones septadas de los insectos (Woods and Bryant, 1991) y en las densidades sinápticas de las neuronas (Cho et al., 1992; Kistner et al., 1993).

Las proteínas MAGUK tienen como característica distintiva a un módulo con al menos a un dominio PDZ, un dominio SH3 y un dominio de cinasa de guanilato (GuK) catalíticamente inactivo (Fig. 4).

El dominio amino terminal de las proteínas MAGUK se une a los componentes transmembranales de la UE, mientras que la porción carboxilo terminal se asocia con el citoesqueleto de actina (Lye et al., 2010).

En la UE también se localizan proteínas MAGUK invertidas o MAGIs que se caracterizan porque en ellas la mayoría de los dominios PDZ se localizan en la porción carboxilo terminal de la molécula al revés de lo que sucede en las MAGUK donde estos dominios se ubican hacia el extremo amino (Fig. 4). Además, en las MAGIs en lugar del dominio SH3, se presenta un dominio WW, que, aunque también se une a motivos ricos en prolina, reconoce a otros consensos [PPXY, PPLP, motivos de poli-prolina flanqueados por arginina o lisina, así como fosfo-SP o fosfo-TP, en donde X corresponde a cualquier aminoácido, P a prolina, L a leucina, fosfo-S a serina fosforilada y fosfo-T a treonina fosforilada (Sudol and Hunter, 2000)].

3.1) Los dominios PDZ

Los dominios PDZ son módulos de 80-90 aminoácidos que se localizan en un amplio rango de proteínas presentes en diversos organismos, que van desde los unicelulares como las bacterias y las levaduras, hasta los pluricelulares como los gusanos, las plantas, las moscas y los mamíferos (Ponting, 1997). Los dominios PDZ se asocian a proteínas que poseen motivos de unión a dominios PDZ (PBMs) en su extremo carboxilo terminal (Saras and Heldin, 1996), aunque también hay casos donde los PBMs se ubican en otras regiones (Cowburn, 1997; Giallourakis et al., 2006; Wang et al., 2008; Ye and Zhang, 2013). Los PBMs se clasifican de acuerdo a los residuos que presentan en las posiciones 0 y -2, en donde la posición 0 corresponde al último aminoácido del motivo. Así, los de clase I tienen el consenso S/TX Φ , donde X corresponde a cualquier aminoácido y Φ representa a algún aminoácido hidrofóbico (Ye and Zhang, 2013). Los de clase II tienen la secuencia Φ X Φ (Songyang et al., 1997), y los de clase III tienen el motivo D/EX Φ . Sin embargo, se ha demostrado que los PDZ interactúan específicamente hasta con siete residuos del PBM, lo que amplía a 16 las clases de asociación PDZ-PBM (Tonikian et al., 2008; Zhang et al., 2006). La interacción de los dominios PDZ con PBMs de clase I que contienen S/T se regula por la fosforilación de estos residuos. Tal es el

caso del canal de potasio Kir 2.3, donde la fosforilación de la serina de su PBM inhibe la asociación con un dominio PDZ de la proteína PSD-95 (Cohen et al., 1996).

Cabe resaltar además que los dominios PDZ también se asocian con otros dominios PDZ. Por ejemplo, el segundo PDZ de ZO-1 se une al segundo PDZ de ZO-2 y -3 (Itoh et al., 1999b; Wittchen et al., 1999) y el dominio PDZ de nNOS se asocia al PDZ de PSD-95 (Brenman et al., 1996). Por otra parte, algunos dominios PDZ también emplean para su unión a otras proteínas, a aminoácidos ubicados más allá de la estructura PDZ canónica. Tales secuencias de extensión constituyen una unidad funcional y estructural con los dominios PDZ formando así dominios PDZ extendidos. Estos macro-dominios PDZ se unen a sus proteínas blanco con más especificidad y afinidad que los propios dominios PDZ (Ye and Zhang, 2013). Así mismo, también se ha demostrado que dos o más dominios PDZ que se localizan en tándem presentan propiedades de unión distintas a los dominios individuales (Ye and Zhang, 2013).

3.2) El dominio GuK

El dominio GuK es homólogo a la enzima que cataliza la conversión del GMP a GDP, a expensas del ATP. Sin embargo, en las proteínas MAGUK el dominio GuK no tiene actividad catalítica porque carece de la región que se une al ATP (Haskins et al., 1998; Kistner et al., 1995), y en cambio funciona como un dominio de unión a otras proteínas. Así, se ha visto que las mutaciones en el dominio GuK de PSD-95 impiden la acumulación del canal de potasio Kv1.4 en la membrana (Shin et al., 2000) y las del dominio GuK de Dlg bloquean la localización de la proteína Coracle, el homólogo de la proteína 4.1 de vertebrados, a las uniones septadas (Woods et al., 1996).

3.3) El dominio SH3

El dominio SH3 es homólogo a una región no catalítica de la tirosina cinasa del oncogén v-Src. Este dominio de entre 55-70 aminoácidos interacciona con motivos ricos en prolina con el consenso PXXP presente en diversas proteínas

(Dalgarno et al., 1997).

3.4) La región carboxilo terminal

La región carboxilo terminal de las proteínas ZO inicia al final de la región U6 (Fig. 5) y en el caso de las proteínas ZO-1 y ZO-2 se compone de una región acídica a la que le sigue una zona rica en prolinas, en la cual se localiza una región de unión a actina (ABR) que en ZO-2 canina corresponde a los aminoácidos 940-1166 (Gonzalez-Mariscal et al., 2017). Por la presencia de la región ABR, la porción carboxilo terminal de ZO-2 co-localiza con las fibras de estrés al transfectarse en fibroblastos (Itoh et al., 1999b). Al final de la porción carboxilo terminal de ZO-2 y ZO-3 se encuentra un PBM de clase I con la secuencia TEL y TDL respectivamente, mientras que en ZO-1 este motivo está ausente.

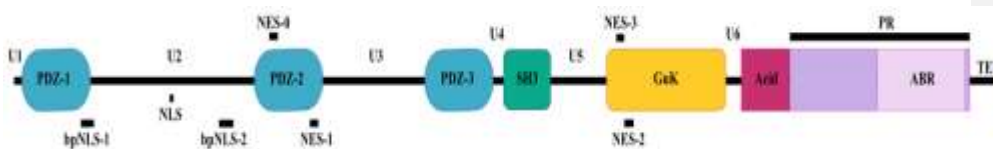


Figura 5. Representación esquemática de ZO-2. En la imagen se indica la localización de los dominios PDZ, SH3 y GuK de ZO-2. También se muestran las regiones rica en prolinas (PR), de unión a actina (ABR), acídica (Acid) y únicas (U). Así mismo se marcan las señales de localización (NLS) y de exportación (NES) nuclear y el motivo de unión a dominios PDZ, TEL (Gonzalez-Mariscal et al., 2017).

La longitud y la composición de la región carboxilo terminal es distinta en las proteínas ZO. En ZO-1, la porción carboxilo terminal es 3 y 10 veces más grande que en ZO-2 y -3 respectivamente (Fig. 6). Además, la región rica en prolinas que en ZO-1 y ZO-2 se ubica en la porción carboxilo terminal, en ZO-3 se localiza entre los dominios PDZ-2 y -3. Las diferencias en longitud y composición de la región carboxilo terminal presente entre las proteínas ZO, sugiere que esta porción contribuye a la función específica de cada una de estas proteínas.

Por otro lado, se cree que la porción carboxilo terminal es esencial para la función supresora tumoral de las proteínas ZO, ya que cuando se expresa una

proteína ZO-1 sin esta región se induce la transformación epitelio a mesénquima (Ryeom et al., 2000).

3.5) Las regiones únicas

Las regiones únicas (U) son secuencias variables que se localizan entre los dominios conservados de las proteínas MAGUK. Las regiones U de las proteínas ZO's tienen diferentes funciones. Por ejemplo: a) la región U5 de ZO-1 se requiere para el direccionamiento de ZO-1 a la UE (Fanning et al., 2007) y se asocia a la ocludina (Schmidt et al., 2004); b) la región U6 de ZO-1 es necesaria para la formación de UEs en la porción más apical de la membrana lateral, ya que su ausencia produce filamentos ectópicos de UE a lo largo de la membrana lateral (Fanning et al., 2007) y c) la región U2 de ZO-2 posee las señales de localización nuclear (SLN) y los repetidos SR que son críticos para la localización nuclear de la proteína (Quiros et al., 2013).

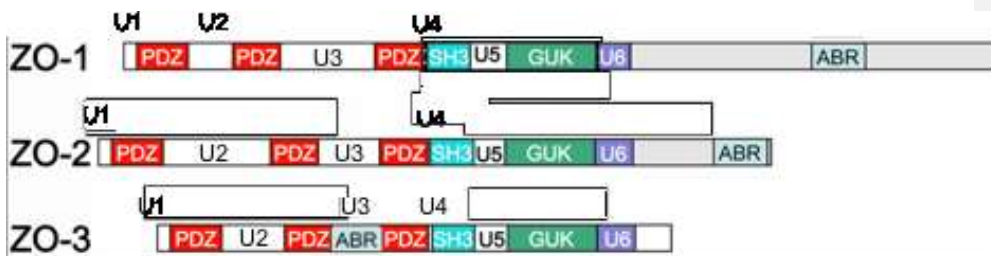


Figura 6. Organización molecular de las proteínas ZO. Las proteínas ZO presentan 3 dominios PDZ (rojo), el supramódulo SH3-U5-GuK (azul-blanco-verde) y la porción carboxilo terminal (gris) que varía en longitud y composición entre las proteínas ZO [Imagen modificada de (Lye et al., 2010)].

3.6) Los macrodominios

Los dominios presentes en las proteínas MAGUK no actúan de manera aislada, sino que conforman macro-dominios (Pan et al., 2011). Esta organización contrasta con el modelo de un collar de perlas, donde cada perla o dominio actúa de manera independiente. Por ejemplo: 1) la unión del PBM de JAM-A al dominio

PDZ-3 de ZO-1, requiere de residuos presentes en el dominio SH3 adyacente (Nomme et al., 2011); y 2) la región U6 de ZO-1, localizada en la porción carboxilo del dominio GuK, inhibe la unión de la ocludina con el dominio GuK (Fanning et al., 2007); y compite con la calmodulina por la asociación al módulo SH3-GuK (Lye et al., 2010).

Así mismo, los dominios SH3 y GuK junto con la región U5 que los conecta, conforman un macro-dominio. Al respecto, cabe mencionar que los dominios GuK de las proteínas MAGUK carecen del consenso PXXP que sirve para la unión al dominio SH3 (McGee and Bredt, 1999). La interacción entre los dominios SH3 y GuK ocurre tanto dentro de la misma proteína, como sucede en la proteína PSD-95 (McGee and Bredt, 1999; Nix et al., 2000; Tavares et al., 2001) y ZO-1 (Umeda et al., 2006); como entre diferentes proteínas. Por ejemplo, entre el GuK de hCASK y el dominio SH3 de hDlg (Nix et al., 2000); el SH3 de SAP102 y el dominio GuK de PSD-95 (Masuko et al., 1999), y el dominio SH3 de p55 y el GuK de hCASK (Nix et al., 2000).

El macro-dominio SH3-U5-GuK de ZO-1 se asocia a diversas proteínas como ocludina (Schmidt et al., 2004), calmodulina (Masuko et al., 1999; Paarmann et al., 2008) y α -catenina (Muller et al., 2005). La región U5 es flexible y funciona como una bisagra que permite que los dominios GuK y SH3 interactúen entre sí. En presencia de Ca^{2+} los dominios GuK y SH3 de ZO-1 están abiertos y no plegados entre sí y de esta manera el dominio GuK puede asociarse con la calmodulina, la ocludina y la región U6. Sin embargo, los sitios de unión a U6 presentes en el dominio GuK, se sobrelapan con los sitios de unión a la calmodulina y a la ocludina (Lye et al., 2010). Esto indica que la región U6 inhibe la unión de ZO-1 a la ocludina a través de un mecanismo dependiente de Ca^{2+} .

4) Evolución de los genes para las proteínas ZO

Los genes que codifican para las proteínas ZOs surgieron con la multicelularidad (Gonzalez-Mariscal et al., 2017; Gonzalez-Mariscal et al., 2011) (Fig. 7). Así, el primer gen ZO apareció en algunas poríferas, como *Oscarella carmela* (Ganot et al., 2015), pero no en otras como *Amphimedon queenslandica*

(de Mendoza et al., 2010; Ganot et al., 2015) y *Suberites domuncula* (te Velthuis et al., 2007). Este gen también se detecta en el placozoa *Trichoplax adhaerens* (de Mendoza et al., 2010; Ganot et al., 2015), un organismo plano que se distingue porque ya posee UA. El ctenóforo *Mnemiopsis leidyi* se caracteriza por ser el organismo más simple que se conoce que posee los genes para dos proteínas ZO: ZO-1 y ZO-2 (Ganot et al., 2015). Estas proteínas se cree que se localizan en los contactos celulares de cadherina, ya que estos organismos de sólo dos capas, endodermo y ectodermo, aún no tienen UEs. Algunos cnidarios como *Hydra vulgaris* (de Mendoza et al., 2010) y *Nematostella vectensis* (Ganot et al., 2015) tienen el gen ZO-1, mientras que otros como *Hydra magnipapillata* no lo presentan (te Velthuis et al., 2007). En los bilateria, que se caracterizan por poseer mesodermo, ectodermo y endodermo, se encuentra a ZO-1, desde los organismos más sencillos, como el nematodo *Caenorhabditis elegans* donde la proteína correspondiente se llama ZOO-1 (Lockwood et al., 2008). En el artrópodo *Drosophila melanogaster*, el gen ZO-1 se llama *Tamou*, que en japonés significa peludo, ya que su mutación genera órganos extrasensoriales (Takahisa et al., 1996). La proteína codificada por *Tamou* se llama Polychaetoid ya que proviene del gen *pyd* que es el mismo que *tamou* (Wei and Ellis, 2001). El artrópodo *Daphnia pulex* (de Mendoza et al., 2010) y algunos moluscos como *Lottia gigantea* tienen al gen ZO, mientras que otros moluscos como *Lymnaea stagnalis* no lo presentan (te Velthuis et al., 2007). También, el anélido *Capitella teleta* y el equinodermo *Strongylocentrotus purpuratus* tienen al gen ZO (de Mendoza et al., 2010; te Velthuis et al., 2007). El cordado más simple que cuenta con el gen ZO-2 es *Ciona intestinalis*, un invertebrado marino filtrador de alimento (te Velthuis et al., 2007). En los craniatas, se detectan los genes para las proteínas ZO's en los mamíferos, las aves y los peces con espinas óseas (Actinopterygii) pero no en los peces cartilaginosos (Chondrichthye) como la pequeña raya *Leucoraja erinacea* (te Velthuis et al., 2007). Sin embargo, es interesante notar que algunos peces como *Danio rerio*, posee genes para ZO-1, -2 y -3 (Kiener et al., 2007), mientras que otros como el pez globo *Tetraodon nigroviridis*, sólo posee el gen ZO-1 (de Mendoza et al., 2010).

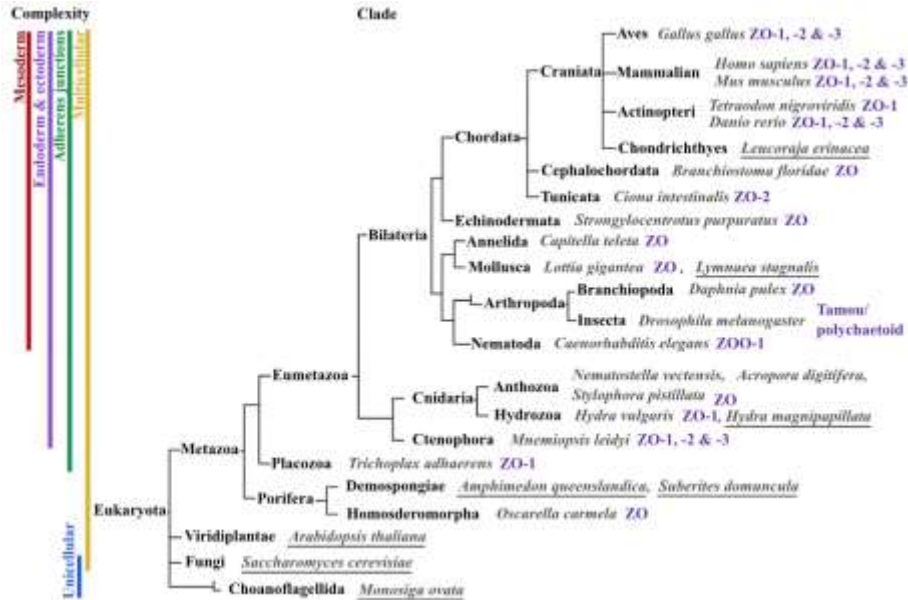


Figura 7. Cladograma que ilustra la presencia de los genes ZO en los organismos multicelulares con diferente grado de complejidad. Los nombres subrayados corresponden a organismos en los cuales no se encontraron los genes ZO (Gonzalez-Mariscal et al., 2017).

5) ZO-2

Mediante procesamiento alternativo, se producen cinco transcritos del gen *TJP2* que codifican para diferentes isoformas de ZO-2 (Fig. 8). La isoforma A1 carece de los exones C y B, las isoformas A2 y A3 se generan mediante el procesamiento alternativo de A1. En la isoforma A2, los exones C, B, 20 y 21 que corresponden a los aminoácidos 961-1108 están ausentes, mientras que en la isoforma A3 además de los exones ausentes en la isoforma A2, también faltan los exones 22 y 23 que en conjunto representan a los aminoácidos 994-1190. En cambio, el exón 19 de la isoforma A3 es más grande que el de la A1 (979 vs 213 pb), pero presenta un codón de paro en el sitio 313.

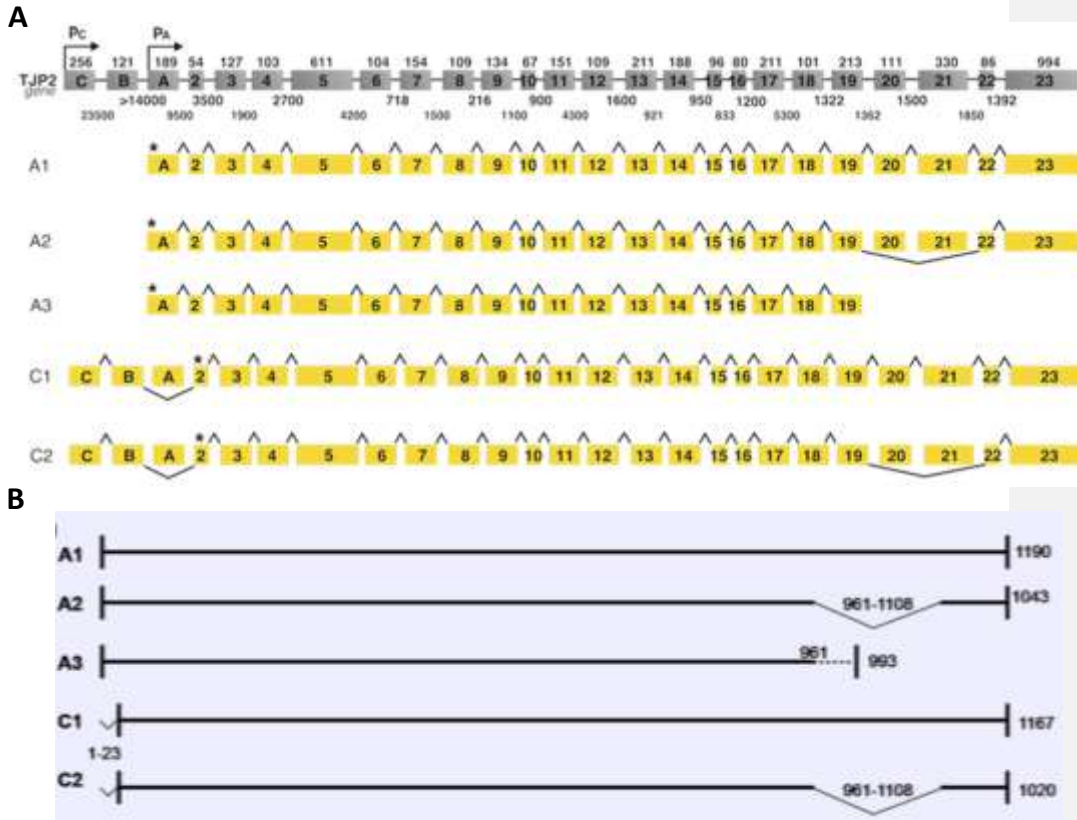


Figura 8. El gen *TJP2* se compone de 25 exones que codifican a 5 isoformas de ZO-2. A) Representación esquemática del gen *TJP2*. El gen *TJP2* se compone de 25 exones (gris) y cinco variantes de transcripción (amarillo). El tamaño de cada exón se indica en pares de bases (pb) en la parte superior, mientras que los asteriscos indican el codón dónde inicia la traducción. Los exones C y B se expresan a partir del promotor C. Estos exones son no-codificantes y el sitio de inicio de la traducción comienza en el ATG localizado en el exón 2. El exón A se transcribe del promotor A. Las isoformas C carecen de los 23 aminoácidos que se localizan en el amino terminal en comparación con las isoformas A. Los exones 20 y 21 se procesan alternativamente. B) Se han encontrado 5 isoformas de *TJP2*. Las isoformas A2 y C2 se obtienen mediante el procesamiento alternativo de los exones 20 y 21. La traducción de la isoforma A3 termina en el exón 19. Sin embargo, en esta isoforma, el exón 19 presenta 979 pb en lugar de 213 y posee un codón de paro en el sitio 313. Estas diferencias producen una secuencia de 33 aminoácidos que no está presente en ninguna otra isoforma de *TJP2*. Los números se refieren a los aminoácidos (Chlenski et al., 2000).

La isoforma C1 pierde al exón A y la isoforma C2, que se genera mediante procesamiento alternativo de la isoforma C1, carece de los exones A, 20 y 21 que corresponden a los aminoácidos 961-1108 (Gonzalez-Mariscal, 2010).

En el cerebro y el músculo esquelético sólo se expresan las isoformas A de ZO-2, mientras que la isoforma C siempre se expresa con la isoforma A en el riñón, el páncreas, el corazón y la placenta (Chlenski et al., 2000).

La proteína ZO-2 tiene una masa molecular de 160 kDa, y se identificó a través de su co-inmunoprecipitación con ZO-1 (Gumbiner et al., 1991). ZO-2 se localiza en la UE de las células epiteliales y endoteliales, en la UA de los fibroblastos (Itoh et al., 1999b), y en el núcleo y el citoplasma de las células musculares cardíacas (Jenkins et al., 2016).

5.1) Interacción de ZO-2 con otras proteínas

La proteína ZO-2 se asocia a las proteínas integrales de las UEs (Fig. 9). Por ejemplo, ZO-2 se une a las claudinas a través del PDZ-1 (Itoh et al., 1999a), a la ocludina (Itoh et al., 1999b) por medio de la región U5-Guk, y a JAM-A, mediante el PDZ-2 (Monteiro et al., 2013). ZO-2 se une también a las proteínas periféricas de la UE. Así, se asocia a ZO-1 y a ZO-2 por medio de su dominio PDZ-2 y a la cabeza globular de la cingulina y la paracingulina, aunque se desconoce a través de qué dominio. ZO-2 también interactúa con proteínas de la UA como α -catenina (Itoh et al., 1999b) y β -catenina (Wetzel et al., 2017) y con proteínas de la unión comunicante (UC) como las conexinas 30, 32, 36 y 43 (Chen et al., 2008; Li et al., 2009; Singh and Lampe, 2003; Singh et al., 2005; Talhouk et al., 2008). A través de su PBM, ZO-2 reconoce a la proteína supresora tumoral del complejo de polaridad de la membrana lateral, hScrib (Metais et al., 2005) y mediante un segmento en la porción carboxilo, se une a actina (Wittchen et al., 1999) y a proteínas de unión a actina como la proteína 4.1 (Mattagajasingh et al., 2000) y a la miosina II (Yamazaki et al., 2008). Así mismo, ZO-2 se une con las cinasas PKA, PKC (Avila-Flores et al., 2001), CsK y Src (Saito et al., 2008). ZO-2 también se asocia a proteínas nucleares como los factores de transcripción Jun, Fos (Betanzos et al., 2004), c-Myc (Huerta et al., 2007) y KyoT2 (Huang et al., 2002); al factor de procesamiento alternativo

SC-35 (Islas et al., 2002), con la proteína de los moteados nucleares ZASP (Lechuga et al., 2010) y con proteínas de la lámina nuclear como la lámina B1 (Jaramillo et al., 2004) (Fig. 9). La lista completa de proteínas que se asocian a ZO-2 se presenta en la Tabla 1.

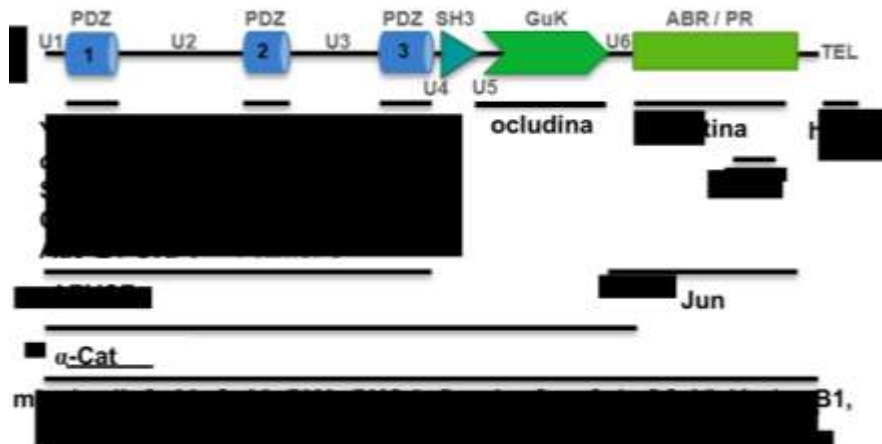


Figura 9. La proteína ZO-2 tiene una organización modular que le permite asociarse con muchas otras proteínas. En términos generales puede decirse que la porción amino de la molécula se asocia a proteínas de los contactos célula-célula, mientras que la porción carboxilo se une al citoesqueleto de actomiosina (Gonzalez-Mariscal et al., 2016).

5.2) Tránsito intracelular de ZO-2

ZO-2 exhibe una localización dual. En los cultivos confluentes se localiza en la UE mientras que en los cultivos subconfluentes ZO-2 además de situarse en la UE se presenta en forma de motas en el núcleo (Islas et al., 2002). Esta doble localización se explica porque ZO-2 entra al núcleo al final de la fase G1 y sale durante la mitosis. Por ello en los cultivos subconfluentes ZO-2 recién sintetizada viaja al núcleo antes de llegar a la membrana plasmática, mientras que en los cultivos confluentes ZO-2 llega a la membrana plasmática sin pasar por el núcleo (Chamorro et al., 2009; Quiros et al., 2013; Tapia et al., 2009). Para el transporte núcleo-citoplasma ZO-2 cuenta con señales de localización (SLN) y de exportación nuclear (SEN). ZO-2 canina tiene cuatro SEN, dos de ellas se localizan en el PDZ2

y las restantes en el dominio GuK (Fig. 5) (Gonzalez-Mariscal et al., 2006). Las cuatro SEN son funcionales y la fosforilación por PKC ϵ de la S369 presente en la SEN-1 es necesaria para la exportación de la proteína (Chamorro et al., 2009).

Además, la exportación nuclear de ZO-2 requiere de la O-N-acetilglicosilación de la S257 que inactiva a la SLN bipartita-2246-262 (Quiros et al., 2013), y de la sumoilación de la K730 localizada en el dominio GuK de la molécula (Wetzel et al., 2017). ZO-2 tiene tres SLN, dos bipartitas y una monopartita, y todas ellas se localizan en la región U2 (Jaramillo et al., 2004). Además, la región U2 de ZO-2 presenta 16 repetidos SR que son blanco de la cinasa de serinas, SRPK. La fosforilación de estos repetidos se induce por el EGF que tras unirse a su receptor activa a la cinasa Akt que promueve la autofosforilación de SRPK y su activación. Entonces, la fosforilación mediada por SRPK de los repetidos SR induce el movimiento de ZO-2 al núcleo y su acumulación en moteados (Quiros et al., 2013).

5.3) Función de ZO-2

ZO-2 funciona como un andamio reclutador de proteínas a través de sus múltiples dominios, motivos y regiones. Dependiendo de su localización celular, ZO-2 forma distintos complejos proteicos que promueven la formación de las UEs (Umeda et al., 2006) y la activación de vías de señalización que regulan el tamaño (Dominguez-Calderon et al., 2016), la migración (Luczka et al., 2013) y la proliferación celular (Tapia et al., 2009).

Tabla 1. Interacción de ZO-2 con diferentes moléculas.

Molecule type	Molecule name	Interaction detected by	ZO-2 segment probed
Eukaryotic replication factor	MCM3	LC-MS/MS	ND
Nuclear protein	Lamin B1	Pull-down, IP	C-terminus
	ZASP	Y2H, Pull-down, IP	PDZ3
	ZMYM3	Cofractionation/MS	ND
	SIRT7	AP-MS	ND
Transcription factor	SNAI2	IP-MS	ND
	SNAI3	AP-MS	ND
	UBN1	Cofractionation/MS	ND
	Jun	Pull-down, IP, IF-Co	AcPr
	Fos	Pull-down, IP, IF-Co	AcPr
	C/EBP	Pull-down, IP, IF-Co	AcPr
	c-Myc	IP	FL
	ZNF328	Cofractionation/MS	ND
Transcriptional regulator	KyoT2	Y2H, Pull-down	ND
	YAP1	BioID-MS	ND
	YAP2	IP, <i>in vitro</i> binding assay, Pull-down, IF-Co	PDZ1
	TAZ	IP, Pull-down, IF-Co	PDZ1
DNA-binding protein	SAF-B	Y2H, IP, <i>in vitro</i> binding assay, IF-Co	PDZ1
	ERR1	Cofractionation/MS	ND
RNA-binding protein	PUS7	LC-MS/MS	ND
	SRRM2	AP-MS	ND
Splicing factor	SC-35	IF-Co	FL
Exportin	CRM1	LC-MS/MS	ND
	THOC5	Cofractionation/MS	ND
Translation initiation factor	EIF1B	LC-MS/MS	ND
Chaperon	HSPB1	Y2H	ND
Tight junction protein	MAGIX	AP-MS	ND
	Claudins	<i>In vitro</i> binding assay, IP	PDZ1
	ZO-1	Pull down, IP, IF-Co	PDZ2
	ZO-2	X-ray crystallography	PDZ2
	JAM-A	IP, PA	PDZ2
	PDZ-GEF1	IP	ND
	Afadin	IP	ND
	Rap2	IF-Co	ND
	Cingulin	Pull-down, IP	FL
	Occludin	Pull-down	N-terminus
Adherens junction protein	α -Catenin	Pull-down	N-terminus
	β -Catenin	Pull-down, IP, PLA	ND
	ARVCF	Pull-down, IF-Co, Y2H	PDZ1-3

Molecule type	Molecule name	Interaction detected by	ZO-2 segment probed
Lateral polarity junctional protein	hScrib	AP-MS, pull-down, IF-Co	TEL
Connexin	Cx30	IP	ND
	Cx32	IP	ND
	CX36	IF-Co, IP, pull-down	PDZ1
	Cx43	HPLC-MS/MS, pull-down, IP, IF-Co, FS	PDZ2
Synaptic adhesion protein	LRRC47	LC-MS/MS	ND
Protein kinase	CLK1	MS	U3
	CDK6	Biochemical activity	ND
	MAPK8	QUBIC/LC-MS	ND
	PKA	Phosphorylation assay	PDZ3-SH3-GuK, AcPr
	PKC λ , ζ	IP, phosphorylation assay	AcPr
	PKC ϵ	IP, phosphorylation assay	PDZ3-SH3-GuK, AcPr
	Src	Pull-down, IP	FL
	Csk	Pull-down, IP	PDZ3-SH3-GuK
	GSK3 β	Pull-down, IP, PLA	ND
	LATS1	BioID-MS	ND
	LATS2	BioID-MS	ND
	SRPK1	PLA	FL
	SRPK2	AP-MS	ND
Phosphatase	PGAM5	BioID-MS	ND
Hydrolase	NUDT12	AP-MS	ND
	PLOD1	BioID-MS	ND
Ubiquitin peptidase	USP53	Pull-down, IF-Co	FL
Centrosomal protein	CEP128	BioID	ND
	CEP135	BioID/MS	ND
	CEP110	BioID	ND
Ubiquitin ligase	TRAF6	IP-HTMS	ND
	FBXW7	KO/KD genome-wide RNAi screening	ND
	KCMF1	Size-exclusion chromatography	ND
	DCAF15	AP-MS	ND
SUMO-conjugating enzyme	Ubc9	Pull-down	ND
SUMO-deconjugating protease	SENP1	IP	ND
	SENP3	IP	ND
Thiol reductase	IFI30	AP-MS	ND

Molecule type	Molecule name	Interaction detected by	ZO-2 segment probed
Cytoskeleton protein	OBSL1	IP, MS	ND
	ODF2	BioID	ND
	MYO1C	QUBIC/LC-MS	ND
	MYO19	QUBIC/LC-MS	ND
	MYO18A	QUBIC/LC-MS	ND
	KIF14	BioID-MS	ND
	4.1R	Y2H, IF-Co, IP, <i>in vitro</i> binding	U5-GuK
	Actin	Actin co-sedimentation assays, IF-Co	ABR/PR
	Myosin 2	IF-Co, KO/KD	FL
	LASP	Pull-down, IP	ND
TUBA	IP, IF-Co	ND	
14-3-3 protein	Stratifin	TAP	ND
	14-3-3 γ , ζ , θ , and β	IP-HTMS, MS, LC-MS/MS	ND
Ras GTPase	IQGAP1	QUBIC/LC-MS	ND
Endocytosis protein	SH3KBP1	TAIS/pull-down	ABR/PR
	HGS	IVEC/pull-down	ND
	SNX27	MS, pull-down, IF-Co	PDZbm
Exosomal protein	EXOSC5	QUBIC/LC-MS	ND
Hormone receptor	SSTR3	Affinity capture/MS	ND
GPCR	MAS	MS, MAS Δ PDZ-BM	PDZs
Scaffold protein	WDR36	Cofractionation/MS	ND
Viral protein	Ad9-E4-ORF1	IF-Co, IP, pull-down	PDZ1
	E6 from HPV16, 18, 31, 51, & 70	MS, pull-down	PDZ-BM
Phosphoinositide	PtdIns(4,5)P2	Protein lipid overlay assay, ELISA	PDZ2

AP-MS, affinity purification-mass spectrometry; AcPr, acidic proline-rich domain; BioID, proximity-dependent biotin identification; C-terminus; carboxyl-terminus half; FL, full length; FS, fluorescence spectroscopy; IVEC, *in vitro* expression cloning; HTMS, high-throughput mass spectrometry; IF-Co, immunofluorescent colocalization; IP, immunoprecipitation of endogenous proteins; KO, knock out; KD, knock down; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry; MAS Δ PDZ-BM, mutant MAS lacking the PDZ-BM; ND, not determined; N-terminus; amino-terminus half; PA, proteomic array; PDZ-BM, PDZ-binding motif; PLA, proximity ligation assay; QUBIC, quantitative BAC-GFP interactomics; TAIS, target-assisted iterative screening; TAP, tandem affinity purification; Y2H, yeast-two hybrid. (Gonzalez-Mariscal et al., 2017)

5.3.1) Función de ZO-2 en la membrana

En los embriones murinos, el noqueo (KO) de ZO-2 es letal pues detiene el desarrollo al inicio de la gastrulación. Así, disminuye la proliferación celular en E6.5 y aumenta la apoptosis en E7.5 (Xu et al., 2008). Para analizar si ZO-2 es importante para el desarrollo de los tejidos extraembrionarios o para el embrión *per se*, se

generó una quimera mediante la inyección de células madre deficientes en ZO-2 en un blastocisto silvestre. La quimera producida fue viable lo que sugiere que la presencia de ZO-2 es fundamental para el desarrollo del trofoblasto y no para el embrión. Sin embargo, se encontró que las quimeras macho adultas tienen abierta la barrera hemato-testicular (BHT) por lo que estos animales son infértiles (Xu et al., 2009). Esto indica que ZO-2 tiene una función crucial y no redundante en la formación de la BHT.

En las células epiteliales mamarias Eph4, el KO de ZO-1 junto con el silenciamiento (KD) de ZO-2 inhibió la polimerización de las claudinas, y la formación de los filamentos de la UE que se observan por crio-fractura. En cambio, la re-expresión de cualquiera de estas dos proteínas ZO, restableció la formación de la UE. Esto indica que las proteínas ZO-1 y ZO-2 juegan un papel crucial para la polimerización de las claudinas en la UE y que además son redundantes entre sí para esta función (Umeda et al., 2006).

En humanos, la mutación V48A de ZO-2 ubicada en el PDZ-1, junto con mutaciones en la enzima CoA, que convierte a los ácidos biliares en sales, produce hipercolanemia con prurito. Esta enfermedad se caracteriza por la fuga de la bilis hacia el suero que ocurre cuando la UE de los hepatocitos se vuelve permeable. Los pacientes tienen esta mutación en todos sus epitelios y sin embargo solo presentan daño en las UEs del hígado, lo que sugiere que ZO-2 tiene un papel crucial e irremplazable en este órgano (Carlton et al., 2003). En apoyo de este punto, se ha visto que mutaciones del gen *TJP2* que codifica para ZO-2, que impiden la traducción de la proteína, producen colestasis progresiva en infantes (Sambrotta et al., 2014) y hepatocarcinoma celular que conducen a la muerte temprana, a menos que se reciba un trasplante hepático (Zhou et al., 2015).

Las fallas en ZO-2 también son determinantes para la sordera. Así, se observó en una familia de origen chino, que la mutación con cambio de sentido en *TJP2* (2081G>A) causa sordera autosómica hereditaria no sindrómica. Esto sucede porque las UEs presentes en las células epiteliales de la cóclea en el oído interno separan a la endolinfa, que contiene un mayor contenido de potasio que de sodio, de la perilinfa que, al revés, tiene bajo potasio y alto sodio. De esta manera, si las

UEs se vuelven permeables, se pierde el gradiente de potasio necesario para excitar a las células sensoriales (Wang et al., 2015). Por otra parte, también se ha observado en el ratón, que se produce sordera cuando degeneran las células peludas del oído interno. Las células peludas juegan un papel fundamental en la audición pues transforman la energía mecánica, producida por las vibraciones del sonido, en impulsos eléctricos que se transmiten a las neuronas del nervio auditivo. Las células peludas se mueren cuando la enzima hidrolasa de ubiquitina USP53 se muta y pierde su función catalítica. Como USP53 se asocia a ZO-2 (Kazmierczak et al., 2015), se concluye que esta enzima ha de regular la vida media de ZO-2 y que, cuando no funciona, ZO-2 se degrada. Por ello se piensa que ZO-2 es crucial e irremplazable en las UEs del oído interno.

5.3.2) Función de ZO-2 en el núcleo

En el núcleo ZO-2 se asocia a la matriz nuclear y en particular a la lámina B1 (Jaramillo et al., 2004) y se distribuye en un patrón moteado. Se sabe que los moteados nucleares son sitios donde se acumulan factores de procesamiento alternativo del pre-ARNm (Lamond and Spector, 2003) y moléculas para la generación de ARNm dependiente de la polimerasa de ARN tipo II (Herrmann and Mancini, 2001; Mintz et al., 1999). Se desconoce si ZO-2 juega un papel en el procesamiento alternativo pero se sabe que se asocia al factor esencial para este proceso, SC35 (Islas et al., 2002), y a la proteína de los moteados nucleares ZASP (Lechuga et al., 2010). ZO-2 también se une a SAF-B, un componente de la cromatina que participa en el ensamble de complejos en el transcriptosoma (Traweger et al., 2003) y a los factores de transcripción Jun, Fos, C/EBP (Betanzos et al., 2004), Myc (Huerta et al., 2007) y KyoT2 (Huang et al., 2002). Además, algunas proteínas entran al núcleo por asociación con ZO-2, tal es el caso del coactivador transcripcional YAP-2 (Oka et al., 2010), de la proteína con repetidos armadillo ausente en el síndrome cardio-facial ARVCF (Kausalya et al., 2004) y de la proteína con dominios LIM y SH3, LASP1 (Mihlan et al., 2013).

En el núcleo ZO-2 se comporta como un inhibidor transcripcional. Así, bloquea la transcripción de genes reporteros regulados por promotores con sitios

AP-1 (Betanzos et al., 2004), e inhibe la transcripción de la ciclina D1 al formar un complejo con c-Myc y HDAC1 que se asocia a una caja E en el promotor de la ciclina D1 (Huerta et al., 2007). ZO-2 además bloquea la transcripción de genes blanco de la vía Wnt. Por ello, la sobre-expresión de ZO-2 reprime la transcripción de un gen reportero, controlado por sitios TCF/LEF y de un gen reportero bajo el control del promotor *Siamois*, un gen blanco de la ruta Wnt. Asimismo, ZO-2 disminuye el RNA mensajero de la axina-2, cuyo gen también es blanco de la vía Wnt (Tapia et al., 2009). En concordancia con estos resultados, se encontró que la transfección hidrodinámica de ZO-2 en el ratón, previene la disfunción podocitaria y la proteinuria inducidas por la activación de la ruta Wnt, a través del tratamiento con el antibiótico y quimioterapéutico adriamicina (Bautista-Garcia et al., 2013).

ZO-2 también inhibe la actividad transcripcional de YAP1, el efector final de la ruta Hippo. YAP actúa como un co-activador transcripcional al asociarse al factor de transcripción TEAD y promover la transcripción del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y de la integrina $\beta 2$. Así, la ausencia de ZO-2 aumenta la actividad de un promotor artificial regulado por sitios de unión a TEAD y del promotor de hCTGF, mientras que la sobre-expresión de ZO-2 reprime la actividad de estos promotores (Dominguez-Calderon et al., 2016).

Las proteínas ZO-1 y ZO-3 también se localizan en el núcleo (Gottardi et al., 1996; Qiao et al., 2014). En perro, ZO-1 presenta 3 SLN y 5 SEN mientras que ZO-3 posee 3 y 1 respectivamente (Lopez-Bayghen et al., 2006). Aunque no se conoce la función de estas proteínas en el núcleo, se ha visto que ZO-1 aparece en este organelo en condiciones en las que se estimula la proliferación celular, tales como la subconfluencia, en el borde de una herida (Gottardi et al., 1996) o cuando el cultivo se trata con factores de crecimiento (Benezra et al., 2007). ZO-1 también interactúa con factores nucleares. Así, se ha visto que secuestra al factor de transcripción ZONAB en la UE (Balda and Matter, 2000). Este factor estimula la proliferación celular promoviendo la expresión de la ciclina D1 (Sourisseau et al., 2006) y la acumulación nuclear de la cinasa CDK4 (Balda et al., 2003). En cuanto a ZO-3, se observa que su ausencia promueve la degradación de la ciclina D1 y el arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 (Capaldo et al., 2011). Sin embargo, la

ausencia de ZO-3 en los embriones murinos no produce un fenotipo aparente (Adachi et al., 2006; Xu et al., 2008), lo que sugiere que puede ser reemplazada por otra proteína ZO.

5.3.3) ZO-2 como promotor de la apoptosis

La sobre-expresión de ZO-2 no afecta la apoptosis en la línea celular epitelial MDCK (Tapia et al., 2009). En cambio, en humanos la duplicación genómica de TJP2, el gen que codifica a ZO-2, produce sordera no sindrómica progresiva ocasionada por un incremento en la expresión de los genes apoptóticos en las células peludas del oído interno (Walsh et al., 2010). Cabe mencionar que estas células son las más sensibles del cuerpo a la apoptosis.

5.3.4) ZO-2 como proteína supresora tumoral

ZO-2 se considera un supresor tumoral porque presenta una alta homología con la proteína supresora tumoral DlgA (Willott et al., 1993). Además, la expresión de ZO-2 disminuye o desaparece en diversas células cancerosas incluidas las de mama (Tokes et al., 2012), próstata (Martin et al., 2014) y páncreas (Doi et al., 2012).

En el cáncer de páncreas y de mama se expresa la isoforma ZO-2C y desaparece la isoforma ZO-2A, mientras que las dos isoformas se expresan en el tejido sano. La diferencia entre estas isoformas radica en que la proteína ZO-2A presenta 23 aminoácidos en la región amino que están ausentes en la isoforma ZO-2C, lo que sugiere que estos aminoácidos probablemente inhiben el desarrollo o la progresión del cáncer (Chlenski et al., 2000; Chlenski et al., 1999).

Otra evidencia que apoya la idea de ZO-2 como supresor tumoral surgió al ver que la sobre-expresión de ZO-2 inhibe la transcripción de la ciclina D1 (Huerta et al., 2007) y aumenta su degradación en el proteasoma (Tapia et al., 2009). Esto disminuye el contenido de ciclina D1 y detiene la proliferación celular, impidiendo el tránsito de las células de la fase G0/G1 a la fase S del ciclo celular (Tapia et al., 2009). Así mismo, la ausencia de ZO-2 cambia la citoarquitectura epitelial a una semejante a la que presentan las células cancerosas, es decir, crecen unas células

encima de otras y aumentan los espacios célula-célula y célula-sustrato (Fig. 10).

5.3.5) ZO-2 como blanco de los oncogenes virales

Hasta ahora se sabe que ZO-2 es blanco de dos proteínas virales. La proteína viral E4 del adenovirus tipo 9 que secuestra a ZO-2 en el citoplasma (Glaunsinger et al., 2001) y la proteína oncogénica E6 de los virus del papiloma humano del grupo 1 de alto riesgo que se une a ZO-2 a través de su PBM (Thomas et al., 2016). Pero, a diferencia de otros blancos de la proteína E6 que poseen dominios PDZ como MUPP1 (Lee et al., 2000), Scribble (Nakagawa and Huibregtse, 2000), Dlg y las MAGIs (Grm and Banks, 2004), ZO-2 no se degrada por E6 sino que se estabiliza, por lo que acaba resultando más abundante. Sin embargo, E6 cambia la localización de ZO-2, desplazándola de la membrana plasmática al núcleo (Hernandez-Monge et al., 2013).

5.3.6) ZO-2 como regulador del tamaño celular

Las células MDCK que no expresan a ZO-2 porque poseen un conjunto de shRNAs anti ZO-2 (ZO-2 KD) exhiben hipertrofia. Este aumento en la talla sucede porque aumenta la expresión de la ciclina D1, lo que provoca un desbalance en el cociente de las ciclinas D/E. Cabe destacar, que previamente se demostró que cuando se activa a la ciclina D sin un aumento concurrente de la ciclina E se produce hipertrofia (Liu and Preisig, 2002). Por otra parte, la hipertrofia ocurre también por un aumento en la síntesis de proteínas. Esto sucede porque la ausencia de ZO-2 inhibe a la ruta Hippo, lo que promueve la acumulación de YAP en el núcleo. Esta proteína induce la transcripción del MiR-29 que inhibe la traducción de PTEN y por otro lado aumenta la transcripción de *Pik3cb* que codifica a la subunidad catalítica p110 de la PI3K. En conjunto, esto aumenta la concentración de PIP3, que activa a Akt, a la vía mTOR y a su efector final, la cinasa S6K. Esto aumenta la síntesis de proteínas y por ende, sube el cociente DNA/proteína y vuelve a las células hipertróficas (Dominguez-Calderon et al., 2016).

5.3.7) ZO-2 como regulador de la arquitectura celular

El silenciamiento parcial de ZO-2 en las células MDCK mediante un siRNA, altera la citoarquitectura epitelial. Así, se vio que unas células crecen encima de otras, aumenta el espacio lateral entre las células adyacentes y disminuye la adhesión al sustrato (Hernandez et al., 2007) (Fig. 10A). Estos resultados sugieren que ZO-2 es un regulador clave de la citoarquitectura epitelial. En esta tesis, exploro los mecanismos por los que ZO-2 lo hace. A continuación, explico cómo se organiza el citoesqueleto en las células epiteliales.

6) El citoesqueleto de actomiosina

6.1) La actina

La actina es la proteína más abundante de las células eucariontes, en las células musculares representa el 10% del peso de las proteínas celulares y en las no musculares el 1-5% (Lodish, 2009). En los vertebrados existen 6 diferentes isoformas de actina. Las células musculares expresan 4 isoformas de α -actina y éstas se asocian a estructuras contráctiles, mientras que la β y la γ -actina se encuentran en las células no musculares como los epitelios.

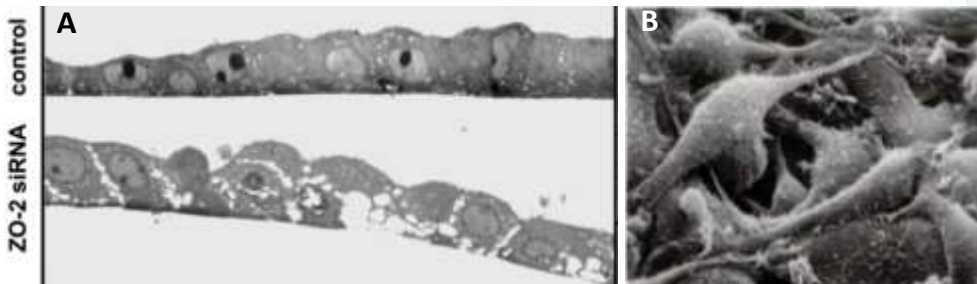


Figura 10. ZO-2 se comporta como una proteína supresora tumoral y su ausencia induce cambios en la forma celular semejantes a los que se observan en las células cancerosas. En la imagen A) se observa que el silenciamiento de ZO-2 con un siRNA altera la citoarquitectura epitelial ya que unas células crecen encima de otras, aumentan los espacios entre las células y con el sustrato (Hernandez et al., 2007). Este fenotipo es similar al de las células tumorales epiteliales de la imagen B) (Lodish, 2009).

La actina en forma de monómero globular se llama G-actina y como polímero filamentosos conformado por una cadena lineal de subunidades de G-actina se denomina F-actina. El citoesqueleto de actina es una estructura dinámica compuesta por haces que se acortan y alargan constantemente y que generan fuerzas que cambian la forma de la célula.

La polimerización de los filamentos de actina ocurre en tres fases. La primera fase llamada de nucleación se caracteriza por un periodo de latencia en el que la G-actina se agrega para formar oligómeros cortos de 3 a 4 subunidades que se conocen como núcleos. En la siguiente fase denominada de elongación, los oligómeros se alargan con rapidez para formar un filamento a través de la adición de monómeros de actina en ambos extremos. A medida que los filamentos de actina crecen disminuye la cantidad de los monómeros de G-actina, hasta alcanzar un equilibrio con los filamentos. En la tercera fase, conocida como estado estacionario, los monómeros de G-actina se intercambian con las subunidades presentes en los extremos de los filamentos de F-actina. En el proceso de polimerización de la actina intervienen varias proteínas. Algunas, como timosina, gelsolina y cofilina, inhiben el ensamble de los filamentos de actina, mientras que otras, como profilina, lo promueven y CapZ lo estabiliza. Los filamentos de actina pueden contraerse porque unos haces se sobrelapan sobre otros. Esta característica contráctil se obtiene cuando la miosina II se incorpora a la F-actina (Lodish, 2009).

6.2) La miosina

La miosina participa en los procesos de contracción, locomoción, transporte de organelos y transducción de señales. La miosina tiene 3 dominios: una cabeza que contiene los sitios de unión al ATP y a la actina, un cuello con sitios de unión a las cadenas ligeras, llamados motivos IQ, y una cola que varía en tamaño y estructura (Holmes, 2008). La superfamilia de las miosinas se divide en 15 clases con base en la similitud que presentan en la secuencia de la cabeza (Sellers, 2000). La superfamilia de las miosinas incluye a las miosinas convencionales como la miosina clase II y a las 14 miosinas no convencionales. Estas últimas tienen

dominios de cinasa, SH3, PH y GAP en sus colas que sugieren su participación en distintas vías de transducción de señales (Oliver et al., 1999).

La miosina II es una miosina motora convencional hexamérica que convierte la energía química de la hidrólisis del ATP en fuerza mecánica que regula la tensión estática y la contracción de los filamentos de actina. La miosina II está compuesta por dos cadenas pesadas, cada una de 230 KDa, dos cadenas ligeras reguladoras (MLC2) de 20 KDa que modulan la actividad de la miosina II, y dos cadenas ligeras esenciales de 17 KDa que estabilizan la estructura de la cadena pesada (Vicente-Manzanares et al., 2009) (Fig. 12). Las cadenas pesadas forman una estructura paralela de cadena doble de la que se proyecta un par de cabezas globulares amino terminales. Las cadenas pesadas son responsables de la hidrólisis del ATP, la unión a actina y la oligomerización en fibras de miosina. El cuello de la miosina actúa como una palanca que amplifica la rotación de la cabeza mientras que el ATP provee la energía química necesaria para el movimiento mecánico de la cabeza (Reggiani, 2008).

Las miosinas tipo II se subdividen en cuatro grupos: 1) miosinas de músculo esquelético y cardíaco; 2) miosinas de músculo liso y no musculares; 3) miosinas de invertebrados y 4) miosinas de protozoarios (May et al., 1998). En las células no musculares como las epiteliales, las miosinas no musculares tipo II (NMII) participan en la locomoción celular, la citocinesis y la estabilidad de la F-actina en las fibras de estrés, el anillo cortical de actina y las vacuolas. La activación de la miosina NMII requiere de la fosforilación de la MLC2 en la serina-19 o la treonina-18. Esta fosforilación fuerza a las cadenas pesadas de miosina a adoptar una conformación extendida, que permite su unión a los filamentos de actina y a otras moléculas de miosina NMII.

6.3) El anillo cortical de actomiosina

En las células epiteliales la miosina NMII y la F-actina forman un cinturón que rodea a las células por debajo de las microvellosidades e interactúa con la UE y la UA (Fig. 13). La integridad del anillo cortical de actomiosina es esencial para la regulación de la permeabilidad paracelular, ya que al inhibir la polimerización de

actina con citocalasina B, se desensambla el anillo cortical y se desploma la RET (Meza et al., 1980; Meza et al., 1982). La contracción del anillo de actomiosina inducida por la fosforilación de la serina 19 de la MLC2, también provoca el desensamble de la UE y la formación de vacuolas apicales envueltas de F-actina y miosina NMII que internalizan a las proteínas de la UE (Ivanov et al., 2004; Utech et al., 2005). Este efecto se evita inhibiendo a la miosina NMII con blebistatina o silenciando a la miosina II con un siRNA.

6.4) Las fibras de estrés

Las fibras de estrés se componen de haces de F-actina que se localizan en la porción basal de las células no musculares (Vicente-Manzanares et al., 2009) (Fig. 13). A lo largo de las fibras de estrés se asocian proteínas como la α -actinina y la miosina NMII que respectivamente entrecruzan a los filamentos y los vuelven contráctiles (Burridge and Guilly, 2016). Los extremos de las fibras de estrés

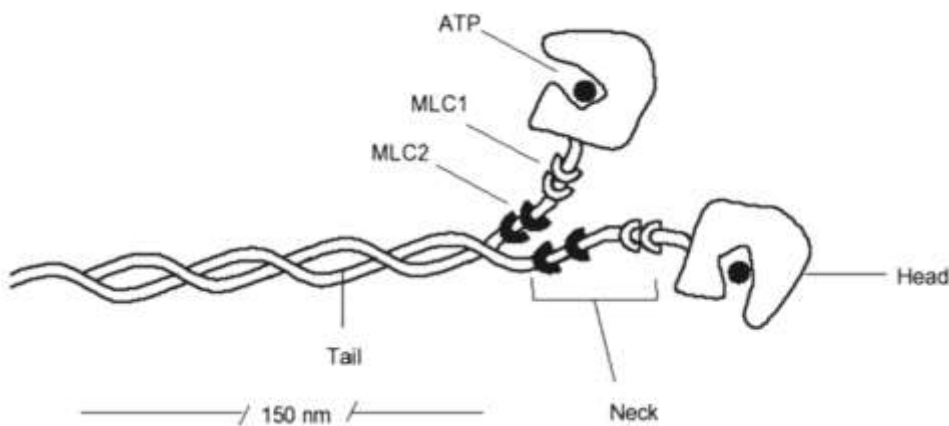


Figura 12. Representación esquemática de la miosina II. La miosina II está formada por una estructura dimérica de colas enrolladas, un cuello al que se asocian las cadenas ligeras reguladoras (MLC2) y esenciales (MLC1) y una cabeza con dominios de unión al ATP (Gonzalez-Mariscal et al., 2008).

terminan en las adhesiones focales (AFs) que son estructuras compuestas por proteínas integrales, como las integrinas, y proteínas periféricas como vinculina, talina y zixina. Estas últimas forman un puente que conecta a las integrinas con las fibras de estrés (Fig. 14) (Vicente-Manzanares et al., 2009).

Las fibras de estrés permiten que las células se anclen a la matriz extracelular y hacen posible la remodelación las adhesiones focales durante la migración celular.

Las fibras de estrés se forman en los cultivos celulares *in vitro* (Abercrombie et al., 1971; Buckley and Porter, 1967; Lewis W.H., 1924), ante la presencia de factores que promueven la permeabilidad paracelular como el $TNF\alpha$ (Hanna et al., 2001) y a consecuencia de la activación de RhoA (Ridley et al., 1992). Recientemente, se demostró que las fibras de estrés también se forman antes de que las células de un carcinoma *in situ* se conviertan en invasivas. Por lo que se piensa que su aparición es crucial para el desarrollo de las metástasis (Tavares et al., 2017).

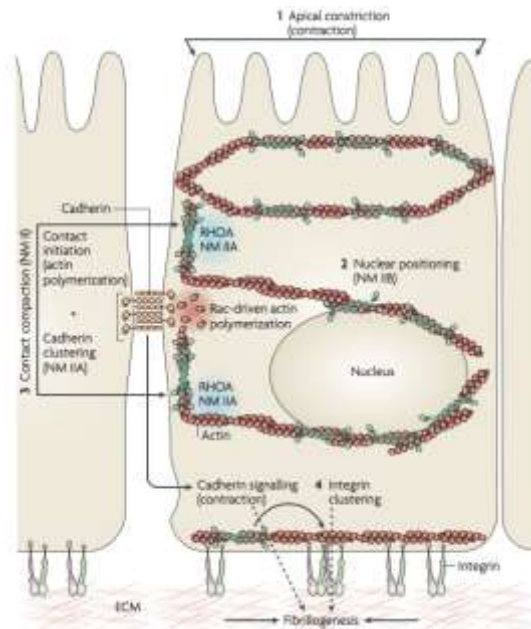


Figura 13. La organización del citoesqueleto de actomiosina determina la forma de las células epiteliales. En la región apical de las células epiteliales, el citoesqueleto de actomiosina se organiza en un anillo cortical que regula la estabilidad de los contactos célula-célula, mientras que, en la parte

basal, el citoesqueleto se organiza en fibras de estrés que regulan la estabilidad de los contactos célula-sustrato (Vicente-Manzanares et al., 2009).

7) La familia Rho

La familia Rho está constituida por proteínas G pequeñas de 20 KDa que hidrolizan al GTP e intercambian al GDP por GTP. Estas proteínas pertenecen a la superfamilia Ras y regulan la organización del citoesqueleto de actina (Ridley, 2001). El intercambio de GDP por GTP activa a las proteínas Rho y la hidrólisis de este nucleótido a GDP las inactiva. En el estado activo, a estas GTPasas se les insertan lípidos isoprenoides en el motivo CAAX que se localiza en la porción carboxilo terminal de estas proteínas (donde C corresponde a cisteína, A a aminoácidos alifáticos y X a cualquier aminoácido). Primero el grupo isoprenoide se une covalentemente a la cisteína del motivo CAAX, en seguida se eliminan los residuos AAX mediante proteólisis y finalmente la cisteína prenilada se carboximetila. Esta inserción lipídica promueve la asociación de las GTPasas a la membrana plasmática. En el estado inactivo de las GTPasas, el lípido isoprenoide se une a las proteínas inhibidoras GDI, que secuestran a estas proteínas en el citoplasma (Solski et al., 2002).

Existen proteínas que regulan de manera espacio-temporal la actividad catalítica de las proteínas Rho. Las proteínas que aumentan la actividad de Rho se denominan RhoGEF del inglés "guanine nucleotide exchange factor" y actúan promoviendo el intercambio de GDP por GTP. Las proteínas que disminuyen la actividad de Rho se denominan RhoGAP del inglés "GTPase activating protein" y se caracterizan porque estimulan la actividad de GTPasa de la proteína Rho.

En particular, las GEFs de la familia Dbl activan a las proteínas Rho. Estas GEFs se caracterizan por presentar dominios homólogos a Dbl (DH) y a plecstrina (PH) organizados en tándem (Sprang, 2001). En el genoma humano se han identificado 69 proteínas GEFs de la familia Dbl (Rossman et al., 2005), cuya activación ocurre por modificaciones post-traduccionales, unión a segundos mensajeros e interacción con otras proteínas (Bos et al., 2007). Así se ha visto que la cabeza de la miosina NMII se une al dominio catalítico de las proteínas GEFs de

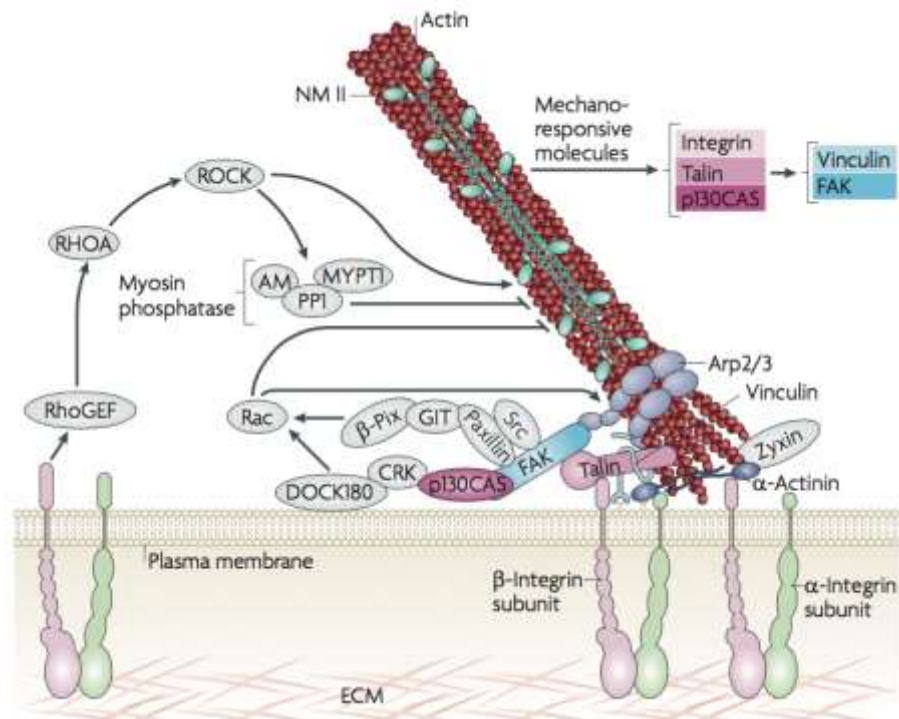


Figura 14. Las adhesiones focales regulan la adhesión célula-sustrato. Las integrinas en contacto con la matriz extracelular se asocian a las fibras de estrés mediante un puente formado por proteínas periféricas como la talina, la vinculina y la zyxina. Las cinasas Src, FAK y la proteína adaptadora paxilina, activan a las proteínas de la familia Rho, que a su vez regulan el ensamblaje de las adhesiones focales. Así, la activación de Rac por paxilina promueve la polimerización de la actina a través del complejo Arp2/3 en las adhesiones focales nacientes, mientras que la activación de RhoA/ROCK por las integrinas, activa a la miosina NMII para promover la contracción de las fibras de estrés y el desensamble de las adhesiones focales maduras (Vicente-Manzanares et al., 2009).

la familia Dbl y que esta interacción inhibe la asociación de las GEF con los nucleótidos de guanina. En consecuencia, se bloquea la conversión de Rho a su forma activa (Lee et al., 2010).

La familia Rho incluye a las subfamilias Rho (A, B y C), Rac (1 y 2) y Cdc42. Rho participa en la formación de fibras de estrés, adhesiones focales y cambios en

la forma celular. Rac está involucrada en la formación de las lamelas y Cdc42 forma los filopodios (Takaishi et al., 1997).

Las proteínas Rho regulan la organización del citoesqueleto de actina y las UEs (Nusrat et al., 1995). Por ejemplo, la activación de RhoA promueve la formación de fibras de estrés y desensambla el anillo cortical de actomiosina. Esto produce la deslocalización de las proteínas de la UE del borde celular y aumenta la permeabilidad paracelular (Bruewer et al., 2004). Algo semejante ocurre cuando se utiliza al factor necrotizante citotóxico 1 de *Escherichia coli* (CNF-1) para activar de forma constitutiva a RhoA, Rac1 y Cdc42 (Essler et al., 2003).

Por otro lado, en las células del epitelio intestinal T84, la inactivación de RhoA con la toxina C3 transferasa de *Clostridium botulinum* disminuye la RET, induce la redistribución de ZO-1 y ocludina fuera de la UE y aumenta la permeabilidad paracelular (Nusrat et al., 1995), mientras que una mutante negativa (DN) de RhoA no ejerce efecto alguno (Bruewer et al., 2004). Estos resultados contradictorios tal vez se expliquen porque C3 además de inhibir a RhoA, también bloquea a RhoB y RhoC (Aktories and Just, 1995). Esto sugiere que inhibir a RhoA no afecta a la UE y que sólo RhoB y RhoC tienen un efecto deletéreo sobre esta estructura.

Asimismo, la transfección de la forma constitutivamente activa (CA) y DN de Rac1, deslocaliza a las claudinas -1 y -2 del borde celular y la mutante DN de Cdc42, produce la deslocalización de la claudina-2. Por este conjunto de resultados se concluye que al modificar la actividad de cualquiera de los integrantes de la familia Rho, se altera la formación y el sellado de las UEs (Bruewer et al., 2004).

Estos resultados ponen en evidencia la relación íntima entre la UE y las moléculas que regulan al citoesqueleto de actina. Cabe entonces la pregunta: ¿Cuál es el papel de ZO-2 en esta relación?

II) Objetivo

Elucidar el mecanismo por el cual la proteína ZO-2 regula la citoarquitectura epitelial.

III) Hipótesis

ZO-2 regula la citoarquitectura epitelial a través de las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42.

IV) Material y métodos

4.1) Las células MDCK ZO-2 KD

La generación de las células MDCK ZO-2 KD se describió previamente (Van Itallie et al., 2009). En resumen, las células MDCK tipo II tet-off se transfectaron con el vector pSVZeo que confiere resistencia a la Zeocina y una mezcla de tres diferentes shARNs contra ZO-2, que se clonaron en los sitios BglIII/HindIII del vector pSuper. Por Western blot e inmunofluorescencia se seleccionaron las células resistentes a Zeocina (1 mg/mL) que no expresaban a ZO-2. De esta manera, se obtuvieron tres diferentes clonas denominadas IC5, IC6 y 2D1. Para hacer los experimentos de rescate del fenotipo se generó una construcción de ZO-2 resistente a los shARNs modificando a los sitios de unión al shARN. Esta construcción se clonó en el vector pTRE y se transfectó a las células MDCK ZO-2 KD.

Las células parentales (MDCK tipo II, Clontech, Mountain View, CA) y ZO-2 KD nos fueron donadas generosamente por el Dr. Alan Fanning (Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, NC) y se cultivaron como se describió previamente (Van Itallie et al., 2009). Las tres clonas de células ZO-2 KD que se usaron en este estudio IC5, IC6 y 2D1 expresan a los shARNs contra ZO-2 en el vector pSuper, mientras que las células parentales o control sólo expresan al vector vacío. La construcción de ZO-2 resistente a los shARNs también nos fue proporcionada amablemente por el Dr. Alan Fanning. Los cultivos confluentes y subconfluentes se sembraron a una densidad de 5×10^5 células/cm² y 1.5×10^5 células/cm², respectivamente.

4.2) Ensayo de cambio a calcio

Para los ensayos de cambio a calcio, las células parentales y ZO-2 KD se sembraron a subconfluencia sobre filtros “Transwell” o cubreobjetos de vidrio de acuerdo a las necesidades experimentales. Después de 48 horas, una vez que las monocapas alcanzaron la confluencia, los cultivos se lavaron 5 veces con PBS sin Ca^{2+} y se incubaron en medio con bajo Ca^{2+} (BC) ($1\text{-}5\ \mu\text{M}\ \text{Ca}^{2+}$). Después de 20 h en medio BC, las monocapas se cambiaron a medio con calcio normal ($1.8\ \text{mM}\ \text{Ca}^{2+}$) por diferentes periodos de tiempo.

4.3) Transfección celular

Las células MDCK ZO-2 KD se sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de 5×10^4 células/pozo. Un día después, las células se transfectaron con las siguientes construcciones empleando Lipofectamina 2000 (Life Technologies, Cat. 11668-019, Carlsbad, CA): 1) $0.4\ \mu\text{g}$ de pTRE-hZO-2 resistente a los shARNs anti ZO-2; 2) $0.5\ \mu\text{g}$ de p-[EGFP \(Clontech, Cat. 6085-1, Palo Alto, CA\)](#) y 3) $0.4\ \mu\text{g}$ de pCDNA-EGFP-GEF-H1 Y393A (construcción donada generosamente por la Dra. Celine DerMardirossian, del Departamento de Inmunología y Ciencias Microbianas, y el Departamento de Biología Celular y Molecular del Instituto de Investigación Scripps, CA, USA). Las células parentales se sembraron a subconfluencia y se transfectaron con Lipofectamina 2000 con $0.5\ \mu\text{g}$ de p-[EGFP \(Clontech, Cat. 6085-1, Palo Alto, CA\)](#) y $0.4\ \mu\text{g}$ of pCDNA-EGFP-GEF-H1 C53R (donada generosamente por la Dra. Celine DerMardirossian).

4.4) Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia (IF) se realizó como previamente se describió (Hernandez et al., 2007). Los anticuerpos primarios policlonales hechos en conejo que se utilizaron fueron: anti ZO-2 (Invitrogen, Cat. 711400, dilución 1:100, Carlsbad, CA), anti miosina IIa (Covance, Cat. PRB-445P; dilución 1:100, Berkeley, CA), anti la cadena ligera de la miosina fosforilada (pMLC2 Ser20) (abcam, Cat. Ab2480, dilución 1:100, Cambridge, MA), anti claudina-1 (Invitrogen, Cat. 51-9000,

dilución 1:50, Camarillo, CA), anti claudina-7 (Invitrogen, Cat. 34-9100, dilución 1:50, Camarillo, CA), anti cingulina (Invitrogen, Cat. 36-4401, dilución 1:100, Camarillo, CA) y anti paracingulina (donado generosamente por la Dra. Sandra Citi de la Universidad de Ginebra en Suiza, dilución 1:1,000). Los anticuerpos policlonales empleados hechos en ratón fueron: contra gp135/podocalixina (Invitrogen, Cat. 39-3800, dilución 1:100, Camarillo, CA), anti GEF-H1 (abcam, Cat. Ab90783, dilución 1:5, Cambridge, MA), y anti β -tubulina (Sigma-Aldrich, Cat. T7816; dilución 1:2000, St Louis, MO). También se usó un anticuerpo monoclonal hecho en rata contra E-cadherina y otro hecho en conejo contra p-cofilina (Cell Signaling Technology, Cat. 3313; dilución 1:1000; Danvers, MA). Los anticuerpos secundarios que se usaron fueron: de burro contra IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Cat A21207, dilución 1:100, Carlsbad, CA) y contra IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Cat A21203, dilución 1:100, Carlsbad, CA) o a Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Cat A11001, dilución 1:100, Eugene, OR). También se utilizó un anticuerpo hecho en conejo contra IgG de rata acoplado a FITC (Sigma-Aldrich, Cat. F1763, St. Louis MO). Para la detección de la F-actina se utilizó faloidina rodaminada (Invitrogen, Cat R415, 1:50, Eugene, OR).

Eliminado: myosin IXa (Abnova, Cat. H00004649-A01; dilution 1:100; Taipei, Taiwan), golgin-97 (Molecular Probes, Cat. A-21270; dilution 1:200; Eugene, OR)

Los inhibidores ML-7 y Y27632 se añadieron a las monocapas confluentes y después de 30 min, las monocapas se lavaron 3 veces con PBS, se fijaron y se procesaron para IF. El inhibidor C3 se añadió a las monocapas confluentes por 2 h en medio sin suero, en seguida las células se lavaron 3 veces con PBS, se fijaron y se procesaron para IF.

Eliminado:

Cómo ya se mencionó, las células MDCK ZO-2 KD son más grandes que las parentales (Dominguez-Calderon et al., 2016). Por esta razón, las células MDCK ZO-2 KD se ven de mayor tamaño en las fotografías de esta tesis, a pesar de que se tomaron al mismo aumento que las células parentales.

4.5) Western blot

Los Western blots (WB) se realizaron de acuerdo al protocolo estándar descrito previamente (Quiros et al., 2013). Los anticuerpos monoclonales hechos en ratón que se emplearon fueron anti: ROCK II (BD Biosciences, Cat. 610623,

dilución 1:2000, San Jose, CA), GEF-H1 (abcam, Cat. Ab90783, dilución 1:50, Cambridge, MA); integrina β 4 (BD Biosciences, Cat. 611233, dilución 1:500, Franklin Lakes, NJ) β -tubulina (Sigma Aldrich, Cat. T7816, dilución 1:20,000, Saint Louis, MO) y actina (donado generosamente por el Dr Manuel Hernández, Departamento de Biología Celular del Cinvestav). Los anticuerpos policlonales hechos en conejo que se emplearon fueron contra: ZO-2 (Invitrogen, Cat. 711400, dilución 1:1000, Carlsbad, CA), la cadena ligera de la miosina fosforilada (p-MLC2 Ser 20) (abcam, Cat. ab2480, dilución 1:5000, Cambridge, MA), myosina IXb (Sigma Aldrich, Cat. M5566, dilución 1:2000, St. Louis, MO); claudina-7 (Invitrogen, Cat. 34-9100, dilución 1:250, Camarillo, CA), integrina β 1 (Millipore, Cat. AB1952, dilución 1:1000, Billerica, MA), [ROCK I \(Chemicon International, Cat. AB3885, dilución 1:3000, Warford, United Kingdom\)](#), cingulina (Invitrogen, Cat. 36-4401, dilución 1:6,000, Camarillo, CA) y paracingulina (donado generosamente por la Dra. Sandra Citi de la Universidad de Ginebra en Suiza, dilución 1:10,000). Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa que se utilizaron fueron: de cabra anti IgG de conejo (Sigma Aldrich, Cat A9169, dilución 1:10,000, San Louis, MO), y anti IgG de ratón (Cat. 62-6420, Invitrogen, Carlsbad, CA, dilución 1:3000). La detección de las bandas que reaccionaron con los anticuerpos se hizo con el sistema immobilon (Cat. WBKLS0500, Millipore, Billerica, MA).

Eliminado:

Eliminado: and

4.6) Cortes semifinos

Las muestras se fijaron por 60 minutos con 2.5% de glutaraldehído en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2 y tetróxido de osmio al 1%. En seguida, las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y óxido de propileno. Después las preparaciones se embebieron en la resina epoxi Polybed y se polimerizaron a 60 °C por 24 h. Se obtuvieron secciones semifinas de 500 nm de espesor que se tiñeron con azul de toluidina (Cat. T3260, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) y se observaron en un microscopio de luz Axiophot (Carl Zeiss, Germany) equipado con la cámara digital AxioCam MRc Zeiss (Carl Zeiss Vision GmbH, Germany).

4.7) Ensayos de activación de las proteínas Rho

El nivel de actividad de RhoA se midió primero en un ensayo G-LISA (Cytoskeleton, Cat BK124, Denver, CO) hecho con extractos de células MDCK parentales y ZO-2 KD. La absorbancia se midió a 490 nm como lo indica el fabricante.

Posteriormente, la activación de las tres proteínas Rho se evaluó mediante ensayos de precipitación por afinidad en las células parentales y ZO-2 KD cómo se describió previamente (Carretero-Ortega et al., 2010). Para detectar a las GTPasas activas se utilizaron proteínas de fusión acopladas a los siguientes dominios presentes en las proteínas efectoras: dominio CRIB de PAK para Cdc42 y Rac1, y dominio RBD de rhotekina para RhoA. Las células MDCK se lavaron con PBS con $MgCl_2$ y se lisaron con 1 mL de solución amortiguadora de lisis fría (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5, 1% Triton X-100 y 5 mM EDTA), con inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, leupeptina 10 g/ml y aprotinina 10 g/ml) e inhibidores de fosfatasa (NaF 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y glicerofosfato 1 mM). Los lisados celulares se incubaron en hielo con agitación constante con 40 μ L de perlas de sefarosa recubiertas con GST-PAK CRIB o GST-Rhotekin RBD. Las perlas se centrifugaron a 5,000 rpm durante 2 min y se lavaron con la solución amortiguadora de lisis. Después, las perlas se resuspendieron con 35 μ L de solución amortiguadora Laemmli 1X, se hirvieron por 5 min y se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min. Las perlas en seguida se corrieron en un gel al 12% de acrilamida. Posteriormente las proteínas del gel se transfirieron a membranas de PVDF y las GTPasas se inmunodetectaron con anticuerpos monoclonales de ratón anti-Cdc42 (Santa Cruz Biotechnology Inc. Cat. sc-87, dilución 1:5,000), anti-Rac1 (Santa Cruz Biotechnology Inc. Cat. sc-217, dilución 1:40000) o anti-RhoA (Santa Cruz Biotechnology Inc. Cat. sc-418, dilución 1:5000). Los lisados celulares totales se analizaron en paralelo como control de carga.

4.8) Localización de RhoA activa

Para localizar a RhoA activa empleamos a un biosensor de cadena sencilla (Pertz et al., 2006) que responde a la activación de RhoA (Addgene, plasmid 12150,

Cambridge, MA). Este biosensor contiene por una parte al dominio de unión a RhoA de la rhotekina unido a la proteína fluorescente cyan (CFP) y por otra a la proteína RhoA unida a la proteína amarilla fluorescente (YFP). Entre estos dos segmentos se encuentra un conector de longitud óptima.

Para estudiar la localización y activación de RhoA durante el ensamble de la UE, las células MDCK control y ZO-2 KD se sembraron a la densidad de 2×10^5 células sobre cubreobjetos de vidrio, que se colocaron en los pozos de una placa de 24 pozos con una superficie de $2 \text{ cm}^2/\text{pozo}$. Después de 48 h, las células se transfectaron con el biosensor de RhoA ($2 \text{ } \mu\text{g DNA/pozo}$) y 24 h más tarde las monocapas se lavaron 5 veces con PBS sin Ca^{2+} y se incubaron en medio con bajo calcio (BC, $1\text{-}5 \text{ } \mu\text{M Ca}^{2+}$). Después de 20 h en medio BC, las monocapas se cambiaron a medio con calcio normal ($1,8 \text{ mM Ca}^{2+}$) por diferentes periodos de tiempo. Al término de estos tiempos se analizó la activación de RhoA como la proporción FRET/CFP. La captura y el análisis de las imágenes se realizó como se describió previamente (Kardash et al., 2011). La media de la proporción FRET/CFP de las células se cuantificó con ImageJ.

4.9) Inmunoprecipitación

ZO-2 se inmunoprecipitó de las células MDCK parentales con anticuerpos contra ZO-2 (Invitrogen, Cat. 71-1400, $0.25 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $2 \text{ } \mu\text{L}$ de anticuerpo por cada $120 \text{ } \mu\text{L}$ de lisado total a una concentración de $7.5\text{-}10 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína, Camarillo, Ca), y la cingulina se inmunoprecipitó de las células parentales y ZO-2 KD con anticuerpos contra cingulina (Invitrogen, Cat. 36-4401, 1:300, $0.4 \text{ } \mu\text{L}$ de anticuerpo por cada $120 \text{ } \mu\text{L}$ de lisado total a una concentración de $7.5\text{-}10 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína, Camarillo, Ca). Se sembraron 1.9×10^6 células en cajas de 35 mm de diámetro y dos días después, las células confluentes se lisaron en $160 \text{ } \mu\text{L}$ de solución amortiguadora de radioinmunoprecipitación, modificada mediante una disminución de la fuerza iónica para preservar la unión entre las proteínas [50 mM Tris-HCl , pH 7.5, 130 mM NaCl y $1\% \text{ NP-40 (vol/vol)}$], en presencia de inhibidores de proteasas (Complete™ Roche Diagnostics, Cat. 11697498001, Mannheim, Germany). Los lisados se preclarificaron con $6 \text{ } \mu\text{L}$ de perlas de agarosa recubiertas con proteína A

(Roche Diagnostics, Cat. 11134515001, Mannheim, Germany) y diluidas 1 a 2 en PBS durante media hora. En seguida, los lisados se incubaron con los anticuerpos durante 24 h en refrigeración y con agitación constante. Posteriormente se añadieron 12 μ L de perlas diluidas y después de una noche de incubación, los lisados se centrifugaron a 13,000 rpm durante 3 min. Las perlas recuperadas en la pastilla se mezclaron con 40 μ L de solución amortiguadora desnaturalizante Laemmli 2X. En seguida, las muestras se hirvieron durante 5 min y se procesaron para el inmunoblot.

4.10) Ensayo de ligación por proximidad *in situ* Duolink

El ensayo de ligación por proximidad *in situ* Duolink (PLA) (Olink Bioscience, Cat. 92101, Uppsala, Suecia) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, empleando un anticuerpo hecho en conejo contra ZO-2 (Invitrogen, Cat. 71-1400; dilución 1:100; Camarillo, CA) y un anticuerpo hecho en ratón anti GEF-H1 (Abcam, Cat. Ab90783; dilución 1:5, Cambridge, MA). Después de completar la reacción, las preparaciones se lavaron 3 veces y los bordes celulares se tiñeron con un anticuerpo anti E-cadherina hecho en rata (Sigma Aldrich, U3254, dilución 1:100, St. Louis, MO), y un anticuerpo anti rata acoplado a FITC (Sigma Aldrich, F1763, dilución 1:100, St Louis, MO). El análisis cuantitativo de los ensayos de PLA se hizo con el programa BlobFinder (Allalou and Wahlby, 2009), desarrollado por el Centro de Análisis de Imágenes de la Universidad de Uppsala en Suecia (www.cb.uu.se/~amin/BlobFinder/).

4.11) Fraccionamiento celular

Las fracciones de membrana de las células MDCK parentales y ZO-2 KD, se aislaron con el estuche de extracción de proteínas de distintos compartimentos celulares (Millipore Bioscience Research, Cat. 2145; Temecula, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los extractos de membrana se corrieron en un gel SDS-PAGE. En el Western blot, como marcador de la membrana plasmática se usó un anticuerpo contra la subunidad β 1 de la Na^+, K^+ -ATPasa (donado amablemente por el Dr. Michael Caplan de la Universidad de Yale, New Haven, CT).

4.12) Ensayo para evaluar la fortaleza de la adhesión célula-célula

Las monocapas parentales y ZO-2 KD se trataron con 0.05% de tripsina en 0.05% de EDTA a 37°C por 15 min. La digestión enzimática se detuvo por la adición de CDMEM (medio Dulbecco modificado por Eagle complementado con suero fetal bovino, insulina y antibióticos) y en seguida se tomaron imágenes de campo claro del medio que se recoge de los pozos en una cámara de alta resolución (AxioCam MRc 5, Zeiss, 0450-354, Oberkochen, Germany) colocada sobre un microscopio invertido (Zeiss Axio Observer.Z1, Oberkochen, Germany). Con estas imágenes se determinó el número de células individuales y agregados celulares presentes.

4.13) Ensayo de desprendimiento de las células del sustrato

Las células parentales y ZO-2 KD se sembraron a una densidad de 2.5×10^5 células/cm² en placas de 24 pozos. Después de 24 h de incubación en CDMEM, las células se lavaron tres veces con PBS y se trataron con 100 µL/pozo de tripsina (0.05% de tripsina y 0.05% de EDTA en PBS) por 5 o 10 min para despegar a las células del sustrato. Después, la tripsina se inactivó con la adición de CDMEM. En seguida, las monocapas se lavaron un par de veces con PBS y se fijaron por 10 min con 100 µL/pozo de metanol. Las células adheridas al sustrato se tiñeron con cristal violeta 1% (m/V) por 5 min a temperatura ambiente. Después de lavar el exceso de colorante con agua y secar, las células teñidas se solubilizaron en deoxicolato de sodio al 1%(m/V) y HEPES 10 mM pH 7.4. La absorbancia del colorante se midió en una placa de 96 pozos a 590 nm.

4.14) Ensayo de migración celular

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se cultivaron sobre placas de 60 mm de diámetro. Cuando las monocapas alcanzaron la confluencia, se incubaron con 5 µg/mL de mitomicina C, para inhibir la síntesis del DNA. Esto se hizo con el fin de evaluar la migración celular de manera independiente a la proliferación celular. Después de 2 horas, el medio de incubación se retiró y las monocapas se lavaron 2 veces con PBS. Después de 10 min de incubación en PBS, la solución se retiró y

las monocapas se rasgaron con la punta de una pipeta. En seguida, las monocapas se incubaron con medio CDMEM y se colocaron dentro de una cámara en el microscopio invertido Zeiss Axio Observer.Z1 con la temperatura fija a 37 °C (Heating Insert P Lab-Tek™ S1, Zeiss, Cat. 411860-9025-000, Erbach, Germany) (TempModule S1, PeCon, Cat. 800-800 000, Erbach, Germany) y una atmósfera de 5% de CO₂ (CO₂-Cover PM S1, PeCon, Cat. 411857-9110-000, Erbach, Germany). Las imágenes se tomaron con una cámara de alta resolución (AxioCam MRc 5, Zeiss, 0450-354, Oberkochen, Germany). Para la captura de las imágenes se empleó el programa Axiovision 4.0. Las fotos se tomaron 0, 7 y 14 h después de herir a la monocapa. La cuantificación de este ensayo se hizo con el programa TScratch version 1.0 (<http://cse-lab.ethz.ch/software/>).

4.15) Ensayo de movimiento celular

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron a baja densidad (2.5×10^4 células/cm²) y 24 h después se analizó el movimiento de las células en el microscopio invertido Zeiss Axio Observer.Z1 equipado con una cámara de incubación que mantenía la temperatura a 37 °C (Heating Insert P Lab-Tek™ S1, Zeiss, Cat. 411860-9025-000, Erbach, Germany) (TempModule S1, PeCon, Cat. 800-800 000, Erbach, Germany) en una atmósfera de CO₂ al 5% (CO₂-Cover PM S1, PeCon, Cat. 411857-9110-000, Erbach, Germany). El movimiento de las células individuales y de las islas celulares se registró mediante microscopía de lapsos de tiempo en una cámara digital (AxioCam MRc 5, Zeiss, 0450-354, Oberkochen, Germany) registrando cada 4 min durante 5 h con un aumento de 10X. La trayectoria de las células e islas y su velocidad de migración se calculó con la aplicación "Manual tracking" de ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/track/track.html>).

4.16) Formación de quistes

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se tripsinizaron y se resuspendieron en 30 µL de DMEM a una densidad de 3×10^6 células/mL. En seguida, las células se mezclaron con 20 µL de Matrigel (BD Bioscience, Cat. 356234, Rockville, MD) y se sembraron en la parte superior de un inserto Transwell (Filtro de policarbonato, 6.5

mm de diámetro, poro de 0.4 μm ; Cat. 3414; Corning, Tewksbury, MA). El inserto en seguida se colocó dentro de una placa de 24 pozos con DMEM, y se incubó durante 1 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Luego, la cámara superior del Transwell se bañó con 100 μL de CDMEM y se dejó en la incubadora por 10 días. El medio de cultivo se cambió por CDMEM fresco cada tercer día. Los quistes que se formaron se fijaron con PFA al 2% y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5%. En seguida, los quistes se procesaron para inmunofluorescencia dentro del mismo Transwell. Para ello, primero se incubaron toda la noche con un anticuerpo de conejo contra claudina-1 (Invitrogen, Cat. 51-9000, dilution 1:1000, Camarillo, CA) y un anticuerpo de ratón contra gp135/podocalixina (Invitrogen, Cat. 39-3800, dilution 1:100, Camarillo, CA). Posteriormente, los quistes en los Transwell se incubaron con un anticuerpo anti ratón acoplado a Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Cat. A11001, dilution 1:300 Eugene, OR) y un anticuerpo anti conejo acoplado a Alexa Fluor 594 (Life Technologies, Cat. A11012, dilution 1:300 Eugene, OR). Después de 12 lavados con PBS, los insertos Transwell se invirtieron y los filtros se desprendieron con una navaja. En seguida, el Matrigel se desprendió de los filtros con una espátula y se colocó sobre un portaobjetos. Allí el gel con los quistes se incubó por 5 min con Topro-3 para teñir a los núcleos (Life Technologies, Cat. T3605, dilución 1:10,000 Eugene, OR). Finalmente, el gel se lavó 5 veces con PBS y se cubrió con medio de montaje y un cubreobjetos. Las muestras se observaron en el microscopio confocal Leica SP8.

4.17) Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-qPCR)

El ARN total se extrajo de las células MDCK parentales y ZO-2 KD con ayuda del reactivo TRI-reagent (Sigma-Aldrich, Cat. T9424, St. Louis, MO). La RT-qPCR se realizó en un solo paso empleando el estuche KAPA SYBR® FAST qPCR kit (KAPA Biosystems, Cat. KK4600, Wilmington, MA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado empleando el sistema de PCR en tiempo real (Applied Biosystems Cat. 4376600, Carlsbad, CA). Las condiciones de la PCR fueron: un ciclo inicial de 5 min a 42 °C, un ciclo de 5 min a

92 °C, 40 ciclos de amplificación (30 s a 92 °C y 30 s a 62 °C) y una curva desnaturante (15 s a 95 °C; 1 min a 60 °C; 15 s a 95 °C). Los oligos que se usaron para la amplificación fueron: claudina-2, sentido: CAAGCCCTGAAGACACTTCTG, antisentido: GTGCTGTAGATGTCACACTGG; claudina-4 sentido: TGCACCAACTGCGTGAGGATGAG, antisentido: ACCACCAGCGGGTTGTAGAAGTCC; claudina-7, sentido: CATTGTGGGAGGTCTTGCTG, antisentido: AGAGTTGGGCTTAGGGTAGG; integrina β 1, sentido: CTCCAGCCAGAAGATATACTCAG, antisentido: AAATGAACCAAACCAATTCGG; integrina β 4, sentido: AAATCCACTTCAACTGGCTG, antisentido: GCACACCTTCATCTCATAGTC; y proteína ribosomal grande P0 (PRP0), sentido: TACAACCCTGAAGTGCTTGAC, antisentido: GCAGATGGATCAGCCAAGAAG.

La abundancia relativa del ARNm se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los datos se expresaron en comparación al RNAm de PRP0

4.18) Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET)

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron en insertos claros Transwell de 1.12 cm² con membranas de poliéster. La RET de cada inserto se midió de manera continua con el sistema de monitoreo automático, cellZscope (nanoAnalytics GmbH, Munster, Germany) Los valores de RET se obtuvieron usando el programa cellZscope, versión 1.5.0.

4.19) Medición del flujo paracelular

La medición del flujo paracelular se hizo como se describió previamente (Nava et al., 2004). Se añadieron 200 μ L de la solución trazadora FITC-Dextran de 10 kDa (Invitrogen Cat. D1821, Eugene, OR) o 70 kDa (Invitrogen D1823, Eugene, OR) a una concentración de 10 μ g/mL, a la cara apical de las monocapas confluentes parentales y ZO-2 KD, sembradas en insertos Transwell (Costar, Cat. 3470, Tewksbury, MA). Después de una hora de incubación a 37 °C, se recogió el medio de los compartimentos superior e inferior y se midió la cantidad de FITC-Dextran en un fluorómetro (excitación 492 nm, emisión 520 nm).

Eliminado: ;
 Eliminado: claudin-2
 Eliminado: ;
 Eliminado: claudin-4
 Eliminado: .

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, Color de fuente: Negro, No revisar la ortografía ni la gramática, Superíndice
 Eliminado: ^c
 Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, Color de fuente: Negro, No revisar la ortografía ni la gramática, Superíndice

4.20) Fármacos

La solución madre de C3 transferasa de *Clostridium botulinum* (Cytoskeleton, Inc., Cat. CT03, Denver, CO), se hizo a una concentración de 1 mg/mL en agua y se usó en los cultivos a una concentración de 1 µg/mL.

La solución madre de Y27632 (Merck KGaA, Cat 688000, Darmstadt, Alemania), se hizo a una concentración de 10 mM en agua y se usó en las células a una concentración de 10 µM.

La solución madre de ML-7 (Merck KGaA, Cat 475880, Darmstadt, Alemania) se hizo a una concentración de 10 mM en DMSO y se usó en las células a una concentración de 10 µM.

La mitomicina C de *Streptomyces caespitosus* (Sigma-Aldrich, Cat. M0503, St. Louis, MO) se preparó como una solución madre de 5 mg/mL en agua y se usó en los experimentos a una concentración de 5 µg/mL.

La solución de forskolina (Sigma-Aldrich, Cat. F6886, St. Louis, MO) se preparó como solución madre a una concentración de 10 mM en DMSO y se usó en las células a una concentración de 50 µM.

V) Resultados

5.1 La ausencia de ZO-2 altera la citoarquitectura e induce la proliferación de las fibras de estrés

El tratamiento de las células MDCK con los shARNs que suprimen la expresión de ZO-2 (ZO-2 KD), aumenta la expresión de ZO-1 (Fig. 14A), produce hipertrofia celular como se había reportado previamente (Dominguez-Calderon et al., 2016), e induce una morfología atípica que se caracteriza por áreas que se separan del sustrato, espacios intercelulares muy amplios y regiones donde unas células crecen encima de otras (Fig. 14B) a semejanza de lo previamente observado al silenciar parcialmente a ZO-2 con un siRNA (Hernandez et al., 2007). Por inmunofluorescencia, las células ZO-2 KD muestran en las imágenes laterales, una alteración de su perfil con áreas donde la superficie apical se abulta (Fig. 14C). En seguida, analizamos si estos cambios en la arquitectura celular se acompañaban de una alteración en el patrón de distribución de actina a nivel apical y basal. Para descartar la posibilidad de que los cambios fenotípicos fueron el resultado de efectos fuera de blanco de los shARNs, se estudió la distribución de actina en tres clones de células MDCK ZO-2 KD: IC5, IC6 y 2D1. La figura 15 revela que las células ZO-2 KD mantienen el anillo de actina en el borde celular a nivel apical, mientras que a nivel basal, exhiben grandes acúmulos de fibras de estrés. En el resto de esta tesis y, a menos que se indique lo contrario, todas las células ZO-2 KD que se usaron corresponden a la clona IC5. Estas células serán identificadas de ahora en adelante sólo como células ZO-2 KD.

5.2 La falta de ZO-2 induce el reclutamiento de la vinculina a las adhesiones focales, disminuye la adhesión célula-célula y la expresión de claudina-7 e integrina β 1 y facilita la separación de las células del sustrato

Como las monocapas de las células ZO-2 KD exhiben espacios intercelulares muy amplios (Fig. 14B), estudiamos la fortaleza de la adhesión célula-célula mediante un ensayo de susceptibilidad a la tripsina. Para ello, las monocapas confluentes parentales y ZO-2 KD se trataron con tripsina al 0.05% y EDTA al 0.05%

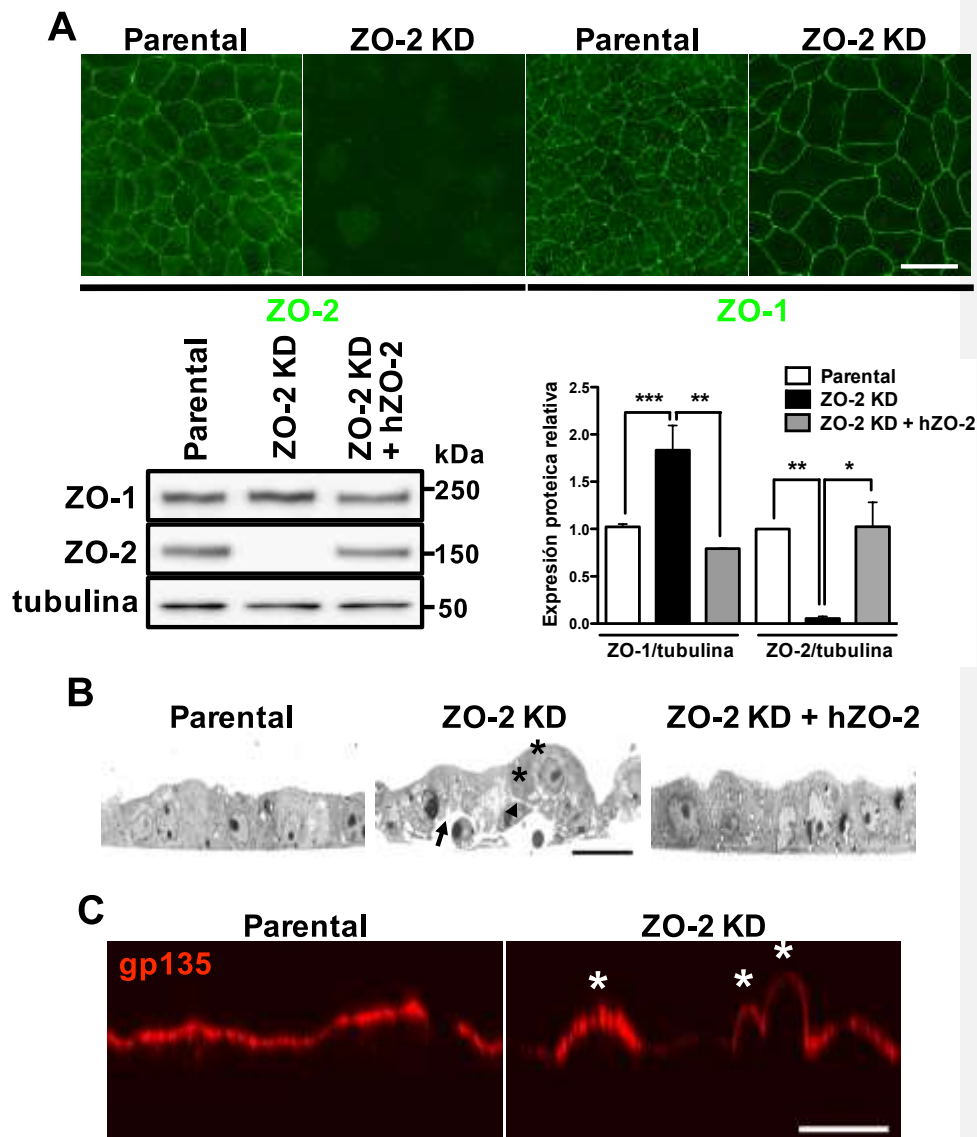


Figura 14. Sin ZO-2 se altera la citoarquitectura y aumenta la expresión de ZO-1 en las células epiteliales MDCK. A) En las células ZO-2 KD no se observa señal de ZO-2 por inmunofluorescencia (panel superior) ni por Western blot (panel inferior). La expresión de ZO-1 aumenta en las células ZO-2 KD y la transfección de hZO-2 en las células ZO-2 KD reduce la cantidad de ZO-1 a un nivel

similar al de las células parentales (panel inferior). En el Western blot, se usó a la tubulina como control de carga. Barra = 40 μm . El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, *** $p < 0.001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0.05$. B) La ausencia de ZO-2 KD altera la arquitectura celular. Las imágenes de microscopía de luz de secciones semifinas muestran que los cultivos de las células ZO-2 KD (clona IC5), exhiben áreas donde la monocapa se despegan del sustrato (flecha), células que crecen unas encima de otras (*) y un aumento del espacio intercelular (cabeza de flecha). Estas características no se observan en las monocapas control o en las células ZO-2 KD transfectadas con hZO-2. Barra = 20 μm . C) El perfil de las monocapas ZO-2 KD (clona IC5), revela regiones donde se abulta la superficie apical. Los cortes laterales de la superficie apical de las monocapas control y ZO-2 KD se observaron por inmunofluorescencia, con un anticuerpo contra gp135/podocalixina. * Señala las protrusiones apicales. Barra = 20 μm .

a 37 °C durante 15 minutos. A continuación, las células se observaron bajo un microscopio donde se contaron el número de las células individuales y de agregados formados por grupos de dos a tres células, y por más de tres células. La figura 16A muestra que el porcentaje de células individuales fue mayor en las células ZO-2 KD que en las parentales. Estos resultados indican que la falta de ZO-2 debilita la adhesión célula-célula.

Como observamos que en las células ZO-2 KD, hay áreas de la monocapa que se despegan del sustrato (Fig. 14B), en seguida realizamos un ensayo de desprendimiento celular inducido por el tratamiento durante 5 o 10 min con 0.05% de tripsina y EDTA al 0.05% a 37 °C. La figura 16B muestra que la falta de ZO-2 facilita el desprendimiento de las células del sustrato, pues en estas condiciones, el tratamiento con tripsina/EDTA despegan a más células y por lo tanto disminuye la cantidad de células teñidas con cristal violeta que permanecen adheridas al fondo del pozo. A continuación, exploramos la expresión de vinculina en la superficie basal de las células. Observamos un incremento en la marca de vinculina en las células que carecen de ZO-2 en comparación con las células parentales (Fig. 17A). Estos resultados sugieren, que en las células ZO-2 KD, las áreas de las monocapas que permanecen unidas al sustrato, refuerzan su adhesión focal con vinculina y fibras de estrés.

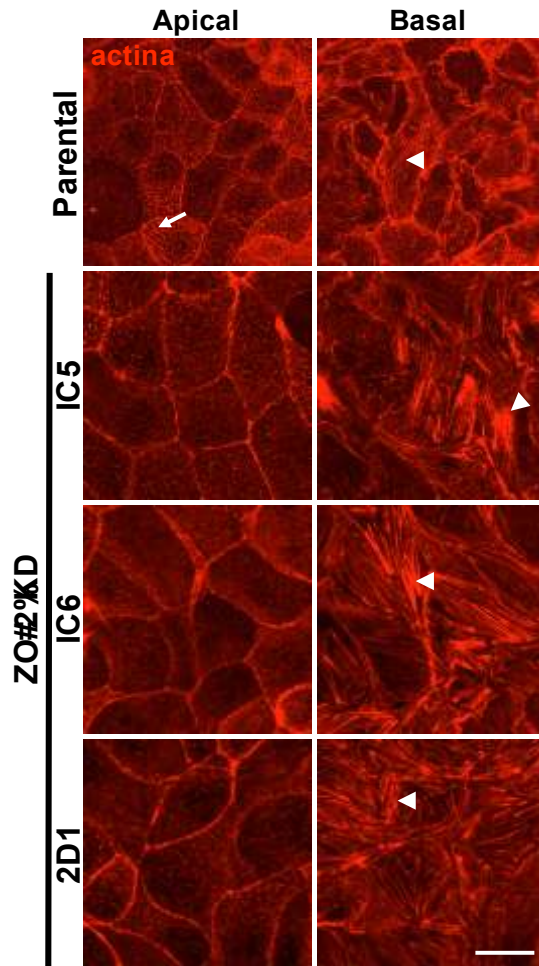


Figura 15. La falta de ZO-2 induce la proliferación de las fibras de estrés en las células epiteliales MDCK. Imágenes de inmunofluorescencia empleando faloidina rodamina para tefir a la F-actina. A nivel apical se detecta el anillo cortical de actina y las microvellosidades (flecha) en las células parentales y en las clonas IC5, IC6 y 2D1 de las células ZO-2 KD. A nivel basal las tres clonas de las células ZO-2 KD muestran una profusión de fibras de estrés (cabeza de flecha), barra = 40 μ m.

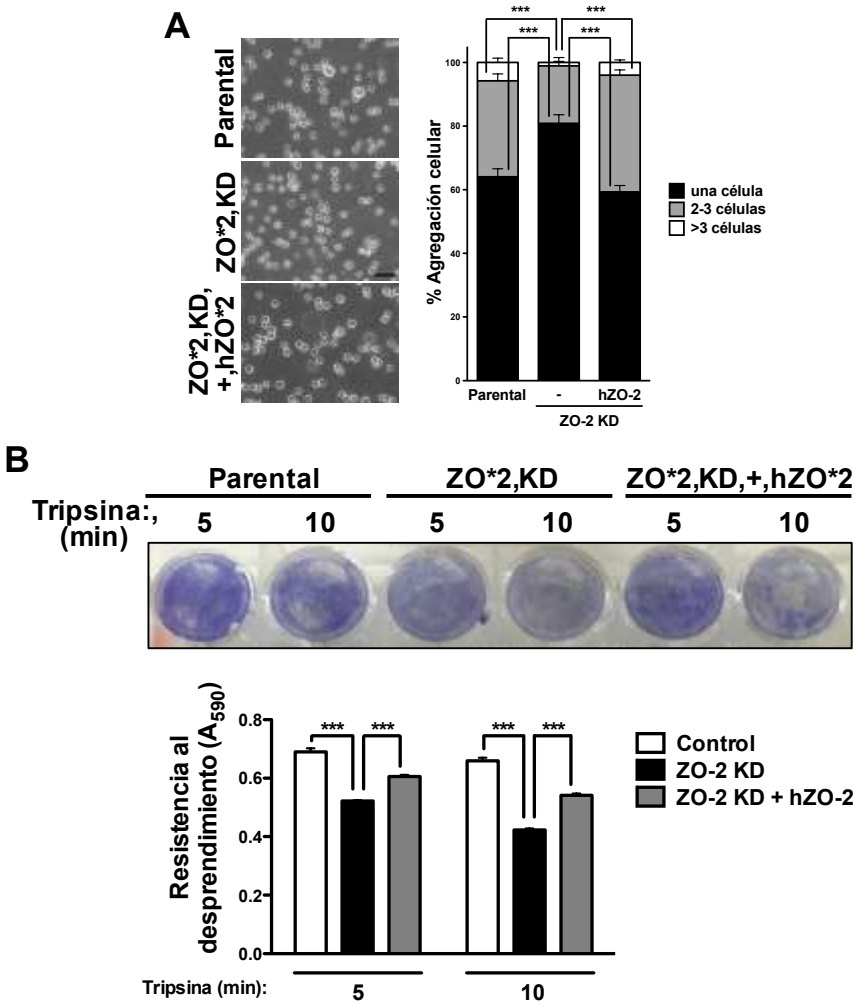


Figura 16. La ausencia de ZO-2 disminuye la adhesión célula-célula y célula sustrato. A) La adhesión célula-célula es más sensible al tratamiento con tripsina en las células ZO-2 KD. Izquierda, imagen de contraste de fases de las células parentales y ZO-2 KD transfectadas o no con hZO-2, y tratadas con tripsina al 0.05% y EDTA al 0.05% a 37°C durante 15 min, barra = 40 μ m. Derecha, análisis estadístico realizado con la prueba ANOVA de una vía y acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, *** p <0.001. B) Las células ZO-2 KD se adhieren menos al sustrato que las células parentales o las células ZO-2 KD transfectadas con hZO-2, después del tratamiento por 5 o 10 min a 37°C con tripsina al 0.05% y EDTA al 0.05%. Las células se fijaron con metanol y se tificaron

con cristal violeta. La cantidad del colorante se cuantificó en un espectrofotómetro de placa a una longitud de onda de 590 nm. Imagen representativa (panel superior), análisis cuantitativo (panel inferior). Análisis estadístico realizado con la prueba ANOVA de dos vías acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, *** $p < 0.001$.

Con el objetivo de analizar a mayor detalle el desprendimiento de las células del sustrato inducido por la falta de ZO-2, en seguida exploramos la expresión de la claudina-7 y la integrina $\beta 1$. La claudina-7 colocaliza y forma un complejo estable con la integrina $\beta 1$. Además la delección de la claudina-7 reduce la expresión de la integrina $\beta 1$ y disminuye la adhesión de las células a la matriz celular (Ding et al., 2012; Lu et al., 2015). La figura 17B muestra por Western blot (panel superior) e inmunofluorescencia (panel inferior) una disminución significativa de la claudina-7 en las células ZO-2 KD. Este cambio ocurre a nivel de proteína y no a nivel del ARNm (Fig. 17C). La disminución de la claudina-7 se acompaña de una disminución en la expresión de la integrina $\beta 1$ en las células ZO-2 KD a nivel de proteína (Fig. 17D) y no a nivel del ARNm (Fig. 17E).

Estos resultados sugieren que en las células ZO-2 KD al disminuir la expresión de la claudina-7 y la integrina $\beta 1$, se promueve el desprendimiento de las células del sustrato.

5.3 La ausencia de ZO-2 induce la activación de Rac1 y la defosforilación de la cofilina, lo que promueve la formación de múltiples lamelipodios y reduce el movimiento con dirección, pero acelera el cierre de las heridas

A continuación, exploramos si la ausencia de ZO-2 altera la formación de las lamelas. Encontramos que en las heridas hechas en las monocapas ZO-2 KD con la punta de una pipeta (Fig. 18A), así como en las células individuales y en las islas de células ZO-2 KD (Fig. 18B), se forman lamelas más grandes que en las células parentales. Además, la figura 18B revela que en las células individuales y en las islas de células ZO-2 KD, aparecen varias lamelas en distintos puntos alrededor de las células. En cambio, en las células individuales y en las islas parentales, únicamente se forma una lamela.

La integrina $\alpha\beta4$ es un receptor de laminina que regula la formación y estabilización de las lamelas (Rabinovitz and Mercurio, 1997), Por ello, en seguida analizamos la expresión de la integrina $\beta4$ en las células ZO-2 KD. Encontramos que la cantidad de integrina $\beta4$ aumenta en ausencia de ZO-2 (Fig. 19A), sin que ocurran cambios a nivel de su ARNm (Fig. 19B)

La cofilina es una proteína crucial para la formación de las lamelas y la migración celular. La activación de la cofilina, por la defosforilación de la serina 3, promueve el corte y la despolimerización de la F-actina a medida que los monómeros de actina, se desensamblan desde la parte posterior del filamento y se reciclan a la parte anterior o frente de migración para realizar el siguiente ciclo de polimerización de actina (Huang et al., 2006). Por esa razón se analizó el estado de fosforilación de la cofilina en las células MDCK parentales y ZO-2 KD. La figura 19C muestra que la cofilina está menos fosforilada en las células ZO-2 KD que en las células parentales y que este efecto se revierte al transfectar a hZO-2. Pensamos que la reversión es parcial porque solamente alrededor del 30% de las células se transfectan exitosamente. Estos resultados sugieren que la profusión de lamelas, inducida por la ausencia de ZO-2, se regula por la sobre-activación de la cofilina.

Rac1 es un miembro de la familia de GTPasas Rho que promueve la defosforilación de la cofilina, por esta razón analizamos si la disminución en la fosforilación de la cofilina se debe a un aumento en la actividad de Rac1 (Pandey et al., 2009). La figura 20A muestra en un ensayo de precipitación por afinidad, un aumento de Rac1 activa en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales y como este valor regresa a su nivel basal con la transfección de hZO-2 en las células ZO-2 KD. Estos resultados sugieren que en las células ZO-2 KD la activación de la cofilina depende de Rac1.

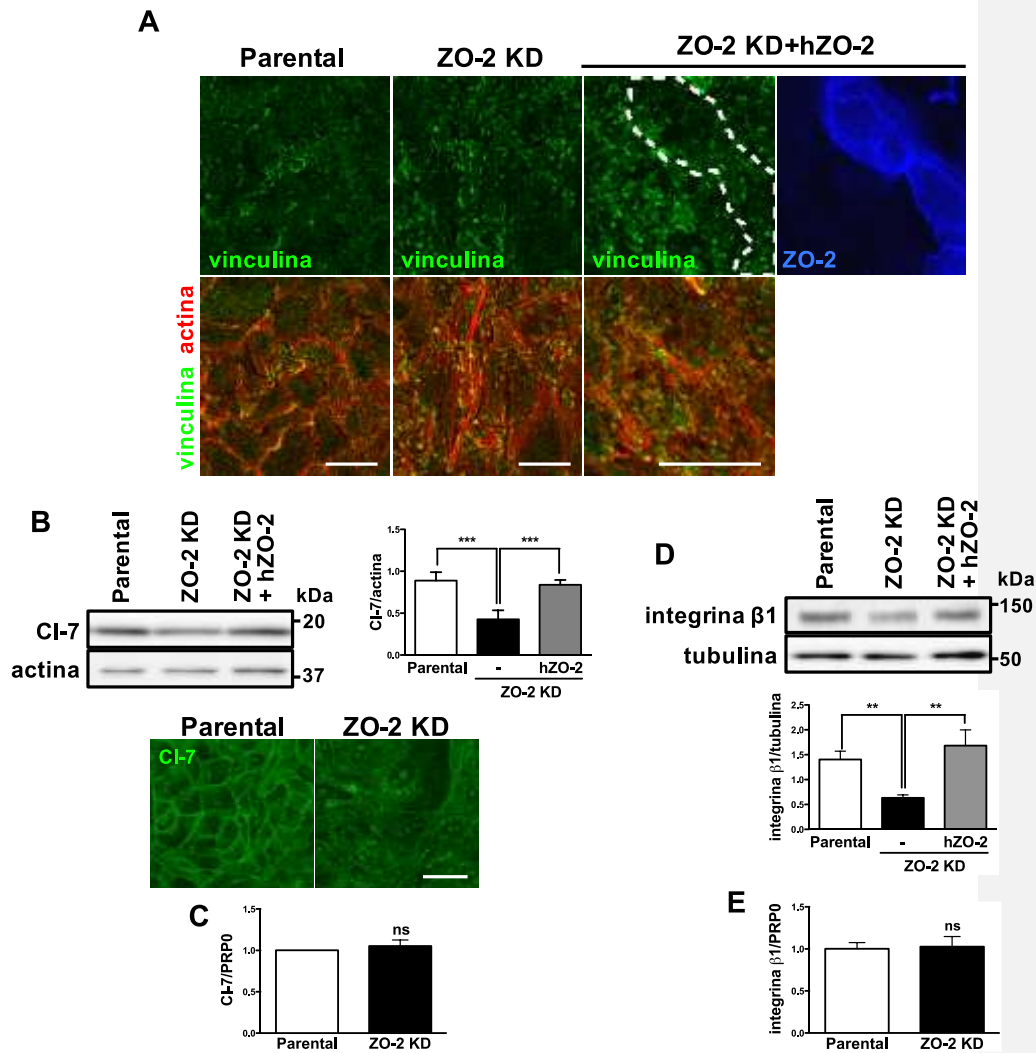


Figura 17. La pérdida de ZO-2 induce el reclutamiento de la vinculina a las adhesiones focales y disminuye la expresión de la claudina-7 y la integrina β 1. A) Las adhesiones focales de la vinculina son más abundantes en las células ZO-2 KD que en las células parentales o en las células ZO-2 KD transfectadas con hZO-2 (circunscritas por la línea punteada). Las imágenes de la sección basal se obtuvieron con un anticuerpo contra la vinculina y con faloidina rodamina. Barra = 40 μ m B) Las células ZO-2 KD tienen una menor cantidad de claudina-7 (Cl-7) que las células parentales o las células ZO-2 KD transfectadas con hZO-2. Panel superior izquierdo, Western blot representativo;

Panel superior derecho, análisis densitométrico. Análisis estadístico realizado con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, *** $p < 0.001$. Panel inferior, detección por inmunofluorescencia de la Cl-7 en células parentales y ZO-2 KD. Barra = 40 μm . C) qRT-PCR de la Cl-7 en las células parentales y ZO-2 KD. Análisis estadístico realizado con la prueba *t* de Student con la corrección de Welch. D) Las células MDCK ZO-2 KD tienen una menor cantidad de integrina $\beta 1$ que las células parentales o las células ZO-2 KD transfectadas con hZO-2. Panel superior, Western blot representativo; panel inferior, análisis densitométrico. Análisis estadístico realizado con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, ** $p < 0.01$. E) qRT-PCR de la integrina $\beta 1$ en las células parentales y ZO-2 KD. Análisis estadístico hecho con la prueba *t* de Student con la corrección de Welch.

Rac1 promueve la formación de lamelas y la migración celular aleatoria, en lugar de la migración dirigida (Pankov et al., 2005). Por lo tanto, analizamos mediante microscopía de lapsos de tiempo, el movimiento de las células aisladas y de las células dentro de islotes, en los cultivos de células MDCK parentales y ZO-2 KD. La figura 20B, muestra ejemplos de las trayectorias seguidas por las células individuales y las islas. Observamos que las células ZO-2 KD viajaron una distancia mayor que las células parentales y que en ambos tipos celulares las islas recorrieron una distancia mayor que las células aisladas (células individuales: parental, $55.7 \pm 7.4 \mu\text{m}$, $n=20$ células vs ZO-2 KD, $74.96 \pm 9.5 \mu\text{m}$, $n=19$ células; Islas: parental, $71.02 \mu\text{m} \pm 6.8 \mu\text{m}$, $n=21$ células Vs ZO-2 KD, $139.4 \pm 4.8 \mu\text{m}$, $n=19$ células). En seguida, calculamos el índice de direccionalidad también conocido como de persistencia en la dirección, como el cociente de la distancia mínima entre los puntos inicial y final de la trayectoria, sobre la distancia real recorrida (Li et al., 2011), encontrando un índice menor de direccionalidad en las células ZO-2 KD (Fig. 20C). Estos resultados indican que las células ZO-2 KD se mueven más que las células parentales, pero que la aparición de múltiples lamelas, en las células ZO-2 KD hace que su movimiento sea desordenado en lugar de dirigido, aunque cabe resaltar que en estos experimentos el movimiento no se induce hacia un estímulo quimiotáctico.

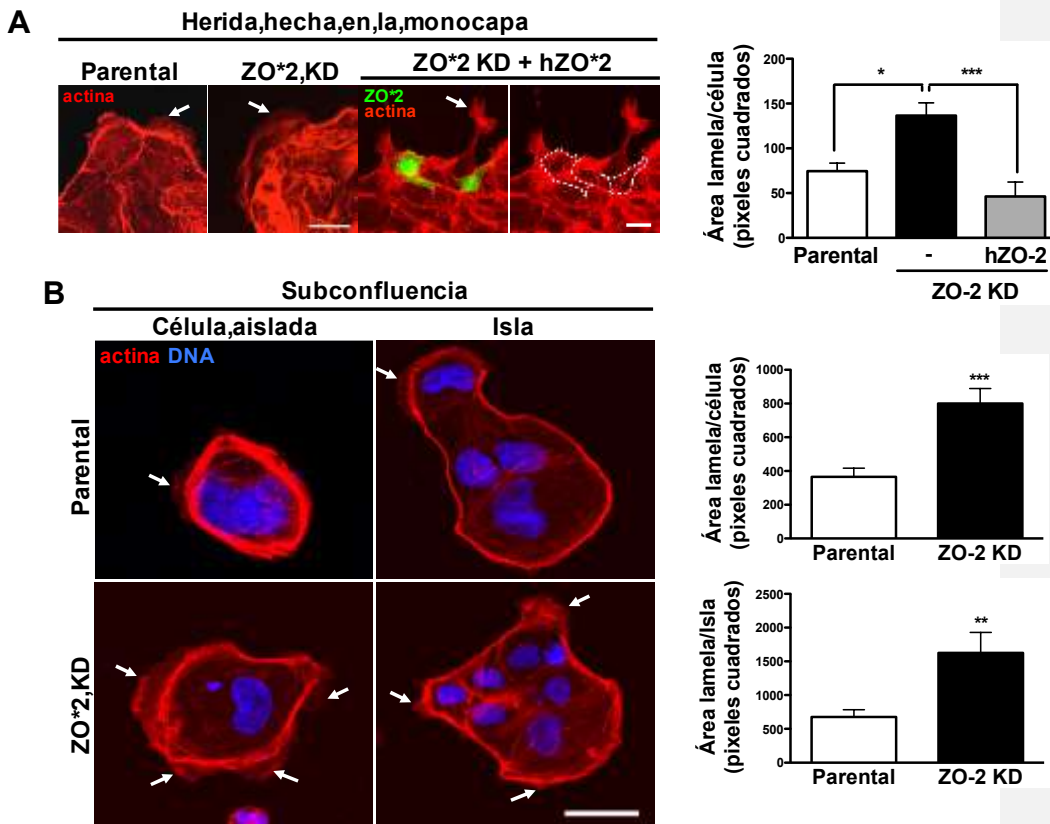


Figura 18. La falta de ZO-2 induce la formación de lamelas más grandes. A y B) Paneles de la izquierda, imágenes representativas de las lamelas (flechas) en el borde de una herida hecha en la monocapa de células parentales y ZO-2 KD transfectadas (circunscritas por la línea punteada) o no con hZO-2 (A) y en las células individuales o en los islotes de células MDCK parentales y ZO-2 KD (B). Las células se tiñeron con faloidina rodamina y DAPI para detectar respectivamente a las lamelas (flechas) en A y B y a los núcleos en B. Paneles de la derecha, análisis cuantitativo correspondiente al área de las lamelas cuantificadas con Image J. A) Análisis estadístico realizado con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, $*p < 0.05$; $***p < 0.001$. B) Análisis estadístico realizado con la prueba *t* de Student. $**p = 0.0046$; $***p < 0.001$. Barras = 40 μ m. En A el número de células que se analizaron fue el siguiente: parental, 272; ZO-2 KD, 112; ZO-2 KD + hZO-2, 15. En B, se analizaron 31 células aisladas y 19 islotes de células parentales y 26 células aisladas y 18 islotes de células ZO-KD. Las células aisladas y los islotes se obtuvieron a partir de dos experimentos independientes.

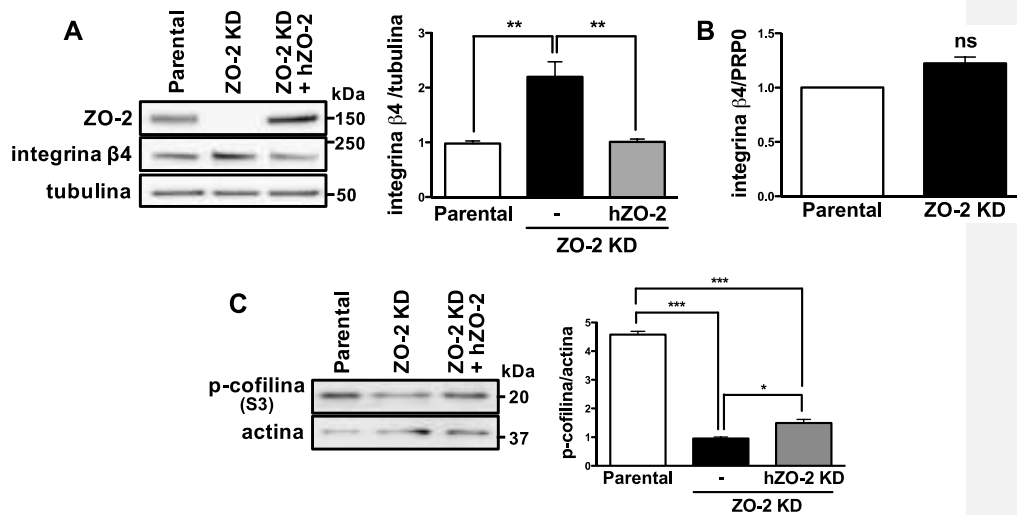


Figura 19. En las células ZO-2 KD aumenta la expresión de integrina $\beta 4$, la cofilina se desfosforila en la Ser3 y se forman múltiples lamelas por célula. A) Las células MDCK ZO-2 KD expresan una mayor cantidad de integrina $\beta 4$ en comparación con las células parentales o las células ZO-2 KD transfectadas con hZO-2. Panel izquierdo, Western blot representativo; Panel derecho, análisis densitométrico. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, $**p < 0.01$. Resultados de 3 experimentos independientes. B) qRT-PCR de la integrina $\beta 4$ en las células parentales y ZO-2 KD. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student con la corrección de Welch. C) En las células MDCK ZO-2 KD, la fosforilación de la cofilina en la Ser3 disminuyó significativamente en comparación con las células parentales. La transfección de hZO-2 en las células ZO-2 KD aumentó la fosforilación de la cofilina. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, $*p < 0.05$; $***p < 0.001$. Los resultados se obtuvieron a partir de dos experimentos independientes.

A continuación, probamos si la ausencia de ZO-2 afecta la migración celular mediante un ensayo de cierre de las heridas. Para este propósito, las monocapas confluentes de células parentales y ZO-2 KD se trataron durante 2 h con mitomicina C para prevenir la proliferación celular durante la migración. Las monocapas se rasgaron con la punta de una pipeta y 7 y 14 h después se evaluó el grado de cierre de la herida. La figura 21 revela que la cerradura de la herida es más eficiente en las células ZO-2 KD que en las células parentales.

5.4 La pérdida de ZO-2 promueve la activación de RhoA y de su efector ROCKII

Previamente se vió que RhoA constitutivamente activo, produce agregados de fibras de estrés en la membrana basal e induce en las monocapas la aparición de células que crecen unas sobre de otras (Bruewer et al., 2004). Además, en las células epiteliales de la córnea se reportó que el aumento de RhoA activo, a través de la expresión de p114RhoGEF, genera protuberancias en la membrana apical (Terry et al., 2011). Dado que estas observaciones se asemejan a los cambios que observamos en las células ZO-2 KD (Figs. 14 y 15), exploramos si la ausencia de ZO-2 modula la actividad de RhoA.

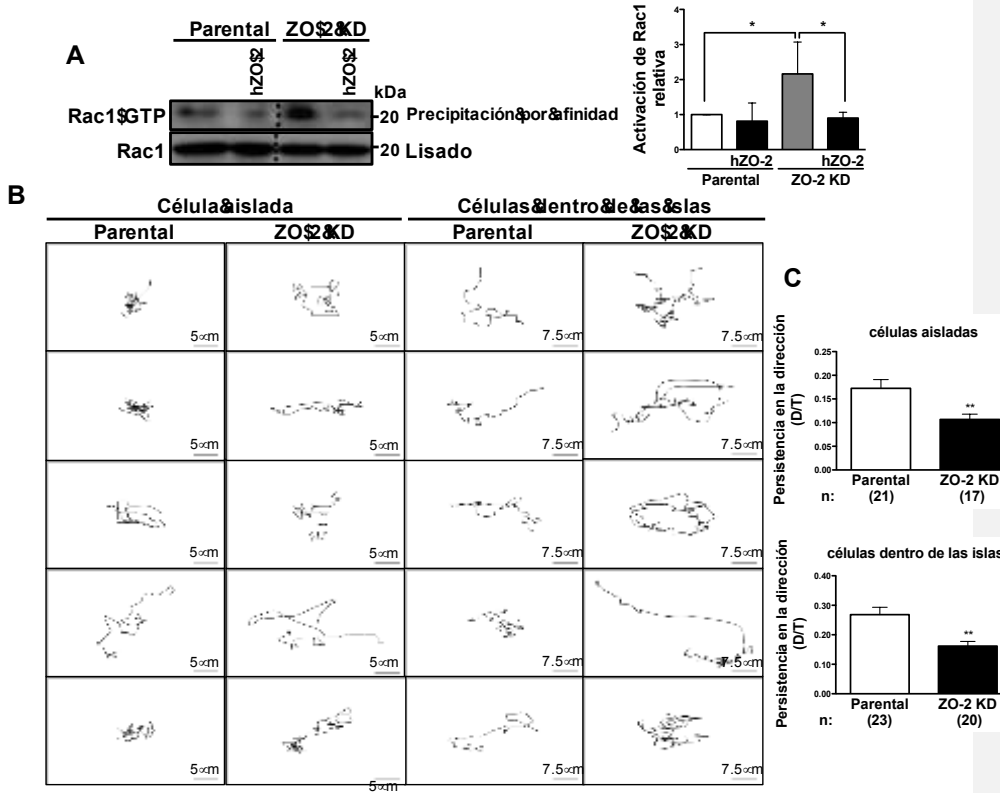


Figura 20. La ausencia de ZO-2 activa a Rac1 y disminuye la migración celular dirigida. A) En comparación con las células parentales, la cantidad de Rac1 activa aumenta en las células ZO-2 KD, y este efecto se revierte al transfectar a hZO-2. La forma activa de Rac1 (Rac1-GTP) se aisló en un

ensayo de precipitación por afinidad, con perlas recubiertas de GST-PAK-CRIB, a partir de lisados de células parentales y ZO-2 KD. Los lisados totales y los precipitados se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se analizaron por inmunodetección con anticuerpos contra Rac1. Izquierda, Western blot representativo; Derecha, activación relativa de Rac1 que se cuantificó mediante el análisis densitométrico de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, $*p < 0.05$. La línea vertical punteada indica el lugar donde se cortó la membrana. B) Las células parentales y ZO-2 KD se sembraron a baja densidad y el movimiento de las células aisladas y de los islotes se analizó mediante microscopía de video por lapsos de tiempos. Izquierda, trayectorias representativas de 5 células individuales o islotes de células. C) La persistencia en la dirección del movimiento de las células aisladas o de los islotes de células parentales y ZO-2 KD, corresponde a la distancia mínima entre los puntos inicial y final / trayectoria real. $n =$ número de células que se analizaron. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student. $**p < 0.01$.

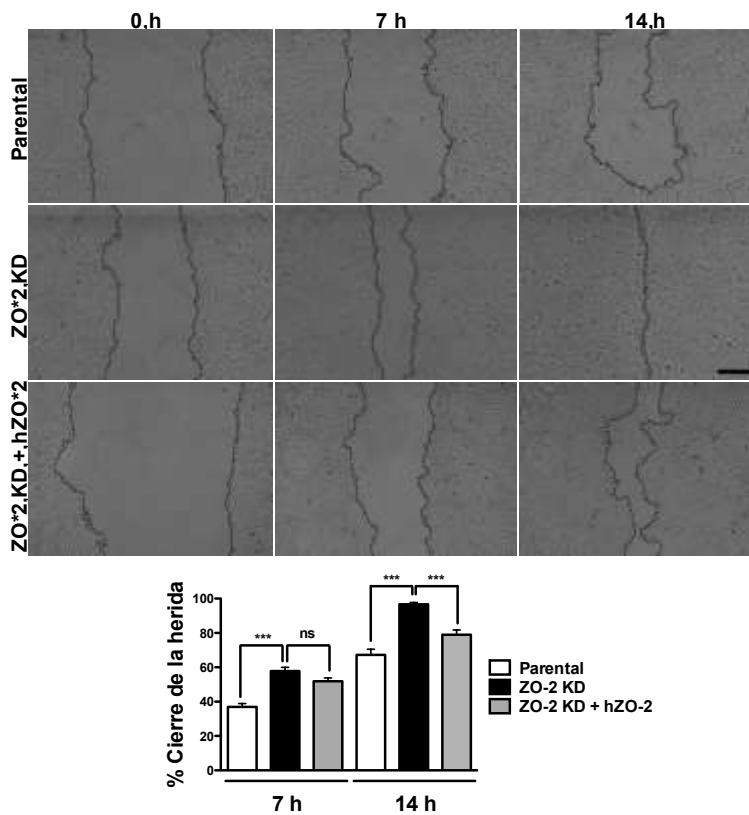


Figura 21. La falta de ZO-2 acelera el cierre de las heridas. Ensayo de cierre de una herida en las monocapas. Las monocapas confluentes de células parentales y ZO-2 KD se transfectaron o no

con hZO-2, y se trataron durante 2 h con mitomicina C. Las heridas se realizaron con la punta de una pipeta y las monocapas se colocaron bajo el microscopio y dentro de una cámara a 37°C y con una atmósfera de CO₂ al 5%. Las imágenes se tomaron 0, 7 y 14 h después de realizar la herida en las monocapas. La línea punteada delinea el borde de la herida. Panel superior, imágenes representativas de microscopía de campo claro; Panel inferior, análisis cuantitativo hecho con el programa TScratch. Barra = 150 μm. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, *** $p < 0.001$; ns, no significativo.

La figura 22A muestra, a través de un ensayo G-LISA™, que hay una mayor cantidad de RhoA activo en las células ZO-2 KD que en las células parentales. Para explorar con más detalle la activación de RhoA, se realizó un ensayo de activación de RhoA que detecta, mediante un ensayo de precipitación por afinidad, la interacción de RhoA-GTP activo con una proteína de fusión que contiene al dominio RBD de la rhotekina. La figura 22B (tres primeros carriles) revela que hay una mayor cantidad de RhoA activo/RhoA total, en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. Sorprendentemente, la transfección de hZO-2 en las células ZO-2 KD, aumenta la activación de RhoA por encima del valor presente en las células parentales y ZO-2 KD. Esto indica que la actividad de RhoA aumenta tanto cuando se depleta a ZO-2 como cuando esta proteína se vuelve a expresar en las células ZO-2 KD.

Después, exploramos la capacidad de las células para responder al ácido lisofosfatídico (LPA), un activador de RhoA. La figura 22B muestra que el tratamiento de las células parentales con LPA aumenta la actividad de RhoA, mientras que la ausencia de ZO-2 bloquea la capacidad de las células para responder al LPA. En conjunto, estos resultados indican que en las células ZO-2 KD, la actividad de RhoA es mayor que en las células parentales, pero que esta actividad no puede aumentar más, a menos que se reexpresa a ZO-2.

En seguida se analizó el impacto de la transfección de hZO-2 en la formación de las fibras de estrés en las células ZO-2 KD. Como era de esperarse, en la misma monocapa, se observaron células con niveles distintos de transfección, que se clasificaron como de alta, media o baja expresión de ZO-2 (Fig. 23, panel izquierdo). Sorprendentemente, aun en las células con el mismo nivel de expresión de ZO-2, encontramos diferencias en la abundancia de fibras de estrés. Así, en algunas

células la cantidad de fibras de estrés disminuyó, mientras que en otras aumentó o no tuvo cambio, en comparación con las células no transfectadas de alrededor (panel derecho). Sin embargo, la frecuencia con la que aparecen los diferentes patrones reveló que en el 65 y el 63% de las células que presentaban baja y alta expresión de ZO-2 respectivamente, la cantidad de las fibras de estrés disminuyó en comparación con las células ZO-2 KD no transfectadas circundantes.

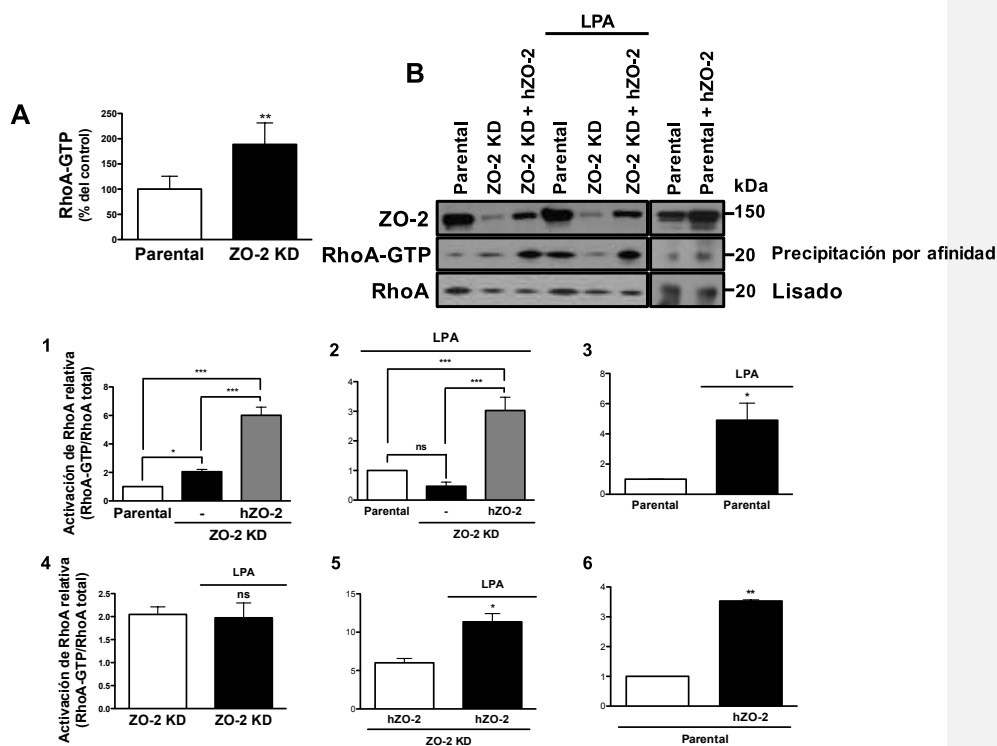


Figura 22. La ausencia de ZO-2 induce la activación de RhoA. A) La actividad de RhoA es mayor en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. La activación de RhoA se cuantificó mediante un ensayo de G-LISA™ en lisados de células parentales y ZO-2 KD. La absorbancia se midió a 490 nm. Los resultados se obtuvieron a partir de 6 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student, ***p* = 0.0014. B) Ensayo de activación de RhoA, hecho en las células parentales, ZO-2 KD y células ZO-2 KD transfectadas con hZO-2, usando un ensayo de precipitación por afinidad con una proteína de fusión que contiene el dominio RBD de la rhotekina. Obsérvese que la transfección de hZO-2 en las células ZO-2 KD

aumentó la activación de RhoA por encima del valor que se detecta en las células ZO-2 KD, mientras que la capacidad de RhoA para responder al activador LPA se perdió en ausencia de ZO-2. El Western blot se detectó con anticuerpos contra ZO-2 y RhoA. Panel superior, Western blot representativo; histogramas 1-6, análisis densitométrico de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico de los histogramas 1 y 2 se realizó con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la prueba de Newman-Keuls, $*p < 0.05$; $***p < 0.001$; en los histogramas 3 y 6 se realizó la prueba *t* de Student con la corrección de Welch, $**p < 0.009$; y en los histogramas 4 y 5 se realizó con la prueba *t* de Student, $*p < 0.05$.

En las células con una expresión intermedia de ZO-2, el 45% mostró una disminución en las fibras de estrés mientras que el 38% no mostró cambio alguno (Fig. 23, panel inferior). Estas observaciones por lo tanto sugieren que la transfección de hZO-2 en las células ZO-2 KD, altera la cantidad de fibras de estrés, siendo la reducción de fibras el comportamiento observado con mayor frecuencia.

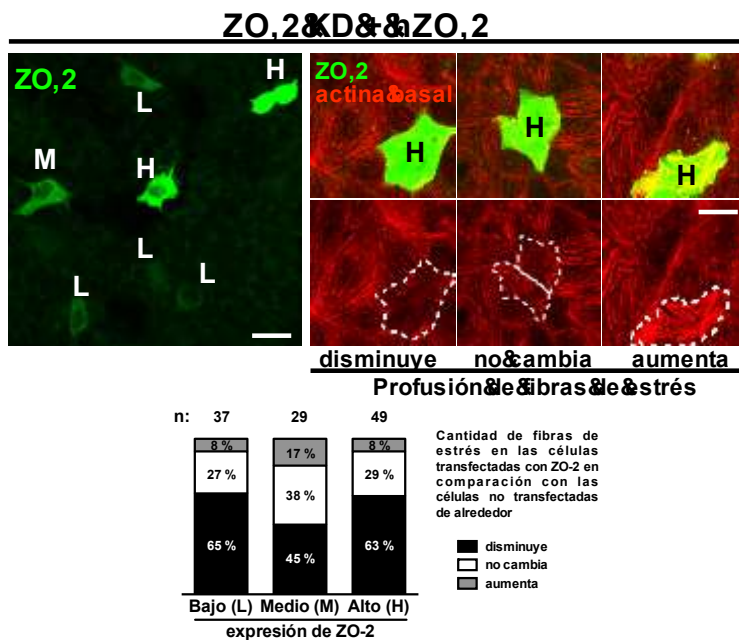


Figura 23. La transfección de hZO-2 en las células ZO-2 KD reduce las fibras de estrés. Las células se transfectaron con hZO-2 y un día más tarde la expresión de ZO-2 y F-actina se observó con anticuerpos contra ZO-2 (verde) y faloidina rodamina (rojo). Las células ZO-2 KD que se

transfectaron con hZO-2 se clasificaron como: H, expresión alta; M, expresión media y L, expresión baja. La línea discontinua delinea a las células que se transfectaron con hZO-2; n, número de células que se analizaron; barra del panel izquierdo = 50 μm ; barra del panel derecho = 25 μm .

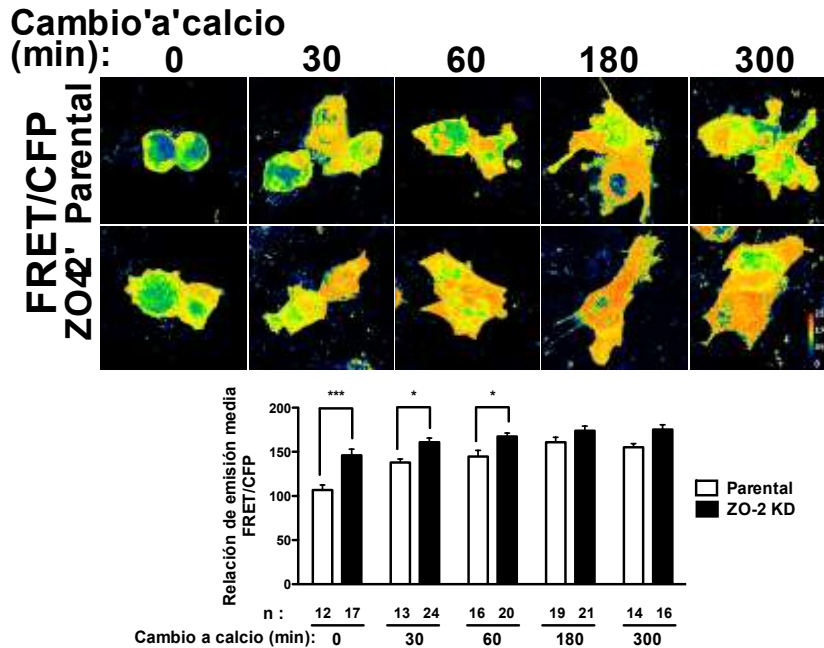


Figura 24. En el ensayo de cambio a Ca^{2+} , la activación de RhoA, es más pronunciada en ausencia de ZO-2. Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio y se transfectaron con el biosensor de RhoA y después de 24 h se incubaron en medio BC durante 20 h. Posteriormente, las monocapas se cambiaron a medio CN durante diferentes períodos de tiempo, en los cuales se cuantificó la activación de RhoA como la relación FRET / CFP_{em} . Panel superior, imágenes representativas codificadas a color de tres experimentos independientes, en las cuales los colores fríos y calientes indican respectivamente un nivel bajo y alto de actividad de RhoA. Panel inferior, cuantificación de la relación FRET / CFP_{em} media para células completas. n, número de células que se evaluaron. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

El siguiente objetivo fue explorar la activación RhoA en las células parentales y ZO-2 KD, durante la formación de novo de los contactos célula-célula. Para este propósito, se realizó un ensayo de cambio a Ca^{2+} , en el cual las células se transfirieron de un medio con bajo Ca^{2+} a otro con Ca^{2+} normal para inducir la

formación de las uniones célula-célula. Así, se evaluó la dinámica de la activación de RhoA mediante un biosensor de RhoA con FRET intramolecular (Pertz et al., 2006). La figura 24 muestra que las células ZO-2 KD incubadas en medio con bajo calcio (BC) presentan parches más grandes de señal, lo que indica que en ellas hay una mayor actividad de RhoA que en las células parentales. El cambio a Ca^{2+} promueve la activación de RhoA, e induce una mayor actividad en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales durante los primeros 60 min después del cambio a Ca^{2+} . Estos resultados indican, que antes de que se establezca la adhesión célula-célula mediada por Ca^{2+} y durante el inicio de la formación de las uniones célula-célula, la ausencia de ZO-2 favorece la activación de RhoA.

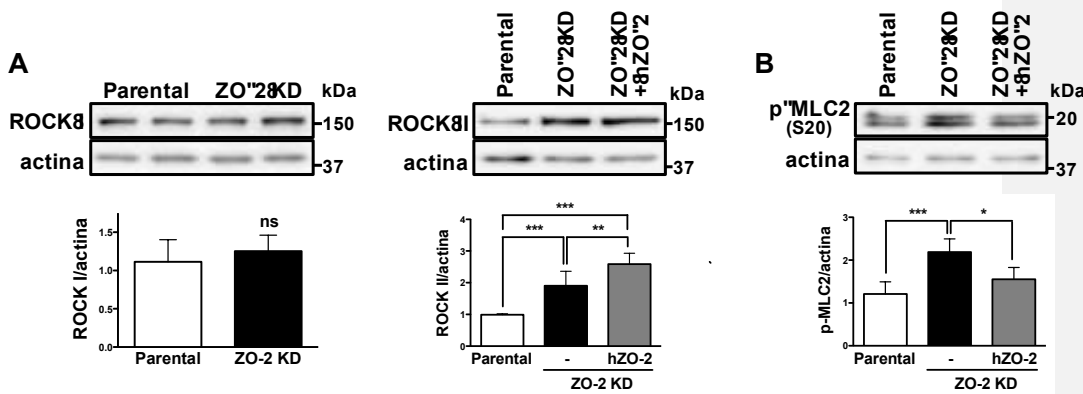


Figura 25. La pérdida de ZO-2 aumenta la expresión de ROCK II y pMLC2. A) En las células MDCK, la cantidad de ROCK II aumenta de acuerdo con la cantidad de RhoA activo presente en las células parentales y en las células ZO-2 KD que se transfectan o no con hZO-2. Los lisados de las células parentales y ZO-2 KD transfectadas o no con hZO-2, se emplearon para un Western blot donde las proteínas ROCK I y ROCK II se detectaron con anticuerpos específicos. Los paneles superiores muestran las imágenes representativas y los paneles inferiores el análisis cuantitativo correspondiente. Los resultados se obtuvieron de al menos cuatro experimentos independientes. El análisis estadístico para ROCK I se realizó con la prueba *t* de Student. ns, no significativo. El análisis estadístico de ROCK II se realizó con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, ****p*<0.001; ***p*<0.01. B) Las células ZO-2 KD tienen una mayor cantidad de MLC2 fosforilada (p-MLC2) que las células parentales. Los lisados de las células parentales y ZO-2 KD transfectadas o no con hZO-2, se emplearon para el Western blot con un anticuerpo específico

contra MLC2 fosforilada en la Ser20. El panel superior muestra una imagen representativa y el panel inferior el análisis cuantitativo correspondiente. Los resultados se obtuvieron a partir de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

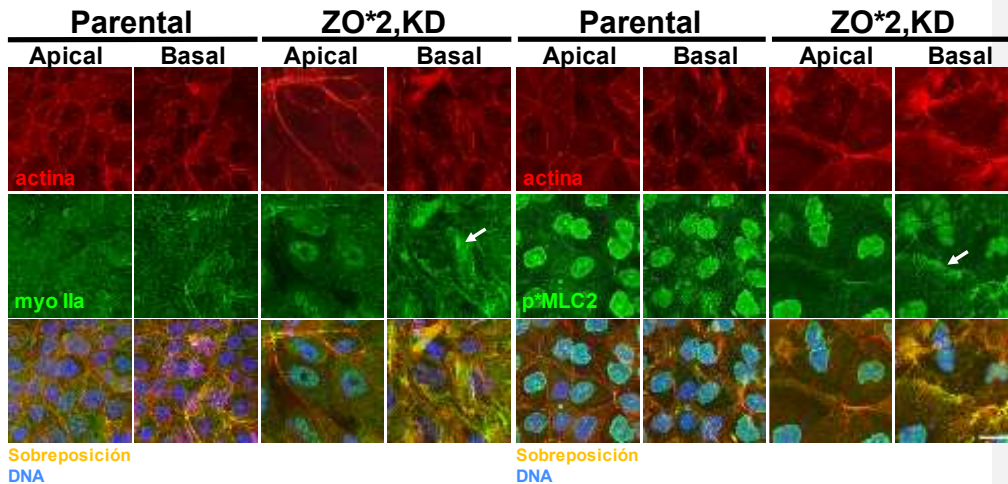
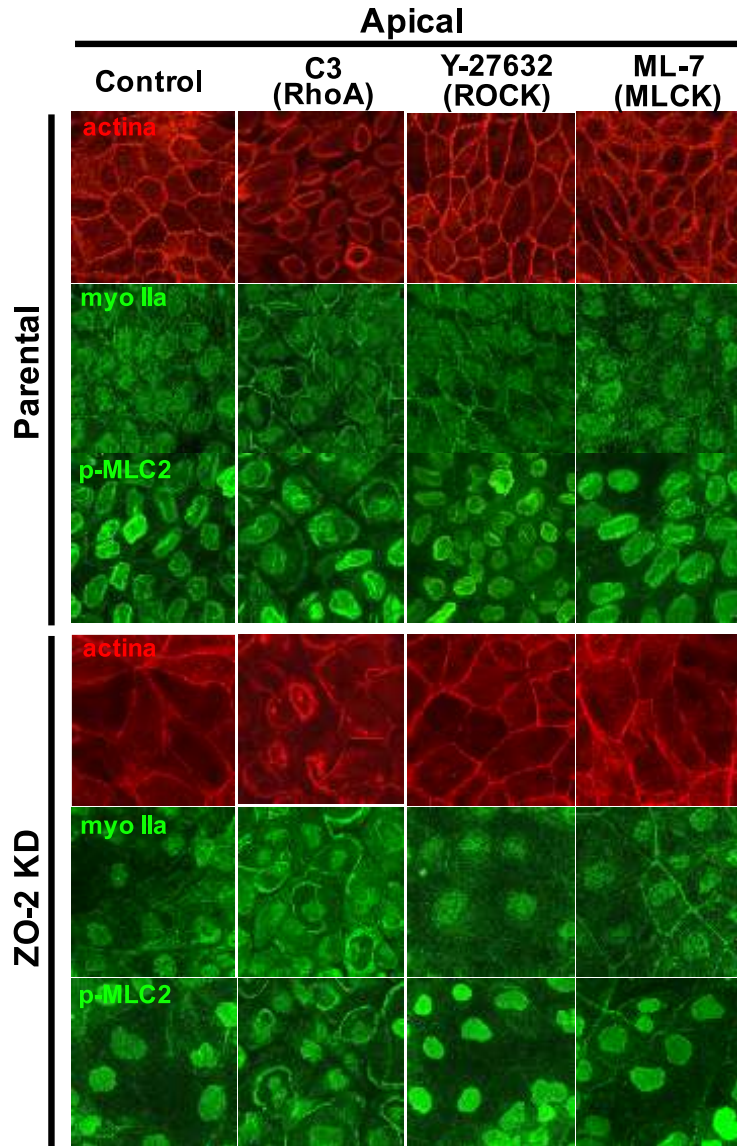


Figura 26. En las células ZO-2 KD, aumentan las fibras de estrés de miosina II y p-MLC2. La ausencia de ZO-2 provoca que la miosina IIa (myo IIa) y la MLC2 fosforilada estén presentes en grandes acúmulos de fibras de estrés en la porción basal (flechas). Las células parentales y ZO-2 KD se trataron para inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra la miosina IIa y la p-MLC2 en la Ser20. Barra = 40 μm .

Como resultado de estas observaciones, en seguida estudiamos en las células MDCK parentales y ZO-2 KD, a la cinasa ROCK II, el efector río abajo de RhoA. El Western blot de la figura 25A, muestra un aumento en la expresión de ROCK II en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales, mientras que no se observó cambio alguno para ROCK I. El aumento en la expresión de ROCK II en las células ZO-2 KD transfectadas con hZO-2 ocurre porque en estas células hay una mayor activación de RhoA en comparación con las células control. ROCK II induce la contracción de la actina-miosina mediante la fosforilación de la cadena reguladora de la miosina (MLC2), y de acuerdo con ello, en la figura 25B, el Western blot revela un incremento en la fosforilación de la MLC2

en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales y este aumento se revierte cuando



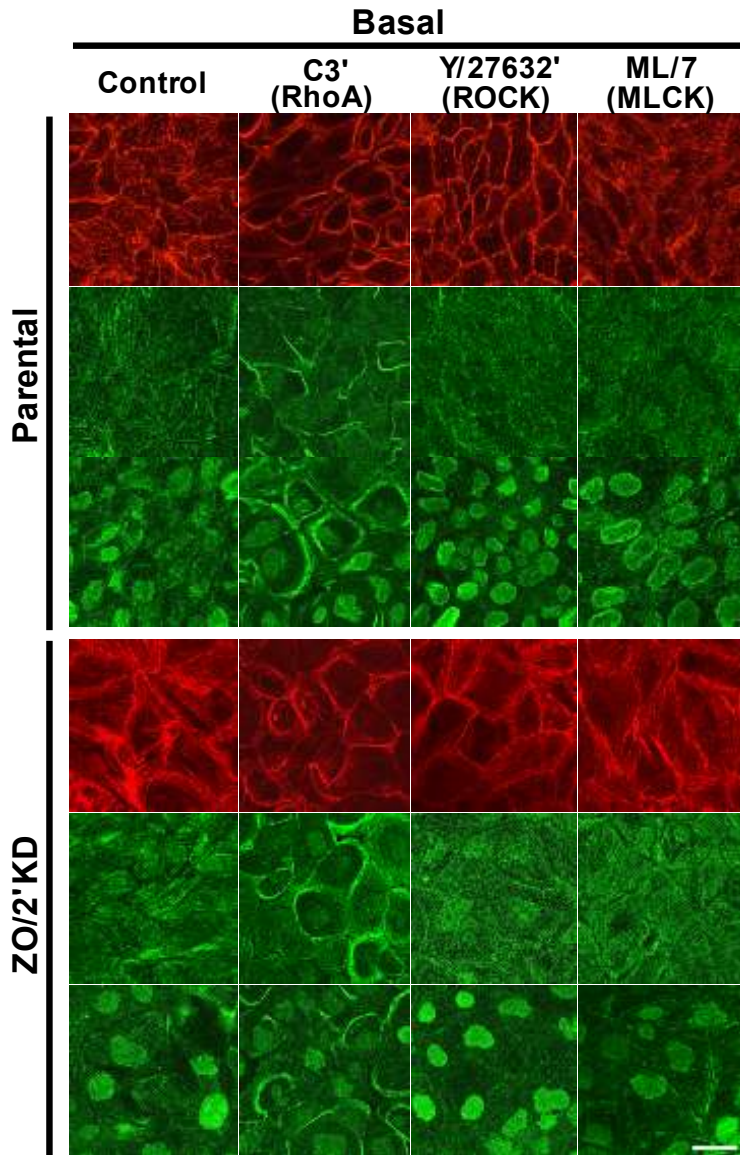


Figura 27. En las células ZO-2 KD la vía RhoA/ROCK II/p-MLC2 está más activa que en las células parentales. En las células ZO-2 KD, la inhibición de RhoA con la transferasa C3 y de ROCK con Y27632 disminuyó la profusión de fibras de estrés de actomiosina en la porción basal, mientras que la inhibición de la MLCK con ML-7 no indujo cambios significativos. Barra = 40 μ m.

se transfecta a hZO-2 en las células ZO-2 KD. Este resultado es sorprendente ya que RhoA está más activo en las células ZO-2 KD transfectadas con hZO-2. Sin embargo, la fosforilación de la MLC2 es compleja pues involucra a múltiples cinasas, que se regulan por una gran variedad de moléculas incluyendo a Rac1 que se inactiva al transfectar a hZO-2 en las células ZO-2 KD. Por inmunofluorescencia observamos que en las células ZO-2 KD, la miosina IIa y la MLC2 fosforilada se concentran en los acúmulos de fibras de estrés presentes en la porción basal (Fig. 26). La tinción nuclear obtenida con el anticuerpo anti pMLC2 corresponde a una tinción no específica reportada previamente (Nandadasa et al., 2009).

Para confirmar estos resultados, en seguida analizamos el impacto de la C3-transferasa de *Clostridium botulinum*. Esta es una ADP-ribosil transferasa que ribosila selectivamente a las proteínas RhoA, B y C inactivándolas (Aktories and Just, 1995). También estudiamos el efecto de Y27632, un potente inhibidor de ROCK I y II (Narumiya et al., 2000); y de ML-7, un inhibidor específico de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) (Saitoh et al., 1987), la enzima que fosforila a la MLC2. La figura 27 muestra que el tratamiento de las células ZO-2 KD con C3 y ML-7 aumentó la señal de la miosina IIa y pMLC2 en los bordes apicales de las células. En las células parentales, se observó una situación similar con la miosina IIa después del tratamiento con C3. Cuando las células parentales o ZO-2 KD se trataron con C3, disminuyeron notoriamente las fibras de estrés de actina, miosina IIa y pMLC2 en la parte basal de las células, mientras que el tratamiento con Y27632 ejerció un efecto similar pero menos pronunciado. La incubación con ML-7 no produjo efecto alguno sobre la actina, la miosina IIa y la pMLC2 presentes en el nivel basal de las células. Un efecto similar se observó en las células parentales. En conjunto, estos resultados sugieren que la formación de fibras de estrés requiere de la activación de RhoA y ROCK, pero no de la MLCK.

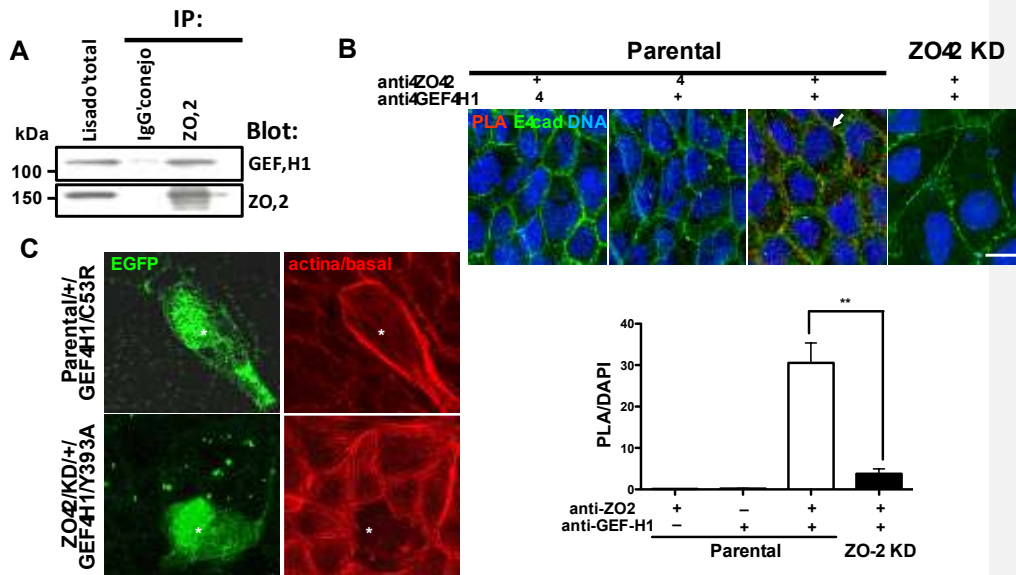


Figura 28. GEF-H1 regula la formación de fibras de estrés en las células ZO-2 KD. A) ZO-2 y GEF-H1 co-inmunoprecipitan. Se inmunoprecipitó a ZO-2 y en seguida, el inmunoprecipitado se corrió en un gel de SDS-PAGE y se inmunodetectó contra GEF-H1. B) ZO-2 y GEF-H1 interactúan. Ensayo de ligación por proximidad (PLA) hecho con un anticuerpo de conejo contra ZO-2 y un anticuerpo de ratón contra GEF-H1. Los bordes celulares y los núcleos se tiñeron respectivamente con anti-E-cadherina y DAPI. Barra = 20 μ m. Panel superior, imágenes representativas de una sección óptica capturada a nivel del complejo de unión apical (CUA); panel inferior, análisis cuantitativo realizado con el programa BlobFinder. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, $**p < 0.01$. C) La transfección de una forma constitutivamente activa de GEF-H1 (GEF-H1 C53R) en las células parentales indujo la formación de abundantes fibras de estrés, mientras que la transfección de una forma dominante negativa de GEF-H1 (GEF-H1 Y393A) en las células ZO-2 KD disminuyó las fibras de estrés. Las células se co-transfectaron con EGFP y GEF-H1 C53R o GEF-H1 Y393A para identificar con la expresión de EGFP en verde, a las células que se transfectaron. *, célula transfectada.

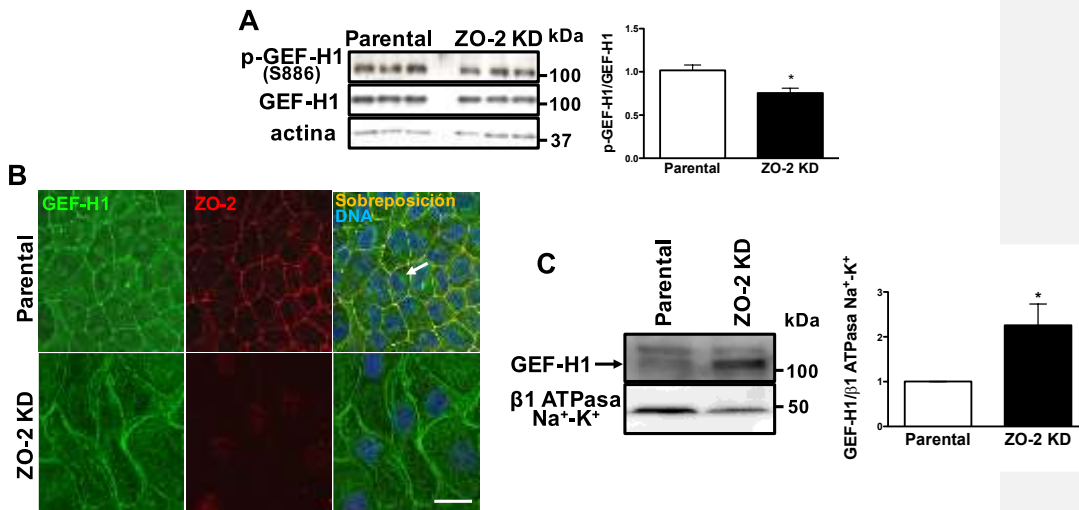


Figura 29. La fosforilación de GEF-H1 en la Ser886 es mayor en las células parentales que en las células ZO-2 KD. A) El Western blot se hizo a partir de los lisados de las células parentales y ZO-2 KD, utilizando un anticuerpo específico contra GEF-H1 fosforilado en la Ser886. La actina se usó como control de carga. Panel izquierdo, imagen representativa; panel derecho, análisis cuantitativo. Los resultados se obtuvieron a partir de 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student. $p = 0.02$. B) La tinción de GEF-H1 en los bordes celulares fue mayor en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. En las células parentales, GEF-H1 se localizó en los bordes celulares y el Golgi (flecha). En las células ZO-2 KD, la tinción de GEF-H1 desapareció del Golgi y se concentró en el borde celular. La inmunofluorescencia se realizó con anticuerpos específicos contra GEF-H1 y ZO-2. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra = 40 μm . C) GEF-H1 aumentó en la fracción de la membrana plasmática en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. El fraccionamiento de la membrana plasmática se analizó mediante Western blot empleando anticuerpos contra GEF-H1 y la subunidad $\beta 1$ de la Na⁺, K⁺-ATPasa. Esta subunidad es un marcador específico de la membrana plasmática. Izquierda, Western blot representativo; derecha, análisis densitométrico. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student acompañada por la corrección de Welch, $*p < 0.05$

5.5 El factor intercambiador de guanina GEF-H1 promueve la formación de fibras de estrés y se recluta al borde celular por la cingulina

Las proteínas GEFs promueven la activación de las pequeñas proteínas G. En el complejo de unión apical (CUA) la activación de RhoA se regula por dos GEFs: p114RhoGEF que promueve la formación y la maduración de la UE (Terry et al., 2011), y GEF-H1 que induce su desensamble. La formación de la UE se mantiene mediante el secuestro de GEF-H1 por la cingulina o la paracingulina, reduciendo así la activación de RhoA en la UE (Aijaz et al., 2005; Guillemot et al., 2008). Dado que la ausencia de ZO-2 promueve la activación de RhoA en las células MDCK, nos preguntamos si esto ocurre a través de GEF-H1. Por ello primero se exploró si ZO-2 se asocia con GEF-H1 en las células parentales MDCK. La figura 28A muestra que en el co-inmoprecipitado de ZO-2 está presente GEF-H1. Para corroborar esta observación, se realizó un ensayo de ligación por proximidad (PLA) utilizando un anticuerpo de conejo contra ZO-2 y un anticuerpo de ratón anti GEF-H1. La figura 28B, confirma con la aparición de puntos rojos fluorescentes, la interacción de ZO-2 con GEF-H1 en los bordes celulares y el citoplasma en las células parentales. Como control se observó la ausencia de estos puntos en las células ZO-2 KD.

Para explorar si la formación de las fibras de estrés depende de la activación de GEF-H1, las células MDCK parentales se co-transfectaron con EGFP y una forma constitutivamente activa de GEF-H1 (GEF-H1-C53R). Se observó que las células transfectadas presentan abundantes fibras de estrés a nivel basal (Fig. 28C, fila superior). Así mismo, las células ZO-2 KD se co-transfectaron con EGFP y una forma dominante negativa de GEF-H1 (GEF-H1-Y393A). Entonces se observó una disminución de la cantidad de fibras de estrés (Fig. 28C, fila inferior). Estos resultados sugieren que la falta de ZO-2 induce la formación de fibras de estrés a través de GEF-H1.

Previamente se demostró que la cinasa PAK4 fosforila a GEF-H1 en la serina 886 localizada dentro del sitio consenso RRXSLXG. Esta fosforilación bloquea la capacidad de GEF-H1 para inhibir la formación de las fibras de estrés (Callow et al., 2005). Ya que observamos una mayor cantidad de fibras de estrés en las células ZO-2 KD, en seguida exploramos la fosforilación de GEF-H1 (pGEF-H1) en estas

células. La figura 29A muestra un mayor contenido de pGEF-H1 en las células parentales en comparación con las células ZO-2 KD, indicando así que en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales, hay una mayor cantidad de GEF-H1 con la capacidad de promover la formación de las fibras de estrés. En cambio, la cantidad total de GEF-H1 no se afecta por la falta de ZO-2.

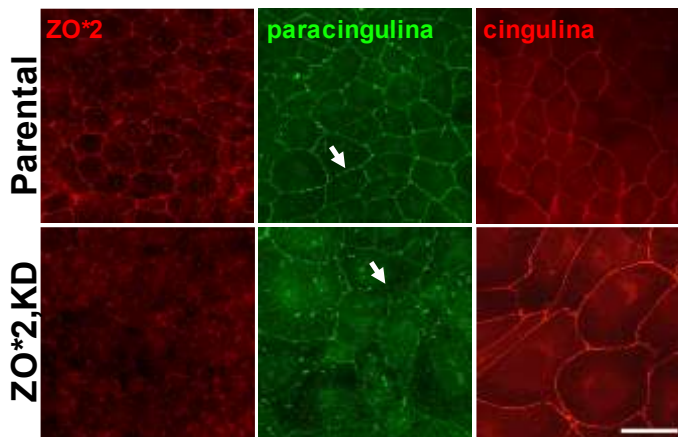


Figura 30. La ausencia de ZO-2 disminuye la expresión de la paracingulina en el borde celular. Inmunofluorescencia de las células parentales y ZO-2 KD, hecha con anticuerpos específicos contra ZO-2, paracingulina y cingulina. Barra = 40 μ m; flecha, paracingulina en borde celular.

A continuación estudiamos la distribución de GEF-H1 en las células parentales y ZO-2 KD. Se observó por IF que en las células MDCK parentales, GEF-H1 se localiza en los bordes celulares y el Golgi, como se había reportado previamente (Benais-Pont et al., 2003; Callow et al., 2005). En cambio, en las células ZO-2 KD, GEF-H1 se concentró en los bordes celulares y desapareció del Golgi (Fig. 29B). Para confirmar este resultado se realizó un ensayo de fraccionamiento celular y por Western blot se observó una mayor acumulación de GEF-H1 en la membrana plasmática de las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales (Fig. 29C).

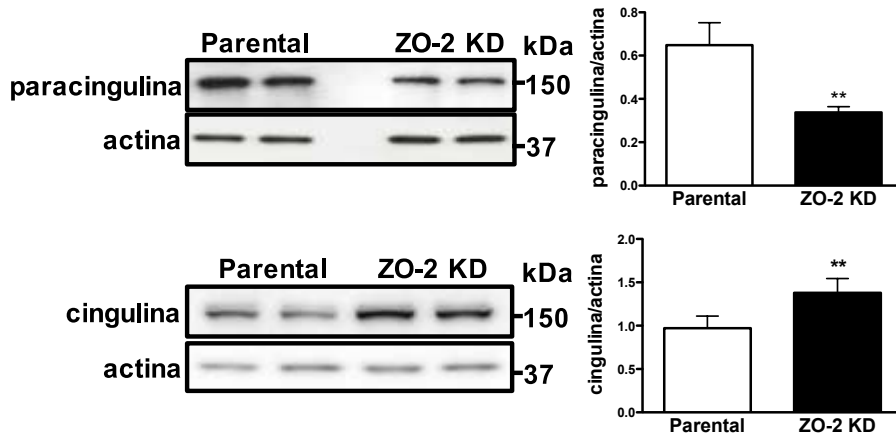


Figura 31. La cingulina es más abundante en las células ZO-2 KD que en las parentales. Western blots y análisis densitométrico correspondiente. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student, paracingulina $**p = 0.0072$; cingulina $**p = 0.0091$; Los resultados se obtuvieron a partir de al menos 3 experimentos independientes.

Para explicar el aumento de GEF-H1 en los bordes celulares, se analizó el nivel de expresión de la paracingulina y la cingulina en las células MDCK ZO-2 KD. La figura 30 muestra que no hay cambio en la expresión de la cingulina en los bordes celulares, mientras que la paracingulina disminuyó en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. Por Western blot confirmamos la disminución de paracingulina en las células ZO-2 KD, que se acompañó de un aumento de la cingulina (Fig. 31). En seguida se probó si la ausencia de ZO-2 favorece la asociación de la cingulina con GEF-H1. La figura 32 muestra en un ensayo de PLA, una gran cantidad de puntos rojos, lo que sugiere un aumento en la interacción cingulina-GEF-H1 en las células ZO-2 KD, en comparación con las células parentales. Notoriamente, muchos de estos puntos se encuentran a lo largo de los bordes celulares (flecha).

En conjunto, estos resultados mostraron que la ausencia de ZO-2 favorece el reclutamiento de GEF-H1 a los bordes celulares a través de la cingulina. Pensamos que por la baja expresión de la paracingulina no se pudo inhibir la actividad de GEF-H1, y en consecuencia, aumentó la señalización de RhoA.

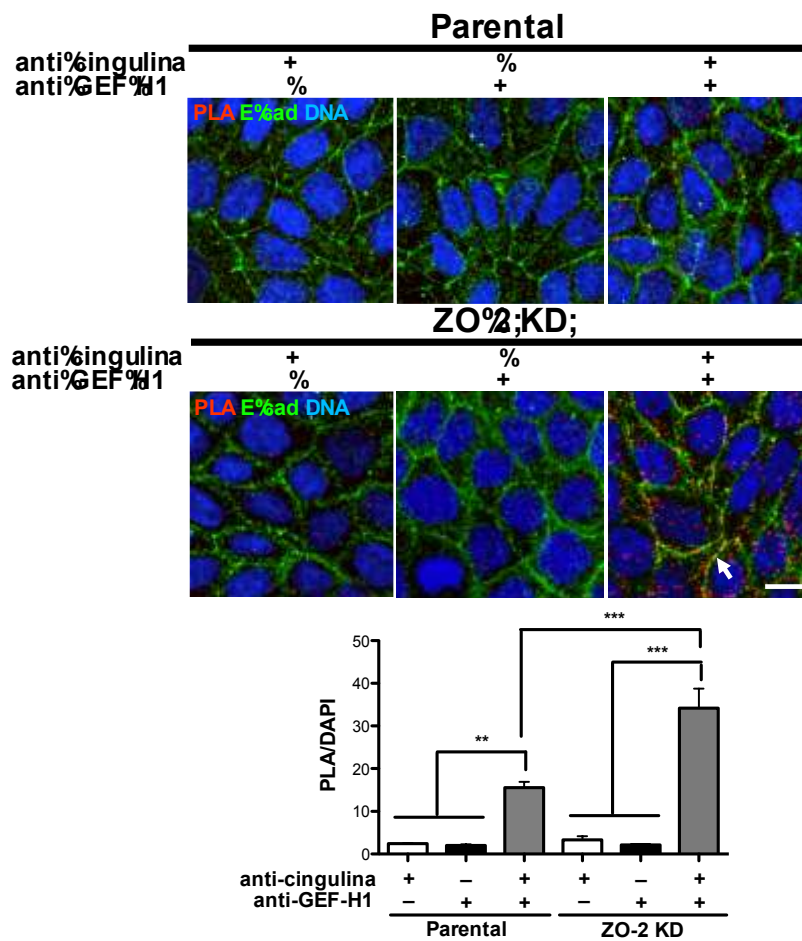


Figura 32. La ausencia de ZO-2 promueve el reclutamiento de GEF-H1 a la membrana por la cingulina. Ensayo de PLA hecho en las células parentales y ZO-2 KD con un anticuerpo policlonal de conejo contra cingulina y un anticuerpo monoclonal de ratón contra GEF-H1. Paneles superiores, imágenes representativas; flecha, puntos de PLA positivos en los bordes celulares; panel inferior, análisis cuantitativo hecho con BlobFinder. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. Barra = 20 μm .

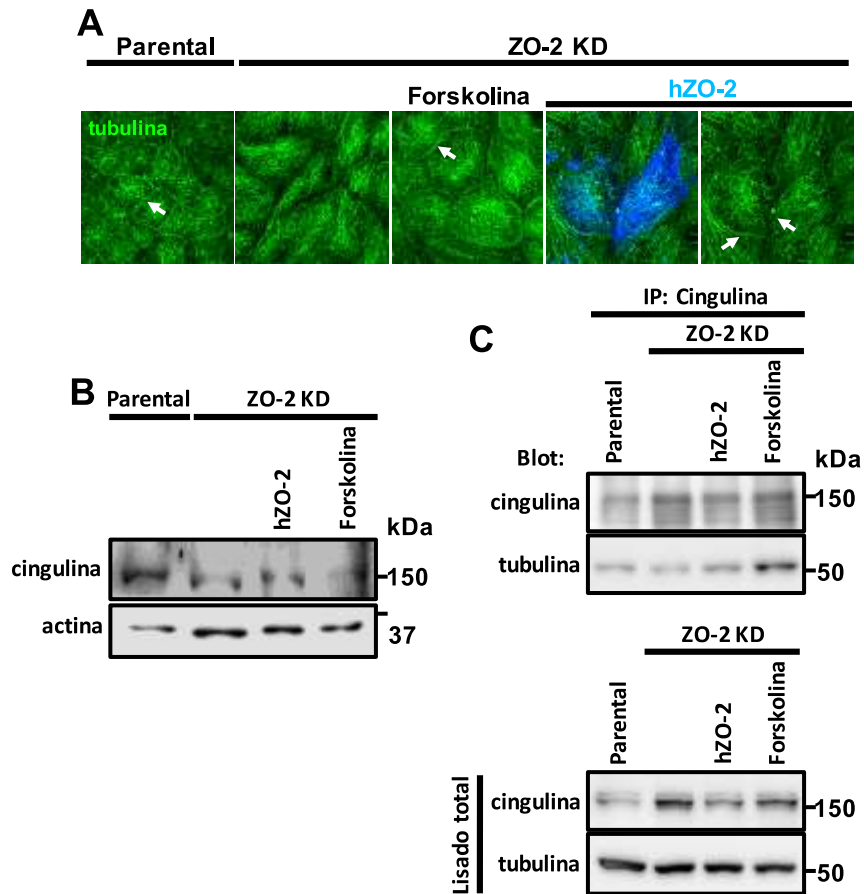


Figura 33. En las células MDCK ZO-2 KD la cingulina se fosforila menos y no se asocia a los microtúbulos en los bordes celulares. A) La ausencia de ZO-2 comprometió la aparición de los microtúbulos en los bordes celulares, mientras que el tratamiento con 50 μ M de forskolina durante 24 h o la transfección de hZO-2 restauró la aparición de los microtúbulos. La inmunofluorescencia se realizó con un anticuerpo contra β -tubulina. Las células ZO-2 KD transfectadas con hZO-2 se identificaron con un anticuerpo contra ZO-2 (azul). Las flechas indican la tinción de la β -tubulina en los bordes celulares. Barra = 40 μ m. B) La fosforilación de la cingulina disminuyó en las células ZO-2 KD, esto se evidenció por una movilidad electroforética más rápida de la cingulina que se restauró después del tratamiento con 50 μ M de forskolina durante 24 h, o de la transfección de hZO-2. El ensayo de movilidad electroforética para la cingulina se realizó corriendo los extractos de las células parentales y ZO-2 KD en un SDS-PAGE Phos-tag. C) La interacción de la cingulina con la β -tubulina

disminuyó en las células ZO-2 KD y se restauró después del tratamiento con 50 μ M de forskolina durante 24 h, o la transfección con hZO-2. La cingulina se inmunoprecipitó con un anticuerpo específico, a partir de extractos de células parentales y ZO-2 KD. El inmunoprecipitado se corrió en un SDS-PAGE y se inmunodetectó con anticuerpos contra cingulina y β -tubulina.

5.6 La ausencia de ZO-2 disminuye la fosforilación de la cingulina y la asociación de los microtúbulos a la UE

Recientemente se demostró que la fosforilación de la cingulina por la proteína cinasa AMPK promueve la asociación de los microtúbulos con la UE (Yano et al., 2013). Como la falta de ZO-2 aumenta la expresión de la cingulina y altera la organización del citoesqueleto de actina, se analizó si las células ZO-2 KD presentan algún cambio en la organización de los microtúbulos al nivel de la UE. La figura 33A muestra que las células ZO-2 KD perdieron a los microtúbulos que en las células parentales se alinean lateralmente a la UE, formando una red no centrosomal que se organiza como una estructura apical plana. Sin embargo, el tratamiento de las células ZO-2 KD con forskolina, un inductor de la activación de la AMPK por un mecanismo hasta ahora no bien definido (Egawa et al., 2008), así como la reintroducción de ZO-2, indujo la reaparición de los microtúbulos en los bordes celulares.

Para analizar el efecto de estos tratamientos sobre la fosforilación de la cingulina, se realizó un ensayo de movilidad electroforética en las células parentales y ZO-2 KD, empleando geles de acrilamida con el complejo de manganeso dinuclear Phos-tag, que se une a las proteínas fosforiladas y retrasa su migración. En la figura 33B se observa una mayor migración de la cingulina en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. Este aumento se revirtió mediante la transfección de hZO-2 o el tratamiento con forskolina en las células ZO-2 KD. En seguida, analizamos si ZO-2 regula la interacción de la cingulina con la β -tubulina. La figura 33C muestra que la cantidad de la β -tubulina que co-inmunoprecipitó con la cingulina disminuyó en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales y que este efecto se revirtió con la transfección de hZO-2 o el tratamiento con forskolina.

En conjunto, estos resultados sugieren que la proteína ZO-2 favoreció la fosforilación de la cingulina por la AMPK, lo que permitió la interacción de la cingulina con los microtúbulos en la región apical.

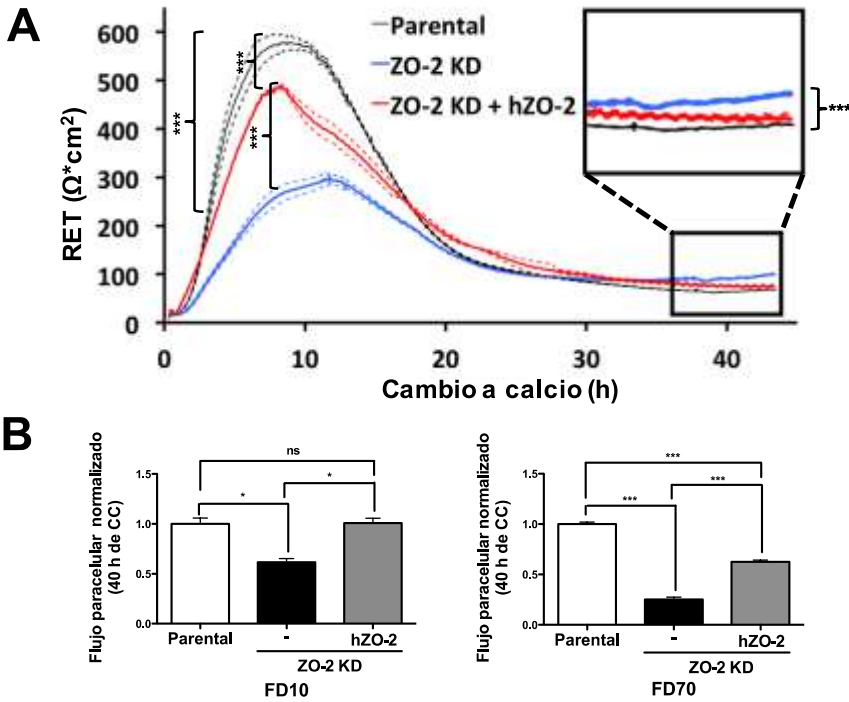


Figura 34. En las células ZO-2 KD, el pico inicial de RET disminuye pero en cambio la RET aumenta en el estado estacionario y se acompaña de una reducción en la permeabilidad. A) Durante el ensayo de cambio a calcio, las células ZO-2 KD muestran un pico inicial de RET menor que en las células parentales, que se puede restaurar mediante la transfección de hZO-2. En el estado estacionario (recuadro), las células ZO-2 KD tienen una RET más alta que las células parentales. La RET se midió de manera continua durante el cambio a calcio (CC), utilizando el sistema CellZscope. La gráfica representa la media \pm DE de los datos de seis monocapas sembradas en Transwells. El análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, $***p < 0.001$. B) Las células ZO-2 KD presentaron una menor permeabilidad paracelular al dextrán-FITC que las células parentales en el estado estacionario (40 h después del cambio a calcio). El dextrán-FITC de 10 (FD10) y 70 kDa (FD70) se colocó en el compartimento apical y se midió en el basolateral. La transfección de hZO-2 en las monocapas ZO-2 KD restauró el flujo paracelular de FD10 y FD70 al observado en las células

parentales. Los resultados se obtuvieron a partir de tres monocapas independientes. El análisis estadístico se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

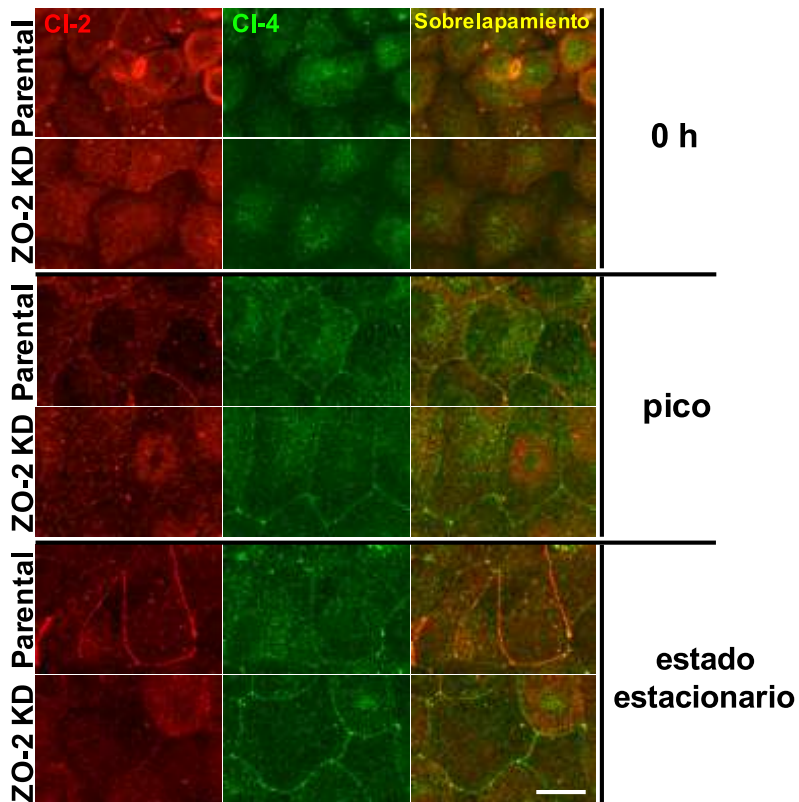


Figura 35. En las células ZO-2 KD disminuye la expresión de la claudina-2 y aumenta la claudina-4 en el borde celular durante el estado estacionario. Detección por inmunofluorescencia de las claudinas-2 y -4 en las células MDCK parentales y ZO-2 KD durante el desarrollo de la RET, antes del cambio a calcio (0 h), en el pico inicial de la RET y durante el estado estacionario. Barra = 20 μm .

5.7 ZO-2 regula la función de barrera de la UE y la expresión de la claudina-2

Para estudiar el efecto de ZO-2 en la función de barrera de la UE empleamos el ensayo de cambio a Ca^{2+} . La figura 34A muestra que las células ZO-2 KD

presentan, un pico inicial de resistencia eléctrica transepitelial (RET) menor que el de las células parentales. Este efecto se revirtió mediante la transfección de hZO-2 (Fig. 34A).

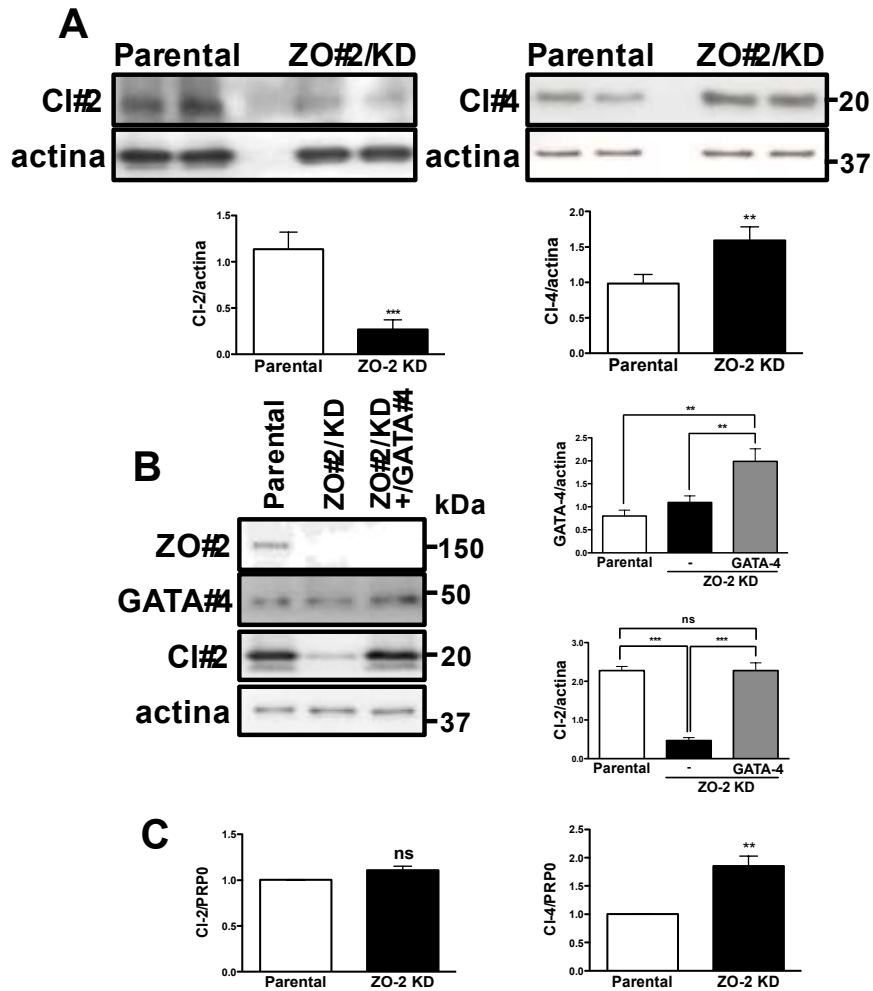


Figura 36. La disminución de la CI-2 que se observa en las células ZO-2 KD se regula de manera post transcripcional mientras que el aumento de la CI-4 ocurre a nivel transcripcional.

A) En las células MDCK ZO-2 KD, el Western blot mostró una menor expresión de claudina-2 y una mayor cantidad de claudina-4, en comparación con las células parentales. Paneles superiores,

imágenes representativas; paneles inferiores, el análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student a partir de 4 experimentos independientes. ****p* = 0.0002; ***p* = 0.002. B) El Western blot mostró una expresión similar de GATA-4 en las células ZO-2 KD, en comparación con las células parentales. Los resultados se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes. Izquierda, imagen representativa; Derecha, análisis densitométrico. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía acompañada de la comparación múltiple de Bonferroni, ***p*<0.01, ****p*<0.001. C) En la qRT-PCR no se detectaron diferencias en la expresión del mRNA de la claudina-2 entre las células parentales y ZO-2 KD, pero se encontró un aumento en el mRNA de la claudina-4 en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. La fosfoproteína ribosomal ácida P0 (PRP0) se amplificó como control de carga.

Cuando la RET se estabilizó en ambas líneas celulares (40 h después del cambio a Ca²⁺), el valor de RET en las células ZO-2 KD fue 43% más alto que en las células parentales (Fig. 34A, recuadro). Así mismo, la permeabilidad paracelular de las monocapas al dextrán fluorescente de 10 y 70 kDa, fue menor en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales (Fig. 34B). Estos efectos se deben a la ausencia de ZO-2 ya que la transfección de hZO-2 en las células ZO-2 KD, disminuyó la RET y aumentó la permeabilidad al dextrán durante el estado estacionario.

El conjunto de claudinas presente en un tejido define su selectividad iónica y el grado de sellado de la vía paracelular (Gunzel and Yu, 2013). La claudina-2 forma poros catiónicos paracelulares (Amasheh et al., 2002; Yu et al., 2009), que aumentan la permeabilidad de la UE (Van Itallie et al., 2003) y disminuyen la RET (Furuse et al., 2001). En cambio, la claudina-4 ejerce el efecto opuesto y funciona como una barrera catiónica (Van Itallie et al., 2001). Por esta razón, analizamos la expresión de las claudinas -2 y -4 en las células parentales y ZO-2 KD.

Por inmunofluorescencia la claudina-2 no se detectó en los contactos celulares de las células ZO-2 KD después del cambio a Ca²⁺ (Fig. 35), mientras que en las células parentales se localizó de manera apenas perceptible en los bordes celulares durante el pico inicial de la RET y de forma conspicua durante el estado estacionario. Por el contrario, la claudina-4 estuvo presente en ambas células pero en el estado estacionario, fue más abundante en los bordes de las células MDCK ZO-2 KD, que en las células parentales.

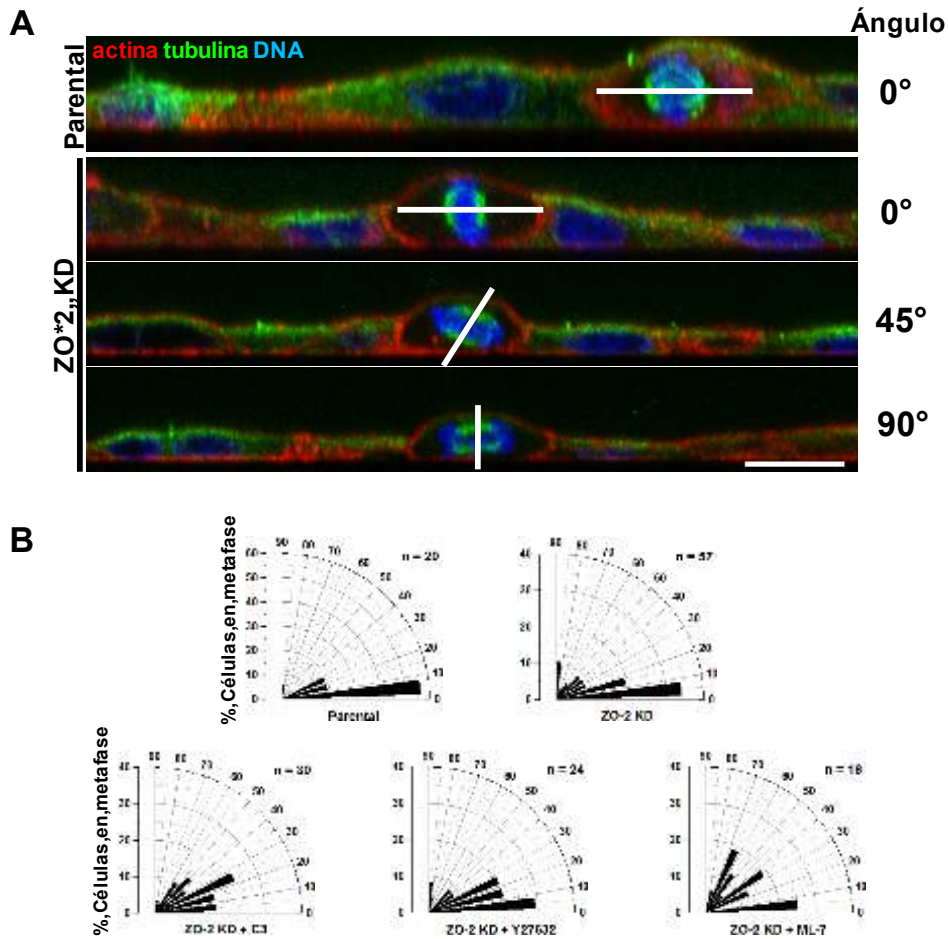


Figura 37. La ausencia de ZO-2 promueve la desorientación del huso mitótico. A) Imágenes en y representativas de la orientación del huso mitótico en las células MDCK parentales y ZO-2 KD. Las células se sembraron a subconfluencia y 24 h después las monocapas se fijaron y se procesaron para inmunofluorescencia con un anticuerpo específico contra la β -tubulina (verde) para la detección del huso mitótico. La actina se observó con faloidina rodamina (rojo) y los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra = 20 μ m. B) Histogramas radiales que muestran el porcentaje de células en metafase con diferentes ángulos de orientación del huso mitótico. El porcentaje de las células con el huso mitótico orientado paralelamente a la superficie del sustrato (ángulo 0-10°), disminuyó de 56% en los cultivos parentales a 34% en las células ZO-2 KD. El tratamiento de las células ZO-2 KD con C3, Y27632 o ML-7 disminuyó este porcentaje hasta el 17%, 29% y 25%, respectivamente.

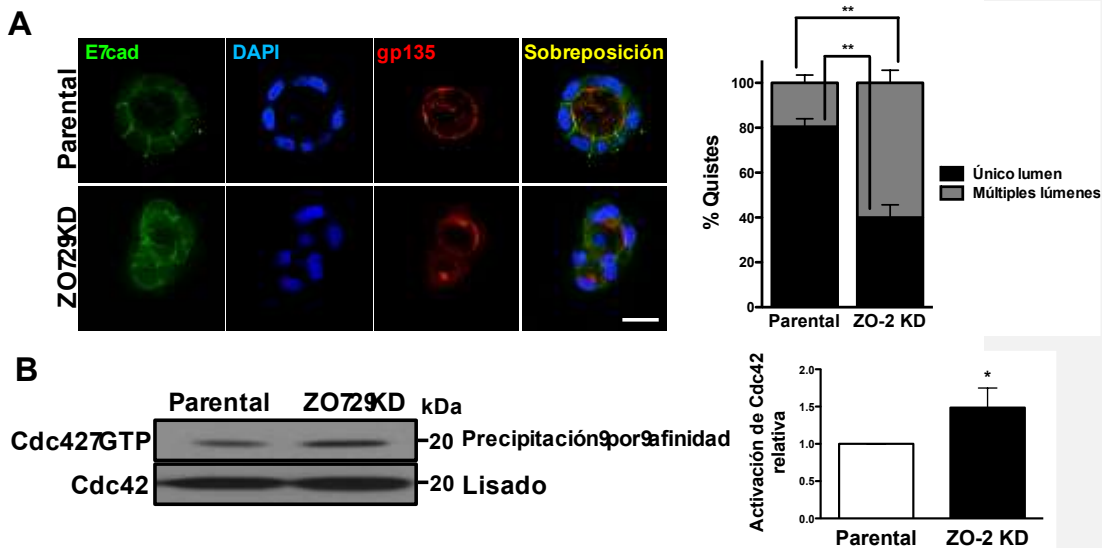


Figura 38. La ausencia de ZO-2 activa a Cdc42 e induce la formación de quistes con múltiples lúmenes en los cultivos en 3D. A) ZO-2 se necesita para la adecuada formación de los quistes. Las células parentales y ZO-2 KD se incubaron con Matrigel y 10 días más tarde se observó el desarrollo de los quistes. Los quistes se fijaron y procesaron para las inmunofluorescencias con anticuerpos contra E-cadherina (verde) y gp135 / podocalixina (rojo). Los núcleos se tiñeron con Topro-3 (azul). Las imágenes (panel izquierdo) y el análisis cuantitativo (panel derecho) muestran que la ausencia de ZO-2 indujo la formación aberrante de quistes con múltiples lúmenes. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student $**p < 0.01$. Barra = 20 μm . B) La actividad de Cdc42 fue mayor en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. La forma activa de Cdc42 (Cdc42-GTP) se aisló a partir de los lisados de las células parentales y ZO-2 KD, con perlas de GST-PAK-CRIB en un ensayo de precipitación por afinidad. La expresión de Cdc42 se analizó por Western blot a partir de lisados celulares totales y precipitados, los cuales se resolvieron en geles SDS-PAGE. Izquierda, Western blot representativo; derecha, cuantificación de la activación de Cdc42 hecha mediante el análisis densitométrico de 4 experimentos independientes. $*p < 0.04$.

El Western blot confirmó una mayor cantidad de claudina-2 en las células parentales en comparación con las células ZO-2 KD en el estado estacionario (Fig. 36A, izquierda). Debido a que el factor de transcripción GATA-4 regula la expresión de la claudina-2 (Guillemot et al., 2013), analizamos el nivel de expresión de este factor en las células parentales y ZO-2 KD. El Western blot en la figura 36B mostró

el mismo nivel de expresión de GATA-4 en las células ZO-2 KD y parentales. Sin embargo, tras la transfección de GATA-4 en las células ZO-2 KD, se produjo un aumento significativo en la expresión de la claudina-2. En seguida, se analizó el nivel de mRNA de la claudina-2 por qRT-PCR sin encontrar diferencias entre las células parentales y ZO-2 KD (Fig. 36C, a la izquierda). Estos resultados por lo tanto indican que la disminución de la claudina-2 en las células ZO-2 KD se regula post transcripcionalmente.

El Western blot de la claudina-4 mostró una mayor expresión de esta proteína en las células ZO-2 KD (Fig. 36A, a la derecha). De acuerdo con este resultado, la qRT-PCR revela un aumento similar del mRNA de la claudina-4 en las células ZO-2 KD (Fig. 36C, derecha), lo que indica que la falta de ZO-2 aumenta la expresión de la claudina-4 a nivel transcripcional.

Nuestros resultados por lo tanto sugieren que el aumento de la RET en el estado estacionario, en ausencia de ZO-2, se debe a una alteración en la expresión de las claudinas.

5.8 La falta de ZO-2 activa a Cdc42, desorienta al huso mitótico e induce la formación de quistes con múltiples lúmenes

La activación de RhoA induce el crecimiento de unas células encima de otras por la desorientación del huso mitótico (Vasiliev et al., 2004). Esta observación nos hizo revisar si la falta de ZO-2 provoca una alteración en el ángulo de orientación del huso mitótico. Las figuras 37A y B muestran que en las células parentales, el 56% de las divisiones ocurrieron en paralelo a la superficie del sustrato (ángulo 0-10°) mientras que en las células ZO-2 KD, solo el 34% de los husos mitóticos fueron paralelos a la superficie del sustrato. Posteriormente, exploramos si la desorientación del huso mitótico, podría revertirse bloqueando a la vía de señalización RhoA / ROCK / pMLC2. Los histogramas radiales de la figura 37B muestran que los tratamientos con C3, Y27632 o ML-7 disminuyeron el porcentaje de células ZO-2 KD en metafase con un ángulo de 0-10°, hasta 17%, 29% y 25%, respectivamente. Estos resultados indican que la falta de ZO-2 desencadena la desorientación del huso mitótico, a través de un mecanismo sensible a una cantidad

precisa de RhoA activo en la célula, ya que tanto la sobre-activación de RhoA presente en las células ZO-2 KD, así como la inhibición de RhoA, ROCK y p-MLC2, producen el mismo efecto.

A continuación probamos si la falta de ZO-2 afecta el desarrollo de los cultivos en tres dimensiones (3D), que se parecen más a la condición fisiológica de las células tubulares renales. Para este propósito cultivamos células ZO-2 KD y MDCK parentales en la matriz extracelular Matrigel. La figura 38A muestra que en las células KD ZO-2 el 60% de los quistes tienen múltiples lúmenes, mientras que el 81% de los quistes de las células parentales muestran un solo lumen hueco rodeado por una capa de células polarizadas. Estos resultados indican que la falta de ZO-2 altera la citoarquitectura epitelial.

Previamente se reportó que Cdc42 dominante negativo o constitutivamente activo inhibe la polarización del centrosoma (Etienne-Manneville and Hall, 2001), y que la falta de Cdc42 induce la desorientación del huso mitótico durante la división celular, lo que conduce a la formación de quistes con múltiples lúmenes (Jaffe et al., 2008). Estas observaciones nos llevaron a explorar la actividad de Cdc42 en las células ZO-2 KD mediante un ensayo de precipitación por afinidad. La figura 38B revela que hay una mayor cantidad de Cdc42 activo en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la desorientación del huso mitótico que desencadena la formación de quistes con múltiples lúmenes es una respuesta a la mayor actividad de RhoA y Cdc42 provocada por la falta de ZO-2.

VI) Discusión

En este trabajo demostramos que ZO-2 es una proteína clave en la regulación de las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42, que regulan el desarrollo de la arquitectura celular y el sellado de la UE (Fig. 39).

Demostramos que las células ZO-2 KD presentan una gran abundancia de fibras de estrés. Este resultado concuerda con un hallazgo similar que se hizo en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas, donde se silenció la expresión de ZO-1 (Tornavaca et al., 2015). En cambio, nuestros datos contrastan

con lo observado en las células que no expresan ni a ZO-1 ni a ZO-2, que no muestran cambios en la abundancia de fibras de estrés y en su lugar presentan un borde celular más lineal (Fanning et al., 2012). También observamos que las células MDCK ZO-2 KD, presentan un abultamiento en el dominio apical. Pensamos que este cambio se debe a la contracción del anillo cortical de F-actina, como ocurre en las células epiteliales corneales humanas que sobre-expresan a p114RhoGEF (Terry et al., 2011). Sin embargo, este punto requiere estudios adicionales.

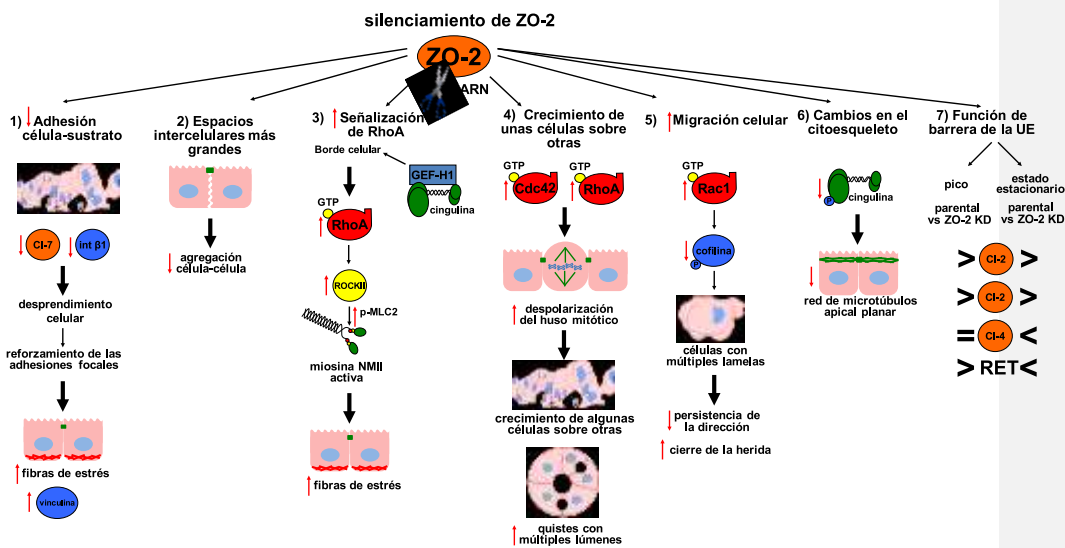


Figura 39. ZO-2 altera la arquitectura celular y el sellado de la UE. Ilustración esquemática de los cambios que produce la ausencia de ZO-2 en las células epiteliales.

Para explorar si las células ZO-2 KD tienen una menor adhesión célula-célula que podría explicar el aumento del espacio intercelular observado, evaluamos su susceptibilidad a la tripsina, y encontramos que es mayor en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. Estos resultados son similares a los que se obtuvieron con las células EpH4 ZO-1 KO / ZO-2 KD (Yamazaki et al., 2008).

También observamos en las células ZO-2 KD, algunas zonas de las monocapas que no se adhieren al sustrato y una mayor susceptibilidad a desprenderse del sustrato con el tratamiento de tripsina. Esto puede explicarse por

la reducción de la claudina-7 y la integrina $\beta 1$, que favorecen la adhesión de la célula al sustrato (Ding et al., 2012; Lu et al., 2015). La sobre-expresión de la vinculina a nivel basal en las células ZO-2 KD era de esperarse, porque el incremento en la fosforilación de la MLC2 presente en las células ZO-2 KD indica la contracción del citoesqueleto de actina-miosina, que a su vez recluta a la vinculina a las adhesiones focales (Dumbauld et al., 2010).

En las células ZO-2 KD, la cofilina se desfosforiló, aparecieron múltiples lamelas y disminuyó la migración dirigida. La fosforilación de la cofilina se regula en parte por la activación de RhoA, ya que las cinasas LIM (LIMK) que fosforilan a la cofilina en la serina 3 (Maekawa et al., 1999), se activan por la fosforilación de ROCK (Ohashi et al., 2000). Sin embargo, la disminución de la fosforilación de la cofilina que se observa en las células ZO-2 KD, se explica más bien por un aumento en la actividad de Rac1 que promueve la activación de las fosfatasa de cofilina (Pandey et al., 2009) y la formación de las lamelas (Ridley et al., 1992). Así mismo, recientemente se observó que las células ZO-2 KD presentan una mayor actividad transcripcional de YAP (Dominguez-Calderon et al., 2016), que promueve la transcripción de *Pik3cb*, un gen que codifica a la subunidad catalítica p110 de la cinasa PI3K (Lin et al., 2015). Por lo tanto, la actividad transcripcional de YAP aumenta la cantidad de PIP3 en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. Esto es importante porque Slingshot-1L, una fosfatasa específica de la cofilina, se activa por la cinasa PI3K (Nishita et al., 2004). En consecuencia, la disminución de la fosforilación de la cofilina en las células ZO-2 KD puede deberse al aumento en la actividad de Rac1 y Slingshot-1L.

Con respecto al ensayo del cierre de las heridas, los resultados fueron congruentes porque las islas de las células MDCK ZO-2 KD recorren distancias más largas que las células parentales. Estos resultados coinciden con una observación que muestra que la inhibición de ZO-2, en las células de cáncer de pulmón humano, aumenta la migración celular (Luczka et al., 2013). Por otra parte, la reducción de la migración con dirección en las células que carecen de ZO-2, es coherente con la observación de la inducción de la migración celular aleatoria por la activación de Rac1 (Pankov et al., 2005). En conjunto, nuestras observaciones sugieren que la

falta de ZO-2 promueve la activación de Rac1 y cofilina lo que conduce a una reorganización del citoesqueleto de actina que se manifiesta por la aparición de múltiples lamelas y de la migración celular aleatoria.

La observación aparentemente contradictoria de que las células ZO-2 KD presentan una menor persistencia direccional mientras que al mismo tiempo muestran un cierre más rápido de las heridas, se puede explicar considerando que en un ensayo de cierre de herida las células del frente de migración están rodeadas por otras células y por lo tanto sólo pueden migrar en la dirección de la herida. Por lo tanto, en esta condición, el mayor movimiento de las células ZO-2 KD, favorece el cierre de la lesión.

Previamente se había observado que la activación de las proteínas Rho con el factor necrotizante citotóxico 1 (CNF-1) de *Escherichia coli* (Hopkins et al., 2003), y la expresión de una forma constitutivamente activa de RhoA, aumentan la abundancia de fibras de estrés en la membrana basal (Bruewer et al., 2004; Jou and Nelson, 1998). Por ello, nosotros ahora exploramos si la ausencia de ZO-2 regulaba la activación de RhoA. Esta pregunta cobró aún mayor relevancia a partir de la reciente observación que muestra que PDZ-GEF1, que se une a ZO-2, recluta y activa a la pequeña GTPasa Rap2c, que inhibe la contracción del citoesqueleto apical por medio de RhoA (Monteiro et al., 2013).

Mediante ensayos de ELISA y precipitación por afinidad demostramos que RhoA estaba más activa en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. También encontramos, empleando el biosensor de RhoA, que la ausencia de ZO-2 activó a RhoA en la condición de BC y durante la formación temprana de los contactos célula-célula inducida por calcio.

Posteriormente, se analizó la expresión de ROCK I y ROCK II y se encontró que sólo la expresión de la última aumenta en las células ZO-2 KD en comparación con las células control. De acuerdo con lo anterior, previamente se encontró que la activación de ROCK II y no ROCK I, regula el desensamble del complejo de unión apical en las células epiteliales (Samarin et al., 2007) y que ROCK II se localiza en las fibras de estrés (Kato et al., 2001).

Para confirmar que la formación abundante de fibras de estrés en las células MDCK ZO-2 KD se debió a la activación de la vía de señalización RhoA / ROCK, tratamos a las monocapas con los inhibidores de RhoA y ROCK y observamos que desapareció la formación de fibras de estrés. En cambio, el tratamiento con ML-7, un inhibidor de MLCK (Saitoh et al., 1987), que a su vez fosforila a la MLC2, no tuvo efecto en la formación de las fibras de estrés, lo que indica que la falta de ZO-2 induce la formación de fibras de estrés a través de la activación de RhoA y ROCK, pero no de la MLCK.

En las células ZO-2 KD, la disminución de la expresión de la paracingulina, que inhibe la actividad de GEF-H1 (Guillemot et al., 2008), podría resultar en la activación de RhoA y la consecuente formación de las fibras de estrés. Esto último se confirmó al observar que en las células MDCK ZO-2 KD, la transfección de una forma inactiva de GEF-H1, elimina la profusión de las fibras de estrés y que en ausencia de ZO-2 disminuye la fosforilación de GEF-H1 en la Ser886, que bloquea la formación de las fibras de estrés (Callow et al., 2005). Además, se observó que la falta de ZO-2 reduce la fosforilación de la cingulina por AMPK, que es crítica para la interacción de la cingulina con los microtúbulos en la unión apical (Yano et al., 2013).

Como previamente se demostró, las células MDCK presentan inicialmente un rápido aumento de la RET que se acompaña de una disminución de la RET hasta alcanzar un nivel estable (Cereijido et al., 1983; Gonzalez-Mariscal et al., 1985). Sin embargo, observamos que la falta de ZO-2 reduce la RET inicial máxima. Esta disminución se observó previamente cuando ZO-2 se silenció parcialmente con un siRNA (Hernandez et al., 2007) y también en las células ZO-1 KD, ocludina KD, α -catenina KD (Odenwald et al., 2017) y paracingulina KD (Guillemot et al., 2008). Por otro lado, demostramos que cuando la RET alcanza un estado estacionario, el valor de RET es 43% más alto en las células ZO-2 KD y disminuye la permeabilidad paracelular al dextrán. Estos efectos se deben a la ausencia de ZO-2 porque se revirtieron parcialmente con la transfección de ZO-2. Resultados similares se obtuvieron cuando se silenció la expresión de ZO-1 en las células MDCK (Van Itallie et al., 2009). El aumento de la RET en las células ZO-2 KD se puede deber al

aumento de tamaño que se observa en estas células en comparación con las células parentales (Dominguez-Calderon et al., 2016), ya que la cantidad de corriente que atraviesa la vía paracelular depende tanto de la resistencia de esta ruta como de la cantidad lineal de UE disponible por superficie epitelial, y esta a su vez depende del tamaño de las células en el epitelio [véase la revisión (Gonzalez-Mariscal et al., 2001)]. Asimismo, el aumento de la RET en las células ZO-2 KD responde a la ausencia de claudina-2, una proteína que forma poros catiónicos paracelulares (Amasheh et al., 2002; Yu et al., 2009), y a la abundante expresión de claudina-4 que funciona como una barrera catiónica (Van Itallie et al., 2001). Observaciones similares se encontraron al silenciar a IQGAP1 en las células MDCK (Tanos et al., 2015).

Se sabe que el silenciamiento de cingulina (Guillemot and Citi, 2006) o paracingulina (Guillemot et al., 2008) aumenta la actividad de RhoA y el mRNA de claudina-2, mientras que el doble silenciamiento de cingulina y paracingulina disminuye la expresión de claudina-2 (Guillemot et al., 2004; Guillemot et al., 2013). Así mismo se ha visto que la expresión del mRNA de la claudina-2 depende de la presencia del factor de transcripción GATA-4 (Guillemot et al., 2013). Nosotros en las células ZO-2 KD observamos que la disminución de la expresión de la claudina-2 no se acompaña por un cambio en el nivel del mRNA de claudina-2 o del factor de transcripción GATA-4. Por lo tanto, estos resultados indican que la falta de ZO-2 inhibe la expresión de la claudina-2 de manera postranscripcional.

Durante la división celular, si el huso mitótico tiene un ángulo cercano a 0° con referencia a la base de la monocapa, las células hijas aparecerán una a lado de la otra. En cambio, si el huso mitótico se despolariza y tiene un ángulo cercano a 90°, una de las células hijas quedará por encima de la otra. Como las monocapas de células ZO-2 KD tienen regiones donde unas células crecen unas sobre de otras, exploramos si esto se debe a la despolarización del huso mitótico. Encontramos que el 66% de los husos mitóticos estaban desorientados en las células ZO-2 KD y que los inhibidores de RhoA, ROCK y MLC2 no pudieron revertir este efecto y en cambio, aumentaron el porcentaje de desorientación. Dado que estos efectos también se observaron en las células que se transfectaron con una forma constitutivamente

activa de RhoA (Vasiliev et al., 2004), concluimos que la despolarización del huso mitótico en las células ZO-2 KD, se debió a un aumento en la actividad de RhoA provocado por la falta de ZO-2. Además, encontramos una sobre-activación de Cdc42 en las células ZO-2 KD y previamente se demostró que Cdc42 constitutivamente activo inhibe la polarización del centrosoma (Etienne-Manneville and Hall, 2001). Por otro lado, previamente demostramos que las células ZO-2 KD presentan una mayor fosforilación de GSK-3 β en la Ser-9 (Dominguez-Calderon et al., 2016), y dicha fosforilación puede inducirse por PKC ζ bajo la activación de Cdc42 (Etienne-Manneville and Hall, 2003). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la desorientación del huso mitótico que induce la formación de múltiples lúmenes por quiste en las células ZO-2 KD sucede por la sobre-activación de RhoA y Cdc42. Nosotros también hemos observado la formación de quistes con múltiples lúmenes cuando las células MDCK se transfectan con ZO-2 mutada en un sitio Yin-yang que regula la entrada de ZO-2 en el núcleo y la fosforilación de la proteína en las UEs maduras (Quiros et al., 2013). Otros investigadores, en cambio, han encontrado que en las células MDCK el silenciamiento de ZO-1, pero no de ZO-2, induce la aparición de quistes con múltiples lúmenes (Odenwald et al., 2017).

ZO-2 es una proteína constituida por varios dominios y que participa en una amplia variedad de funciones, incluyendo la formación de la UE, la inhibición de la proliferación celular, la inhibición de la transcripción y la regulación del tamaño celular, [para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2016)]. Con esta tesis nosotros ahora proponemos que ZO-2 además actúa como un regulador maestro de las proteínas Rho y de la citoarquitectura epitelial.

Finalmente cabe mencionar que nuestro trabajo adquirió una mayor relevancia a partir de una reciente observación que mostró como la proliferación de las fibras de estrés constituye un paso crucial y necesario para la transformación de las células de un carcinoma *in situ* a uno de tipo invasivo (Tavares et al., 2017). Por ello y con base en nuestras observaciones, en el futuro será importante estudiar si ZO-2 se comporta como una proteína inhibidora de las metástasis.

VII) Bibliografía

Abercrombie, M., Heaysman, J.E., and Pegrum, S.M. (1971). The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res* 67, 359-367.

Adachi, M., Inoko, A., Hata, M., Furuse, K., Umeda, K., Itoh, M., and Tsukita, S. (2006). Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein. *Mol Cell Biol* 26, 9003-9015.

Aijaz, S., D'Atri, F., Citi, S., Balda, M.S., and Matter, K. (2005). Binding of GEF-H1 to the tight junction-associated adaptor cingulin results in inhibition of Rho signaling and G1/S phase transition. *Dev Cell* 8, 777-786.

Aktories, K., and Just, I. (1995). In vitro ADP-ribosylation of Rho by bacterial ADP-ribosyltransferases. *Methods Enzymol* 256, 184-195.

Allalou, A., and Wahlby, C. (2009). BlobFinder, a tool for fluorescence microscopy image cytometry. *Comput Methods Programs Biomed* 94, 58-65.

Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A.H., Schoneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2002). Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115, 4969-4976.

Avila-Flores, A., Rendon-Huerta, E., Moreno, J., Islas, S., Betanzos, A., Robles-Flores, M., and Gonzalez-Mariscal, L. (2001). Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C. *The Biochemical journal* 360, 295-304.

Baas, A.F., Kuipers, J., van der Wel, N.N., Batlle, E., Koerten, H.K., Peters, P.J., and Clevers, H.C. (2004). Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* 116, 457-466.

Balda, M.S., Garrett, M.D., and Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 160, 423-432.

Balda, M.S., and Matter, K. (2000). The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J* 19, 2024-2033.

Bautista-Garcia, P., Reyes, J.L., Martin, D., Namorado, M.C., Chavez-Munguia, B., Soria-Castro, E., Huber, O., and Gonzalez-Mariscal, L. (2013). Zona occludens-2 protects against podocyte dysfunction induced by ADR in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 304, F77-87.

Benais-Pont, G., Punn, A., Flores-Maldonado, C., Eckert, J., Raposo, G., Fleming, T.P., Cerejido, M., Balda, M.S., and Matter, K. (2003). Identification of a tight junction-associated guanine nucleotide exchange factor that activates Rho and regulates paracellular permeability. *J Cell Biol* 160, 729-740.

Benezra, M., Greenberg, R.S., and Masur, S.K. (2007). Localization of ZO-1 in the nucleolus of corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 2043-2049.

Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J., and Gonzalez-Mariscal, L. (2004). The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Experimental cell research* 292, 51-66.

Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.

Bossinger, O., Klebes, A., Segbert, C., Theres, C., and Knust, E. (2001). Zonula adherens formation in *Caenorhabditis elegans* requires *dlg-1*, the homologue of the *Drosophila* gene discs large. *Developmental biology* 230, 29-42.

Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., *et al.* (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84, 757-767.

Bruewer, M., Hopkins, A.M., Hobert, M.E., Nusrat, A., and Madara, J.L. (2004). RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C327-335.

Buckley, I.K., and Porter, K.R. (1967). Cytoplasmic fibrils in living cultured cells. A light and electron microscope study. *Protoplasma* 64, 349-380.

Burridge, K., and Guilluy, C. (2016). Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res* 343, 14-20.

Callow, M.G., Zozulya, S., Gishizky, M.L., Jallal, B., and Smeal, T. (2005). PAK4 mediates morphological changes through the regulation of GEF-H1. *J Cell Sci* 118, 1861-1872.

Capaldo, C.T., Koch, S., Kwon, M., Laur, O., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2011). Tight junction zonula occludens-3 regulates cyclin D1-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell* 22, 1677-1685.

Carlton, V.E., Harris, B.Z., Puffenberger, E.G., Batta, A.K., Knisely, A.S., Robinson, D.L., Strauss, K.A., Shneider, B.L., Lim, W.A., Salen, G., *et al.* (2003). Complex

inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nature genetics* 34, 91-96.

Carretero-Ortega, J., Walsh, C.T., Hernandez-Garcia, R., Reyes-Cruz, G., Brown, J.H., and Vazquez-Prado, J. (2010). Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis. *Mol Pharmacol* 77, 435-442.

Cereijido, M., Contreras, R.G., and Shoshani, L. (2004). Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiol Rev* 84, 1229-1262.

Cereijido, M., Gonzalez-Mariscal, L., and Borboa, L. (1983). Occluding junctions and paracellular pathways studied in monolayers of MDCK cells. *J Exp Biol* 106, 205-215.

Chamorro, D., Alarcon, L., Ponce, A., Tapia, R., Gonzalez-Aguilar, H., Robles-Flores, M., Mejia-Castillo, T., Segovia, J., Bandala, Y., Juaristi, E., *et al.* (2009). Phosphorylation of zona occludens-2 by protein kinase C epsilon regulates its nuclear exportation. *Molecular biology of the cell* 20, 4120-4129.

Chen, J., Pan, L., Wei, Z., Zhao, Y., and Zhang, M. (2008). Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites. *EMBO J* 27, 2113-2123.

Chlenski, A., Ketels, K.V., Korovaitseva, G.I., Talamonti, M.S., Oyasu, R., and Scarpelli, D.G. (2000). Organization and expression of the human zo-2 gene (*tjp-2*) in normal and neoplastic tissues. *Biochim Biophys Acta* 1493, 319-324.

Chlenski, A., Ketels, K.V., Tsao, M.S., Talamonti, M.S., Anderson, M.R., Oyasu, R., and Scarpelli, D.G. (1999). Tight junction protein ZO-2 is differentially expressed in normal pancreatic ducts compared to human pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 82, 137-144.

Cho, K.O., Hunt, C.A., and Kennedy, M.B. (1992). The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9, 929-942.

Cohen, N.A., Brenman, J.E., Snyder, S.H., and Brecht, D.S. (1996). Binding of the inward rectifier K⁺ channel Kir 2.3 to PSD-95 is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Neuron* 17, 759-767.

Cowburn, D. (1997). Peptide recognition by PTB and PDZ domains. *Curr Opin Struct Biol* 7, 835-838.

Dalgarno, D.C., Botfield, M.C., and Rickles, R.J. (1997). SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function. *Biopolymers* 43, 383-400.

de Mendoza, A., Suga, H., and Ruiz-Trillo, I. (2010). Evolution of the MAGUK protein gene family in premetazoan lineages. *BMC Evol Biol* 10, 93.

Diamond, J.M. (1977). Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist* 20, 10-18.

Ding, L., Lu, Z., Foreman, O., Tatum, R., Lu, Q., Renegar, R., Cao, J., and Chen, Y.H. (2012). Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology* 142, 305-315.

Doi, Y., Yashiro, M., Yamada, N., Amano, R., Noda, S., and Hirakawa, K. (2012). VEGF-A/VEGFR-2 signaling plays an important role for the motility of pancreas cancer cells. *Ann Surg Oncol* 19, 2733-2743.

Dominguez-Calderon, A., Avila-Flores, A., Ponce, A., Lopez-Bayghen, E., Calderon-Salinas, J.V., Luis Reyes, J., Chavez-Munguia, B., Segovia, J., Angulo, C., Ramirez, L., *et al.* (2016). ZO-2 silencing induces renal hypertrophy through a cell cycle mechanism and the activation of YAP and the mTOR pathway. *Mol Biol Cell* 27, 1581-1595.

Dumbauld, D.W., Shin, H., Gallant, N.D., Michael, K.E., Radhakrishna, H., and Garcia, A.J. (2010). Contractility modulates cell adhesion strengthening through focal adhesion kinase and assembly of vinculin-containing focal adhesions. *J Cell Physiol* 223, 746-756.

Egawa, M., Kamata, H., Kushiya, A., Sakoda, H., Fujishiro, M., Horike, N., Yoneda, M., Nakatsu, Y., Ying, G., Jun, Z., *et al.* (2008). Long-term forskolin stimulation induces AMPK activation and thereby enhances tight junction formation in human placental trophoblast BeWo cells. *Placenta* 29, 1003-1008.

Essler, M., Linder, S., Schell, B., Hufner, K., Wiedemann, A., Randhahn, K., Staddon, J.M., and Aepfelbacher, M. (2003). Cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli* stimulates Rho/Rho-kinase-dependent myosin light-chain phosphorylation without inactivating myosin light-chain phosphatase in endothelial cells. *Infect Immun* 71, 5188-5193.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106, 489-498.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421, 753-756.

Fanning, A.S., Little, B.P., Rahner, C., Utepbergenov, D., Walther, Z., and Anderson, J.M. (2007). The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. *Mol Biol Cell* 18, 721-731.

Fanning, A.S., Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2012). Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia. *Mol Biol Cell* 23, 577-590.

Firestein, B.L., and Rongo, C. (2001). DLG-1 is a MAGUK similar to SAP97 and is required for adherens junction formation. *Molecular biology of the cell* 12, 3465-3475.

Furuse, M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002907.

Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., and Tsukita, S. (2001). 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, 263-272.

Ganot, P., Zoccola, D., Tambutte, E., Voolstra, C.R., Aranda, M., Allemand, D., and Tambutte, S. (2015). Structural molecular components of septate junctions in cnidarians point to the origin of epithelial junctions in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 32, 44-62.

Giallourakis, C., Cao, Z., Green, T., Wachtel, H., Xie, X., Lopez-Illasaca, M., Daly, M., Rioux, J., and Xavier, R. (2006). A molecular-properties-based approach to understanding PDZ domain proteins and PDZ ligands. *Genome Res* 16, 1056-1072.

Glaunsinger, B.A., Weiss, R.S., Lee, S.S., and Javier, R. (2001). Link of the unique oncogenic properties of adenovirus type 9 E4-ORF1 to a select interaction with the candidate tumor suppressor protein ZO-2. *EMBO J* 20, 5578-5586.

Gonzalez-Mariscal, L., Avila, A., and Betanzos, A. (2001). Tight junctions, second edn (CRC Press LLC).

Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., and Avila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Seminars in cell & developmental biology* 11, 315-324.

Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B.E. (2003). Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81, 1-44.

Gonzalez-Mariscal, L., Chavez de Ramirez, B., and Cerejido, M. (1985). Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol* 86, 113-125.

Gonzalez-Mariscal, L., Miranda, J., Ortega-Olvera, J.M., Gallego-Gutierrez, H., Raya-Sandino, A., and Vargas-Sierra, O. (2016). Zonula Occludens Proteins in Cancer. *Current Pathobiology Reports* 4, 107-116.

Gonzalez-Mariscal, L., Miranda, J., Raya-Sandino, A., Dominguez-Calderon, A., and Cuellar-Perez, F. (2017). ZO-2, a tight junction protein involved in gene expression, proliferation, apoptosis, and cell size regulation. *Ann N Y Acad Sci* 1397, 35-53.

Gonzalez-Mariscal, L., Ponce, A., Alarcon, L., and Jaramillo, B.E. (2006). The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Experimental cell research* 312, 3323-3335.

Gonzalez-Mariscal, L., Quiros, M., and Diaz-Coranguéz, M. (2011). ZO proteins and redox-dependent processes. *Antioxid Redox Signal* 15, 1235-1253.

Gonzalez-Mariscal, L., Quiros, M., Diaz-Coranguéz, M., and Bautista, P. (2012). Tight Junctions. In *Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology*, P.S. Najman, ed. (InTech).

Gonzalez-Mariscal, L.G., Quiros, M., Tapia, R. (2010). TJP2 (tight junction protein 2 (zona occludens 2)) (*Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*), pp. 423-428.

Gottardi, C.J., Arpin, M., Fanning, A.S., and Louvard, D. (1996). The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10779-10784.

Grm, H.S., and Banks, L. (2004). Degradation of hDlg and MAGIs by human papillomavirus E6 is E6-AP-independent. *J Gen Virol* 85, 2815-2819.

Guillemot, L., and Citi, S. (2006). Cingulin regulates claudin-2 expression and cell proliferation through the small GTPase RhoA. *Mol Biol Cell* 17, 3569-3577.

Guillemot, L., Hammar, E., Kaister, C., Ritz, J., Caille, D., Jond, L., Bauer, C., Meda, P., and Citi, S. (2004). Disruption of the cingulin gene does not prevent tight junction formation but alters gene expression. *J Cell Sci* 117, 5245-5256.

Guillemot, L., Paschoud, S., Jond, L., Foglia, A., and Citi, S. (2008). Paracingulin regulates the activity of Rac1 and RhoA GTPases by recruiting Tiam1 and GEF-H1 to epithelial junctions. *Mol Biol Cell* 19, 4442-4453.

Guillemot, L., Spadaro, D., and Citi, S. (2013). The junctional proteins cingulin and paracingulin modulate the expression of tight junction protein genes through GATA-4. *PLoS One* 8, e55873.

Gumbiner, B., Lowenkopf, T., and Apatira, D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *88*, 3460-3464.

Gunzel, D., and Yu, A.S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* *93*, 525-569.

Hanna, A.N., Berthiaume, L.G., Kikuchi, Y., Begg, D., Bourgoin, S., and Brindley, D.N. (2001). Tumor necrosis factor- α induces stress fiber formation through ceramide production: role of sphingosine kinase. *Mol Biol Cell* *12*, 3618-3630.

Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J., and Stevenson, B.R. (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *The Journal of cell biology* *141*, 199-208.

Hernandez, S., Chavez Munguia, B., and Gonzalez-Mariscal, L. (2007). ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. *Exp Cell Res* *313*, 1533-1547.

Hernandez-Monge, J., Garay, E., Raya-Sandino, A., Vargas-Sierra, O., Diaz-Chavez, J., Popoca-Cuaya, M., Lambert, P.F., Gonzalez-Mariscal, L., and Gariglio, P. (2013). Papillomavirus E6 oncoprotein up-regulates occludin and ZO-2 expression in ovariectomized mice epidermis. *Exp Cell Res* *319*, 2588-2603.

Herrmann, C.H., and Mancini, M.A. (2001). The Cdk9 and cyclin T subunits of TAK/P-TEFb localize to splicing factor-rich nuclear speckle regions. *J Cell Sci* *114*, 1491-1503.

Holmes, K.C. (2008). *Myosin structure*, 1 edn (Springer Netherlands).

Hopkins, A.M., Walsh, S.V., Verkade, P., Boquet, P., and Nusrat, A. (2003). Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *J Cell Sci* *116*, 725-742.

Huang, H.Y., Li, R., Sun, Q., Wang, J., Zhou, P., Han, H., and Zhang, W.H. (2002). [LIM protein KyoT2 interacts with human tight junction protein ZO-2-i3]. *Yi chuan xue bao = Acta genetica Sinica* *29*, 953-958.

Huang, T.Y., DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M. (2006). Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol* *18*, 26-31.

Huerta, M., Munoz, R., Tapia, R., Soto-Reyes, E., Ramirez, L., Recillas-Targa, F., Gonzalez-Mariscal, L., and Lopez-Bayghen, E. (2007). Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Molecular biology of the cell* *18*, 4826-4836.

Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2007). Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J Cell Biol* 176, 779-786.

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

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999a). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of cell biology* 147, 1351-1363.

Itoh, M., Morita, K., and Tsukita, S. (1999b). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *The Journal of biological chemistry* 274, 5981-5986.

Ivanov, A.I., McCall, I.C., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2004). Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell* 15, 2639-2651.

Jaffe, A.B., Kaji, N., Durgan, J., and Hall, A. (2008). Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol* 183, 625-633.

Jaramillo, B.E., Ponce, A., Moreno, J., Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., and Gonzalez-Mariscal, L. (2004). Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Experimental cell research* 297, 247-258.

Jenkins, E.L., Caputo, M., Angelini, G.D., and Ghorbel, M.T. (2016). Chronic hypoxia down-regulates tight junction protein ZO-2 expression in children with cyanotic congenital heart defect. *ESC Heart Fail* 3, 131-137.

Jou, T.S., and Nelson, W.J. (1998). Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. *J Cell Biol* 142, 85-100.

Kardash, E., Bandemer, J., and Raz, E. (2011). Imaging protein activity in live embryos using fluorescence resonance energy transfer biosensors. *Nat Protoc* 6, 1835-1846.

Katoh, K., Kano, Y., Amano, M., Onishi, H., Kaibuchi, K., and Fujiwara, K. (2001). Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol* 153, 569-584.

Kausalya, P.J., Phua, D.C., and Hunziker, W. (2004). Association of ARVCF with zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell

adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF. *Molecular biology of the cell* 15, 5503-5515.

Kazmierczak, M., Harris, S.L., Kazmierczak, P., Shah, P., Starovoytov, V., Ohlemiller, K.K., and Schwander, M. (2015). Progressive Hearing Loss in Mice Carrying a Mutation in *Usp53*. *J Neurosci* 35, 15582-15598.

Kiener, T.K., Sleptsova-Friedrich, I., and Hunziker, W. (2007). Identification, tissue distribution and developmental expression of *tjp1/zo-1*, *tjp2/zo-2* and *tjp3/zo-3* in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene Expr Patterns* 7, 767-776.

Kistner, U., Garner, C.C., and Linial, M. (1995). Nucleotide binding by the synapse associated protein SAP90. *FEBS letters* 359, 159-163.

Kistner, U., Wenzel, B.M., Veh, R.W., Cases-Langhoff, C., Garner, A.M., Appeltauer, U., Voss, B., Gundelfinger, E.D., and Garner, C.C. (1993). SAP90, a rat presynaptic protein related to the product of the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg-A*. *The Journal of biological chemistry* 268, 4580-4583.

Lamond, A.I., and Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 605-612.

Lechuga, S., Alarcon, L., Solano, J., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., and Gonzalez-Mariscal, L. (2010). Identification of ZASP, a novel protein associated to Zona occludens-2. *Exp Cell Res* 316, 3124-3139.

Lee, C.S., Choi, C.K., Shin, E.Y., Schwartz, M.A., and Kim, E.G. (2010). Myosin II directly binds and inhibits Dbl family guanine nucleotide exchange factors: a possible link to Rho family GTPases. *J Cell Biol* 190, 663-674.

Lee, S.S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L., and Javier, R.T. (2000). Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol* 74, 9680-9693.

Lewis W.H., L.M.R. (1924). *Behavior of cells in tissue cultures* (Chicago, IL: The University of Chicago Press).

Li, C.C., Kuo, J.C., Waterman, C.M., Kiyama, R., Moss, J., and Vaughan, M. (2011). Effects of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange (BIG) 1 and KANK1 proteins on cell polarity and directed migration during wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19228-19233.

Li, X., Lu, S., and Nagy, J.I. (2009). Direct association of connexin36 with zonula occludens-2 and zonula occludens-3. *Neurochem Int* 54, 393-402.

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. *Circ Res* 116, 35-45.

Liu, B., and Preisig, P.A. (2002). Compensatory renal hypertrophy is mediated by a cell cycle-dependent mechanism. *Kidney Int* 62, 1650-1658.

Lockwood, C., Zaidel-Bar, R., and Hardin, J. (2008). The *C. elegans* zonula occludens ortholog cooperates with the cadherin complex to recruit actin during morphogenesis. *Curr Biol* 18, 1333-1337.

Lodish, H. (2009). *Biología celular y molecular*, 5ta edn (Argentina).

Lopez-Bayghen, E., Jaramillo, B.E., Huerta, M., Betanzos, A., and Gonzalez-Mariscal, L. (2006). *TJ Proteins That Make Round Trips to the Nucleus* (U.S.A.: Landes Bioscience, Springer Science+Business Media, LLC).

Lu, Z., Kim, D.H., Fan, J., Lu, Q., Verbanac, K., Ding, L., Renegar, R., and Chen, Y.H. (2015). A non-tight junction function of claudin-7-Interaction with integrin signaling in suppressing lung cancer cell proliferation and detachment. *Mol Cancer* 14, 120.

Luczka, E., Syne, L., Nawrocki-Raby, B., Kileztky, C., Hunziker, W., Birembaut, P., Gilles, C., and Polette, M. (2013). Regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression by zonula occludens-2 in human lung cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 30, 833-843.

Lye, M.F., Fanning, A.S., Su, Y., Anderson, J.M., and Lavie, A. (2010). Insights into regulated ligand binding sites from the structure of ZO-1 Src homology 3-guanylate kinase module. *J Biol Chem* 285, 13907-13917.

Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-898.

Mandel, L.J., Bacallao, R., and Zampighi, G. (1993). Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. *Nature* 361, 552-555.

Martin, T.A., Mason, M.D., and Jiang, W.G. (2014). HGF and the regulation of tight junctions in human prostate cancer cells. *Oncol Rep* 32, 213-224.

Masuko, N., Makino, K., Kuwahara, H., Fukunaga, K., Sudo, T., Araki, N., Yamamoto, H., Yamada, Y., Miyamoto, E., and Saya, H. (1999). Interaction of NE-dlg/SAP102, a neuronal and endocrine tissue-specific membrane-associated guanylate kinase protein, with calmodulin and PSD-95/SAP90. A possible regulatory role in molecular clustering at synaptic sites. *J Biol Chem* 274, 5782-5790.

Mattagajasingh, S.N., Huang, S.C., Hartenstein, J.S., and Benz, E.J., Jr. (2000). Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 275, 30573-30585.

May, K.M., Win, T.Z., and Hyams, J.S. (1998). Yeast myosin II: a new subclass of unconventional conventional myosins? *Cell Motil Cytoskeleton* 39, 195-200.

McGee, A.W., and Bredt, D.S. (1999). Identification of an intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *J Biol Chem* 274, 17431-17436.

Metais, J.Y., Navarro, C., Santoni, M.J., Audebert, S., and Borg, J.P. (2005). hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells. *FEBS Lett* 579, 3725-3730.

Meza, I., Ibarra, G., Sabanero, M., Martinez-Palomo, A., and Cereijido, M. (1980). Occluding junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol* 87, 746-754.

Meza, I., Sabanero, M., Stefani, E., and Cereijido, M. (1982). Occluding junctions in MDCK cells: modulation of transepithelial permeability by the cytoskeleton. *J Cell Biochem* 18, 407-421.

Mihlan, S., Reiss, C., Thalheimer, P., Herterich, S., Gaetzner, S., Kremerskothen, J., Pavenstadt, H.J., Lewandrowski, U., Sickmann, A., and Butt, E. (2013). Nuclear import of LASP-1 is regulated by phosphorylation and dynamic protein-protein interactions. *Oncogene* 32, 2107-2113.

Mintz, P.J., Patterson, S.D., Neuwald, A.F., Spahr, C.S., and Spector, D.L. (1999). Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J* 18, 4308-4320.

Monteiro, A.C., Sumagin, R., Rankin, C.R., Leoni, G., Mina, M.J., Reiter, D.M., Stehle, T., Dermody, T.S., Schaefer, S.A., Hall, R.A., *et al.* (2013). JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function. *Molecular biology of the cell* 24, 2849-2860.

Muller, S.L., Portwich, M., Schmidt, A., Utepbergenov, D.I., Huber, O., Blasig, I.E., and Krause, G. (2005). The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem* 280, 3747-3756.

Nakagawa, S., and Huijbregtse, J.M. (2000). Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 20, 8244-8253.

Nakano, A., and Takashima, S. (2012). LKB1 and AMP-activated protein kinase: regulators of cell polarity. *Genes Cells* 17, 737-747.

Nandadasa, S., Tao, Q., Menon, N.R., Heasman, J., and Wylie, C. (2009). N- and E-cadherins in *Xenopus* are specifically required in the neural and non-neural ectoderm, respectively, for F-actin assembly and morphogenetic movements. *Development* 136, 1327-1338.

Narumiya, S., Ishizaki, T., and Uehata, M. (2000). Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. *Methods Enzymol* 325, 273-284.

Nava, P., Lopez, S., Arias, C.F., Islas, S., and Gonzalez-Mariscal, L. (2004). The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Sci* 117, 5509-5519.

Nishita, M., Wang, Y., Tomizawa, C., Suzuki, A., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. (2004). Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion. *J Biol Chem* 279, 7193-7198.

Nix, S.L., Chishti, A.H., Anderson, J.M., and Walther, Z. (2000). hCASK and hDlg associate in epithelia, and their src homology 3 and guanylate kinase domains participate in both intramolecular and intermolecular interactions. *J Biol Chem* 275, 41192-41200.

Nomme, J., Fanning, A.S., Caffrey, M., Lye, M.F., Anderson, J.M., and Lavie, A. (2011). The Src homology 3 domain is required for junctional adhesion molecule binding to the third PDZ domain of the scaffolding protein ZO-1. *J Biol Chem* 286, 43352-43360.

Nusrat, A., Giry, M., Turner, J.R., Colgan, S.P., Parkos, C.A., Carnes, D., Lemichez, E., Boquet, P., and Madara, J.L. (1995). Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10629-10633.

Odenwald, M.A., Choi, W., Buckley, A., Shashikanth, N., Joseph, N.E., Wang, Y., Warren, M.H., Buschmann, M.M., Pavlyuk, R., Hildebrand, J., *et al.* (2017). ZO-1 interactions with F-actin and occludin direct epithelial polarization and single lumen specification in 3D culture. *J Cell Sci* 130, 243-259.

Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Mizuno, K. (2000). Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem* 275, 3577-3582.

Oka, T., Remue, E., Meerschaert, K., Vanloo, B., Boucherie, C., Gfeller, D., Bader, G.D., Sidhu, S.S., Vandekerckhove, J., Gettemans, J., *et al.* (2010). Functional

complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem J* 432, 461-472.

Oliver, T.N., Berg, J.S., and Cheney, R.E. (1999). Tails of unconventional myosins. *Cell Mol Life Sci* 56, 243-257.

Paarmann, I., Lye, M.F., Lavie, A., and Konrad, M. (2008). Structural requirements for calmodulin binding to membrane-associated guanylate kinase homologs. *Protein Sci* 17, 1946-1954.

Pan, L., Chen, J., Yu, J., Yu, H., and Zhang, M. (2011). The structure of the PDZ3-SH3-GuK tandem of ZO-1 protein suggests a supramodular organization of the membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family scaffold protein core. *J Biol Chem* 286, 40069-40074.

Pandey, D., Goyal, P., Dwivedi, S., and Siess, W. (2009). Unraveling a novel Rac1-mediated signaling pathway that regulates cofilin dephosphorylation and secretion in thrombin-stimulated platelets. *Blood* 114, 415-424.

Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K., and Yamada, K.M. (2005). A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol* 170, 793-802.

Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L., and Hahn, K.M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440, 1069-1072.

Ponting, C.P. (1997). Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein science : a publication of the Protein Society* 6, 464-468.

Qiao, X., Roth, I., Feraille, E., and Hasler, U. (2014). Different effects of ZO-1, ZO-2 and ZO-3 silencing on kidney collecting duct principal cell proliferation and adhesion. *Cell Cycle* 13, 3059-3075.

Quiros, M., Alarcon, L., Ponce, A., Giannakouros, T., and Gonzalez-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.

Rabinovitz, I., and Mercurio, A.M. (1997). The integrin alpha6beta4 functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures. *J Cell Biol* 139, 1873-1884.

Reggiani, C.B., R. (2008). *Myosin II: Sarcomeric myosins, the motors of contraction in cardiac and skeletal muscles* (Springer Netherlands).

Ridley, A.J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114, 2713-2722.

Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410.

Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 167-180.

Ryeom, S.W., Paul, D., and Goodenough, D.A. (2000). Truncation mutants of the tight junction protein ZO-1 disrupt corneal epithelial cell morphology. *Mol Biol Cell* **11**, 1687-1696.

Saito, K., Enya, K., Oneyama, C., Hikita, T., and Okada, M. (2008). Proteomic identification of ZO-1/2 as a novel scaffold for Src/Csk regulatory circuit. *Biochemical and biophysical research communications* **366**, 969-975.

Saitoh, M., Ishikawa, T., Matsushima, S., Naka, M., and Hidaka, H. (1987). Selective inhibition of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* **262**, 7796-7801.

Samarin, S.N., Ivanov, A.I., Flatau, G., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2007). Rho/Rho-associated kinase-II signaling mediates disassembly of epithelial apical junctions. *Mol Biol Cell* **18**, 3429-3439.

Sambrotta, M., Strautnieks, S., Papouli, E., Rushton, P., Clark, B.E., Parry, D.A., Logan, C.V., Newbury, L.J., Kamath, B.M., Ling, S., *et al.* (2014). Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease. *Nat Genet* **46**, 326-328.

Saras, J., and Heldin, C.H. (1996). PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trends Biochem Sci* **21**, 455-458.

Schmidt, A., Utepbergenov, D.I., Mueller, S.L., Beyermann, M., Schneider-Mergener, J., Krause, G., and Blasig, I.E. (2004). Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1354-1365.

Sellers, J.R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 3-22.

Shin, H., Hsueh, Y.P., Yang, F.C., Kim, E., and Sheng, M. (2000). An intramolecular interaction between Src homology 3 domain and guanylate kinase-like domain required for channel clustering by postsynaptic density-95/SAP90. *J Neurosci* **20**, 3580-3587.

Singh, D., and Lampe, P.D. (2003). Identification of connexin-43 interacting proteins. *Cell Commun Adhes* **10**, 215-220.

Singh, D., Solan, J.L., Taffet, S.M., Javier, R., and Lampe, P.D. (2005). Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *J Biol Chem* 280, 30416-30421.

Solski, P.A., Helms, W., Keely, P.J., Su, L., and Der, C.J. (2002). RhoA biological activity is dependent on prenylation but independent of specific isoprenoid modification. *Cell Growth Differ* 13, 363-373.

Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A., Chan, A.C., Anderson, J.M., and Cantley, L.C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73-77.

Sourisseau, T., Georgiadis, A., Tsapara, A., Ali, R.R., Pestell, R., Matter, K., and Balda, M.S. (2006). Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol* 26, 2387-2398.

Sprang, S. (2001). GEFs: master regulators of G-protein activation. *Trends Biochem Sci* 26, 266-267.

Staehein, L.A., Mukherjee, T.M., and Williams, A.W. (1969). Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice. *Protoplasma* 67, 165-184.

Sudol, M., and Hunter, T. (2000). NeW wrinkles for an old domain. *Cell* 103, 1001-1004.

Takahisa, M., Togashi, S., Suzuki, T., Kobayashi, M., Murayama, A., Kondo, K., Miyake, T., and Ueda, R. (1996). The *Drosophila* tamou gene, a component of the activating pathway of extramacrochaetae expression, encodes a protein homologous to mammalian cell-cell junction-associated protein ZO-1. *Genes Dev* 10, 1783-1795.

Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., and Takai, Y. (1997). Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* 139, 1047-1059.

Talhouk, R.S., Mroue, R., Mokalled, M., Abi-Mosleh, L., Nehme, R., Ismail, A., Khalil, A., Zaatari, M., and El-Sabban, M.E. (2008). Heterocellular interaction enhances recruitment of alpha and beta-catenins and ZO-2 into functional gap-junction complexes and induces gap junction-dependant differentiation of mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 314, 3275-3291.

Tanos, B.E., Perez Bay, A.E., Salvarezza, S., Vivanco, I., Mellinghoff, I., Osman, M., Sacks, D.B., and Rodriguez-Boulan, E. (2015). IQGAP1 controls tight junction formation through differential regulation of claudin recruitment. *J Cell Sci* 128, 853-862.

Tapia, R., Huerta, M., Islas, S., Avila-Flores, A., Lopez-Bayghen, E., Weiske, J., Huber, O., and Gonzalez-Mariscal, L. (2009). Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. *Molecular biology of the cell* *20*, 1102-1117.

Tavares, G.A., Panepucci, E.H., and Brunger, A.T. (2001). Structural characterization of the intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *Mol Cell* *8*, 1313-1325.

Tavares, S., Vieira, A.F., Taubenberger, A.V., Araujo, M., Martins, N.P., Bras-Pereira, C., Polonia, A., Herbig, M., Barreto, C., Otto, O., *et al.* (2017). Actin stress fiber organization promotes cell stiffening and proliferation of pre-invasive breast cancer cells. *Nat Commun* *8*, 15237.

te Velthuis, A.J., Admiraal, J.F., and Bagowski, C.P. (2007). Molecular evolution of the MAGUK family in metazoan genomes. *BMC Evol Biol* *7*, 129.

Terry, S.J., Zihni, C., Elbediwy, A., Vitiello, E., Leefa Chong San, I.V., Balda, M.S., and Matter, K. (2011). Spatially restricted activation of RhoA signalling at epithelial junctions by p114RhoGEF drives junction formation and morphogenesis. *Nat Cell Biol* *13*, 159-166.

Thomas, M., Myers, M.P., Massimi, P., Guarnaccia, C., and Banks, L. (2016). Analysis of Multiple HPV E6 PDZ Interactions Defines Type-Specific PDZ Fingerprints That Predict Oncogenic Potential. *PLoS Pathog* *12*, e1005766.

Tokes, A.M., Szasz, A.M., Juhasz, E., Schaff, Z., Harsanyi, L., Molnar, I.A., Baranyai, Z., Besznyak, I., Jr., Zarand, A., Salamon, F., *et al.* (2012). Expression of tight junction molecules in breast carcinomas analysed by array PCR and immunohistochemistry. *Pathol Oncol Res* *18*, 593-606.

Tonikian, R., Zhang, Y., Sazinsky, S.L., Currell, B., Yeh, J.H., Reva, B., Held, H.A., Appleton, B.A., Evangelista, M., Wu, Y., *et al.* (2008). A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS Biol* *6*, e239.

Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L.O., Conway, D.E., Randi, A.M., Schwartz, M.A., Matter, K., and Balda, M.S. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol* *208*, 821-838.

Traweger, A., Fuchs, R., Krizbai, I.A., Weiger, T.M., Bauer, H.C., and Bauer, H. (2003). The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *The Journal of biological chemistry* *278*, 2692-2700.

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.

Utech, M., Ivanov, A.I., Samarin, S.N., Bruewer, M., Turner, J.R., Mrsny, R.J., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2005). Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell* **16**, 5040-5052.

Van Itallie, C., Rahner, C., and Anderson, J.M. (2001). Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* **107**, 1319-1327.

Van Itallie, C.M., Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (2003). Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F1078-1084.

Van Itallie, C.M., Fanning, A.S., Bridges, A., and Anderson, J.M. (2009). ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **20**, 3930-3940.

Vasiliev, J.M., Omelchenko, T., Gelfand, I.M., Feder, H.H., and Bonder, E.M. (2004). Rho overexpression leads to mitosis-associated detachment of cells from epithelial sheets: a link to the mechanism of cancer dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12526-12530.

Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 778-790.

Walsh, T., Pierce, S.B., Lenz, D.R., Brownstein, Z., Dagan-Rosenfeld, O., Shahin, H., Roeb, W., McCarthy, S., Nord, A.S., Gordon, C.R., *et al.* (2010). Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. *American journal of human genetics* **87**, 101-109.

Wang, H.Y., Zhao, Y.L., Liu, Q., Yuan, H., Gao, Y., Lan, L., Yu, L., Wang, D.Y., Guan, J., and Wang, Q.J. (2015). Identification of Two Disease-causing Genes TJP2 and GJB2 in a Chinese Family with Unconditional Autosomal Dominant Nonsyndromic Hereditary Hearing Impairment. *Chin Med J (Engl)* **128**, 3345-3351.

Wang, N.X., Lee, H.J., and Zheng, J.J. (2008). Therapeutic use of PDZ protein-protein interaction antagonism. *Drug News Perspect* **21**, 137-141.

Wei, X., and Ellis, H.M. (2001). Localization of the Drosophila MAGUK protein Polychaetoid is controlled by alternative splicing. *Mech Dev* **100**, 217-231.

Wetzel, F., Mittag, S., Cano-Cortina, M., Wagner, T., Kramer, O.H., Niedenthal, R., Gonzalez-Mariscal, L., and Huber, O. (2017). SUMOylation regulates the intracellular fate of ZO-2. *Cell Mol Life Sci* 74, 373-392.

Willott, E., Balda, M.S., Fanning, A.S., Jameson, B., Van Itallie, C., and Anderson, J.M. (1993). The tight junction protein ZO-1 is homologous to the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7834-7838.

Wittchen, E.S., Haskins, J., and Stevenson, B.R. (1999). Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* 274, 35179-35185.

Woods, D.F., and Bryant, P.J. (1991). The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* 66, 451-464.

Woods, D.F., Hough, C., Peel, D., Callaini, G., and Bryant, P.J. (1996). Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J Cell Biol* 134, 1469-1482.

Xu, J., Anuar, F., Ali, S.M., Ng, M.Y., Phua, D.C., and Hunziker, W. (2009). Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility. *Molecular biology of the cell* 20, 4268-4277.

Xu, J., Kausalya, P.J., Phua, D.C., Ali, S.M., Hossain, Z., and Hunziker, W. (2008). Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Molecular and cellular biology* 28, 1669-1678.

Yamazaki, Y., Umeda, K., Wada, M., Nada, S., Okada, M., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2008). ZO-1- and ZO-2-dependent integration of myosin-2 to epithelial zonula adherens. *Molecular biology of the cell* 19, 3801-3811.

Yano, T., Matsui, T., Tamura, A., Uji, M., and Tsukita, S. (2013). The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J Cell Biol* 203, 605-614.

Ye, F., and Zhang, M. (2013). Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *Biochem J* 455, 1-14.

Yu, A.S., Cheng, M.H., Angelow, S., Gunzel, D., Kanzawa, S.A., Schneeberger, E.E., Fromm, M., and Coalson, R.D. (2009). Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J Gen Physiol* 133, 111-127.

Zhang, Y., Yeh, S., Appleton, B.A., Held, H.A., Kausalya, P.J., Phua, D.C., Wong, W.L., Lasky, L.A., Wiesmann, C., Hunziker, W., *et al.* (2006). Convergent and divergent ligand specificity among PDZ domains of the LAP and zonula occludens (ZO) families. *J Biol Chem* **281**, 22299-22311.

Zhou, S., Hertel, P.M., Finegold, M.J., Wang, L., Kerkar, N., Wang, J., Wong, L.J., Plon, S.E., Sambrotta, M., Foskett, P., *et al.* (2015). Hepatocellular carcinoma associated with tight-junction protein 2 deficiency. *Hepatology* **62**, 1914-1916.