



**Centro de Investigación y Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

“La proteína ZO-2 modula la concentración nuclear del
factor de transcripción TEAD”

T E S I S

que presenta

M. en C. Helios Alfredo Gallego Gutiérrez

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en la Especialidad de
Fisiología Celular y Molecular**

Directora de la tesis

Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel

México, Ciudad de México

Julio, 2021

Índice

Lista de abreviaturas	3
Resumen	5
Abstract.....	6
I) Introducción	7
1) Los epitelios.....	7
2) Las uniones estrechas	7
3) ZO-2.....	9
3.1) Organización molecular de ZO-2.....	10
3.2) Interacción de ZO-2 con otras moléculas.....	10
3.3) Localización y tráfico intracelular de ZO-2.....	14
4) Función nuclear de ZO-2.....	17
4.1) Interacción de ZO-2 con proteínas y lípidos nucleares.....	17
4.2) Interacción de ZO-2 con JUN y Fos	18
4.3) ZO-2 inhibe la transcripción de CD1	19
4.4) ZO-2 favorece la degradación de la CD1.....	19
4.5) ZO-2 inhibe la transcripción activada por la ruta Wnt.....	20
4.6) ZO-2 inhibe la transcripción activada por Yap/TEAD y Yap/RUNX2	21
5) El factor de transcripción TEAD	22
5.1) Coactivadores de TEAD independientes de la vía Hippo	23
5.2) Interacción de TEAD con otros factores de transcripción	23
5.3) Modificaciones post-traduccionales de TEAD	23
5.4) La localización subcelular de TEAD regula la transcripción.....	24
6) ZO-2 y el cáncer	25

II) Planteamiento del problema	26
III) Hipótesis	26
IV) Objetivo General	26
V) Material y métodos	26
5.1) Cultivo celular	26
5.2) Transfecciones	27
5.3) Inmunofluorescencia	28
5.4) Ensayo de ligación por proximidad <i>in situ</i> Duolink	29
5.5) Western Blot	29
5.6) Fraccionamiento celular	30
5.7) Tratamiento con fosfatasa alcalina	31
5.8) Ensayo de arrastre de proteínas	31
5.9) Ensayo de gen reportero TOP/FOP Flash.....	31
5.10) Inhibidores y activadores de cinasas	32
VI) Resultados.....	33
6.1) ZO-2 favorece la entrada de ZO-2 al núcleo de las células epiteliales.....	33
6.2) TEAD nuclear está fosforilada	36
6.3) La inhibición de la nPKC δ incrementa el contenido celular de TEAD y promueve la importación nuclear de ZO-2, favoreciendo la acumulación nuclear de TEAD.....	37
6.4) La interacción nuclear entre ZO-2 y TEAD se inhibe por la nPKC δ	42
6.5) La exportación nuclear de ZO-2 y TEAD se induce cuando se activa una NES de ZO-2 por acción de la nPKC ϵ	45
VII) Discusión	50
VIII) Bibliografía	52

Lista de abreviaturas

B-TrCP: Proteína beta con repetidos transducina

CD1: Ciclina D1

CK1: Casein cinasa 1

CTGF: Factor de crecimiento del tejido conectivo

G0: Intervalo 0

G1: Intervalo 1

GSK-3 β : Cinasa 3 beta de la síntesis de glicógeno

GUK: Guanilato cinasa

JAM: Molécula de las uniones de adhesión

LRP5/6: Receptor de lipoproteínas de baja densidad relacionado a la proteína 5 y 6

LSR: Receptor a lipoproteína estimulado por lipólisis

MAGUK: Proteína asociada a membrana con homología a la cinasa de guanilato

NES: Señal de exportación nuclear

NLS: Señal de localización nuclear

PBS: Amortiguador salino de fosfatos

PKC: Proteína cinasa C

PDZ: Acrónimo formado por las proteínas PSD95, Disc large y ZO-1 en las que este dominio se identificó inicialmente

SH3: Homólogo a Src

SRPK1: Proteína cinasa 1 de motivos SR

TAZ: Coactivador transcripcional con motivo de unión a dominios PDZ

UA: Unión adherente

UE: Unión estrecha

Wnt: Acrónimo formado por las proteínas homólogas Wingless e Int-1

YAP: Proteína asociada a Yes

ZO: Zonula occludens

Resumen

Zonula occludens 2 (ZO-2) es una proteína plataforma de la unión estrecha que se mueve al núcleo de las células epiteliales en la condición de subconfluencia, e inhibe la transcripción de genes regulados por el factor de transcripción TEAD. En esta tesis analizamos si la importación y exportación nuclear de ZO-2 modula la concentración de TEAD en el núcleo. Encontramos que en los cultivos subconfluentes de las células MDCK ZO-2 Knock-down (KD), así como en las células parentales transfectadas con una construcción de ZO-2 sin señales de localización nuclear, el contenido nuclear de TEAD disminuye, lo que indica que ZO-2 favorece la entrada de TEAD al núcleo. La inhibición de la nPKC δ en las células parentales promueve la interacción entre ZO-2 y TEAD en el citoplasma y facilita la importación al núcleo del complejo ZO-2/TEAD. La exportación nuclear de TEAD en las células parentales se favorece por la activación de la señal de exportación nuclear de ZO-2 por la nPKC ϵ . En cambio, la retención de ZO-2 en el núcleo por la inhibición de la nPKC ϵ , bloquea el aumento en la actividad transcripcional del promotor hCTGF, que se observa en las células ZO-2 KD por la acumulación nuclear de TEAD. Nuestros resultados revelan una nueva función de ZO-2 como translocador de factores de transcripción al núcleo.

Abstract

Zonula occludens 2 (ZO-2) is a scaffold tight junction protein that moves to the nucleus in subconfluent epithelial cells and inhibits the transcription of genes regulated by TEAD transcription factor. Here we analyzed if the movement of ZO-2 in and out of the nucleus modulates the nuclear concentration of TEAD. We found that in sparse cultures of ZO-2 Knock-down (KD) MDCK cells, the amount of nuclear TEAD diminishes, as in parental cells transfected with a ZO-2 construct without nuclear localization signals, indicating that ZO-2 favors the entry of TEAD into the nucleus. Inhibition of nPKC δ in parental cells triggers the interaction between ZO-2 and TEAD at the cytoplasm and facilitates the nuclear importation of TEAD/ZO-2 complex. Nuclear exportation of TEAD in parental cells is enhanced by activation of a ZO-2 nuclear exportation signal by nPKC ϵ . Accordingly, in parental cells the nuclear retention of ZO-2 induced by nPKC ϵ inhibition blocks the increase in CTGF promoter activity observed in ZO-2 KD cells due to the nuclear accumulation of TEAD. Our results reveal a novel role of ZO-2 as a nuclear translocator of transcription factors.

D) Introducción

1) Los epitelios

En los organismos multicelulares los epitelios forman barreras entre el individuo y el exterior. En las áreas con alto estrés mecánico como la piel, el esófago, la vagina y la córnea, los epitelios son estratificados, mientras que en el resto del organismo se organizan en forma de monocapa. Las células epiteliales tienen diversas morfologías, así, por ejemplo son columnares en el intestino, tubulares en el riñón y escamosas en el pulmón [para revisión ver (González-Mariscal et al., 2012)]. La membrana plasmática de las células epiteliales se encuentra polarizada en una región apical y otra basolateral, y en el límite apico-lateral se localiza la unión estrecha (UE). Esta estructura de contacto célula-célula, regula el movimiento de iones, moléculas y células a través del espacio paracelular entre las células adyacentes (Fanning and Anderson, 2009). A esta función de la UE se le conoce como de compuerta. La UE además tiene una función denominada de cerca que consiste en bloquear la libre difusión de proteínas y lípidos en el plano de la membrana, entre los dominios apical y basolateral. De esta manera la UE mantiene la polaridad celular (Mandel et al., 1993).

2) Las uniones estrechas

Por microscopía electrónica de corte fino la UE aparece en la porción más apical de la membrana lateral como puntos de fusión entre las membranas de las células adyacentes (Farquhar and Palade, 1963). En cambio, por microscopía electrónica de criofractura la UE se observa como una red de filamentos entrecruzados por debajo de las microvellosidades apicales (Fig. 1A y B) (Claude and Goodenough, 1973).

Las proteínas integrales de la UE se contactan entre sí de forma homotípica en el espacio paracelular entre células adyacentes. Hay dos clases de proteínas integrales en las UEs: las que poseen un dominio transmembranal y las que tienen cuatro [para revisión ver (González-Mariscal et al., 2012)]. La primera clase la constituyen las proteínas JAMs y LSR/angulinas, que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La segunda clase la integran las claudinas y las proteínas de la familia TAMP: ocludina, tricelulina y marvel D3 [para revisión ver (Balda and Matter, 2000; González-Mariscal et al., 2012)]. Estas últimas se caracterizan por tener un dominio transmembranal MARVEL, presente en

proteínas que se concentran en microdominios ricos en colesterol y que participan en procesos de fusión de membranas [para revisión ver (Sanchez-Pulido et al., 2002)] (Fig. 1C).

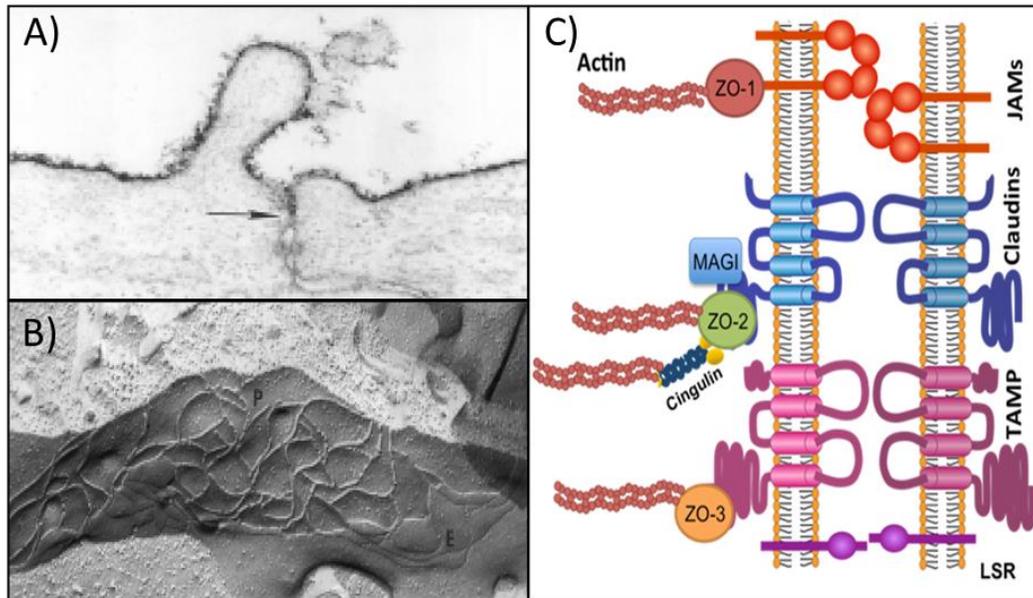


Figura 1. Morfología y composición molecular de la unión estrecha. A) Imagen de corte fino de la UE. La flecha indica el sitio de la UE entre dos células epiteliales vecinas. A partir de esta unión se impide el paso del rojo de rutenio de la cara apical al espacio paracelular. (Imagen tomada de González-Mariscal *et al.*, 2003). B) Imagen de criofractura de la UE. La UE se observa como una red de filamentos en la cara protoplásmica (P) de la membrana plasmática, con surcos complementarios en la cara exoplásmica. (Imagen tomada de González-Mariscal *et al.*, 2003). C) Representación esquemática de la composición molecular de la UE integrada por proteínas transmembranales y periféricas (Imagen tomada de González-Mariscal *et al.*, 2012).

Las UE también se componen de proteínas periféricas, muchas de las cuáles contienen dominios PDZ, llamados así por las iniciales de las proteínas donde fueron inicialmente identificados (PSD95/DLG/ZO-1). Los dominios PDZ se unen a motivos específicos presentes en el carboxilo terminal de una gran variedad de proteínas y a otros motivos PDZ. Los dominios PDZ, así como otros módulos de unión a proteínas como SH3, guanilato cinasa (GK) y WW, permiten a las proteínas periféricas de la UE actuar como una plataforma de unión al citoesqueleto, a proteínas integrales de las uniones intercelulares y a diversas proteínas de señalización [para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2003)].

En la figura 2 se muestran las proteínas de la UE que poseen dominios PDZ. Destacan las de la familia MAGUK (Membrane Asociated Guanylate Kinase homologues) ZO-1, ZO-2, ZO-3 y Pals1 que se caracterizan por tener dominios PDZ, SH3 y GK. En la región citoplásmica de las UE, además se encuentran las proteínas MAGUK invertidas o MAGIs,

donde la mayor parte de sus dominios PDZ se orientan hacia la región carboxilo de la proteína en vez de la porción amino, como sucede en las MAGUK. Además, en las MAGIs el dominio SH3 se sustituye por el WW. Ambos dominios SH3 y WW se caracterizan por unirse a consensos ricos en prolina. En la UE también están presentes proteínas con múltiples repetidos PDZ, como MUPP1 y PATJ, así como otras proteínas con dominios PDZ que no corresponden a las familias antes mencionadas como Par-3, Par-6 y AF-6 [para revisión ver (González-Mariscal et al., 2012)].

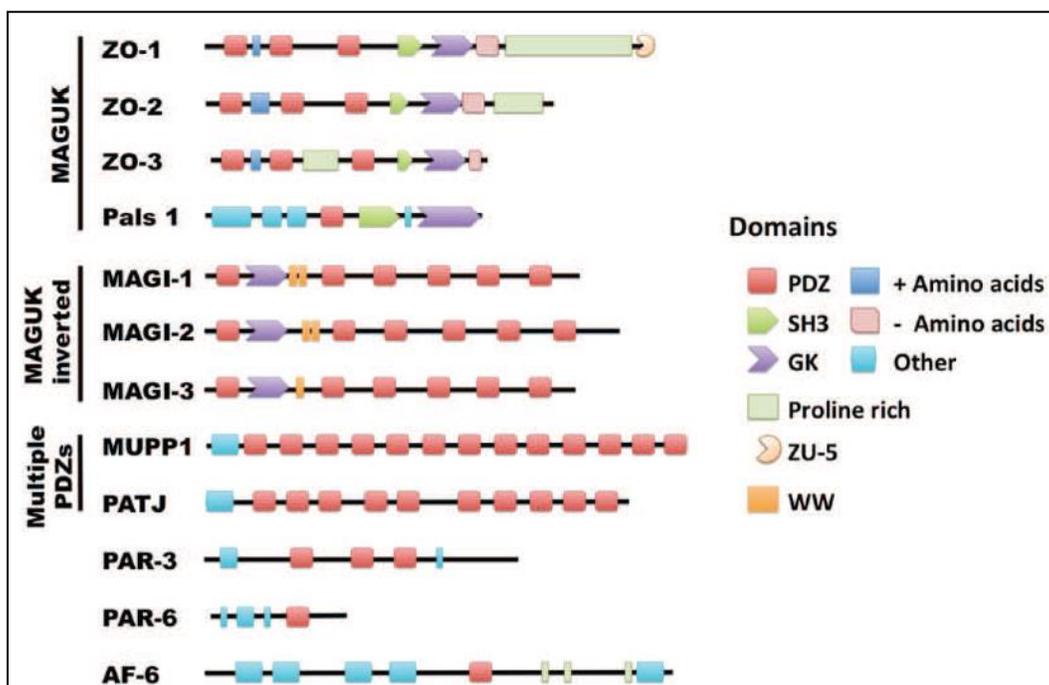


Figura 2. Representación esquemática de las proteínas periféricas de la UE con dominios PDZ. Las proteínas pertenecientes a la familia MAGUK contienen dominios SH3, GK y PDZ. Las proteínas MAGI son semejantes a las MAGUK pero tienen la mayoría de sus dominios PDZ

3) ZO-2

ZO-2 es una proteína de 160 kDa de la familia MAGUK que se descubrió porque co-immunoprecipita con ZO-1 (Gumbiner et al., 1991). El gen *TJP2* que codifica para ZO-2 se encuentra en el cromosoma humano 9q21.11 (Walsh et al., 2010).

3.1) Organización molecular de ZO-2

En la porción amino de ZO-2 se localizan 3 dominios PDZ; en la región central se ubican los dominios SH3 y GK y en la región carboxilo se presentan un dominio ácido y otro rico en prolinas que en conjunto constituyen una región de unión a actina. Además, en el extremo carboxilo terminal se encuentra el motivo TEL de unión a dominios PDZ [para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2000)] (Fig. 3).

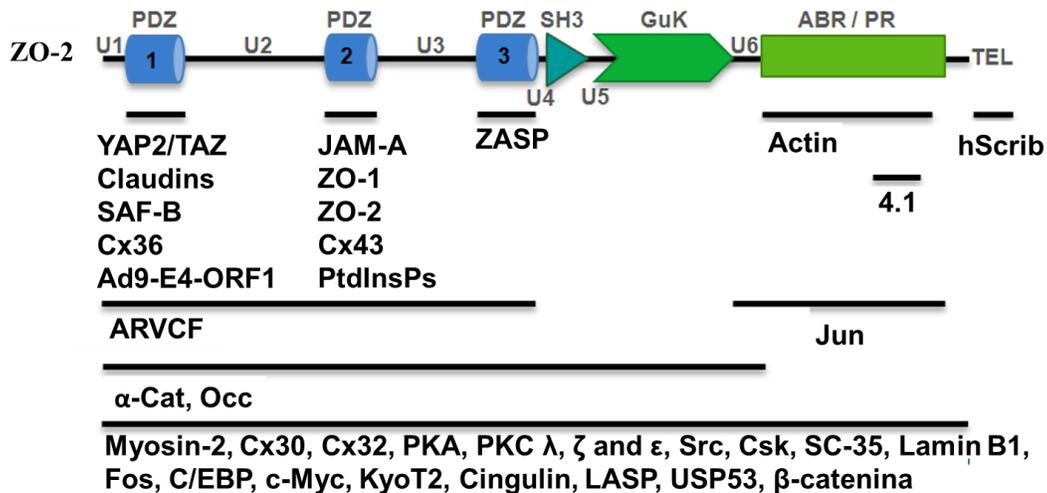


Figura 3. Esquema de la organización molecular de ZO-2 y su interacción con otras moléculas. En el esquema se ilustran en la parte superior los dominios y regiones de ZO-2 y abajo aparecen las proteínas con las que interactúa. Las líneas delimitan el segmento de ZO-2 al que se asocian distintas proteínas del citoesqueleto, de los contactos celulares, cinasas, factores de transcripción y nucleares. [Imagen tomada de (Gonzalez-Mariscal et al., 2016)].

3.2) Interacción de ZO-2 con otras moléculas

ZO-2 es una proteína plataforma que se asocia a través de sus diferentes dominios a una gran variedad de proteínas. En la tabla 1 se indican en detalle todas las interacciones de ZO-2. Pero a manera de resumen podemos decir que si dividimos a la molécula ZO-2 en dos, la mitad amino de ZO-2 se une a proteínas de los contactos célula-célula, mientras que la mitad carboxilo se une al citoesqueleto de actina (Fig. 3).

Tabla 1. Interacción de ZO-2 con otras proteínas

Proteína (PM KDa)	Función	Sitio de unión en ZO-2	Sitio de unión en la proteína asociada	Método	Ref
Proteínas de los contactos celulares					
Claudinas (22-24)	UE, proteína integral	PDZ-1	Motivo YV en C-terminal	Pareja justa Arrastre IP	(Itoh et al. 1999)
Ocludina (65)	UE, proteína integral	Amino	C-terminal	IP	(Itoh et al. 1999; Wittchen et al. 1999)
JAM-A (32-43)	UE, proteína integral	PDZ-2	Motivo FLV en C-terminal	Co-IP	(Monteiro, et al. 2013)
Conexinas (25-65)	UC, proteína integral	PDZ-2	C-terminal	IP Arrastre Co-L	(Singh et al. 2005)
Cingulina (140)	UE, proteína adaptadora	Amino	ND	PD IP	(Cordenonsi et al. 1999)
ZO-1 (210)	UE, proteína adaptadora	PDZ-2	PDZ-2	IP	(Itoh et al. 1999; Wittchen et al. 1999)
ZO-2 (160)	UE, proteína adaptadora	PDZ-2	PDZ-2	IP	(Itoh et al. 1999; Wittchen, et al. 1999)
AMOTL (106)	UE, proteína adaptadora	ND	ND	IP	(Oka et al. 2012)
α -catenina (100)	UA, proteína adaptadora	Amino	ND	IP	(Itoh et al. 1999)
β -catenina (100)	UA, proteína adaptadora	ND	ND	Duolink, IP	(Wetzel et al. 2016)
Proteínas del citoesqueleto					
Actina (42)	Anillo cortical actino-miosina	ND	ND	Co-Sed Co-L	(Wittchen et al. 1999)
4.1R (135, 150)	Citoesqueleto de membrana	Aa 1054- 1118	Últimos 96 aa C- terminal	DH IP	(Mattagajasingh /et al. 2000)

Espectrina (274)	Citoesqueleto de membrana	ND	ND	IP	(Meerschaert et al. 2009)
Miosina 2 (223)	Cinturón cortical actino-miosina	ND	ND	Co-L ARNsi	(Yamazaki et al. 2008)
Oncoproteínas					
TAZ (44)	Ruta hippo <i>Drosophila sp</i>	PDZ-1	muPDZ C-terminal	IP Arrastre	(Remue et al. 2010)
YAP2 (65)	Ruta hippo humana	PDZ1	muPDZ C- terminal	IP Pareja justa	(Oka, Remue et al. 2010)
ARVCF (104)	Mutada en síndrome Di George	PDZ	muPDZ	Co-L	(Kausalya, Phua et al. 2004)
LASP (29)	Migración celular	Dominio rico en prolinas	Dominio SH3	ELP	(Mihlan,Reiss et al. 2013)
Proteínas supresoras tumorales					
hScrib (175)	Supresor tumoral	muPDZ TEL	PDZ	DH EM IP	(Metais et al. 2005)
Proteínas de señalización					
PKA (40)	Serin/treonin cinasa	ND	ND	IP	(Avila-Flores et al. 2001)
PKC (60-70)	Serin/treonin cinasa	ND	ND	IP	(Avila-Flores et al. 2001)
JAK1 (133)	Tirosin cinasa	N-terminal	ND	ME	(Tkachuk et al. 2011)
Src (60)	Tirosin cinasa	ND	ND	IP	(Saito et al. 2008)
Csk (50)	Tirosin cinasa	Región Tyr	SH2	IP	(Saito et al. 2008)
Factores nucleares					
SAF-B (102)	Organización de cromatina y represión transcripcional	PDZ-1	ND	DH IP	(Traweger, Fuchs et al. 2003)

ZASP (24)	Moteados nucleares	PDZ3	muPDZ	DH IP Arrastre	(Lechuga et al. 2010)
SC-35 (35)	Procesamiento alternativo	ND	ND	Co-L	(Islas et al. 2002)
Lámina B1 (68)	Matriz nuclear	ND	ND	IP	(Jaramillo et al. 2004)
Factores de transcripción					
Jun (35)	Transcripción	ND	ND	IP Co-L	(Betanzos et al. 2004)
Fos (40)	Transcripción	ND	ND	IP Co-L	(Betanzos et al. 2004)
C/EBP (37)	Transcripción	ND	ND	IP Co-L	(Betanzos et al. 2004)
KyoT2 (36)	Transcripción	ND	Dominio LIM2	DH Arrastre	(Huang et al. 2002)
c-myc (48)	Transcripción	ND	ND	IP ChIP	(Huerta et al. 2007)
Proteínas virales					
TBEVNS5 (900)	Replicación del virus de la encefalitis por garrapatas	PDZ-1	muPDZ	IP	(Melik et al 2012)
Lípidos					
PtdIns	Señalización por lípidos	PDZ-2	ND	IP	(Meerschaert et al. 2009)

IP, inmunoprecipitación; Co-sed, co-sidimentación; ChIP, inmunoprecipitación de la cromatina; DH, doble híbrido; ND, no determinado; Co-L, cromatografía líquida; EM, espectrometría de masas; ARNsi, silenciamiento de ARN; muPDZ, motivo de unión a dominios PDZ.

3.3) Localización y tráfico intracelular de ZO-2

En las células epiteliales, ZO-2 se encuentra en la UE de los cultivos confluentes, y en el núcleo y la UE de los cultivos subconfluentes (Islas et al., 2002). El tráfico intracelular de ZO-2 se regula por el ciclo celular. Así, ZO-2 entra al núcleo al final de la fase G1 y sale durante la mitosis. Esto explica porque ZO-2 no se encuentra en el núcleo de los cultivos confluentes y únicamente se concentra ahí en los cultivos subconfluentes en proliferación (Tapia et al., 2009).

Para desplazarse, ZO-2 emplea señales de localización y exportación nuclear (NLS y NES, por sus siglas en inglés). ZO-2 canina (cZO-2) posee cuatro NES, dos localizadas en el PDZ-2 y dos en el dominio GK (Gonzalez-Mariscal et al., 2006). Las cuatro NES son funcionales y la fosforilación en la S369 localizada en la NES-1 por la nueva proteína cinasa C ϵ (nPKC ϵ) es crítica para la exportación nuclear de ZO-2 (Chamorro et al., 2009). De igual manera, ZO-2 tiene dos NLS bipartitas (bpNLS) y una monopartita en la región U2 presente entre los dominios PDZ-1 y PDZ-2. Además, ZO-2 posee dieciséis repetidos de serina y arginina (SR) (Jaramillo et al., 2004) que dirigen a las proteínas a los moteados nucleares (Hedley et al., 1995). La bpNLS-2 posee tres residuos de serina (S257, S259 y S261) que al fosforilarse bloquean el funcionamiento de la señal y retardan la importación de ZO-2 al núcleo (Quiros et al., 2013) (Fig. 4).

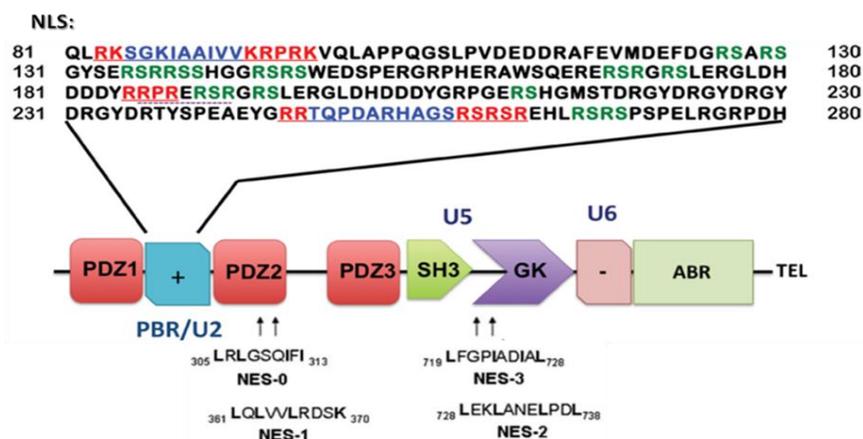


Figura 4. Representación esquemática de las NLS y NES de ZO-2 canina. cZO-2 tiene 4 NES, dos localizadas en el PDZ-2 y otras dos en el dominio GK. Además, en la región U2 posee 2 NLS bipartitas y una monopartita (letras de color rojo) y 16 repetidos SR (letras en color verde). [Modificado de (Gonzalez-Mariscal et al., 2006; Quiros et al., 2013)].

La unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a su receptor en la membrana basolateral de las células epiteliales, induce la activación de AKT que favorece la autofosforilación de la cinasa SRPK, que fosforila a los residuos SR. Dicha fosforilación induce la entrada de ZO-2 al núcleo y su acumulación en moteados (Quiros et al., 2013). La fosforilación de la NES-1 de ZO-2 por la nPKC ϵ en la S369 (Chamorro et al., 2009), así como la O-GlcNAcación de la S257 que se ubica en la bNLS-2, inducen la exportación de ZO-2 del núcleo al citoplasma (Quiros et al., 2013) (Fig. 5).

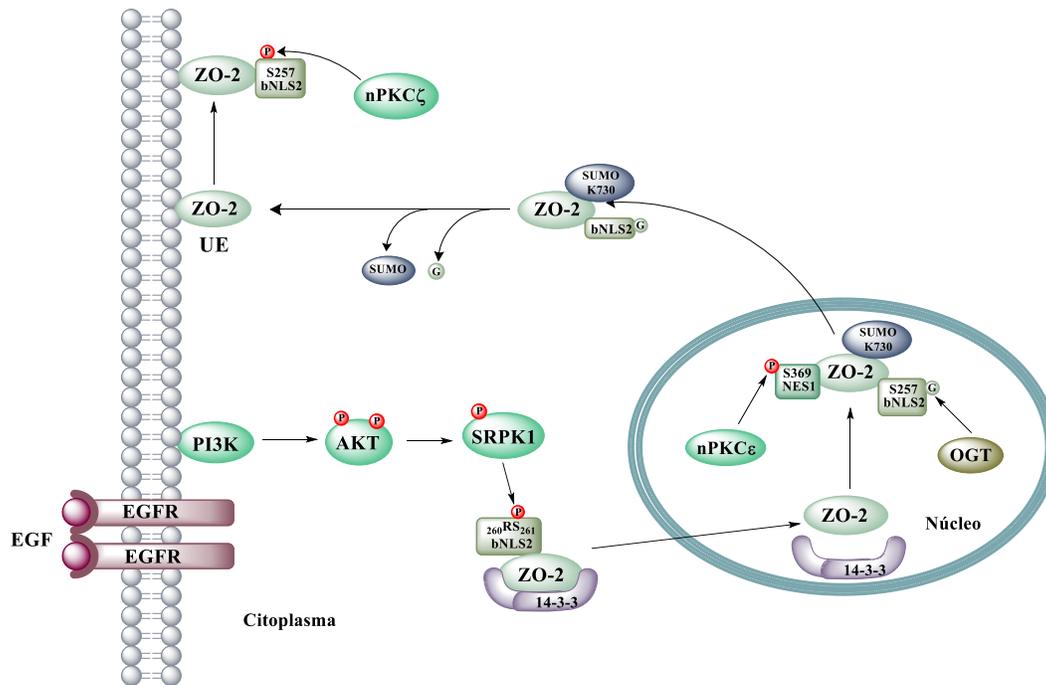


Figura 5. Esquema del tráfico intracelular de ZO-2. En los cultivos subconfluentes la activación del EGFR por el EGF activa a AKT, que induce la autofosforilación de la cinasa SRPK1. Esta cinasa, fosforila a los residuos SR de ZO-2 induciendo la entrada de esta proteína al núcleo y su concentración en moteados. La activación de la NES-1 por la fosforilación de la S369 mediada por la nPKC ϵ junto con la O-GlcNAcación en la S257 localizada en la bNLS-2 y la sumoilación de la K730, inducen la exportación de ZO-2 del núcleo (Imagen modificada de Quiros *et al.*, 2013).

El movimiento de ZO-2 también se regula por SUMOilación, ya que la mutación del sitio de sumoilación en la lisina 730, induce la acumulación nuclear de ZO-2. En cambio, la sumoilación constitutiva de ZO-2 en el extremo amino induce la concentración de la proteína en el citoplasma (Wetzel et al., 2017). Estas observaciones en conjunto sugieren que la

sumoilación de ZO-2 en la lisina 730 ocurre en el núcleo y se requiere para la exportación de la proteína del núcleo.

En el citoplasma ZO-2 se asocia a la proteína 14-3-3. Esta interacción protege a ZO-2 citosólica de la degradación en el proteosoma y promueve su importación al núcleo (Amaya et al., 2019) donde se mantiene una reserva importante de ZO-2 en las células que aún no forman sus UE (Chamorro et al., 2009). El movimiento de ZO-2 al borde celular depende de la presencia de Ca^{+2} en el medio externo. Así cuando las células se siembran en un medio con bajo calcio (LC, 1-5 μM de Ca^{+2}) ZO-2 se localiza en el citoplasma y el núcleo (Amaya et al., 2019; Islas et al., 2002), pero cuando se transfieren a un medio con Ca^{+2} normal (NC, 1.8 mM de Ca^{+2}), ZO-2 se desplaza a las UEs (Amaya et al., 2019). Este proceso también conocido como cambio a calcio (CS), induce la formación de los filamentos de la UE que se ven por criofractura, y el desarrollo de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) (Gonzalez-Mariscal et al., 1985). La formación de las UEs en el CS ocurre aún en ausencia de síntesis de proteínas, lo que indica que en el medio con bajo calcio, los componentes de la UE ya están sintetizados, pero aún no se han ensamblado (Gonzalez-Mariscal et al., 1990). La presencia de Ca^{+2} en el medio activa al receptor sensor de Ca^{+2} (CaSR) y a una cadena de señalización río abajo que incluye secuencialmente a la subunidad $\alpha_{q/11}$ de la proteína G, la fosfolipasa C y la nPKC ϵ que fosforila a ZO-2 y a la cinasa sin lisina-4 (WNK4). Esta cinasa a su vez fosforila a ZO-2 y provoca su liberación de 14-3-3 e integración a la UE (Amaya et al., 2019) (Fig. 6).

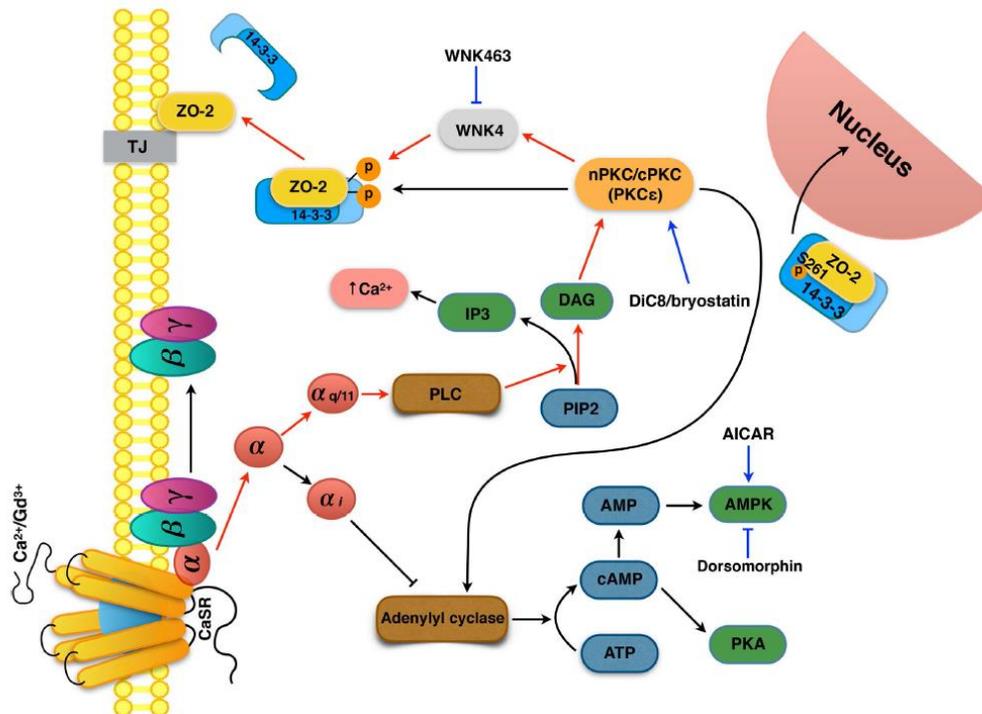


Figura 6. Esquema de la cascada de señalización que inicia con la activación del CaSR y que induce el arribo de ZO-2 a la UE. La presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular activa al CaSR presente en la membrana plasmática. Este receptor está acoplado a una proteína G cuya subunidad $G_{\alpha_{q/11}}$ inicia la cascada de señalización que lleva a la activación de la nPKCε. Esta cinasa fosforila a la cinasa WNK4, que a su vez fosforila a ZO-2 provocando su separación de la proteína 14-3-3 e integración a la UE. El residuo 261 de ZO-2, localizado en una NLS, se une a 14-3-3σ y ζ que facilitan la importación de ZO-2 al núcleo. Líneas rojas, vía de señalización que conduce al reclutamiento de ZO-2 al borde celular. (Imagen tomada de Amaya et al., 2019)

4) Función nuclear de ZO-2

4.1) Interacción de ZO-2 con proteínas y lípidos nucleares

ZO-2 en el núcleo se asocia a la matriz nuclear y se une a la lámina B1 y a la actina (Jaramillo et al., 2004). A través de su segundo dominio PDZ, ZO-2 se une al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), que se concentra en los moteados nucleares y de esta manera estabiliza a estos gránulos de intercromatina (Meerschaert et al., 2009), donde se lleva a cabo la transcripción y el procesamiento alternativo del mRNA [para revisión ver (Galganski et al., 2017)]. ZO-2 co-localiza en los moteados con la proteína esencial del procesamiento alternativo SC-35 (Islas et al., 2002), con la proteína ZASP (ZO-2 associated speckle protein) (Lechuga et al., 2010), y con el factor SAF-B (Traweger et al., 2003). Este último se une a las cajas-E de distintos promotores (Lin et al., 2008), donde recluta a

deacetilasas de histonas induciendo la compactación del DNA y el bloqueo de la transcripción (Townson et al., 2004).

Cuando se observó que ZO-2 se concentraba en los moteados nucleares (Islas et al., 2002), se planteó la posibilidad de que interactuara con los factores de transcripción, que ahí se acumulan (Galganski et al., 2017). Algunos factores de transcripción poseen una región conocida como cremallera de leucinas, que es necesaria para su unión al DNA, y para la interacción con otras proteínas con cremallera de leucinas [para revisión ver (Baxevanis and Vinson, 1993)]. Estas cremalleras son regiones donde se encuentran leucinas espaciadas cada 7 aminoácidos, y a las que precede una zona básica que se caracteriza por la presencia de un residuo de asparagina y otro de arginina. ZO-2 tiene una cremallera putativa de leucinas en el dominio GK compuesta por una región de 4 leucinas (L823, 830, 837 y 844 en cZO-2) con el espaciamiento de acuerdo al consenso (Jesaitis and Goodenough, 1994), a la que precede una región básica donde en cZO-2 la asparagina se conserva (Asn798), mientras que en lugar de la arginina se encuentra una lisina, otro aminoácido básico (Gonzalez-Mariscal et al., 2017). Por esta razón, se evaluó si ZO-2 podía unirse a factores de transcripción. Mediante ensayos de arrastre y de retardamiento electroforético se descubrió que ZO-2 interactúa con los factores de transcripción JUN, Fos y C/EBP, y no con otros factores con cremallera de leucinas como CREB y el factor embrionario tirotrófico (TEF-1), ni con factores de transcripción sin cremallera de leucinas como YY1, NF-1, p53 y Oct-2 (Betanzos et al., 2004).

4.2) Interacción de ZO-2 con JUN y Fos

Los factores de transcripción JUN y Fos pertenecen al grupo de genes tempranos de activación inmediata que permiten la traducción de estímulos a un fenotipo transiente [para revisión ver (Healy et al., 2013)]. JUN y Fos requieren heterodimerizarse para formar al factor de transcripción AP-1. Este factor se une a la secuencia consenso 5'TGAG/CTCA-3' en el DNA, denominada elemento de respuesta al éster de forbol TPA (TRE por sus siglas en inglés) (Healy et al., 2013). El factor AP-1 tiene funciones críticas en diferentes procesos celulares como la inflamación, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis [para revisión ver (Gazon et al., 2017)] . Con base en esta información, se evaluó si ZO-2 inhibía la actividad transcripcional del factor AP-1. Para ello, se utilizó un gen reportero con un

promotor artificial regulado por 5 sitios AP-1, y se encontró que ZO-2 inhibe de manera dosis-dependiente la transcripción mediada por este factor (Betanzos et al., 2004).

4.3) ZO-2 inhibe la transcripción de CD1

Posteriormente, se analizó si ZO-2 inhibe la transcripción regulada por promotores naturales con sitios de unión a AP-1. Como modelo se escogió al promotor humano de la ciclina D1 (hCD1), ya que posee un sitio TRE funcional en la región -954 (Albanese et al., 1995). Mediante un ensayo de gen reportero se encontró que ZO-2 inhibe la transcripción controlada por el promotor de hCD1 de manera dosis-dependiente. De igual manera, se vio que al sobreexpresar a ZO-2 disminuye la cantidad de CD1 a nivel de mRNA y proteína (Huerta et al., 2007). Para confirmar que ZO-2 regula al promotor hCD1, a través del sitio TRE, éste se mutó encontrándose que aún en esta condición ZO-2 inhibe la transcripción regulada por este promotor. En consecuencia, se hicieron experimentos de gen reportero con deleciones de distintos segmentos del promotor, encontrándose que ZO-2 se une a la región -553 a -548 en la que se encuentra una caja E. Mediante un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina se confirmó que ZO-2 se une a esta caja E del promotor hCD1 (Huerta et al., 2007). A las cajas-E se asocian diversos factores de transcripción, incluyendo c-Myc, por ello mediante una inmunoprecipitación de la cromatina se confirmó la unión de c-Myc a esta caja E del promotor hCD1. Además, se vio que c-Myc co-inmunoprecipita con ZO-2 (Huerta et al., 2007). Dado que la represión transcripcional se caracteriza por el reclutamiento de deacetilasas de histonas (HDACs), se evaluó también su presencia, encontrándose que HDAC1 se asocia al complejo ZO-2/c-Myc/caja-E que inhibe la transcripción de la CD1 (Huerta et al., 2007). Así mismo, se descubrió que la proteína ZASP se une a ZO-2 y al complejo c-Myc/caja-E/HDAC y revierte la inhibición de la transcripción de la CD1 (Lechuga et al., 2010).

4.4) ZO-2 favorece la degradación de la CD1

Como ZO-2 inhibe la transcripción de la CD1, se evaluó su efecto sobre la proliferación celular. Así, se observó que la sobre-expresión de ZO-2 silencia la expresión de la proteína CD1 y arresta a las células en la fase G1 del ciclo celular (Tapia et al., 2009). Sin embargo, en los cultivos sincronizados la sobre-expresión de ZO-2 no altera la cantidad

de mRNA de CD1 (Tapia et al., 2009). Por ello, se estudió si ZO-2 afecta la estabilidad de CD1, encontrándose que ZO-2 incrementa la degradación de la CD1 en el proteosoma de manera dosis dependiente (Tapia et al., 2009). La fosforilación de la Thr286 de la CD1 por la cinasa GSK-3 β , genera la exportación nuclear, ubiquitinación y degradación de la CD1 en el proteosoma (Diehl et al., 1998). Como la actividad de la cinasa GSK-3 β , se inhibe cuando se fosforila en la Ser9 (Cross et al., 1995), se evaluó si la sobreexpresión de ZO-2 afectaba esta fosforilación. Se encontró que la sobreexpresión de ZO-2 disminuye la fosforilación inhibitoria de GSK-3 β , lo que explica porque en esta situación la CD1 se degrada (Tapia et al., 2009).

4.5) ZO-2 inhibe la transcripción activada por la ruta Wnt

La cinasa GSK-3 β también forma parte de la vía de señalización Wnt [para revisión ver (Nusse and Clevers, 2017)]. En ausencia del ligando Wnt, GSK-3 β interactúa con las proteínas plataforma APC y Axina1, y fosforila a la β -catenina, promoviendo su ubiquitinación y degradación vía proteosoma. Por otra parte, en presencia del ligando Wnt, el complejo de destrucción de la β -catenina se ancla a la membrana y se inhibe la degradación de la β -catenina, lo que genera su translocación al núcleo donde se une al factor de transcripción TCF/LEF y promueve la transcripción de diversos genes blanco de la vía Wnt (Li et al., 2012).

Utilizando un promotor artificial con 4 sitios TCF/LEF o el promotor del gen *Siamois*, un gen blanco de la vía Wnt, se demostró que la sobreexpresión de ZO-2 disminuye la actividad transcripcional del complejo β -catenina/TCF de manera dosis-dependiente (Tapia et al., 2009). Así mismo se vio que al sobreexpresar a ZO-2 disminuye el mRNA de la Axina2, un gen blanco de la vía Wnt. (Tapia et al., 2009).

Para evaluar si ZO-2 inhibe *in vivo* a la vía Wnt, se utilizó un modelo de nefropatía murina inducida por adriamicina, un antibiótico que activa a la vía Wnt en los podocitos y genera proteinuria y el silenciamiento de la nefrina, una proteína crítica de la unión en hendidura de los podocitos (Dai et al., 2009). Se encontró que la transfección hidrodinámica de ZO-2 en los ratones tratados con adriamicina, previene la pérdida de la expresión de la nefrina, el daño estructural a los podocitos y la proteinuria, y aumenta la degradación de la

β -catenina (Bautista-Garcia et al., 2013). Por ello, con este conjunto de resultados se concluyó que ZO-2 inhibe *in vitro* e *in vivo* la transcripción activada por la ruta Wnt.

Para confirmar la importancia de la presencia de ZO-2 en el núcleo para inhibir la transcripción promovida por la ruta Wnt, se generó una construcción de ZO-2 constitutivamente sumoilada, que no puede entrar al núcleo, así como otra donde ZO-2 se concentra en el núcleo porque contiene varias NLS del virus SV40 (ZO-2-NLS). En ensayos de gen reportero con un promotor artificial con 4 sitios TCF/LEF o con el promotor del gen *Siamois* se observó que la ZO-2 sumoilada y citosólica no reprime la actividad transcripcional de la β -catenina, mientras que la ZO-2-NLS inhibe por completo la actividad transcripcional del complejo β -catenina/TCF. Sin embargo, al utilizar una construcción del factor de transcripción LEF que carece del sitio de unión a la β -catenina y en cambio posee el dominio transactivador del virus del herpes VP16, se observó que tanto ZO-2 como ZO-2-NLS inhiben la actividad transcripcional de un promotor artificial regulado por sitios LEF/TCF. Esto indica que ZO-2 también puede inhibir la transcripción regulada por sitios LEF/TCF de manera independiente de la β -catenina (Wetzel *et al.*, 2016).

4.6) ZO-2 inhibe la transcripción activada por Yap/TEAD y Yap/RUNX2

Las células MDCK carentes de ZO-2 (ZO-2 KD) son de mayor tamaño que las células parentales (Dominguez-Calderon et al., 2016). La hipertrofia de estas células se genera por dos mecanismos: 1) Dependiente del ciclo celular, ya que al no haber ZO-2 sube la expresión de CD1 pero no de Ciclina E y esto genera un desbalance que aumenta el tiempo que las células pasan en la fase G1. 2) Independiente del ciclo celular, por la acumulación nuclear del co-factor transcripcional YAP, el efector final de la vía Hippo (Huang et al., 2005). Esta vía es una cadena de cinasas presente desde *Drosophila* hasta humanos que comienza con la proteína plataforma SAV1 (*Salvador*, ortólogo en *Drosophila*) y la cinasa MST 1/2 (*Hippo*, ortólogo en *Drosophila*). Cuando esta cinasa se activa fosforila a la cinasa LATS 1/2 (*Warts*, ortólogo en *Drosophila*) que se asocia a la proteína plataforma MOB1a/b (*Mats* ortólogo en *Drosophila*). Enseguida, la cinasa LATS 1/2, fosforila a la proteína YAP (*Yorkie* ortólogo en *Drosophila*). Cuando YAP se fosforila se une a la proteína 14-3-3 y se mantiene secuestrada en el citoplasma o se degrada (Zhao et al., 2007).

Cuando la vía Hippo se apaga, las fosforilaciones secuenciales no suceden y YAP se transloca al núcleo. YAP no se une al DNA directamente y en cambio se asocia a factores de transcripción. El 75% de YAP se une al DNA a través del factor de transcripción TEAD, sin embargo, otros factores de transcripción también se unen a YAP, como p73 (Strano et al., 2001), ERBB4 (Komuro et al., 2003), EGFR-1 (Zagurovskaya et al., 2009), RUNXs (Qiao et al., 2016) y SMADs (Ferrigno et al., 2002).

La ausencia de ZO-2 induce hipertrofia porque inhibe a la vía Hippo y entonces YAP entra al núcleo y promueve la transcripción de la subunidad catalítica de la cinasa PI3K (Lin et al., 2015) y del miRNA-29 que inhibe la traducción de la fosfatasa PTEN (Tumaneng et al., 2012). En conjunto esto genera un incremento de PIP3 y la subsecuente activación de AKT y de la ruta mTOR (Dominguez-Calderon et al., 2016). Esto lleva a la fosforilación de la cinasa S6K y de su blanco S6 que promueve la síntesis de proteínas y aumenta el cociente de proteína/DNA que conduce a hipertrofia (Ohanna et al., 2005).

Por las observaciones anteriores se evaluó si ZO-2 inhibe la actividad transcripcional de YAP. Así, se demostró que en ausencia de ZO-2 sube la actividad transcripcional de un promotor artificial regulado por 8 sitios TEAD y del promotor natural del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), regulado por 3 sitios TEAD. En cambio, la sobreexpresión de ZO-2 inhibe la actividad transcripcional de dichos promotores (Dominguez-Calderon et al., 2016). Con base en esta evidencia se concluyó que ZO-2 también inhibe la transcripción mediada por TEAD.

ZO-2 también inhibe la actividad transcripcional regulada por sitios RUNX2 (Oka et al., 2010). El factor de transcripción RUNX2 actúa como activador o represor transcripcional, dependiendo de las modificaciones post-traduccionales que contenga o de las proteínas con las que interactúe [para revisión ver (Mevel et al., 2019)]. En las células epiteliales, la activación del promotor de osteocalcina se regula por el complejo YAP/RUNX2 y esta actividad la inhibe ZO-2 de manera dosis dependiente (Oka et al., 2010).

5) El factor de transcripción TEAD

En los mamíferos hay 4 factores de transcripción muy conservados de la familia TEA-domain (TEAD)/Transcriptional enhancer factor (TEF). La función de cada uno de estos

factores TEAD es aún controversial. TEAD1, como su número lo indica fue el primero en ser descrito (Xiao et al., 1991) y en los humanos su inactivación se asocia con la degeneración de la coroides y la retina en la atrofia corioretinal de Sveinsson (Fossdal et al., 2004). En los murinos, la ausencia de TEAD1 produce muerte embrionaria por defectos en el desarrollo del corazón (Chen et al., 1994). El KO murino de TEAD2 no tiene un fenotipo aparente (Sawada et al., 2008), aunque ciertos datos sugieren que tiene alteraciones en el cierre del tubo neural (Kaneko et al., 2007), y de hecho, el doble KO murino de TEAD1 y TEAD2 es letal por problemas en el cierre del tubo neural (Sawada et al., 2008). En cambio, los ratones sin TEAD4 no son viables por defectos en la implantación del embrión (Yagi et al., 2007).

5.1) Coactivadores de TEAD independientes de la vía Hippo

Algunos coactivadores independientes de la vía Hippo regulan al factor de transcripción TEAD. Por ejemplo, VGLL4 interactúa con TEAD a través de un tándem de dominios TONDU, a través del cual inhibe la unión de TEAD a YAP (Jiao et al., 2014; Pobbati et al., 2012).

5.2) Interacción de TEAD con otros factores de transcripción

TEAD también interactúa con TCF4, un factor de transcripción de la vía Wnt. La unión de TEAD con TCF4 facilita la expresión de los genes blanco de la vía Wnt (Jiao et al., 2017). TEAD también interactúa con la familia de los receptores a esteroides p160 y esta asociación potencia la actividad transcripcional de TEAD (Belandia and Parker, 2000). Así mismo, TEAD interactúa con el complejo AP-1, conformado por Jun y Fos. TEAD y AP-1 se unen al mismo sitio en la cromatina, y son necesarios para la activación de algunos genes blanco de TEAD (Liu et al., 2016; Zanconato et al., 2015).

5.3) Modificaciones post-traduccionales de TEAD

El factor de transcripción TEAD sufre dos modificaciones post-traduccionales. La primera es la palmitoilación. Esta modificación agrega el ácido graso palmitato, a los residuos de cisteína. La palmitoilación regula el tráfico de proteínas, su localización en la membrana y la señalización. (Resh, 2006). TEAD tiene palmitoilación intrínseca, lo que le permite auto-palmitoilarse en una cisteína que se ha conservado en todas las isoformas de TEAD (Chan et

al., 2016; Noland et al., 2016). La palmitoilación no altera la localización subcelular de TEAD, sin embargo, es necesaria para su interacción con YAP y TAZ y no así con VGLL4 (Chan et al., 2016).

La segunda modificación de TEAD es la fosforilación. En los cardiomiocitos, TEAD interactúa con el factor de transcripción Max y ambos se unen al promotor del gen de la cadena pesada α de la miosina cardiaca (α -MHC) y promueven su transcripción. Este promotor se activa cuando TEAD y MAX se unen a un motivo híbrido compuesto por una caja E y un motivo M-CAT (Gupta et al., 1994). PKA fosforila a TEAD en la serina 102 y esto potencia la expresión del gen de la α -MHC (Gupta et al., 2000). TEAD también se regula por las proteínas cinasas C, pues al inhibir a estas cinasas, la actividad transcripcional de TEAD sube, mientras que la sobreexpresión de las isoformas nPKC δ y cPKC γ inhibe su actividad transcripcional (Jiang et al., 2001).

5.4) La localización subcelular de TEAD regula la transcripción

En los embriones de ratón, la localización subcelular de TEAD es crítica para la diferenciación de las células totipotenciales embrionarias hacia el trofoectodermo o la masa celular interna. Así, en las células troncales embrionarias (mESC) TEAD se localiza en el citoplasma, mientras que en las células troncales del trofoblasto (mTSC) TEAD se concentra en el núcleo donde activa un programa de transcripción específico del trofoectodermo (Home et al., 2012).

El estrés celular activa a la vía Hippo, que incrementa la fosforilación de YAP lo que bloquea su importación nuclear, e inhibe la transcripción mediada por TEAD. Entre las condiciones de estrés que inducen este efecto se encuentran la alta densidad celular, el desprendimiento de las células del sustrato y el estrés osmótico (Lin et al., 2017). El estrés hiperosmótico activa a la MAP cinasa p38, que se une a TEAD y promueve la salida de TEAD del núcleo hacia el citoplasma (Lin et al., 2017). La cinasa p38 no fosforila directamente a TEAD ya que este factor es un sustrato pobre para p38, sin embargo, la actividad de la cinasa es necesaria para promover la salida de TEAD del núcleo, lo que sugiere la participación de otra proteína blanco de p38 (Lin et al., 2017). La localización citoplásmica de TEAD impide la translocación al núcleo de YAP/TAZ de forma

independiente a su fosforilación (Chan et al., 2009; Diepenbruck et al., 2014; Lin et al., 2017).

6) ZO-2 y el cáncer

Desde hace muchos años se sabe que en los tejidos cancerosos se altera la citoarquitectura y se pierden los contactos célula-célula (Kalluri and Weinberg, 2009), y más recientemente se ha visto que estos tejidos silencian la expresión de diversas proteínas de la unión adherente y la UE.

Con respecto a ZO-2, las siguientes evidencias sugieren que actúa como una proteína supresora tumoral:

1) ZO-2 posee una alta homología con la proteína MAGUK Discs large (Dlg) de *Drosophila* (Jesaitis and Goodenough, 1994). Esta es una proteína supresora tumoral, cuyo silenciamiento en las moscas induce el crecimiento neoplásico de las células epiteliales de los discos imagales (Woods et al., 1996).

2) La expresión de ZO-2 disminuye o se abate en diversos tipos de cáncer, como los de mama, colon (Chlenski et al., 2000; Tokes et al., 2012), pulmón (Luczka et al., 2013), testículo (Fink et al., 2006), estómago (Kato et al., 2010) y ductos pancreáticos (Chlenski et al., 1999).

3) ZO-2 inhibe la transcripción del gen de la CD1 (Huerta et al., 2007) y promueve la degradación de la CD1 en las células epiteliales (Tapia et al., 2009). En conjunto estas acciones disminuyen la proliferación celular por un arresto en la transición de la fase G0/G1 a S del ciclo celular. Cabe resaltar, sin embargo, que este arresto no provoca un aumento en la apoptosis o la necrosis celular (Tapia et al., 2009).

4) El silenciamiento de ZO-2 altera la citoarquitectura epitelial y promueve la migración celular y la formación de fibras de estrés por activación de RhoA (Raya-Sandino et al., 2017). La formación de estas fibras es un pre-requisito para el avance de la transformación epitelio a mesénquima (TEM) (Tavares et al., 2017).

5) La proteína ZO-2 es blanco de oncoproteínas virales. Por ejemplo, la proteína E6 del virus del papiloma humano (HPV) en las variantes de alto riesgo, 16, 18, 31, 33, 35, 51 y 56, contiene en su extremo carboxilo terminal un motivo de unión a dominios PDZ con el que se une a ZO-2. En consecuencia, E6 deslocaliza a ZO-2 de la UE y la secuestra en el citoplasma y el núcleo y provoca un aumento en su vida media (Hernandez-Monge et al.,

2013; Thomas et al., 2016), a diferencia de lo que sucede con otros blancos de E6 como Dlg (Grm and Banks, 2004), MAGI (Grm and Banks, 2004), MUPP1 (Lee et al., 2000) y Scribble (Nakagawa and Huijbrechtse, 2000), a los que degrada la oncoproteína E6. Por otra parte, la oncoproteína viral E4-ORF1 del adenovirus tipo 9 (Ad9), se une a través de su motivo de unión a dominios PDZ al PDZ1 de ZO-2 y la secuestra en el citoplasma favoreciendo la TEM generada por el Ad9 (Glaunsinger et al., 2001).

II) Planteamiento del problema

ZO-2 inhibe la transcripción de genes con promotores regulados por cajas E, y sitios AP-1 y TEAD. ZO-2 no se une directamente al DNA, pero si interactúa con varios factores de transcripción. Ya que ZO-2 entra y sale del núcleo continuamente, en esta tesis nos preguntamos si estos movimientos de ZO-2 regulan el contenido nuclear del factor de transcripción TEAD.

III) Hipótesis

La entrada y salida de ZO-2 del núcleo modula el contenido nuclear del factor de transcripción TEAD.

IV) Objetivo General

Determinar si el movimiento de ZO-2 regula la cantidad de TEAD presente en el núcleo de las células epiteliales MDCK.

V) Material y métodos

5.1) Cultivo celular

Las células epiteliales de riñón de perro Madin-Darby (MDCK) parentales y ZO-2 KD fueron donadas generosamente por el Dr. Alan Fanning (Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, NC). Estas células expresan una mezcla de 3 shRNA diferentes contra ZO-2 en el vector pSuper. La clona estable IC5 usada en esta tesis, se obtuvo con base a su resistencia a Zeocina. Las células se cultivaron de acuerdo a lo reportado anteriormente (Gonzalez-Mariscal et al., 1985). Los cultivos subconfluentes y confluentes se sembraron respectivamente a una densidad de 2.5×10^4 y 3×10^5 células/cm².

Las células epiteliales IEC-18 derivadas de intestino delgado de rata (Cat. CRL-1589, Manassas, VA), se cultivaron en medio DMEM-F-12 (Cat. 12500-062, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) suplementado con 5% de suero fetal bobino y una mezcla de penicilina-estreptomicina 10,000 (U/ μ g/ml) (Cat. A-01 In Vitro, Mexico).

Las células epiteliales embrionarias derivadas de riñón humano, HEK-293T (ATCC, Cat. CRL-3216, Manassas, VA) se cultivaron en medio DMEM de alta glucosa (Cat. 11965-118, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) suplementado con 5% de suero fetal bovino y una mezcla de penicilina-estreptomicina 10,000 (U/ μ g/ml) (Cat. A-01 In Vitro, Mexico).

5.2) Transfecciones

Las transfecciones se hicieron con Lipofectamina 2000® (Cat. 11668-019, Life Technologies, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células parentales se transfectaron con las siguientes construcciones: 1) Flag-hZO-2 o Flag-hZO-2 Δ NLS contenidas en el plásmido p3XFlag con el promotor de CMV10 y la etiqueta de 3 x Flag. 2). Flag-hZO-2 y la construcción de nPKC δ silvestre (Plasmid 16386, addgene, Watertown, MA). 3) HA-cZO-2-MutNES presente en el vector pGW1 y con la etiqueta HA, elaborada previamente en el laboratorio de la Dr. Lorenza González-Mariscal (Gonzalez-Mariscal et al., 2006).

Las células ZO-2 KD se transfectaron con la construcción pTRE-hZO-2, donada generosamente por el Dr. Alan Fanning (University of North Carolina, Chapel Hill, NC), que corresponde a hZO-2 con mutaciones en el sitio de unión del shRNA.

Para generar la construcción hZO-2 Δ NLS en el plásmido p3XFLAG con el promotor de CMV10 y la etiqueta 3 x Flag, primero fue necesario liberar del vector p2XFLAG al inserto hZO-2 Δ NLS (donado generosamente por el Dr. Marius Sudol, National University of Singapore, Singapore) que carece de las pares de bases 313-873 de hZO-2 que codifican para el segmento U2 (aminoácidos 105-291), utilizando a las enzimas de restricción KpnI y XbaI. En un segundo paso se liberó con las mismas enzimas de restricción al inserto de hZO-2 completo, del vector p3XFLAG (donando generosamente por Otmar Huber, Jena

University, Germany). Finalmente, la construcción hZO-2 Δ NLS se insertó en el vector vacío p3XFLAG con el promotor CMV10 y la etiqueta 3 x Flag.

Las células HEK293T se tranfectaron con los segmentos amino (398-962 nt), 3PSG (1595-3019 nt), o AP (3029-3923 nt) de cZO-2, en el vector pcDNA4/HisMax (Betanzos et al., 2004).

El fabricante de la Lipofectamina indica que el tiempo óptimo después de la transfección para que una construcción se exprese como proteína es de 6 horas. Por ello, en nuestros experimentos este tiempo corresponde a la hora 0 después de la transfección.

5.3) Inmunofluorescencia

Las células se sembraron a subconfluencia o confluencia sobre cubreobjetos de vidrio. Para las inmunofluorescencias las monocapas se fijaron con formalina al 10% (vol/vol) en PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5 % por 15 min. Las monocapas se lavaron 3 veces con PBS y posteriormente se bloquearon por 1 hora con albúmina de suero bovino libre de inmunoglobulinas [Ig] (Research Organics, 1331-A; Cleveland, OH) al 1% (p/v) en PBS. Como anticuerpos primarios se utilizaron: un monoclonal de conejo contra TEAD (Cat. 12292, Cell Signaling, 1:200, Danvers, MA); monoclonales de ratón contra Flag (Cat. F3165, Sigma Aldrich, 1:1500, Darmstadt, Germany) y HA (Cat. H9658, Sigma Aldrich, 1:1000, Darmstadt, Germany); y un policlonal de conejo contra ZO-2 (Cat. 71-1400, Invitrogen, 1:200, Carlsbad, CA). Después de 3 lavados con PBS, las células se incubaron con los anticuerpos de burro anti-IgG de conejo acoplados a Alexa Fluor 488 (Cat. A21206, Invitrogen, 1:1000, Carlsbad, CA) o Alexa Fluor 594 (Cat. A21207, Invitrogen, 1:1000, Carlsbad, CA) y con los anticuerpos de burro anti-IgG de ratón acoplados a Alexa Fluor 488 (Cat. A11001, Invitrogen, 1:1000, Carlsbad, CA). Los núcleos se tiñeron con DAPI (Sigma-Aldrich, DUO-82040; St. Louis, MO). Las observaciones se realizaron en un microscopio Leica TCS SP8. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de TEAD en el núcleo se realizó utilizando ImageJ. Los núcleos teñidos con DAPI se utilizaron para definir la región donde posteriormente se cuantificaría la intensidad de la fluorescencia de TEAD.

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

El ensayo de ligación por proximidad (PLA, por sus siglas en inglés) *in situ* Duolink (Cat. DUO92101, Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) revela interacciones entre dos moléculas ubicadas entre sí a una distancia <40 nm. Para este ensayo se realizan los siguientes pasos: 1.- Fijación de las células sobre los cubreobjetos de vidrio. 2.- Adición de los anticuerpos primarios específicos para dos proteínas de interés hechos en especies distintas. 3.- Adición de anticuerpos secundarios acoplados a sondas de ADN complementarias. 4.- Ligación de las sondas de ADN que se encuentren a una distancia <40 nm para formar un DNA circular completo. 5.- Amplificación en círculo rodante del DNA circular que al excitarse a 596 nm se observará en color rojo. 6.- Observación de las muestras en el microscopio confocal y captura de las imágenes.

Para el ensayo de ligación por proximidad *in situ* Duolink[®] se utilizaron anticuerpos monoclonales de conejo contra TEAD (Cat. 12292, Cell Signaling, 1:200, Danvers, MA) y de ratón contra la etiqueta Flag (Cat. F3165, Sigma Aldrich, 1:1,500, Darmstadt, Germany). Después de la reacción de Duolink, las muestras se lavaron 3 veces con la solución amortiguadora B del Duolink. Posteriormente las células se tiñeron con un anticuerpo de burro contra IgG de ratón, acoplado al fluoróforo Alexa-Fluor488 para detectar a las células transfectadas con la construcción Flag-hZO-2.

El análisis cuantitativo del PLA se realizó con el programa BlobFinder (Allalou and Wahlby, 2009) desarrollado por el Centro de análisis de imágenes de la Universidad de Uppsala.

5.5) Western Blot

Los experimentos de Western blot, se realizaron de acuerdo a lo reportado anteriormente (Quiros et al., 2013), solo que ahora se utilizó la siguiente solución amortiguadora de radioinmunoensayo (RIPA): 25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% de Tritón X-100, 1% de deoxicolato de sodio y 0.1% de SDS. También se empleó una solución comercial amortiguadora de muestra (Cat. NP0008, Invitrogen, Carlsbad, CA), y una solución amortiguadora de corrida con la siguiente composición: 0.25 M Tris base; 1.9 M glicina y 0.5% SDS.

Para detectar por Western Blot a las proteínas específicas, se usaron los siguientes anticuerpos primarios: un monoclonal de conejo contra TEAD (Cat. 12292, Cell Signaling, 1:2000, Danvers, MA); monoclonales de ratón contra GAPDH (Cat. Sc-32233, Santa Cruz Biotechnology, 1:15,000, Santa Cruz, CA) y lamina B1 (Cat. 33-2000, Invitrogen, 1:2000, Carlsbad, CA); y un policlonal de conejo contra ZO-2 (Cat. 71-1400, Invitrogen, 1:2000, Carlsbad, CA).

Se emplearon anticuerpos secundarios hechos en cabra acoplados a la peroxidasa de rábano contra: IgG de conejo (Cat. A9169, Sigma Aldrich, 1:20,000, St Louis, MO) o IgG de ratón (Cat. 62-6420, 1:10,000, Invitrogen, Carlsbad, CA). Para revelar las membranas se usó el sistema de quimioluminiscencia Inmobilon Western (Merck Millipore, Cat. WBKLS0500, Darmstadt, Germany).

Para el ensayo de retardamiento de TEAD por fosforilación de, se realizó una SDS-PAGE con el compuesto fosfoafín Phos-Tag (Cat. AAL-107; Wako Pure Chemical Industries, Richmond, VA), siguiendo las instrucciones del fabricante. En el ensayo con Phos-tag no se puede estimar el peso molecular con marcadores, por lo que se utiliza una muestra defosforilada de la proteína de interés como control. Por ello, en la figura 11B se exhibe la banda de 50 kDa de TEAD después del tratamiento con la fosfatasa alcalina.

5.6) Fraccionamiento celular

Las fracciones nuclear y citosólica de las células parentales y ZO-2 KD, transfectadas o no con la construcción pTRE-hZO-2 se obtuvieron de acuerdo a un protocolo descrito anteriormente (Shaiken and Opekun, 2014). Brevemente, las células se lisaron en una solución isotónica amortiguadora A (HEPES 40 mM, pH 7.4, KCl 120 mM, EGTA 2 mM, glicerol 0.4%, β -glicerol fosfato 10 mM y NP-40 0.2%) y se mantuvieron en rotación constante por 30 min. a 4 °C. Enseguida, el lisado se centrifugó a 1000 g por 5 min y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 10,000 g por 10 minutos a 4 °C. Con esta centrifugación se obtuvo la fracción citosólica en el sobrenadante y en la pastilla se concentraron los núcleos. Esta última se resuspendió y lavó suavemente con NP-40 0.1% en la solución amortiguadora A sin detergente. Posteriormente la solución con los núcleos se

volvió a centrifugar a 1000 g por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y la pastilla de los núcleos se resuspendió en RIPA.

5.7) Tratamiento con fosfatasa alcalina

Las pastillas de núcleos obtenidas del fraccionamiento celular de los cultivos confluentes de las células MDCK, se resuspendieron en la solución amortiguadora NEB 3 (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM; Cat B7003S, New England Biolabs, Ipswich, MA). Enseguida, la solución de núcleos se sonicó e incubó por 30 min a 34 °C con 20 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Cat. M0290S; New England Biolabs, Ipswich, MA). Las muestras se procesaron posteriormente por Western blot.

5.8) Ensayo de arrastre de proteínas

Las células HEK293T se transfectaron con las construcciones de ZO-2 correspondientes a los segmentos amino (398-962 nt), 3PSG (1595-3019 nt), o AP (3029-3923 nt) de cZO-2, en el vector pcDNA4/HisMax (Betanzos et al., 2004). Las células se lisaron 24 horas después de la transfección, y el extracto celular se purificó por cromatografía de afinidad con columnas de níquel para atrapar la bandera de histidina (His-Tag) (Cat. COHISC-RO, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Las fracciones purificadas se corrieron en un gel de poliacrilamida, y se tiñeron con azul de Coomassie o se analizaron por WB con anticuerpos contra ZO-2 y TEAD.

5.9) Ensayo de gen reportero TOP/FOP Flash

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron en cajas de 96 pozos a una densidad de 2.5×10^4 células/pozo. Después de 24 horas, las células se transfectaron con Lipofectamina 3000 (Cat. L3000015, Thermo Fischer, Waltham, MA) con: 1) 100 ng de la construcción del promotor natural del gen *hCTGF* que contiene 3 sitios putativos de unión para TEAD. Esta construcción está insertada en el vector reportero de Luciferasa pGL3-6xOSE-Luc (Zhao et al., 2008) y fue proporcionada amablemente por el Dr. Kun-Liang Guan del Centro de Cáncer de Moors, en la Universidad de California en San Diego. 2) 75 ng del vector pGL3 control (Cat. E1741, Promega, Madison, WI) con actividad constitutiva.

Después de 6 h, el medio de transfección se retiró y se reemplazó con medio de cultivo fresco conteniendo o no al péptido permeable inhibidor de la nPKC ϵ , ϵ V1-2. Después de 20 horas las células se lisaron en la solución comercial de lisis para reporteros (Cat. E3971, Promega, Madison WI). La extracción de la proteína se hizo con un choque térmico de 5 min a 70 °C, seguido de 1 min. a 37 °C y 3 min en agitación. La actividad de la luciferasa se determinó con un estuche comercial (Cat. E1500, Promega, Madison, WI) en el equipo Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf, Switzerland). Los valores de la actividad de la luciferasa se normalizaron con respecto al contenido de proteína y se expresan en relación al valor de las células parentales, o las células ZO-2 KD sin el tratamiento con el péptido permeable inhibidor de la nPKC ϵ , ϵ V1-2. En todos los casos la eficiencia de la transfección se normalizó con el vector PGL3-control.

5.10) Inhibidores y activadores de cinasas

El H89, que inhibe a la PKA (Cat. B1427, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) se preparó como una solución madre en DMSO a una concentración de 5 mM y se utilizó a una concentración final de 10 μ M.

Los péptidos permeables que inhiben (ϵ v1-2) o activan (ϵ v1-7) a la nPKC ϵ fueron proporcionados generosamente por la Dra. Daria Mochely-Rosen (Stanford University, Stanford, CA) y se disolvieron en agua en una solución madre a una concentración de 1 mM y se utilizaron a una concentración final de 2 μ M.

El Ro 31-8220, que inhibe a cPKC α , γ y β 1 y a nPKC ϵ (Cat R136, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) se preparó como una solución madre en DMSO a una concentración de 5 mM y se utilizó a una concentración final de 27 nM

El Gö-6983, que inhibe cPKC α , γ y β 1 y a nPKC δ (Cat. Sc-203432, Santa Cruz Biotechnology, Sta. Cruz, CA) se preparó como una solución madre en DMSO a una concentración de 5 mM y se utilizó a una concentración final de 10 nM.

La röttlerina, inhibidora de la nPKC δ (Cat. 557370, Calbiochem, Darmstadt, Germany) se preparó como una solución madre en DMSO a una concentración de 12 mM y se utilizó a una concentración final de 3 μ M.

VI) Resultados

6.1) ZO-2 favorece la entrada de ZO-2 al núcleo de las células epiteliales

Comenzamos esta tesis, explorando por inmunofluorescencia la localización subcelular de TEAD en las células parentales y ZO-2 KD. Utilizamos cultivos subconfluentes y confluentes, ya que previamente se demostró que ZO-2 se acumula en el núcleo de los cultivos subconfluentes, mientras que en los cultivos confluentes la cantidad nuclear de ZO-2 es mínima (Islas et al., 2002). La figura 7 muestra que la ausencia de ZO-2 disminuye la expresión de TEAD en los núcleos de los cultivos subconfluentes, mientras que en los cultivos confluentes únicamente se observa un incremento en la expresión de TEAD en el citoplasma de las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. Por medio de WB de lisados totales se observa que la expresión de TEAD disminuye en los cultivos subconfluentes de células ZO-2 KD de manera dependiente de ZO-2, ya que al transfectar la construcción hZO-2 resistente al shRNA se revierte la disminución de TEAD. En cambio, en los cultivos confluentes se incrementa la expresión de TEAD en ausencia de ZO-2 y disminuye el contenido de TEAD al transfectar hZO-2 a las células ZO-2 KD (Fig. 8).

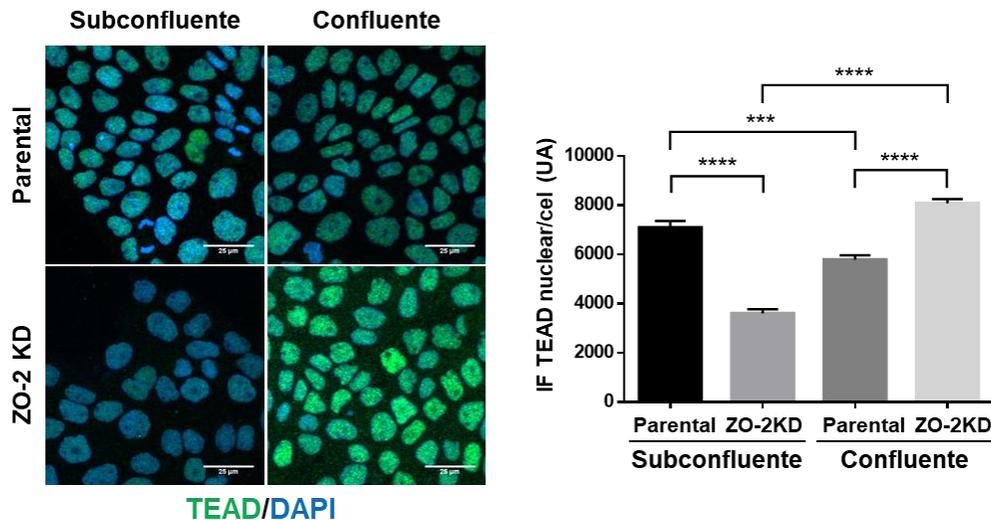


Figura 7. En las células ZO-2 KD, la cantidad de TEAD nuclear disminuye en los cultivos subconfluentes pero incrementa en los cultivos confluentes. Los cultivos subconfluentes y confluentes de células parentales y ZO-2 KD se procesaron para inmunofluorescencia con anticuerpos contra TEAD. Izquierda, imágenes representativas. Barras, 25 μm; derecha, análisis cuantitativo. El análisis estadístico se hizo con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. UA, unidades arbitrarias. ****p<0.0001, ***p<0.001. Cada barra muestra el promedio ± error estándar.

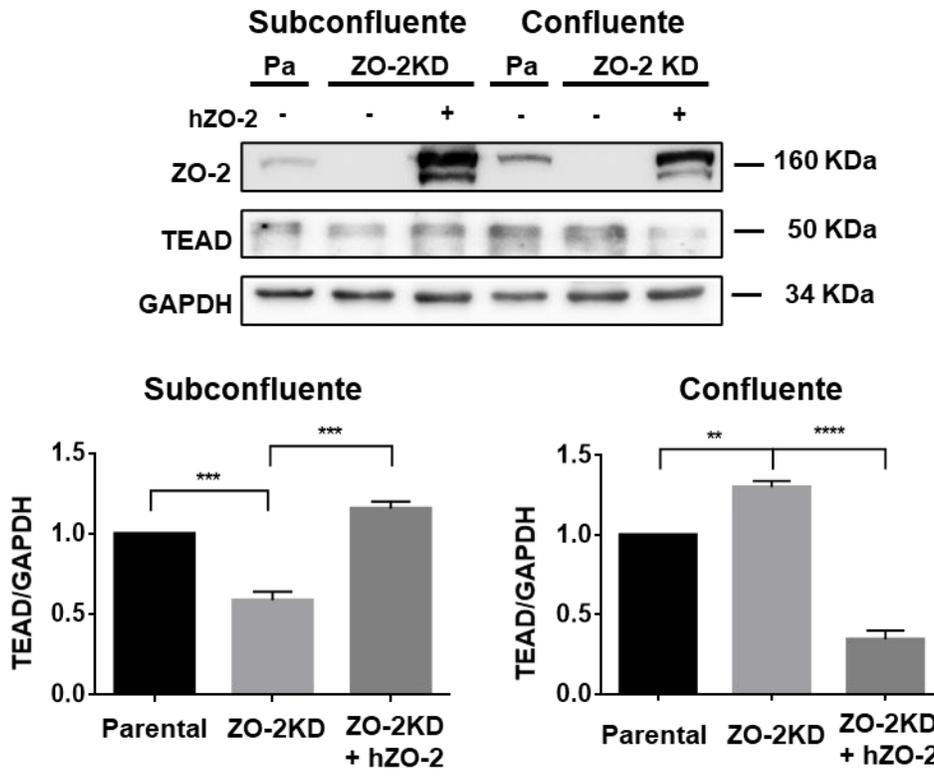


Figura 8. El contenido total de TEAD disminuye en los cultivos subconfluentes y sube en los cultivos confluentes. Detección de TEAD mediante WB de extractos celulares totales provenientes de cultivos de células parentales y ZO-2 KD transfectadas o no con h-ZO-2. GAPDH se utilizó como control de carga. Panel superior, imagen representativa; panel inferior, análisis densitométrico. El análisis estadístico se hizo con ANOVA de una vía, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$. Cada barra muestra el promedio \pm error estándar.

Después analizamos la cantidad de TEAD en las fracciones nucleares y citosólica. Observamos que en los cultivos subconfluentes disminuye TEAD en el núcleo de las células ZO-2 KD y que este efecto se revierte al transfectar a hZO-2 (Fig. 9A). En cambio, en los cultivos confluentes la ausencia de ZO-2 aumenta el contenido citosólico de TEAD y la transfección de hZO-2 en las células ZO-2 KD bloquea este efecto (Fig. 9B). En los cultivos confluentes el contenido de TEAD nuclear aumenta en ausencia de ZO-2 y el efecto se revierte al transfectar hZO-2. Aquí cabe recordar que en la condición de confluencia ZO-2 no entra el núcleo (Islas et al., 2002; Quiros et al., 2013). Esto resultados sugieren que la entrada de TEAD al núcleo se facilita por ZO-2.

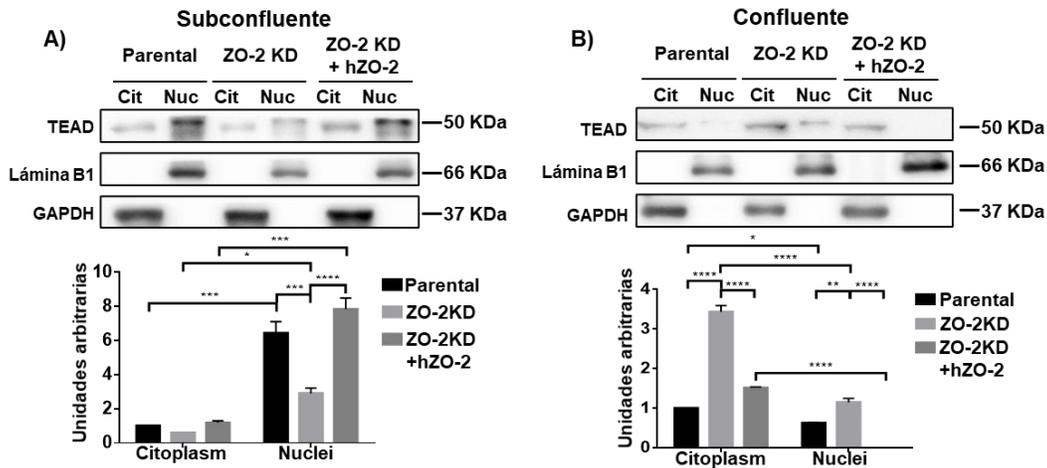


Figura 9. La ausencia de ZO-2 disminuye la cantidad de TEAD nuclear en los cultivos subconfluentes e incrementa TEAD citosólico en los cultivos confluentes. A) Detección de TEAD por WB en las fracciones nucleares (Nuc) y citosólicas (Cit) provenientes de cultivos subconfluentes de células parentales y ZO-2 KD transfectadas o no con hZO-2. B) Detección de TEAD por WB en las fracciones nucleares (Nuc) y citosólicas (Cit) provenientes de cultivos confluentes de células parentales y ZO-2 KD transfectadas o no con hZO-2. Lámina B1 y GAPDH se utilizaron como marcadores de las fracciones nucleares y citosólicas, respectivamente. Panel superior, imágenes representativas de tres experimentos independientes; panel inferior, análisis cuantitativo de TEAD/lamina B1 en las fracciones nucleares y de TEAD/GAPDH en las fracciones citosólicas. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Cada barra muestra el promedio \pm error estándar.

Enseguida, exploramos si la acumulación de TEAD depende de las NLS de ZO-2. Para ello analizamos la cantidad de TEAD presente en el núcleo de los cultivos subconfluentes de células parentales transfectadas con Flag-hZO-2 silvestre o con la construcción Flag-hZO-2- Δ NLS que carece de las NLS de ZO-2 (Quiros et al., 2013). La cantidad de TEAD nuclear disminuye en las células transfectadas con la construcción Flag-hZO-2- Δ NLS (Fig. 10), lo que sugiere que el movimiento de TEAD al núcleo se favorece con la importación de ZO-2 al núcleo.

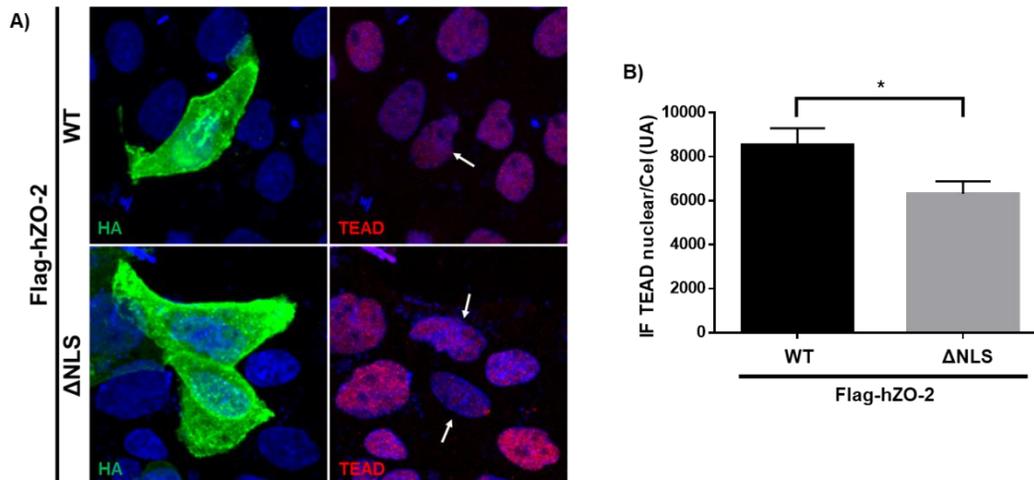


Figura 10. El contenido nuclear de TEAD disminuye en las células transfectadas con una construcción de ZO-2 sin NLS. A) Imagen representativa de las células MDCK 24 h después de la transfección con Flag-hZO-2 silvestre (WT) o Flag-hZO-2 Δ NLS. Las células se fijaron y procesaron para inmunofluorescencia con anticuerpos contra Flag o TEAD. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Flechas, núcleos de células transfectadas. B) Análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia nuclear de TEAD en las células transfectadas con hZO-2 WT o Flag-hZO-2 Δ NLS. Se cuantificaron los núcleos de 30 células transfectadas por condición, provenientes de tres experimentos independientes. UA, unidades arbitrarias. El análisis estadístico se realizó con la prueba de *t* de Student. * $p < 0.05$. Cada barra muestra el promedio \pm error estándar.

6.2) TEAD nuclear está fosforilada

En la figura 9 el WB revela que la banda de TEAD de la fracción nuclear es de mayor peso molecular (51 kDa) que la banda de TEAD de la fracción citosólica (49 kDa). El análisis *in silico* con el programa GPS 3.0 reveló que TEAD tiene 58 sitios putativos de fosforilación. Para determinar si el peso molecular más elevado que exhibe TEAD en el núcleo es consecuencia de una fosforilación, se realizó un ensayo de WB en presencia de la fosfatasa alcalina que remueve a los fosfatos. En la figura 11A se observa una disminución en el peso molecular de TEAD nuclear de 51 a 50 kDa después del tratamiento con la fosfatasa alcalina, lo que sugiere que TEAD nuclear está más fosforilada que TEAD citosólica. Para confirmar esta observación, se realizó un ensayo de movilidad por fosforilación para el factor de transcripción TEAD. Para ello, se realizó un WB con los extractos nucleares, tratados o no con fosfatasa alcalina, en un gel de acrilamida adicionado con Phos-Tag. Este es un compuesto afín a los grupos fosfatos, que retarda la migración de las proteínas fosforiladas. La figura 11B muestra una banda de TEAD de mayor peso molecular, que no se observa en el extracto nuclear tratado con fosfatasa alcalina. Estos resultados confirman que la banda de mayor peso corresponde a TEAD fosforilada.

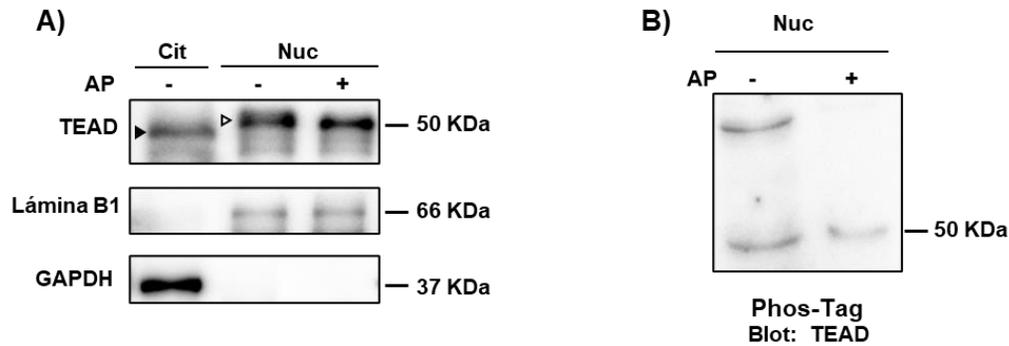


Figura 11. TEAD nuclear pesa más que TEAD citosólico por efecto de la fosforilación. Detección de TEAD por WB en las fracciones citosólicas (Cit) y nucleares (Nuc), tratadas o no con fosfatasa alcalina (AP). Se utilizaron anticuerpos contra lámina B1 y GAPDH como marcadores de las fracciones nucleares y citosólicas, respectivamente. Imagen representativa de 2 experimentos independientes. Cabeza de flecha negra, banda de 49 kDa, cabeza de flecha vacía, banda de 51 kDa.

6.3) La inhibición de la nPKC δ incrementa el contenido celular de TEAD y promueve la importación nuclear de ZO-2, favoreciendo la acumulación nuclear de TEAD

En los cultivos confluentes, la cantidad de TEAD aumenta en el citoplasma de las células ZO-2 KD y disminuye después de la transfección con hZO-2 (Fig. 9B). Se sabe que el estrés hiperosmótico, a través de la fosforilación mediada por p38 produce la translocación de TEAD al citoplasma. Sin embargo, TEAD es un sustrato muy pobre de fosforilación para p38, e incluso la mutación de los 4 sitios putativos de fosforilación por p38 en TEAD, no altera la translocación citoplásmica inducida por estrés (Lin et al., 2017). Esto sugiere que otras cinasas deben de fosforilar a TEAD. El análisis *in silico* con el programa GPS 3.0 reveló que TEAD tiene 23 y 6 sitios putativos de fosforilación por PKA y PKC, respectivamente. Además, se ha visto que TEAD se fosforila por diferentes isoformas de PKC (Jiang et al., 2001) y por PKA (Gupta et al., 2000).

Por lo tanto, exploramos si la inhibición de PKA y de diferentes isoformas de PKC altera la distribución núcleo-citosólica de TEAD en los cultivos de células parentales y ZO-2 KD. El tratamiento con 27 nM de Ro 31-8220 que inhibe a cPKC α , γ y $\beta 1$ y a nPKC ϵ (Young et al., 2005), incrementa significativamente la concentración de TEAD en los núcleos de las células ZO-2 KD pero no en las células parentales (Fig. 12A). Esto sugiere que en ausencia de ZO-2, cPKC α , γ y $\beta 1$ o nPKC ϵ inducen la exportación nuclear de TEAD. En cambio, el tratamiento con Gö-6986 que inhibe a cPKC α , γ y $\beta 1$ y a nPKC δ no tiene efecto

en la concentración nuclear de TEAD en las células ZO-2 KD. Lo que sugiere que la inhibición de nPKCε bloquea la exportación nuclear de TEAD en las células ZO-2 KD (Fig. 12A y B).

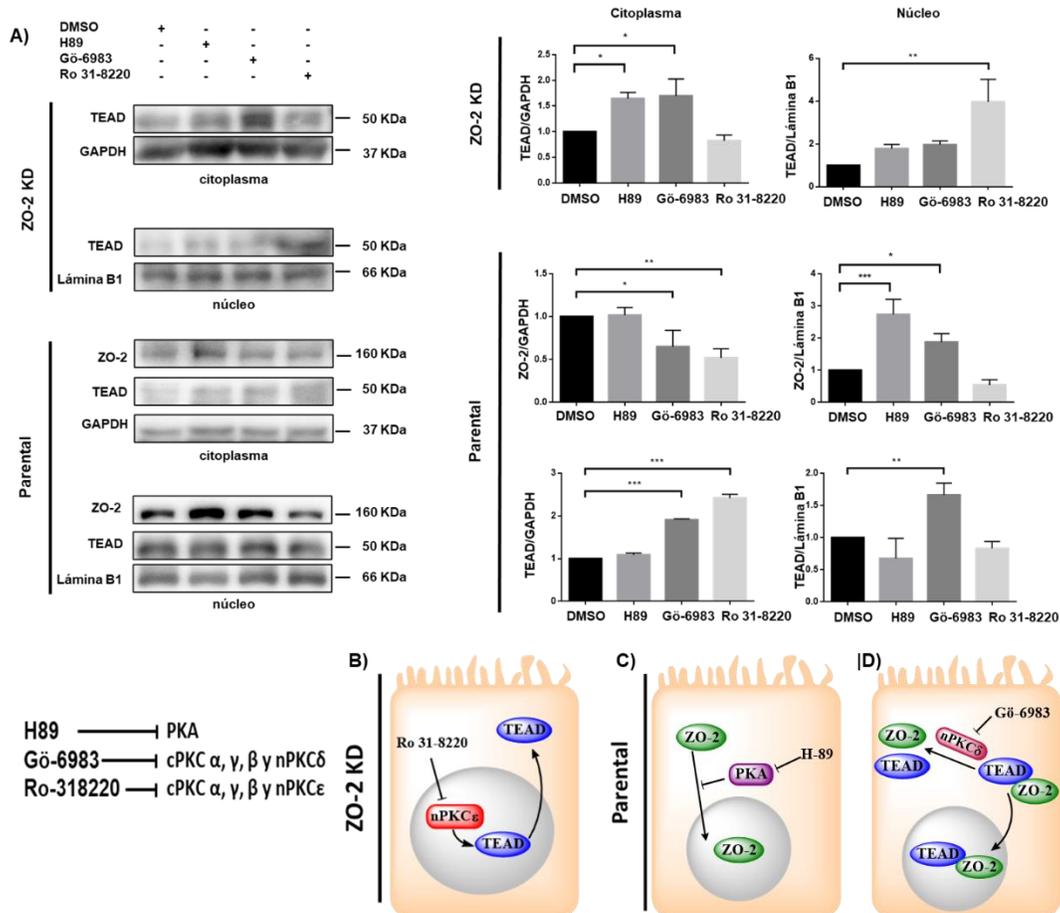


Figura 12. nPKCδ bloquea la interacción ZO-2/TEAD que favorece la acumulación nuclear de TEAD.

A) Los cultivos confluentes de células parentales y ZO-2 KD se trataron con 10 μM del inhibidor de PKA H89, 27 nM de Ro 31-8220 que inhibe a las cPKC α, γ y β1 y a la nPKCε, 10 nM de Gö-6986 que inhibe a las cPKC α, β and γ y nPKCδ, o con 0.1% de DMSO como vehículo. WB de TEAD y ZO-2 en fracciones nucleares (Nuc) y citosólicas (Cit) provenientes de cultivos de células parentales y ZO-2 KD. Lamina B1 y GAPDH se utilizaron como marcadores de las fracciones nucleares y citosólicas, respectivamente. Izquierda, imágenes representativas de WB; derecha, análisis densitométrico de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía seguido por la prueba de Fisher LSD. *p < 0.05, **p < 0.01 ***p < 0.001. Cada barra muestra el promedio ± error estándar. B) Representación esquemática donde se muestra que en las células ZO-2 KD el inhibidor Ro 31-8220 bloquea la exportación nuclear de TEAD mediada por nPKCε. C) Diagrama que muestra que en las células parentales la inhibición de la PKA con 10 μM de H89 provoca la entrada de ZO-2 al núcleo. D) Esquema que muestra que la nPKCδ bloquea la interacción citosólica ZO-2-TEAD y su importación al núcleo.

Para entender con mayor claridad el efecto de la inhibición de la nPKCε en la función de TEAD, se realizó un ensayo de gen reportero con una construcción en la cual la expresión

de luciferasa se regula por el promotor del factor de crecimiento de tejido conectivo humano (hCTGF), que tiene 3 sitios de unión a TEAD (Zhao et al., 2008). La figura 13A confirma que conforme a lo que previamente reportamos (Dominguez-Calderon et al., 2016), la actividad del promotor de hCTGF es mayor en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. Esto se explicó previamente en las células ZO-2 KD por un incremento en la importación nuclear de YAP, que se asocia a TEAD y funciona como un co-activador transcripcional. El tratamiento con el péptido permeable inhibidor de nPKC ϵ , ϵ V1-2, incrementa la actividad del promotor de hCTGF en las células ZO-2 KD pero no en las células parentales (Fig. 13B). Este resultado se explica por el incremento en TEAD nuclear observado en las células ZO-2 KD después del tratamiento con el inhibidor Ro 31-8220 27 nM y que no ocurre con el inhibidor Gö-6983 10nM (Fig 11).

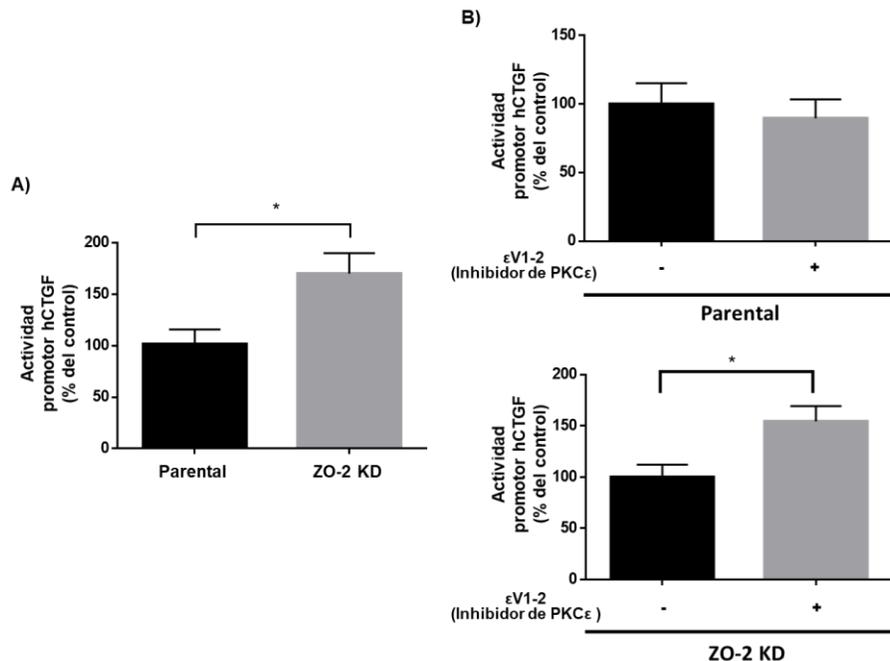


Figura 13. En las células ZO-2 KD la inhibición de nPKC ϵ incrementa la actividad del promotor hCTGF regulado por sitios TEAD. Ensayo de gen reportero hecho en células parentales y ZO-2 KD transfectadas con la construcción hCTGF-Luc. A) La actividad del promotor hCTGF-Luc es mayor en las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales. Los valores de la actividad se normalizaron con los observados en las células parentales. El análisis estadístico se realizó con la prueba de *t* de Student. * $p < 0.05$. B) La inhibición de nPKC ϵ incrementa la actividad del promotor hCTGF-Luc en las células ZO-2 KD pero no en las células parentales. Los valores de la actividad del promotor hCTGF-Luc se normalizaron con los observados en las células sin el inhibidor de nPKC ϵ . El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student. * $p < 0.05$. En todos los casos los datos se normalizaron con el contenido de proteína y la eficiencia de transfección con el vector pGL3-Control. Cada barra muestra el promedio \pm error estándar.

La figura 12A también muestra que el contenido citosólico de TEAD en las células ZO-2 KD sube después del tratamiento con 10 μM del inhibidor de PKA, H89 o con el inhibidor Gö-6983, pero no con el inhibidor Ro 31-8220. Esto sugiere que la inhibición de PKA o nPKC δ aumenta el contenido citosólico TEAD, pero bloquea su importación al núcleo. En las células parentales la inhibición de PKA con H89, no afecta la cantidad de TEAD citosólico o nuclear, en cambio, incrementa la cantidad de ZO-2 en el núcleo sin inducir una disminución en el citoplasma, lo que sugiere que la inhibición de PKA incrementa el contenido de ZO-2 en la célula e induce su acumulación nuclear (Fig 12A y C). Para confirmar estos resultados, se emplearon las dosis adicionales 1 y 100 μM de H89. En la figura 14 se observa que en las células parentales, disminuye la cantidad de ZO-2 citoplásmico con 1, 10 o 100 μM de H89. Sin embargo, el incremento de ZO-2 nuclear sólo se observa con las concentraciones de 10 o 100 μM de H89.

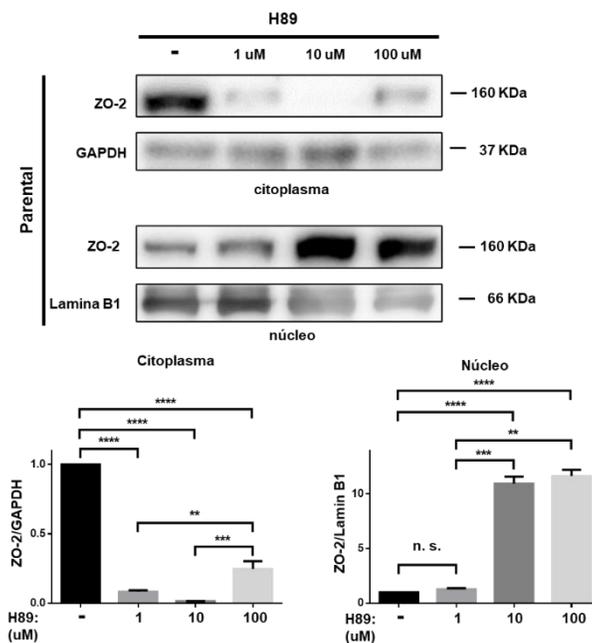


Figura 14. La inhibición de PKA con dosis crecientes de H89 incrementa el contenido nuclear de ZO-2. En las células parentales la inhibición de PKA con 10 μM de H89, incrementa la concentración nuclear de ZO-2 y produce la disminución de ZO-2 en el citoplasma. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Cada barra muestra el promedio \pm error estándar.

En las células parentales el contenido nuclear de TEAD se incrementa después del tratamiento con el inhibidor Gö-6983 pero no con el inhibidor Ro 31-8220, lo que indica que la acumulación nuclear de TEAD está mediada por la inhibición de nPKC δ (Fig 12A). El

incremento en el contenido nuclear de TEAD se acompaña de un incremento en la cantidad de TEAD citosólico, sugiriendo que la inhibición de nPKC δ incrementa la síntesis o estabilidad de TEAD, así como su importación nuclear. El incremento de ZO-2 nuclear en respuesta al inhibidor Gö-6983 10 nM pero no al inhibidor Ro 31-8220 se acompaña por una disminución de ZO-2 en la fracción citosólica, lo que sugiere que la inhibición de nPKC δ induce la importación nuclear de ZO-2 (Fig. 12A). Para confirmar estos resultados, en las células MDCK parentales transfectadas con la construcción de nPKC δ , se analizó por WB el contenido nuclear de ZO-2 y TEAD. En la figura 15A se observa una disminución del contenido nuclear de TEAD y ZO-2 en las células parentales transfectadas con nPKC δ . Para reforzar la importancia de ZO-2 en este proceso, las células ZO-2 KD también se transfectaron con la construcción de nPKC δ , y en ellas no se encontró un cambio en la concentración nuclear de TEAD en comparación con las células no transfectadas (Fig. 15B). Con base en estos resultados, se propone que la inhibición de nPKC δ en las células parentales confluentes induce la síntesis o favorece la estabilidad de TEAD y promueve la importación conjunta de ZO-2 y TEAD al núcleo (Fig. 12D).

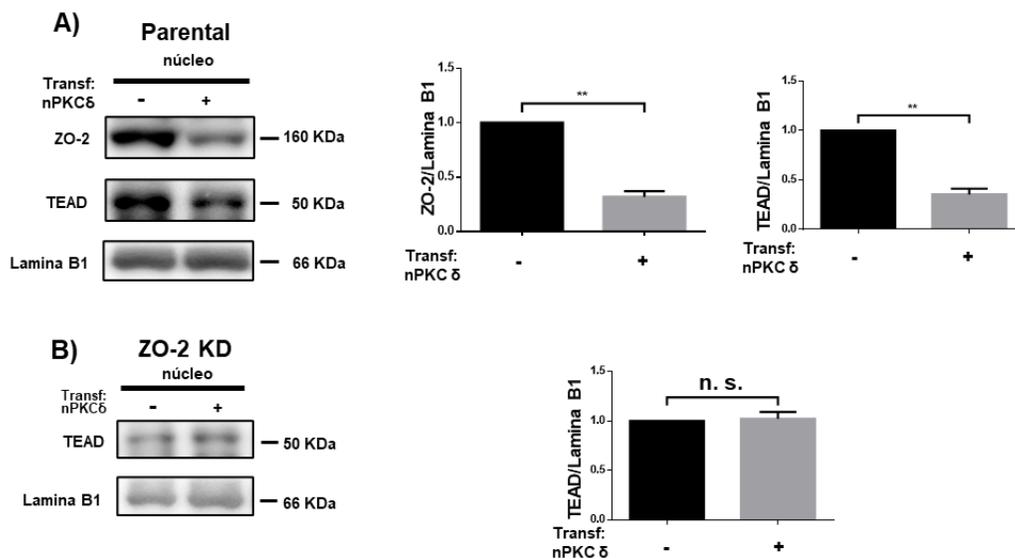


Figura 15. ZO-2 regula el efecto ejercido por nPKC δ en la acumulación nuclear de TEAD. A) Las células parentales se transfectaron con nPKC δ . Después de 24 horas de transfección se aisló la fracción nuclear y se evaluó por WB la expresión de TEAD y ZO-2. Se utilizó lamina B1 como marcador de la fracción nuclear. Izquierda, imagen representativa de WB; derecha, análisis densitométrico de 3 experimentos independientes. B) Las células ZO-2 KD se transfectaron con la construcción de la nPKC δ . Después de 24 horas de transfección se aisló la fracción nuclear y se evaluó por WB la expresión de TEAD. Izquierda, imagen representativa de WB; derecha, análisis densitométrico de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t de Student. ** $p < 0.01$; ns., no significativo. Cada barra muestra el promedio \pm el error estándar.

En resumen, mientras que en las células parentales la inhibición de PKA induce la acumulación nuclear de ZO-2 pero no la de TEAD (Fig. 12C), la inhibición de nPKC δ promueve la acumulación nuclear tanto de ZO-2 como de TEAD (Fig. 12D). Dado que la inhibición de nPKC δ no induce la acumulación nuclear de TEAD en las células carentes de ZO-2, se concluye que la fosforilación por nPKC δ bloquea la interacción entre ZO-2 y TEAD que facilita la entrada de TEAD al núcleo (Fig. 12D).

6.4) La interacción nuclear entre ZO-2 y TEAD se inhibe por la nPKC δ

Para probar que ZO-2 y TEAD interactúan, y que este proceso se inhibe por la nPKC δ , se realizó un ensayo de ligación por proximidad (PLA) en las células MDCK tranfectadas con la construcción Flag-hZO-2, en presencia o ausencia de 3 μ M de röttlerina, un inhibidor específico de la nPKC δ . Para este ensayo se empleó un anticuerpo hecho en ratón contra TEAD y otro hecho en conejo contra ZO-2 (Fig 16A). Al tiempo 0 (6 horas después de la transfección), cuando las células transfectadas tienen a ZO-2 en el núcleo como previamente se había mostrado (Chamorro et al., 2009; Quiros et al., 2013), se observan puntos rojos fluorescentes en el núcleo de las células transfectadas con Flag-hZO-2 (marca verde) (Fig. 16B y Ca,a'). La cantidad de puntos rojos observados es superior a la presente en el fondo, que corresponde a la imagen que se obtiene cuando se omite al anticuerpo anti TEAD (Fig. 16B y Ce,e'). La cantidad de puntos rojos positivos que señala la interacción de ZO-2 con TEAD sube en el núcleo de las células transfectadas con Flag-hZO-2 cuando se inhibe a la nPKC δ con röttlerina (Fig. 14B y Cb,b'). El número de puntos rojos disminuye cuando se co-transfecta Flag-hZO-2 con nPKC δ (Fig. 16B y Cc,c'), y el valor máximo de la interacción se obtiene cuando se inhibe con röttlerina a la nPKC δ transfectada. En este último caso, también se observa la aparición de abundantes puntos rojos en el citoplasma (Fig 16B y Cd,d'), lo que confirma que la inhibición de la nPKC δ permite la interacción entre TEAD y ZO-2 en el citoplasma. En cambio, 24 h después de la transfección, cuando solo el 17% de las células transfectadas tiene a ZO-2 en el núcleo (Chamorro et al., 2009; Quiros et al., 2013), los puntos rojos positivos son apenas perceptibles en todas las condiciones (Fig 16B y Cf, g, h, i).

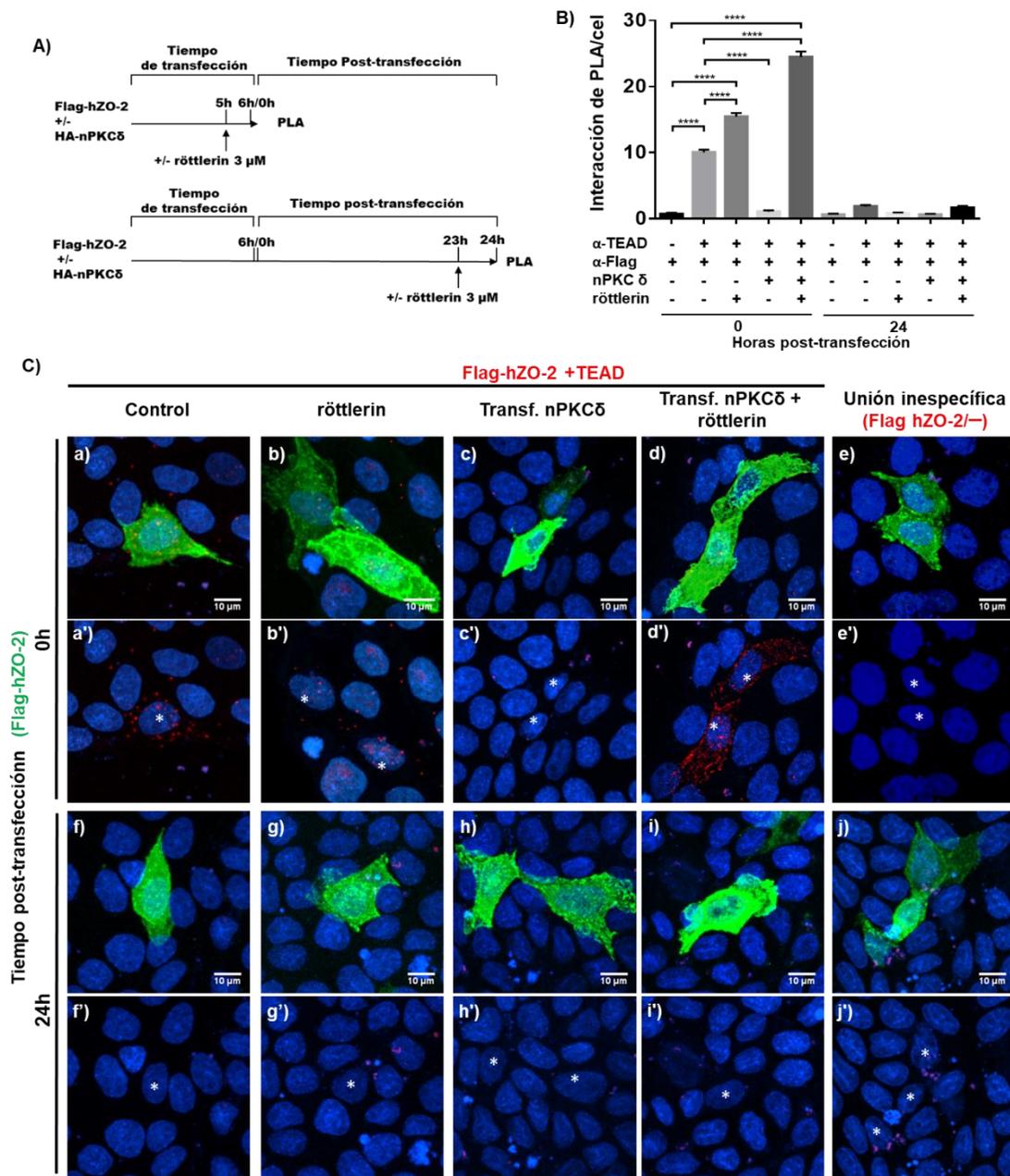


Figura 16. La inhibición de la nPKCδ con rottlerina aumenta la interacción de ZO-2 y TEAD en el núcleo.
A) Diagrama del procedimiento experimental que se realizó. Las células MDCK se transfectaron con Flag-hZO-2 sola o acompañada de la construcción de nPKCδ. Las células se fijaron 0 y 24 h después de la transfección (el tiempo 0 corresponde a las 6 h requeridas después de la transfección para que las proteínas se expresen) y enseguida se procesaron para el ensayo de ligación por proximidad (PLA), hecho con un anticuerpo de ratón contra la proteína Flag y otro de conejo contra la proteína TEAD. Antes de la fijación en los tiempos indicados en el diagrama, se añadió rottlerina 3 μM por 1 h. **B) Análisis cuantitativo del ensayo de PLA** utilizando el programa BlobFinder. Se contaron por lo menos 25 células por condición experimental. Análisis estadístico realizado con ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiple de Tukey. ****p<0001. Cada barra muestra el promedio ± error estándar **C) Imágenes de IF representativas del PLA.** Barras, 10 μm. Los puntos rojos fluorescentes representan la interacción positiva entre Flag-hZO-2 y TEAD. Las células transfectadas con Flag-h-ZO-2 se identificaron empleando un anticuerpo de ratón contra la etiqueta

Flag y un anticuerpo secundario de burro contra IgG de ratón acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 488. La imagen del fondo corresponde a los experimentos hechos sin el anticuerpo anti-TEAD. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Transf, transfectadas.

Para confirmar que la nPKC δ , bloquea la interacción entre TEAD y ZO-2 analizamos la presencia de TEAD en un inmunoprecitado de ZO-2, y encontramos que la inhibición de la nPKC δ con röttlerina aumenta la cantidad de TEAD asociado a ZO-2 en las células MDCK (Fig 17A). Además, en las células de intestino delgado de rata IEC-18, se confirmó la interacción entre ZO-2 y TEAD por medio de un ensayo de inmunoprecipitación (Fig 17B). También se analizó la interacción de ZO-2 y TEAD a través de un ensayo de arrastre, en las células de riñón humano HEK293T. Para este ensayo, las células se transfectaron con los segmentos amino (dominios PDZ 1-3), o AP (región ácida y rica en prolinas) de cZO-2, presentes en el vector PCDNA3/HisMax. Posteriormente, las proteínas se purificaron de un lisado total con columnas afines a níquel, se sometieron a una electroforesis y se tiñeron con azul de coomasie. La figura 17C muestra la presencia de bandas de 62 y 45 kDa, correspondientes al segmento amino y AP, respectivamente. La identidad de la región amino, se confirmó en un WB con un anticuerpo contra ZO-2, dirigido a la región de la proteína presente entre los dominios PDZ 2 y 3. El WB contra TEAD, reveló la presencia de TEAD en el ensayo de arrastre realizado con ambos segmentos (Fig. 17D), lo que sugiere que TEAD puede interactuar con las porciones amino y carboxilo de ZO-2.

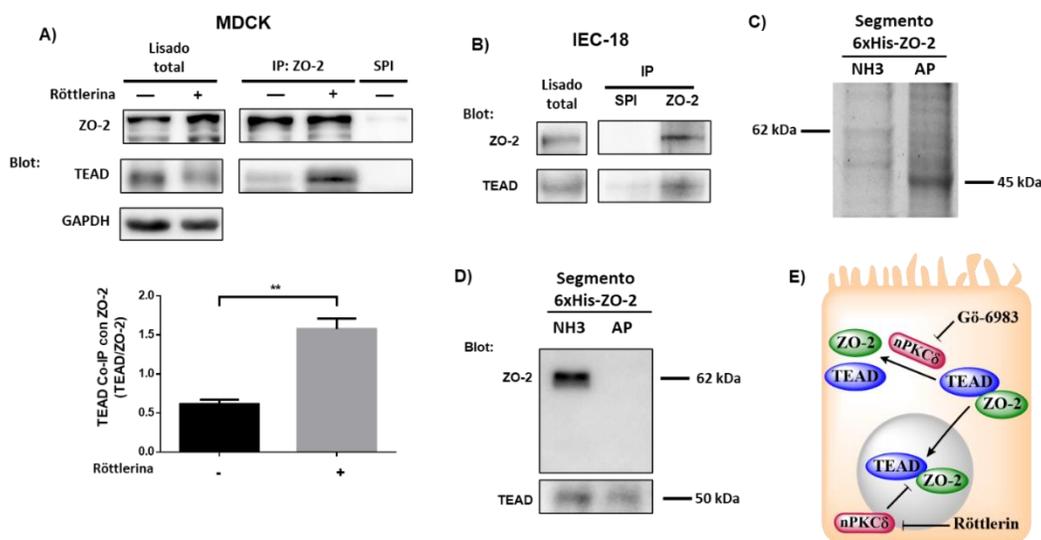


Figura 17. La nPKC δ inhibe la interacción entre TEAD y ZO-2. A) La cantidad de TEAD que co-inmunoprecipitación con ZO-2 aumenta en las células tratadas con röttlerin 3 μ M por 1 hora. Panel superior,

imagen representativa; panel inferior, análisis densitométrico de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba de *t* de Student. ***p*<0.01. Cada barra muestra el promedio ± el error estándar. Co-IP, co-inmunoprecipitación; IP, inmunoprecipitación; PIS, suero pre-inmune. B) TEAD co-inmunoprecipita con ZO-2 en las células IEC-18. PIS, suero pre-inmune. C) Los segmentos amino y AP de ZO-2 acoplados a una bandera de 6 histidinas, se purificaron por cromatografía en columnas de afinidad a níquel, a partir de extractos de células HEK293T transfectadas con los segmentos amino y AP de ZO-2. Las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. D) Análisis por WB del ensayo de arrastre con los segmentos amino y AP de ZO-2. Panel superior, el anticuerpo contra ZO-2 sólo reconoce al segmento amino de ZO-2; panel inferior, TEAD está presente en los lisados purificados de los segmentos amino y AP de ZO-2. E) Diagrama donde se ilustra que la inhibición de la nPKCδ permite la interacción de ZO-2 y TEAD, que facilita la importación nuclear de estas proteínas. En el núcleo la nPKCδ también rompe la asociación ZO-2/TEAD.

En conjunto, estos resultados indican que ZO-2 y TEAD interactúan en el núcleo y que esta asociación se promueve al inhibir a la nPKCδ (Fig. 17E).

6.5) La exportación nuclear de ZO-2 y TEAD se induce cuando se activa una NES de ZO-2 por acción de la nPKCε

Previamente demostramos que la exportación nuclear de ZO-2 se induce por la fosforilación mediada por la nPKCε de la serina 369 presente en la NES-1 de ZO-2 (Chamorro et al., 2009). Por ello, ahora se analizó en islas de células el movimiento de TEAD después del tratamiento con el péptido permeable activador de la nPKCε, εV1-7. En estas células tratadas con εV1-7, no se encontró a ZO-2 en el núcleo (Fig. 18Ae), en comparación con los cultivos control, como se demostró previamente (Quiros et al., 2013). De la misma manera, la expresión de TEAD en el núcleo disminuyó después del tratamiento con este péptido (Fig. 18Ah y B), en comparación con la condición control. En cambio, el tratamiento con el péptido permeable inhibidor εV1-2, concentró a ZO-2 en el núcleo (Fig. 18Af), e incrementó la cantidad de TEAD nuclear en comparación con el control (Fig. 18Ai y B). Los mismos resultados se obtuvieron en la línea celular epitelial de intestino delgado IEC-18 (Fig. 19). Por lo tanto, se concluye que la exportación nuclear de ZO-2 dependiente de la activación de su NES-1 por la nPKCε provoca la exportación nuclear de TEAD, mientras que la acumulación nuclear de ZO-2 facilita la concentración de TEAD en el núcleo.

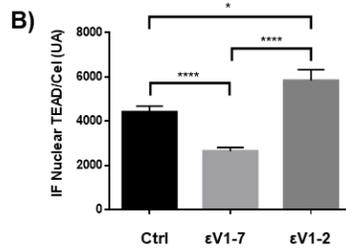
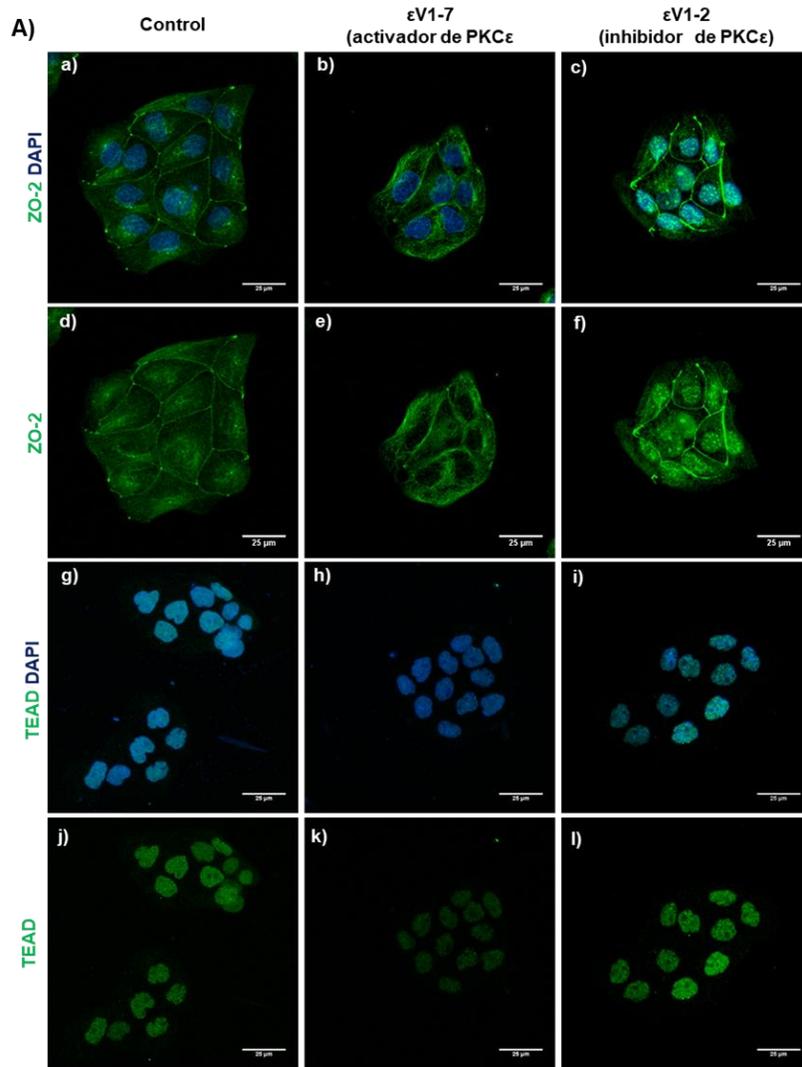


Figura 18. La exportación nuclear de ZO-2 inducida por nPKCε induce la salida de TEAD del núcleo en células MDCK. A) Imágenes representativas de la IF de ZO-2 (a-f) y TEAD (g-l) en los cultivos subconfluentes de células MDCK parentales en la condición control (primera columna), tratadas por 24 h con 2 μ M del péptido permeable activador de nPKCε (ϵ V1-7) que activa a la NES1-1 de ZO-2 (segunda columna), o con 2 μ M del péptido permeable inhibidor de nPKCε (ϵ v1-2) que bloquea la exportación nuclear de ZO-2 (tercera columna). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barras, 25 μ m. B) Cuantificación de la IF nuclear de TEAD/célula en unidades arbitrarias (UA). Se analizaron por lo menos 50 núcleos por condición experimental. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. * $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

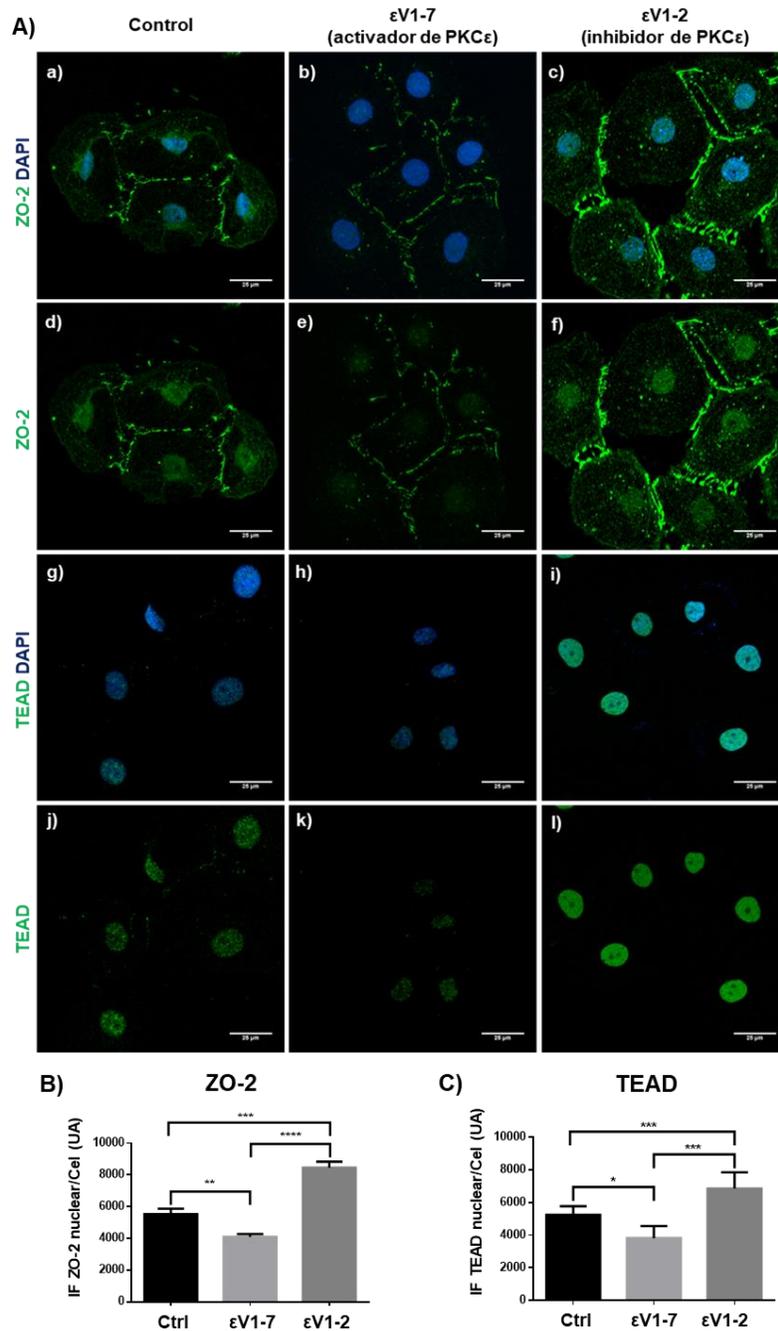


Figura 19. La activación de la nPKC ϵ induce la exportación nuclear de ZO-2 y TEAD en las células IEC-18. A) Imágenes representativas de IF de ZO-2 (a-f) y TEAD (g-l) en los cultivos subconfluentes de células IEC-18 en las condiciones control (primera columna), tratadas por 24 h con 2 μ M del péptido permeable activador de nPKC ϵ (ϵ V1-7) que activa a la NES1 de ZO-2 (segunda columna), o con 2 μ M del péptido permeable inhibidor de nPKC ϵ (ϵ V1-2) que bloquea la exportación nuclear de ZO-2 (tercera columna). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barras, 25 μ m B) Cuantificación de la IF nuclear de TEAD y ZO-2 por célula en unidades arbitrarias (UA). Se analizaron por lo menos 50 núcleos por condición experimental. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Previamente se demostró que en los cultivos subconfluentes ZO-2 recién sintetizada viaja al núcleo, y conforme el cultivo llega a confluencia, ZO-2 sale del núcleo y viaja a la UE (Chamorro et al., 2009). Por lo tanto, ahora probamos si al bloquear la exportación nuclear de ZO-2 conforme el cultivo llega a confluencia se altera el contenido nuclear de TEAD. Para ello, se transfectaron células parentales con HA-cZO-2 silvestre o con las 4 NES mutadas (HA-cZO-2 MutNES), y 48 h después cuando las células ya habían alcanzado la confluencia se analizó la expresión de TEAD en el núcleo de las células transfectadas. Por inmunofluorescencia se observa una fuerte tinción de HA en el núcleo de las células transfectadas con HA-cZO-2 MutNES, en comparación con las células transfectadas con HA-ZO-2. En cambio, el contenido de TEAD nuclear no se afectó por la incapacidad de ZO-2 para salir del núcleo (Fig. 20).

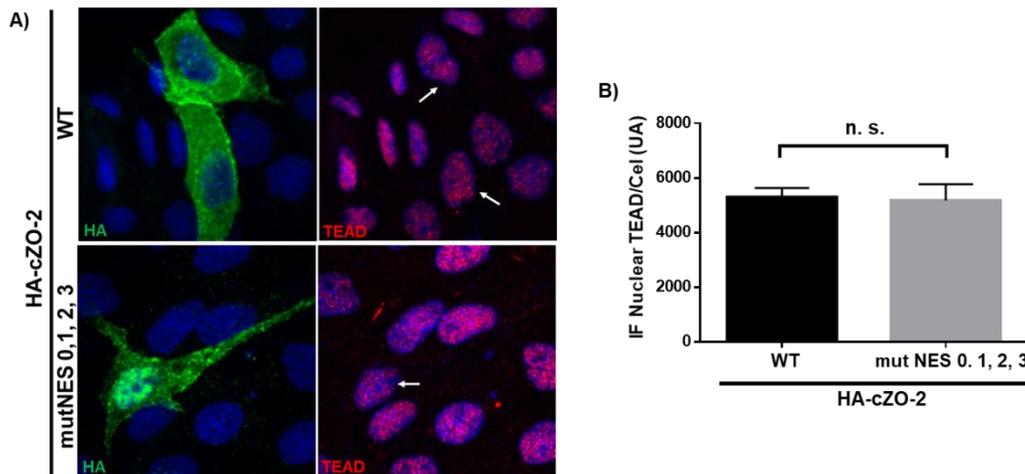


Figura 20. La mutación de las NES de ZO-2 produce la acumulación nuclear de ZO-2 pero no afecta la concentración nuclear de TEAD. A) Imágenes de IF representativas de células MDCK parentales 48 h después de la transfección con HA-cZO-2 silvestre o con las 4 NES de mutadas (HA-cZO-2 MutNES 0, 1, 2, 3). Primera columna, tinción de la bandera HA; segunda columna, tinción de TEAD. Flechas, núcleo de las células transfectadas. B) Cuantificación de la IF nuclear de TEAD en las células transfectadas con HA-cZO-2 o HA-cZO-2 MutNES 0, 1, 2, 3. UA, unidades arbitrarias. Se analizaron 35 núcleos de células transfectadas por condición experimental. El análisis estadístico se realizó con la prueba de *t* de Student. ns, no significativo.

En conjunto estos resultados indican que la exportación nuclear de ZO-2 activada por sus NES promueve la salida de TEAD del núcleo (Fig. 21), mientras que la acumulación nuclear de ZO-2 no cambia la concentración nuclear de TEAD porque existen otros mecanismos para la salida de TEAD independientes de ZO-2.

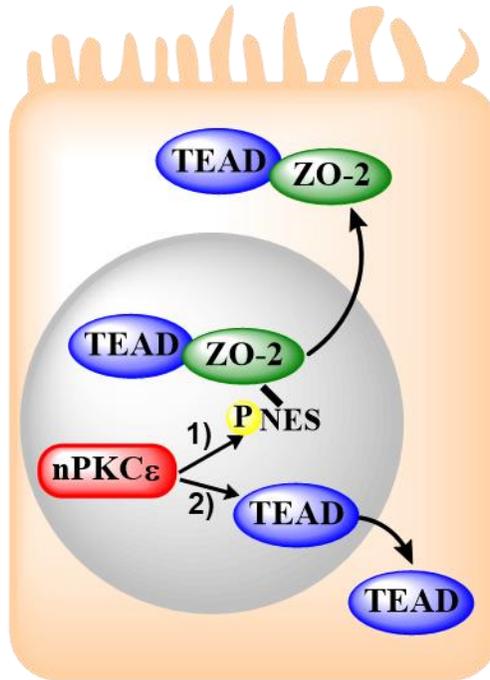


Figura 21. nPKC ϵ induce la salida de TEAD del núcleo de manera dependiente e independiente de ZO-2. La nPKC ϵ promueve la exportación nuclear de TEAD a través de dos mecanismos: 1) De manera dependiente de ZO-2, al fosforilar a la NES-1 de ZO-2 e inducir su exportación nuclear acompañada del factor de transcripción TEAD y 2) De manera independiente de ZO-2.

En resumen, nuestros resultados indican que la salida de TEAD del núcleo se induce por la activación de la nPKC ϵ . Este proceso puede suceder de manera independiente de ZO-2 como se observa en las células ZO-2 KD, así como de manera dependiente de ZO-2 a través de un mecanismo que requiere la activación de las NES de ZO-2. También que la importación nuclear de TEAD se favorece por la entrada al núcleo de ZO-2 regulada por sus NLS. Y, por último, que la exportación e importación nuclear de ZO-2, modula el tráfico intracelular de TEAD, mediado por PKA y por nPKC δ (Fig. 22).

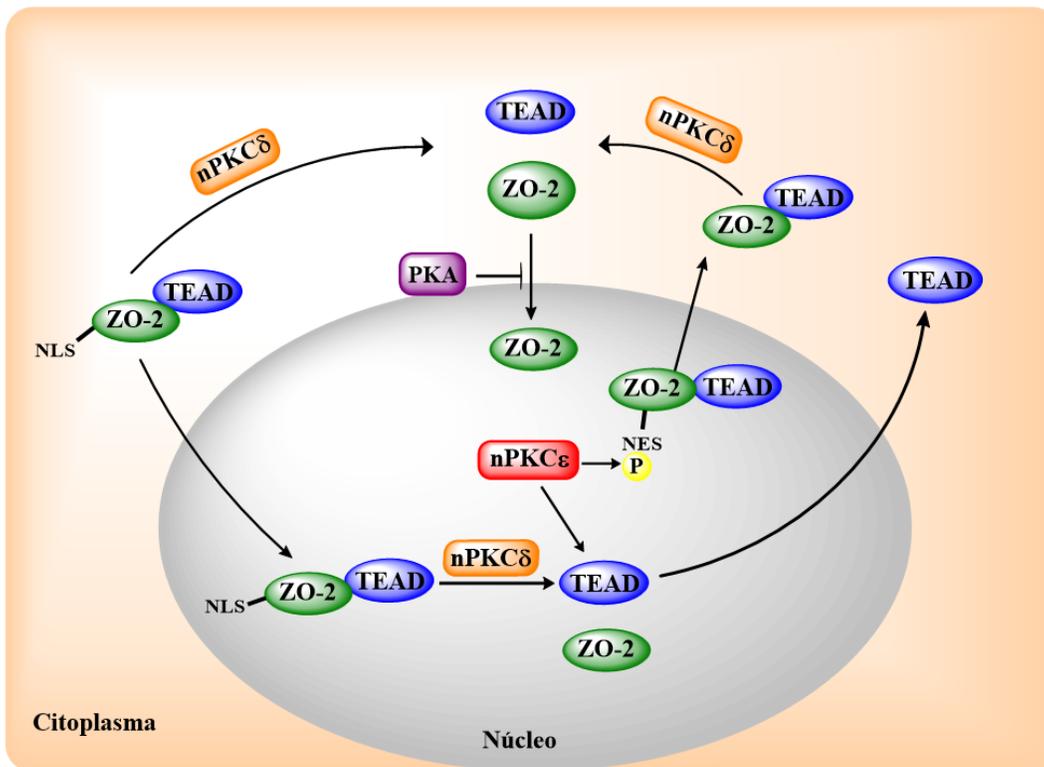


Figura 22. Representación esquemática del movimiento de TEAD y ZO-2 hacia adentro y afuera del núcleo regulado por las SLN y SEN de ZO-2 y por la actividad de la cinasa PKA y las cinasas nPKC δ y ϵ . En las células epiteliales MDCK, la nPKC δ bloquea la interacción de ZO-2 y TEAD e inhibe la importación al núcleo del complejo ZO-2/TEAD. La cinasa PKA bloquea la importación nuclear de ZO-2, mientras que la nPKC ϵ activa la NES-1 de ZO-2 y promueve la exportación nuclear de TEAD, de manera dependiente e independiente de ZO-2.

VII) Discusión

En las células epiteliales MDCK la distribución subcelular de ZO-2 depende del grado de contacto célula-célula. Así, en los cultivos subconfluentes ZO-2 está presente en la UE, pero también es abundante en el núcleo. En cambio, en los cultivos confluentes con UEs maduras, ZO-2 se concentra en el borde celular (Islas et al., 2002). Considerando que la ausencia de ZO-2 incrementa la actividad transcripcional de promotores regulados por sitios TEAD, y que la sobreexpresión de ZO-2 reprime esta actividad transcripcional (Dominguez-Calderon et al., 2016), en esta tesis se analizó si la importación/exportación nuclear de ZO-2 regula la acumulación nuclear del factor de transcripción TEAD en el núcleo.

El papel de ZO-2 como un translocador nuclear de proteínas se ha observado previamente. Así, ZO-2 incrementa la localización nuclear de YAP-2, a través de un proceso

que requiere la presencia de las NLSs de ZO-2 (Oka et al., 2010). YAP se une al primer dominio PDZ de ZO-2 a través del motivo de unión a dominios PDZ presente en su carboxilo terminal (Oka et al., 2010). De manera semejante, el movimiento de la proteína ARVCF hacia el núcleo requiere de la interacción de su motivo de unión a dominios PDZ con la región amino de ZO-2 donde se ubican los dominios PDZ (Kausalya et al., 2004). La proteína ARVCF en el núcleo se une a factores del procesamiento alternativo y contribuye a regular este proceso (Rappe et al., 2014).

En esta tesis investigamos si la concentración nuclear de TEAD se regula por ZO-2, dado que la ausencia de ZO-2 incrementa la actividad transcripcional de promotores artificiales y naturales regulados por sitios TEAD, y la sobreexpresión de ZO-2 bloquea la actividad transcripcional de TEAD (Dominguez-Calderon et al., 2016). Ahora, en los cultivos subconfluentes de células MDCK observamos que ZO-2 y TEAD se acumulan en el núcleo, y detectamos que la cantidad nuclear de TEAD disminuye en las células donde la expresión de ZO-2 se ha silenciado, así como en los cultivos subconfluentes de células parentales transfectadas con una construcción de ZO-2 carente de NLSs, lo que indica que la importación nuclear de ZO-2 favorece la entrada de TEAD al núcleo. Esta idea se fortalece porque en las células parentales la inhibición de la nPKC δ favorece la interacción ZO-2/TEAD en el citoplasma, lo que facilita la entrada y acumulación en el núcleo de ambas proteínas. El sitio de fosforilación por la nPKC δ que bloquea la interacción ZO-2/TEAD, sigue siendo una incógnita, y podría estar en ZO-2 o en TEAD, ya que ambas proteínas tienen sitios putativos de fosforilación por la nPKC δ (ZO-2, 22 sitios; TEAD 2 sitios, de acuerdo al programa GPS 3.0). Cabe destacar que TEAD se fosforila experimentalmente por varias isozimas de PKC y que la sobreexpresión de la nPKC δ inhibe su actividad transcripcional (Jiang et al., 2001), lo cual a la luz de nuestros resultados podría explicarse por una disminución en el contenido nuclear de TEAD.

El bloqueo de la importación nuclear de ZO-2 y TEAD generado por la nPKC δ , puede explicarse porque la región básica de la bpNLS2 de ZO-2 tiene 3 residuos de serina (S257, S259 y S261) que son sitios putativos de fosforilación por la nPKC δ . Al respecto, previamente se demostró que la mutación fosfomimética de estos residuos impide la acumulación nuclear de ZO-2, al neutralizarse las cargas positivas del segmento carboxilo terminal de la bpNLS2 (Quiros et al., 2013).

Nuestros resultados también indican que en las células MDCK la salida de TEAD del núcleo se estimula por la nPKC ϵ . Este proceso sucede de manera independiente de ZO-2 como se observa en las células ZO-2 KD, así como de forma dependiente de ZO-2 en las células parentales, donde se requiere la activación de la NES-1 de ZO-2 por la nPKC ϵ . Esta última observación confirma que el movimiento de TEAD se facilita cuando interactúa con ZO-2. Sin embargo, debe mencionarse que TEAD también contiene una bpNLS y una NES que se han conservado en diversas especies, y cuya funcionalidad se probó en *Drosophila* (Magico and Bell, 2011). Por lo tanto, creemos que la interacción de ZO-2 con TEAD sirve para reforzar el movimiento de este factor de transcripción.

En resumen, nuestras observaciones revelan que ZO-2 tiene una función nueva, ya que actúa como una plataforma que facilita la importación y exportación nuclear de TEAD.

VIII) Bibliografía

Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., and Pestell, R.G. (1995). Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* 270, 23589-23597.

Allalou, A., and Wahlby, C. (2009). BlobFinder, a tool for fluorescence microscopy image cytometry. *Computer methods and programs in biomedicine* 94, 58-65.

Amaya, E., Alarcon, L., Martin-Tapia, D., Cuellar-Perez, F., Cano-Cortina, M., Ortega-Olvera, J.M., Cisneros, B., Rodriguez, A.J., Gamba, G., and Gonzalez-Mariscal, L. (2019). Activation of the Ca(2+) sensing receptor and the PKC/WNK4 downstream signaling cascade induces incorporation of ZO-2 to tight junctions and its separation from 14-3-3. *Molecular biology of the cell* 30, 2377-2398.

Balda, M.S., and Matter, K. (2000). Transmembrane proteins of tight junctions. *Semin Cell Dev Biol* 11, 281-289.

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. *American journal of physiology Renal physiology* 304, F77-87.

Baxevanis, A.D., and Vinson, C.R. (1993). Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Current opinion in genetics & development* 3, 278-285.

Belandia, B., and Parker, M.G. (2000). Functional interaction between the p160 coactivator proteins and the transcriptional enhancer factor family of transcription factors. *J Biol Chem* 275, 30801-30805.

- Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J., and González-Mariscal, L. (2004). The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Experimental Cell Research* 292, 51-66.
- 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.
- Chan, P., Han, X., Zheng, B., DeRan, M., Yu, J., Jarugumilli, G.K., Deng, H., Pan, D., Luo, X., and Wu, X. (2016). Autopalmitoylation of TEAD proteins regulates transcriptional output of the Hippo pathway. *Nature chemical biology* 12, 282-289.
- Chan, S.W., Lim, C.J., Loo, L.S., Chong, Y.F., Huang, C., and Hong, W. (2009). TEADs mediate nuclear retention of TAZ to promote oncogenic transformation. *J Biol Chem* 284, 14347-14358.
- Chen, Z., Friedrich, G.A., and Soriano, P. (1994). Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice. *Genes & development* 8, 2293-2301.
- 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. *Biochimica et biophysica 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.
- Claude, P., and Goodenough, D.A. (1973). Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol* 58, 390-400.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Dai, C., Stolz, D.B., Kiss, L.P., Monga, S.P., Holzman, L.B., and Liu, Y. (2009). Wnt/beta-catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 20, 1997-2008.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & development* 12, 3499-3511.
- Diepenbruck, M., Waldmeier, L., Ivanek, R., Berninger, P., Arnold, P., van Nimwegen, E., and Christofori, G. (2014). Tead2 expression levels control the subcellular distribution of Yap and Taz, zyxin expression and epithelial-mesenchymal transition. *Journal of cell science* 127, 1523-1536.

- 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. *Molecular biology of the cell* 27, 1581-1595.
- Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (2009). Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165, 113-120.
- Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17, 375-412.
- Ferrigno, O., Lallemand, F., Verrecchia, F., L'Hoste, S., Camonis, J., Atfi, A., and Mauviel, A. (2002). Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. *Oncogene* 21, 4879-4884.
- Fink, C., Weigel, R., Hembes, T., Lauke-Wettwer, H., Kliesch, S., Bergmann, M., and Brehm, R.H. (2006). Altered expression of ZO-1 and ZO-2 in Sertoli cells and loss of blood-testis barrier integrity in testicular carcinoma in situ. *Neoplasia* 8, 1019-1027.
- Fossdal, R., Jonasson, F., Kristjansdottir, G.T., Kong, A., Stefansson, H., Gosh, S., Gulcher, J.R., and Stefansson, K. (2004). A novel TEAD1 mutation is the causative allele in Sveinsson's chorioretinal atrophy (helicoid peripapillary chorioretinal degeneration). *Human molecular genetics* 13, 975-981.
- Galganski, L., Urbanek, M.O., and Krzyzosiak, W.J. (2017). Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic acids research* 45, 10350-10368.
- Gazon, H., Barbeau, B., Mesnard, J.M., and Peloponese, J.M., Jr. (2017). Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL. *Frontiers in microbiology* 8, 2686.
- 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. *The EMBO journal* 20, 5578-5586.
- González-Mariscal, L., Bautista, P., Díaz-Coránguez, M., and Quirós, M. (2012). Tight Junctions. In *Curr Frontiers and Perspectives in Cell Biol*, S. Najman, ed.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., and Avila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 11, 315-324.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B.E. (2003). Tight junction proteins. *Progress in biophysics and molecular biology* 81, 1-44.
- Gonzalez-Mariscal, L., Chavez de Ramirez, B., and Cerejido, M. (1985). Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *The Journal of membrane biology* 86, 113-125.

Gonzalez-Mariscal, L., Contreras, R.G., Bolivar, J.J., Ponce, A., Chavez De Ramirez, B., and Cerejido, M. (1990). Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells. *The American journal of physiology* 259, C978-986.

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. *Annals of the New York Academy of Sciences* 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. *Exp Cell Res* 312, 3323-3335.

Grm, H.S., and Banks, L. (2004). Degradation of hDlg and MAGIs by human papillomavirus E6 is E6-AP-independent. *The Journal of general virology* 85, 2815-2819.

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.

Gupta, M.P., Gupta, M., and Zak, R. (1994). An E-box/M-CAT hybrid motif and cognate binding protein(s) regulate the basal muscle-specific and cAMP-inducible expression of the rat cardiac alpha-myosin heavy chain gene. *J Biol Chem* 269, 29677-29687.

Gupta, M.P., Kogut, P., and Gupta, M. (2000). Protein kinase-A dependent phosphorylation of transcription enhancer factor-1 represses its DNA-binding activity but enhances its gene activation ability. *Nucleic acids research* 28, 3168-3177.

Healy, S., Khan, P., and Davie, J.R. (2013). Immediate early response genes and cell transformation. *Pharmacology & therapeutics* 137, 64-77.

Hedley, M.L., Amrein, H., and Maniatis, T. (1995). An amino acid sequence motif sufficient for subnuclear localization of an arginine/serine-rich splicing factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11524-11528.

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.

Home, P., Saha, B., Ray, S., Dutta, D., Gunewardena, S., Yoo, B., Pal, A., Vivian, J.L., Larson, M., Petroff, M., *et al.* (2012). Altered subcellular localization of transcription factor TEAD4 regulates first mammalian cell lineage commitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 7362-7367.

Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122, 421-434.

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.

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.

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. *Exp Cell Res* *297*, 247-258.

Jesaitis, L.A., and Goodenough, D.A. (1994). Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol* *124*, 949-961.

Jiang, S.W., Dong, M., Trujillo, M.A., Miller, L.J., and Eberhardt, N.L. (2001). DNA binding of TEA/ATTS domain factors is regulated by protein kinase C phosphorylation in human choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* *276*, 23464-23470.

Jiao, S., Li, C., Hao, Q., Miao, H., Zhang, L., Li, L., and Zhou, Z. (2017). VGLL4 targets a TCF4-TEAD4 complex to coregulate Wnt and Hippo signalling in colorectal cancer. *Nature communications* *8*, 14058.

Jiao, S., Wang, H., Shi, Z., Dong, A., Zhang, W., Song, X., He, F., Wang, Y., Zhang, Z., Wang, W., *et al.* (2014). A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer. *Cancer cell* *25*, 166-180.

Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* *119*, 1420-1428.

Kaneko, K.J., Kohn, M.J., Liu, C., and DePamphilis, M.L. (2007). Transcription factor TEAD2 is involved in neural tube closure. *Genesis* *45*, 577-587.

Kato, Y., Yashiro, M., Noda, S., Tendo, M., Kashiwagi, S., Doi, Y., Nishii, T., Matsuoka, J., Fuyuhiko, Y., Shinto, O., *et al.* (2010). Establishment and characterization of a new hypoxia-resistant cancer cell line, OCUM-12/Hypo, derived from a scirrhous gastric carcinoma. *British journal of cancer* *102*, 898-907.

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.

Komuro, A., Nagai, M., Navin, N.E., and Sudol, M. (2003). WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J Biol Chem* *278*, 33334-33341.

- 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, 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. *Journal of virology* 74, 9680-9693.
- Li, V.S., Ng, S.S., Boersema, P.J., Low, T.Y., Karthaus, W.R., Gerlach, J.P., Mohammed, S., Heck, A.J., Maurice, M.M., Mahmoudi, T., *et al.* (2012). Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149, 1245-1256.
- Lin, J., Xu, P., LaVallee, P., and Hoidal, J.R. (2008). Identification of proteins binding to E-Box/Ku86 sites and function of the tumor suppressor SAFB1 in transcriptional regulation of the human xanthine oxidoreductase gene. *J Biol Chem* 283, 29681-29689.
- Lin, K.C., Moroishi, T., Meng, Z., Jeong, H.S., Plouffe, S.W., Sekido, Y., Han, J., Park, H.W., and Guan, K.L. (2017). Regulation of Hippo pathway transcription factor TEAD by p38 MAPK-induced cytoplasmic translocation. *Nat Cell Biol* 19, 996-1002.
- Lin, Z., Zhou, P., von Gise, A., Gu, F., Ma, Q., Chen, J., Guo, H., van Gorp, P.R., Wang, D.Z., and Pu, W.T. (2015). Pi3kcb links Hippo-YAP and PI3K-AKT signaling pathways to promote cardiomyocyte proliferation and survival. *Circulation research* 116, 35-45.
- Liu, X., Li, H., Rajurkar, M., Li, Q., Cotton, J.L., Ou, J., Zhu, L.J., Goel, H.L., Mercurio, A.M., Park, J.S., *et al.* (2016). Tead and AP1 Coordinate Transcription and Motility. *Cell reports* 14, 1169-1180.
- 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. *Clinical & experimental metastasis* 30, 833-843.
- Magico, A.C., and Bell, J.B. (2011). Identification of a classical bipartite nuclear localization signal in the Drosophila TEA/ATTS protein scalloped. *PLoS One* 6, e21431.
- 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.
- Meerschaert, K., Tun, M.P., Remue, E., De Ganck, A., Boucherie, C., Vanloo, B., Degeest, G., Vandekerckhove, J., Zimmermann, P., Bhardwaj, N., *et al.* (2009). The PDZ2 domain of zonula occludens-1 and -2 is a phosphoinositide binding domain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66, 3951-3966.
- Mevel, R., Draper, J.E., Lie, A.L.M., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2019). RUNX transcription factors: orchestrators of development. *Development* 146.

Nakagawa, S., and Huibregtse, 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.

Noland, C.L., Gierke, S., Schnier, P.D., Murray, J., Sandoval, W.N., Sagolla, M., Dey, A., Hannoush, R.N., Fairbrother, W.J., and Cunningham, C.N. (2016). Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling. *Structure* 24, 179-186.

Nusse, R., and Clevers, H. (2017). Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169, 985-999.

Ohanna, M., Sobering, A.K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P.A., Sotiropoulos, A., and Pende, M. (2005). Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol* 7, 286-294.

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. *The Biochemical journal* 432, 461-472.

Pobbati, A.V., Chan, S.W., Lee, I., Song, H., and Hong, W. (2012). Structural and functional similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD complexes. *Structure* 20, 1135-1140.

Qiao, Y., Lin, S.J., Chen, Y., Voon, D.C., Zhu, F., Chuang, L.S., Wang, T., Tan, P., Lee, S.C., Yeoh, K.G., *et al.* (2016). RUNX3 is a novel negative regulator of oncogenic TEAD-YAP complex in gastric cancer. *Oncogene* 35, 2664-2674.

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. *Molecular biology of the cell* 24, 2528-2543.

Rappe, U., Schlechter, T., Aschoff, M., Hotz-Wagenblatt, A., and Hofmann, I. (2014). Nuclear ARVCF protein binds splicing factors and contributes to the regulation of alternative splicing. *J Biol Chem* 289, 12421-12434.

Raya-Sandino, A., Castillo-Kauil, A., Dominguez-Calderon, A., Alarcon, L., Flores-Benitez, D., Cuellar-Perez, F., Lopez-Bayghen, B., Chavez-Munguia, B., Vazquez-Prado, J., and Gonzalez-Mariscal, L. (2017). Zonula occludens-2 regulates Rho proteins activity and the development of epithelial cytoarchitecture and barrier function. *Biochimica et biophysica acta* 1864, 1714-1733.

Resh, M.D. (2006). Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nature chemical biology* 2, 584-590.

Sanchez-Pulido, L., Martin-Belmonte, F., Valencia, A., and Alonso, M.A. (2002). MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends in biochemical sciences* 27, 599-601.

Sawada, A., Kiyonari, H., Ukita, K., Nishioka, N., Imuta, Y., and Sasaki, H. (2008). Redundant roles of Tead1 and Tead2 in notochord development and the regulation of cell proliferation and survival. *Mol Cell Biol* 28, 3177-3189.

Shaiken, T.E., and Opekun, A.R. (2014). Dissecting the cell to nucleus, perinucleus and cytosol. *Sci Rep* 4, 4923.

Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Castagnoli, L., Shaul, Y., Sacchi, A., Oren, M., Sudol, M., Cesareni, G., and Blandino, G. (2001). Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. *J Biol Chem* 276, 15164-15173.

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, 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. *Nature communications* 8, 15237.

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 pathogens* 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.

Townson, S.M., Kang, K., Lee, A.V., and Oesterreich, S. (2004). Structure-function analysis of the estrogen receptor alpha corepressor scaffold attachment factor-B1: identification of a potent transcriptional repression domain. *J Biol Chem* 279, 26074-26081.

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. *J Biol Chem* 278, 2692-2700.

Tumaneng, K., Schlegelmilch, K., Russell, R.C., Yimlamai, D., Basnet, H., Mahadevan, N., Fitamant, J., Bardeesy, N., Camargo, F.D., and Guan, K.L. (2012). YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nat Cell Biol* 14, 1322-1329.

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.

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. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74, 373-392.

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.

Xiao, J.H., Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J.M., and Chambon, P. (1991). Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* 65, 551-568.

Yagi, R., Kohn, M.J., Karavanova, I., Kaneko, K.J., Vullhorst, D., DePamphilis, M.L., and Buonanno, A. (2007). Transcription factor TEAD4 specifies the trophoctoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 134, 3827-3836.

Young, L.H., Balin, B.J., and Weis, M.T. (2005). Go 6983: a fast acting protein kinase C inhibitor that attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular drug reviews* 23, 255-272.

Zagurovskaya, M., Shareef, M.M., Das, A., Reeves, A., Gupta, S., Sudol, M., Bedford, M.T., Prichard, J., Mohiuddin, M., and Ahmed, M.M. (2009). EGR-1 forms a complex with YAP-1 and upregulates Bax expression in irradiated prostate carcinoma cells. *Oncogene* 28, 1121-1131.

Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., Rosato, A., Bicciato, S., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2015). Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat Cell Biol* 17, 1218-1227.

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

Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., Yu, J., Lin, J.D., Wang, C.Y., Chinnaiyan, A.M., *et al.* (2008). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & development* 22, 1962-1971.