

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

Unidad Zacatenco

**Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias**

**El papel de ZO-2 en la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes y la expresión de las conexinas 32 y 43**

**L.B.M. Diego Lara Morales**

Tesis para obtener el grado de

**Maestría en Ciencias**

En la especialidad de  
Fisiología Celular y Molecular

Directora de tesis

**Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel**

Ciudad de México

Agosto, 2022

**Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel profesora titular del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV y con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becario CONACYT CVU 1080761)**

## **Agradecimientos**

A la Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel por aceptarme a formar parte de su equipo de trabajo y estar bajo su tutela, también por su dedicación a mi enseñanza y desarrollo profesional. Es un gran ejemplo de excelencia y pasión por la ciencia.

A la Q.F. B. María de Lourdes Alarcón Mortera, a la M. en C. Dolores Martín Tapia y al Biol. Miguel Ángel Rojas Sierra por su apoyo técnico necesario para la realización de mi proyecto, también su disposición al brindarme siempre a tiempo y en perfectas condiciones el material y la enseñanza de técnicas necesarias para mi trabajo. A Alicia Teudosio Díaz por su apoyo para conseguir mis reactivos.

A mi comité tutorial el Dr. Arturo Ponce Balderas y el Dr. José Segovia Vila por la revisión de mi trabajo de tesis y por sus observaciones para mejorar el proyecto

A mis compañeros del laboratorio 29: Christian, Misael, Cristina, Sara y Laura. Gracias por su apoyo y amistad durante este tiempo.

A Lulú, Lollita, Mike y Alice por sus enseñanzas, apoyo, cariño, amistad y hacer más amena mi estancia en laboratorio.

A mis padres, José Luis Lara Perón y Cristina Morales Hernández, gracias por apoyarme incondicionalmente, poner su mayor esfuerzo para que salga adelante y cumplir mis metas, tenerme paciencia y educarme con tanto amor. Los amo profundamente y todo lo que soy es gracias a ustedes.

A mis hermanas, Val y Lup, gracias por todo el apoyo y confianza que ponen en mí, gracias por ser mis cómplices en todo, hacerme sonreír todos los días y cuidarme tanto.

A Abiram Gómez Ávila, por el apoyo durante todo este tiempo que hemos compartido, consentirme y por aguantar mi especial forma de ser. Por quererme, y cuidarme tanto.

A mis tíos y primos tanto Lara como Morales por todas las muestras de cariño y los buenos momentos.

# Índice

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	7
<b>Resumen</b> .....	8
<b>Abstract</b> .....	9
<b>I Introducción</b> .....	10
1. Las células epiteliales .....	10
2. Las UEs .....	10
2.1 Localización y apariencia de las UEs .....	10
2.2 Función de las UEs .....	11
2.3 Composición molecular de las UE .....	11
3. ZO-2 .....	13
3.1 Organización molecular de ZO-2 .....	13
3.2 Interacción de ZO-2 con diversas proteínas .....	13
3.3 Localización de ZO-2 .....	14
4. Las uniones comunicantes .....	15
4.1 Localización y apariencia de las uniones comunicantes .....	15
4.2 Función de la unión comunicante .....	16
4.3 Composición molecular de las uniones comunicantes .....	17
5. Interacción de ZO-2 con las conexinas .....	17
<b>II Planteamiento del problema</b> .....	18
<b>III Hipótesis</b> .....	18
<b>IV Objetivo general</b> .....	18
<b>V Objetivos particulares</b> .....	19
<b>VI Metodología</b> .....	19
1. Cultivo celular .....	19
2. Inmunofluorescencia .....	19
3. Western Blot .....	20
4. Protocolo para inducir la formación de las UEs en las células epiteliales .....	20
5. Medición de la GJIC por transferencia de colorante .....	21
<b>VII Resultados</b> .....	21
1. La GJIC disminuye en ausencia de ZO-2 .....	21
2. La GJIC inducida por ouabaina se bloquea en ausencia de ZO-2 .....	23
3. El cambio a calcio induce la GJIC y este proceso es sensible a la presencia de ZO-2 .....	23

4. La activación del receptor sensor de calcio aumenta la GJIC y este proceso es sensible a la presencia de ZO-2 .....	24
5. El movimiento de ZO-2 al borde celular inducido por la AMPK promueve la GJIC .....	25
6. La expresión de la conexina 32 disminuye cuando no hay ZO-2 .....	26
7. En ausencia de ZO-2 aumenta la expresión de la Cx43 .....	27
8. La ausencia de ZO-2 reduce el incremento en la expresión de la Cx32 inducido por el cambio a calcio, pero aumenta el contenido de la Cx43 .....	28
<b>VIII Discusión</b> .....	30
<b>X Referencias</b> .....	33

## **Lista de abreviaturas**

**Cx:** conexina

**GJIC:** comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes

**GK:** Guanilato cinasa

**BC:** Medio con bajo calcio (1-5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ )

**MAGI:** MAGUK invertida

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

**CN:** Medio con calcio normal (1.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ )

**UC:** unión comunicante

**UE:** unión estrecha

**ZO:** Zonula occludens

## Resumen

En los epitelios, el análisis por crio-fractura de la membrana plasmática muestra a los filamentos de las uniones estrechas (UEs) en contacto con placas de uniones comunicantes (UCs) formadas por partículas intramembranales de conexinas (Cxs). Se sabe que la proteína ZO-2 de las UE se une a varias Cxs. Con estos antecedentes, en esta tesis se investigó si ZO-2 modula la comunicación intercelular mediada por UCs y la expresión de las Cx32 y Cx43. Se encontró que cuando falta ZO-2, disminuye la comunicación intercelular mediada por las uniones comunicantes (GJIC) inducida con ouabaina. También, se vió que es necesario que ZO-2 migre al borde celular para favorecer la GJIC. Por otro lado, la ausencia de ZO-2 altera el perfil de las conexinas ya que disminuye la expresión de la Cx32 y en cambio, es más abundante la Cx43. Nuestros resultados sugieren que ZO-2 es una proteína plataforma que modula la GJIC.

## **Abstract**

Freeze-fracture analysis of the plasma membrane of epithelia shows tight junction (TJs) strands in contact with gap junction (GJ) plates formed by intramembrane connexin (Cxs) particles. ZO-2 protein of TJs binds to several Cxs. With this background, in this thesis we investigated whether ZO-2 modulates GJ intercellular communication (GJIC) and the expression of Cx32 and Cx43. We found that GJIC decreases in the absence of ZO-2, even when the latter is induced with ouabain. We also found that it is necessary for ZO-2 to migrate to the cell border to favor GJIC. The lack of ZO-2 alters Cxs expression through the down-regulation of Cx32 and the up-regulation of Cx43. Our results suggest that ZO-2 modulates GJIC.

## **I Introducción**

### **1. Las células epiteliales**

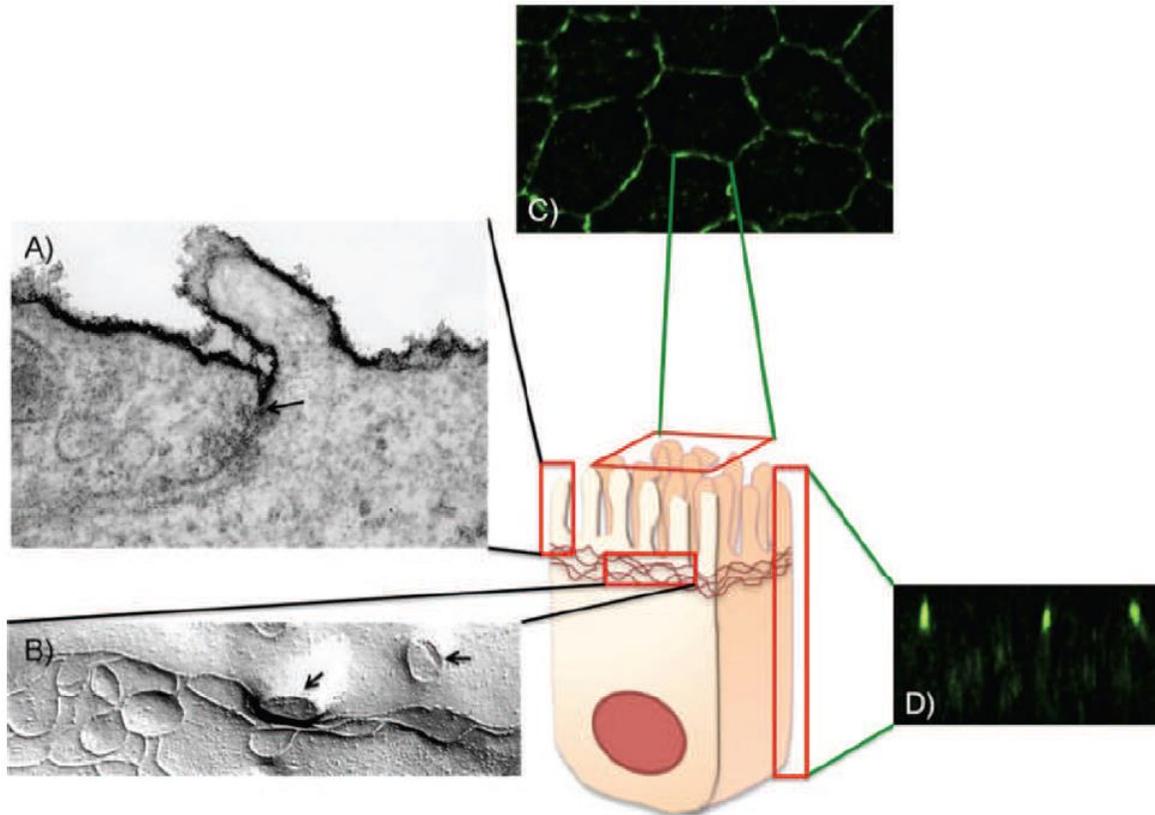
Los epitelios recubren al cuerpo (e.g. piel), las cavidades (e.g. vagina, vejiga, próstata, útero y estómago) y los ductos (e.g. intestino, esófago y túbulo renales) de los organismos multicelulares. Las células epiteliales forman una barrera entre el individuo y el medio externo, que regula selectivamente el paso de iones y moléculas hacia adentro y afuera del organismo. Este intercambio de iones y sustancias en los epitelios se hace por dos vías diferentes: la paracelular, entre el espacio célula-célula, y la transcelular, a través de las células (Gonzalez-Mariscal, et al., 2012).

Las células epiteliales se encuentran polarizadas por lo que su membrana apical es morfológica y bioquímicamente distinta de la basolateral. Entre estas dos membranas se localiza un complejo de unión celular llamado unión estrecha (UE).

### **2. Las UEs**

#### **2.1 Localización y apariencia de las UEs**

La UE es una estructura de contacto célula-célula característica de las células epiteliales que se localiza en la parte más apical de la membrana lateral. Por microscopía electrónica de transmisión la UE se observa como puntos de contacto donde las caras exoplásmicas de las membranas de las células vecinas parecen fusionarse (Farquhar and Palade., 1963). Usando la técnica de crío-fractura que permite observar el interior de la membrana, la UE aparece como una red de filamentos que rodea a la célula justo por debajo de las microvellosidades apicales (Staehele et al., 1969). Por inmunofluorescencia, las proteínas de la UE se localizan en el borde celular generando un patrón que asemeja a una malla de gallinero. Desde una vista lateral por inmunofluorescencia, las proteínas de la UE se concentran en puntos, en la porción más apical de la membrana lateral (Fig. 1).



**Figura 1.** UE vista por microscopía electrónica y de fluorescencia. A) Imagen de microscopía electrónica de transmisión donde la UE se ve como puntos en los que las membranas adyacentes parecen fusionarse (flecha). Se observa, como el marcador electrodenso, rojo de rutenio que se agregó a la cara apical, no difunde por la vía paracelular más allá de la UE. B) Por crio-fractura las UE se observan con una red de filamentos que rodea a la célula por debajo de las microvellosidades. C) Por microscopía de fluorescencia en un corte transversal, las UE se aprecian en el borde celular formando un patrón de malla de gallinero. D) En un corte lateral, las UEs aparecen como puntos en el límite superior de la membrana lateral (Gonzalez-Mariscal, et al., 2012).

## 2.2 Función de las UEs

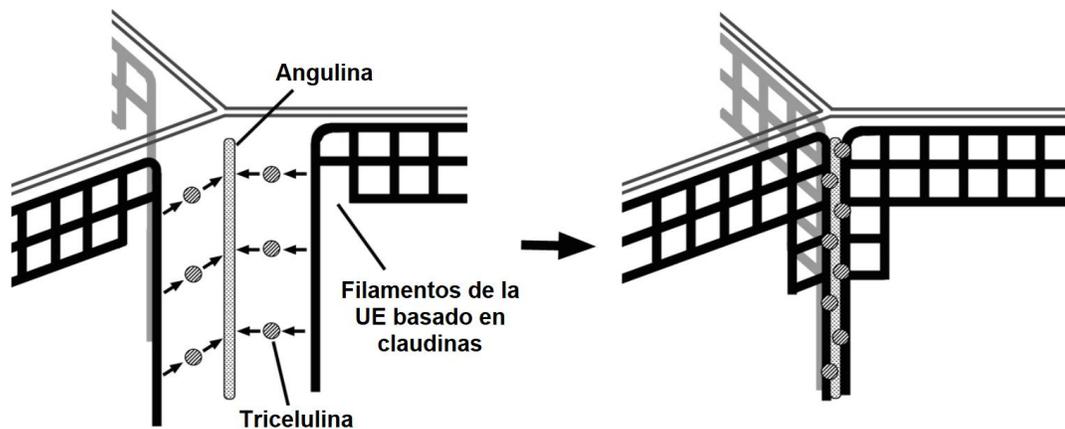
Las UEs tienen dos funciones canónicas: 1) De **cerca**, que restringe la difusión de lípidos y proteínas en el plano de la membrana, entre los dominios apical y basal, manteniendo así la polaridad de la membrana plasmática. 2) De **compuerta**, que regula el paso de iones y moléculas, a través de la vía paracelular (Gonzalez-Mariscal, et al., 2014).

## 2.3 Composición molecular de las UE

Las UEs están constituidas por un conjunto complejo de proteínas, tanto periféricas como integrales. Dentro de estas últimas, encontramos a las que

atraviesan cuatro veces la membrana como las claudinas. Estas constituyen una familia de más de 24 miembros y se caracterizan porque forman poros o barreras paracelulares responsables de la selectividad iónica paracelular. Entre las proteínas tetraspan de las UE se encuentran también tricelulina, ocludina y MarvelD3, todas ellas miembros de la familia TAMP (Tight Junction Associated Marvel Proteins). Los filamentos característicos de la UE están constituidos por cadenas polimerizadas de claudinas, con moléculas intercaladas de ocludina. La ocludina es importante porque permite el entrecruzamiento de la red de filamentos de la UE (Saito et al., 2021), y la tricelulina es esencial para las uniones tricelulares, ya que en su ausencia no se forman los filamentos laterales de estas uniones que se conectan con el filamento central y perpendicular (Sugawara et al., 2021) (Fig. 2).

Las proteínas de la UE que atraviesan una sola vez la membrana son las angulinas y las JAM. Las primeras se localizan en las UEs tricelulares y las segundas en las bicelulares. Ambas proteínas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y son las primeras proteínas en llegar a los sitios donde se formarán las UEs, y al hacerlo facilitan la aposición y acercamiento de las membranas en la región de la UE. La angulina-1 es crucial para la UE tricelular ya que en su ausencia no se forma el filamento central, perpendicular característico de esta unión (Sugawara et al., 2021) (Fig. 2).



**Figura 2.** Esquema de la UE tricelular. En el panel izquierdo se muestra como en las UE tricelulares la angulina forma el eje central al cual se une de forma lateral la tricelulina. Tanto en el eje central como en las ramificaciones, se polimerizan las claudinas formando una estructura particular de las UE tricelulares que asemeja el esqueleto de un pez, como se observa en el panel derecho (modificado de Furuse et al., 2014).

Las proteínas periféricas de la UE forman un puente entre el citoesqueleto de actina y las proteínas integrales de la UE, y se unen a una variedad de proteínas de señalización cuya presencia concentran en la UE. Por ello, se les denomina también proteínas adaptadoras (Gonzalez-Mariscal, et al., 2014). Estas proteínas pueden interactuar con otras porque contienen regiones de asociación proteína-proteína como los dominios PDZ, SH3 y guanilato cinasa (GuK), y el motivo de unión a dominios PDZ.

Entre las proteínas adaptadoras de la UE se encuentran las proteínas de la familia MAGUK: ZO-1, ZO-2, ZO-3 y Pals-1; así como las MAGUK invertidas MAGI-1, -2 y -3. También, están aquellas con múltiples dominios PDZ como PATJ y MUP1; y las que poseen un solo dominio PDZ y no pertenecen a las familias anteriores, como afadina, par-3 y par-6.

### **3. ZO-2**

La proteína ZO-2 (*zonula occludens 2*) de 160 KDa, se identificó inicialmente por su co-inmunoprecipitación con ZO-1, en extractos de células MDCK (Gumbiner et al., 1991).

#### **3.1 Organización molecular de ZO-2**

ZO-2 en su región amino contiene tres dominios PDZ, y en su porción media exhibe un dominio SH3 y un módulo GuK. SH3 y GuK juntos forman un supra módulo que se abre y cierra y de esta manera cambia la conformación de la molécula de estirada a plegada. En la región carboxilo de ZO-2 se encuentra una región rica en prolina que se une a la actina (ABR, por las siglas en inglés de actin binding región). Finalmente, ZO-2 en su porción carboxilo terminal, contiene al motivo TEL de unión a dominios PDZ.

#### **3.2 Interacción de ZO-2 con diversas proteínas**

En la membrana, ZO-2 se une a proteínas de la UE, la unión adherente (UA), la unión comunicante (GJ) y del citoesqueleto. El primero dominio PDZ de ZO-2 se une a las claudinas y a la conexina 36; el segundo a ZO-1 y a otras moléculas de

ZO-2, a las JAMs y a la conexina 43. La región central SH3-GuK se une a la  $\alpha$ -catenina y a la ocludina, mientras que el motivo TEL se une a la proteína scribble que pertenece al complejo de polaridad lateral [para una revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2019)].

Cuando ZO-2 se encuentra en el núcleo, se asocia al factor SC-35 del procesamiento alternativo del ARNm, y a los factores de transcripción Jun, Fos, CEBP, Myc y TEAD, y de esta manera regula la transcripción de genes (Islas et al., 2002; Gallegos-Gutierrez et al., 2021; Huerta et al., 2007; Betanzos et al., 2004). ZO-2 también interacciona con la proteína del nucleoesqueleto lámina B1 y con la proteína SUN-1 que funciona como vínculo entre el esqueleto nuclear y el citoplásmico (Hernandez-Guzman et al., 2021) (Fig. 3).

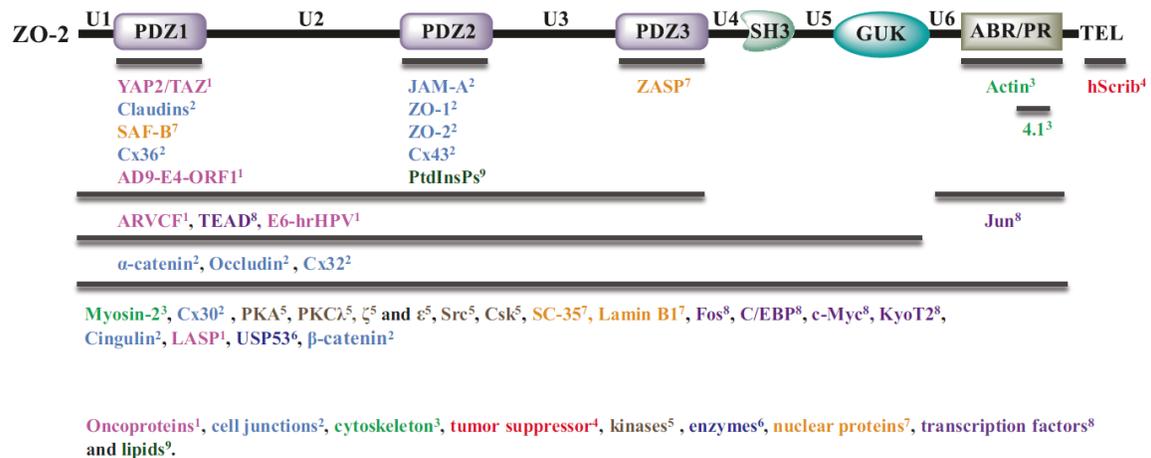


Figura 3. Organización esquemática de ZO-2. ZO-2 tiene tres dominios PDZ, un módulo SH3, un dominio GUK y una región rica en prolina y de unión a actina (ABR/PR), en el segmento carboxilo terminal cuenta con un motivo TEL de unión a dominios PDZ. Las regiones únicas (U) localizadas entre los diferentes dominios y segmentos de ZO-2 están numeradas. Las líneas indican las regiones de ZO-2 que se asocian a diferentes moléculas, incluyendo oncoproteínas, proteínas de las uniones celulares, supresores de tumores, cinasas, factores nucleares y de transcripción, y lípidos (Gonzalez-Mariscal et al., 2022).

### 3.3 Localización de ZO-2

La localización de ZO-2 depende de la confluencia del cultivo. Así, en los cultivos subconfluentes en proliferación, ZO-2 está presente tanto en las UEs como en el núcleo. En estos cultivos ZO-2 viaja al núcleo al final de la fase G1. En cambio, en los cultivos confluentes, ZO-2 se concentra en la membrana celular a donde llega

sin pasar antes por el núcleo (Chamorro et al., 2009; Quiros et al., 2013; Tapia et al., 2019).

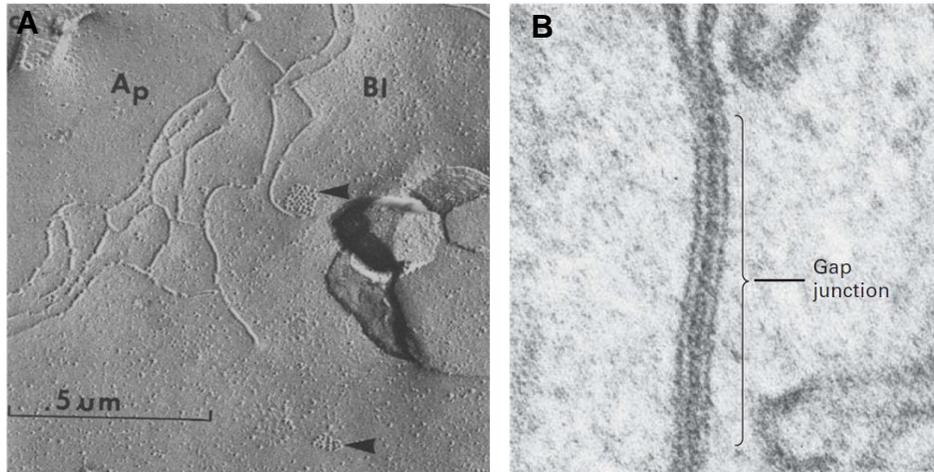
Para entrar y salir del núcleo, ZO-2 contiene 2 señales de localización nuclear (NLS) bipartitas y una monopartita, localizadas en el segmento U2 entre los dominios PDZ1 y 2 (Quiros et al., 2013). Para salir del núcleo, ZO-2 posee 4 señales de exportación (NES), dos en el dominio PDZ2 y las restantes en el módulo GuK (Chamorro et al., 2009). La actividad de estas señales se regula por modificaciones postraduccionales como la fosforilación, glucosilación y SUMOilación (Wetzel et al., 2016; Chamorro et al., 2009; Quiros et al., 2013)

#### **4. Las uniones comunicantes**

Las GJs son uniones célula-célula que permiten la comunicación entre el citoplasma de las células vecinas. Forman canales por los que pasan iones, segundos mensajeros y otras moléculas solubles en agua, menores a 1 KDa [para una revisión ver (Sohl and Willecke, 2004)].

##### **4.1 Localización y apariencia de las uniones comunicantes**

En las réplicas de crio-fracturas las GJs se observan como parches de partículas intramembranales que con frecuencia se intercalan o se localizan junto a los filamentos de la UE (Fig. 2) (Cereijido et al., 1984; Kojima et al., 2001). Por microscopía electrónica de corte fino, la GJ se distingue como una región en la membrana lateral con un patrón particular de 5 líneas paralelas: 2 oscuras en los extremos que corresponde a las cabezas polares de las hojas citoplásmicas de las membranas adyacentes, seguidas hacia adentro por líneas claras de la región hidrofóbica de las membranas y una región central oscura correspondiente a las cabezas polares de las hojas exoplásmicas de las membranas adyacentes que se encuentran a 2-3 nm de distancia entre sí (Lodish et al., 2016).



**Figura 4.** A) Réplica de crio-fractura donde se observan GJs (cabeza de flecha) cercanas o junto a los filamentos de la UE en las células MDCK. Ap; membrana apical; Bl; membrana basolateral (Cerejido et al., 1984) B). Microscopía electrónica de corte fino de una GJ conectando a las células hepáticas de ratón. Obsérvese el patrón pentalaminar de la estructura (Lodish et al., 2016).

## 4.2 Función de la unión comunicante

La GJ permite el intercambio entre células vecinas, de iones como el  $\text{Ca}^{++}$ , segundos mensajeros como el  $\text{IP}_3$  y el cAMP, y de otras moléculas hidrosolubles menores a 1 KDa. Este intercambio se denomina comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes (GJIC, por las siglas en inglés de gap junction intercellular communication) (Kojima et al., 2001). Esta comunicación tiene un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis, la morfogénesis, la diferenciación celular y el control del crecimiento en los organismos multicelulares.

La permeabilidad de los canales de las GJs depende de:

1) El tipo de conexinas que lo componen. Por ejemplo, las células de glioma C6 que expresan Cx32 intercambian la adenosina 12 veces más rápido que las que expresan Cx43 (Goldberg et al., 2002).

2) Modificaciones postraduccionales como la fosforilación de la región carboxilo terminal de las conexinas. Así, en el hígado se ha visto que la fosforilación de la Cx32 en la S233 por la proteína cinasa A (PKA) aumenta la GJIC (Saez et al., 1990), mientras que la activación de la PKC en la astroglía la disminuye (Enkvist y McCarthy et al., 1992)

3) Cambios en el ambiente celular. Por ejemplo, en los astrocitos conforme aumenta la actividad del  $\text{Ca}^{++}$  intracelular de 150 a 600 nM, se abate la GJIC (Enkvist et al., 2002). Así mismo, cuando en las células HeLa el pH del medio se acidifica, el canal formado por la Cx26 se cierra (Yu et al., 2007).

#### **4.3 Composición molecular de las uniones comunicantes**

Los canales de las GJs están compuestos por dos conexones, uno en cada célula adyacente, que se contactan entre sí en la membrana lateral. Cada conexón está constituido por seis conexinas (Cx). Estas son proteínas que atraviesan 4 veces la membrana y cuyo peso molecular en KDa da origen a su nombre. Así, por ejemplo, las conexinas que pesan 43 o 32 KDa se denominan Cx43 y Cx32 respectivamente. La familia de genes que codifica para las conexinas tiene 20 miembros en el ratón y 21 en humanos.

Cada tejido o tipo celular expresa a un conjunto particular de conexinas [para una revisión ver (Oyamada et al., 2013)]. Por ejemplo, en el cerebro del ratón se han detectado Cx36, Cx45, y Cx57; en los miocitos cardiacos las Cx30.2, Cx40, Cx43 y Cx45 (Lambiase et al., 2015); en los hepatocitos las Cx26 y Cx32 (Sohl et al., 2004); en el pulmón las Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43; y en el cérvix las Cx26, Cx30, Cx40 y Cx43 (Aasen et al., 2005). Como se observa, por lo general, los epitelios comparten la expresión de las Cx26, Cx32 y Cx43 (Koval, 2002; Monaghan et al., 1996; Jamieson et al., 1998; Aasen et al., 2005).

Los conexones pueden ser heteroméricos si están formados por dos o más conexinas diferentes, y formar canales heterotípicos si los dos conexones son diferentes entre sí (Niesen et al., 2012).

#### **5. Interacción de ZO-2 con las conexinas**

Las conexinas en su porción carboxilo terminal poseen un motivo de unión a dominios PDZ, con el que se pueden unir a los dominios PDZ de las proteínas ZO. En particular, ZO-2 se une a las conexinas 30, 32, 36 y 43. Su asociación con las Cx30 y 32 se ha demostrado por inmunoprecipitación, pero aún no se sabe a través de que dominio PDZ ocurre (Talhok et al., 2008). En cambio, ya se sabe que el

PDZ1 de ZO-2 se une al motivo de unión de dominios PDZ de la Cx36 (Li et al., 2009), y el PDZ2 de ZO-2 al carboxilo terminal de Cx43 (Singh & Lampe, 2005) (tabla 1). Sin embargo, cabe destacar que, aunque se conocen estas interacciones ZO-2/Cx no se ha estudiado su efecto sobre la GJIC, ni el mecanismo involucrado.

Tabla 1. ZO-2 interacciona con diferentes conexinas.

Proteína	Dominio	Conexina	Motivo en conexina	Técnicas	Tejido / células	Referencias
ZO-2	PDZs	Cx30		IP	Mamario	Talhouk et al., (2008). <i>Experimental cell research</i> , 314:3275-3291.
		Cx32		IP	Mamario	
	PDZ-1	Cx36	Residuos terminales (SAYV)	CI	HeLa and $\beta$ TC-3	Li et al., (2009) <i>Neurochem. Int.</i> 54:393-402
	PDZ-2	Cx43	C-terminal	IP, CI, PD, MS	NRK, HEK 293T, corazón	Singh & Lampe, (2005) <i>J. Biol. Chem.</i> 280:30416-30421.

CI, colocalización; IP, inmunoprecipitación; PD, pull-down; MS, espectrometría de masas; HeLa, células de cancer cervical humano;  $\beta$ TC-3, insulinoma de ratón; NRK, células epiteliales de riñón de rata normal; HEK293, células 293 de riñón de embrión humano.

## II Planteamiento del problema

ZO-2 se une a varias conexinas, sin embargo, se desconoce qué efecto tiene esta interacción en la GJIC

## III Hipótesis

ZO-2 se asocia a varias conexinas, por ello proponemos que esta interacción regula la GJIC.

## IV Objetivo general

Estudiar el papel de ZO-2 en la regulación de la comunicación intercelular mediada por las uniones comunicantes (GJIC).

## **V Objetivos particulares**

### **Analizar si:**

- La ausencia de ZO-2 disminuye la GJIC
- La inducción de la GJIC por ouabaina o el calcio extracelular requiere de la presencia de ZO-2
- La activación del receptor sensor de calcio (CaSR) o la AMPK, que induce el movimiento de ZO-2 al borde celular, promueven la GJIC
- La ausencia de ZO-2 altera la expresión de las Cx32 y Cx43
- Al inducir la formación de UEs se altera la expresión de las Cx32 y Cx43

## **VI Metodología**

### **1. Cultivo celular**

Las clonas parentales (control) y ZO-2 KD de las células epiteliales de riñón de perro MDCK (Madin Darby canine kidney) las donó generosamente el Dr. Alan Fanning (Universidad de Carolina del Norte, Chapell Hill, NC). Las células ZO-2 KD expresan de forma estable tres shRNAs contra ZO-2 insertados en el vector pSuper, mientras que las células parentales expresan al vector vacío. Las células se cultivaron como se reportó anteriormente (Gonzalez-Mariscal., 1985).

### **2. Inmunofluorescencia**

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% por 30 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con acetona a -20°C por 5 minutos. Posteriormente, las células se hidrataron con PBS y se lavaron 3 veces con el mismo amortiguador. En seguida se incubaron con la solución ASE (50 mM glicina, 0.05% tween-20, 0.1% triton X-100, 0.1% BSA, y 2% SFB) por 20 minutos a temperatura ambiente. Las células parentales (control) y ZO-2 KD se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos policlonales de conejo anti-conexina 43 (Cat. 71-0700, dilución 1:100, Invitrogen, Rockford, IL, USA) o 32 (Cat. 71-0600, dilución 1:100, Invitrogen, Rockford, IL, USA), o con el anticuerpo monoclonal de rata anti-ZO-1 (Cat. R26.4C, dilución 1:10,

Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA). Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron con anticuerpos de burro anti-conejo acoplados a Alexa Fluor 594 (Cat. A-21207, dilución 1:1000, Eugene, OR, USA) o Alexa FLuor 488 (Cat. A-21208, dilución 1:1000, Eugene, OR, USA). Los núcleos se tiñeron con VECTASHIELD® (Cat. H-1200; Vector Laboratories, Burlingame CA, USA). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal (Leica TC5, SP8, Wetzlar, Alemania) y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las conexinas 43 y 32 se hizo con el programa imageJ.

### **3. Western Blot**

La inmunodetección por western blot se hizo con un protocolo previamente reportado (Quiros et al., 2013), solo que ahora se empleó una solución amortiguadora comercial para cargar las muestras (Cat. NP0008, Invitrogen, Carlsbad, CA). La inmunodetección se realizó con anticuerpos policlonales de conejo contra: conexina 43 (Cat. 71-0700, dilución 1:250, Invitrogen, Rockford, IL, USA), conexina 32 (Cat. 71-0600, dilución 1:200, Invitrogen, Rockford, IL, USA), y ZO-2 (Cat. 71-1400, dilución 1:1000, Invitrogen, Carlsbad, CA); y con el anticuerpo de ratón anti-actina (Dr. Manuel Hernández, dilución 1:500, departamento de Biología Celular CINVESTAV-IPN, Zacatenco, MX). Se utilizaron también anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de conejo (Cat. 65-6120, dilución 1:2000, Frederick, MD, USA), y anti-IgG de ratón (Cat. 62-6520, dilución 1:10000) acoplados a peroxidasa de rábano. Para revelar las membranas se empleó el sistema de quimioluminiscencia Immobilion Western Chemiluminescent HRP substrate (Cat. WVKLS 0500, Millipore Corporation, Darmstadt, Germany).

### **4. Protocolo para inducir la formación de las UEs en las células epiteliales**

A las monocapas de las células parentales y ZO-2 KD cultivadas en medio con calcio normal (CN, 1.8 mM Ca<sup>2+</sup>), se les cambió el medio por uno con bajo calcio (BC, 1-5 μM Ca<sup>2+</sup>) y EGTA 2 mM para inducir el desensamble y la endocitosis de las UEs. Después de 20 h, este medio se cambió por uno con CN para inducir la formación *de novo* de las UEs

## 5. Medición de la GJIC por transferencia de colorante

La comunicación intercelular se evaluó como se describió previamente (Ogazon Del Toro et al., 2019). En resumen, las micropipetas de vidrio con una resistencia en la punta de 5-10 M $\Omega$  se rellenaron con una solución que contenía 120 mM KCl, 5 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES (pH 7.4) y 1% de amarillo Lucifer (Cat. 67764-47-5, Sigma-Aldrich). Después, las micropipetas se montaron en un micromanipulador (PCS-750; Burleigh Instruments) para la inyección de las células. Los cubreobjetos donde se sembraron las células MDCK, se transfirieron a cámaras con PBS y 1.8 mM de Ca<sup>2+</sup> a temperatura ambiente. En seguida, la cámara se montó en un microscopio invertido y equipado con epi-fluorescencia (Diaphot 300; Nikon) para monitorear la inyección. Se eligieron al azar las células de las monocapas que se inyectaron una a una con amarillo Lucifer utilizando un dispositivo de microinyección accionado neumáticamente (IM300; Narishige). Luego de inyectar entre 30 y 50 células, las monocapas se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 4%. Posteriormente, las monocapas se lavaron 3 veces con PBS y se montaron con VECTASHIELD® (Cat. H-1000; Vector Laboratories, Burlingame CA, USA).

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron a temperatura ambiente con un microscopio invertido Zeiss M200 equipado con el objetivo Plan-NeoFluar 63x N.A. 1.25, una cámara AxioCam MRm, y el software Axovision 4.8. Las imágenes capturadas se ajustaron en brillo y contraste con el software ImageJ (release 2.8, NIH, Bethesda, MD, USA).

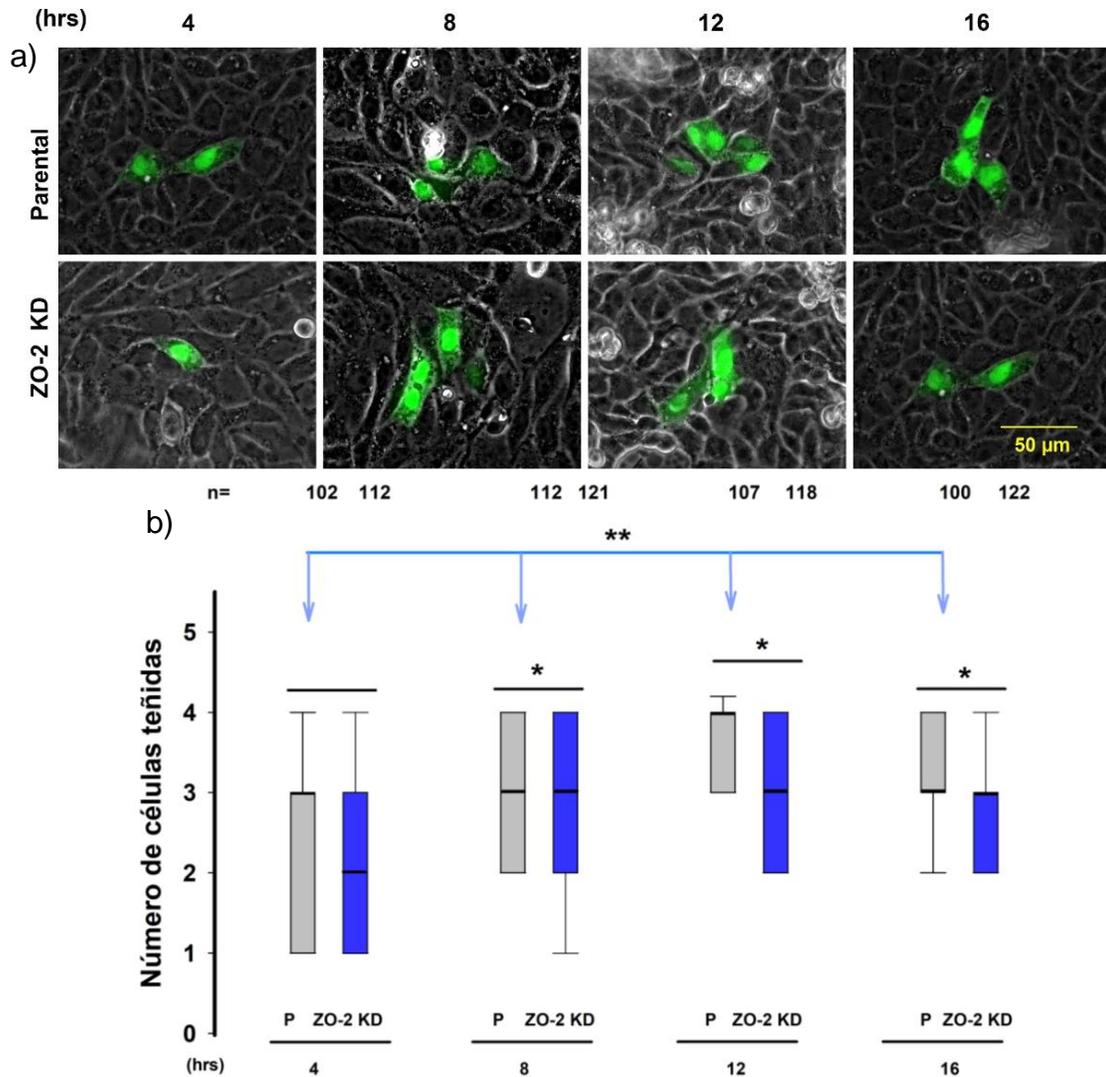
## VII Resultados

**Nota:** Todos los experimentos de medición de la GJIC por transferencia de colorante los hizo el Dr. Arturo Ponce Balderas. Yo los presento en esta tesis porque son parte integral de este proyecto de investigación y participé en su análisis, diseño, e interpretación.

### 1. La GJIC disminuye en ausencia de ZO-2

Para investigar si ZO-2 regula la GJIC, las clonas parental y ZO-2 KD de las células MDCK se sembraron a confluencia y después de 4, 8, 12 y 16 horas se

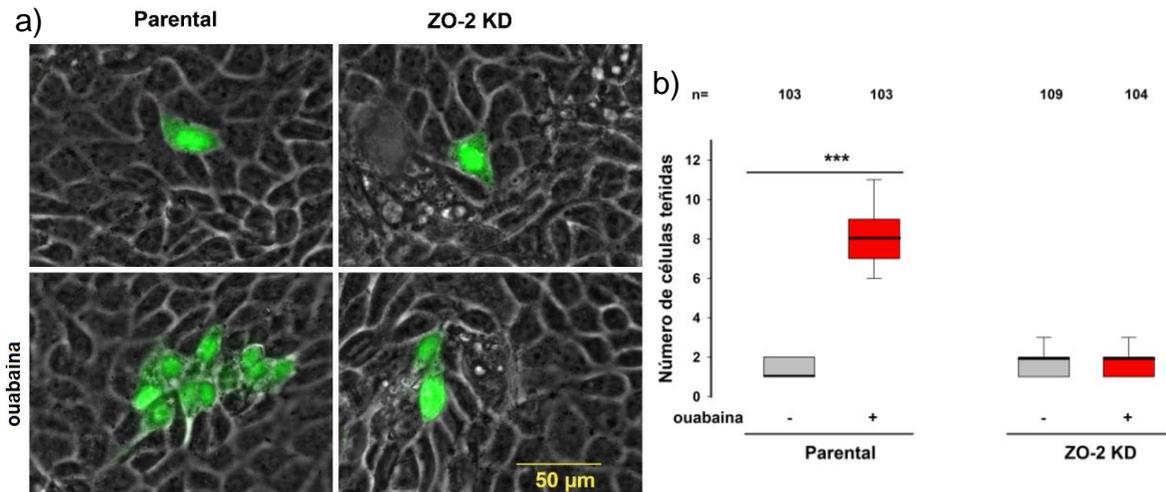
inyectaron células individuales al azar con amarillo Lucifer al 1%. Después las células se fijaron y se contó el número de células vecinas teñidas a las que difundió el colorante. Como se observa en la figura 5, el pico de GJIC ocurre a las 12 horas de sembradas las monocapas tanto de células parentales como de ZO-2 KD. Sin embargo, si no hay ZO-2 disminuye el número de células comunicadas en todos los tiempos analizados.



**Figura 5.** La ausencia de ZO-2 disminuye la GJIC. a) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de las monocapas fijadas, barra 50  $\mu$ m. b) Diagrama de caja que comparan las medianas de los distintos grupos señalados. n, número de células inyectadas; P, parental. Resultados de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de Mann-Whitney, seguida de la comparación múltiple de Kruskal Wallis, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

## 2. La GJIC inducida por ouabaina se bloquea en ausencia de ZO-2

En seguida, nos preguntamos si la falta de ZO-2 evitaría un incremento súbito de la GJIC. Para investigar este punto, analizamos si la pérdida de ZO-2 bloquea la GJIC inducida por ouabaina. La ouabaina es un glucósido cardíaco (Hollman, 1985) y que a la concentración fisiológica de 10 nM induce la GJIC (Ponce et al., 2014). Para este experimento, se sembraron a confluencia las células parentales y ZO-2 KD y se trataron con 10 nM de ouabaina por 1 hora. Después, se inyectaron células individuales al azar con 1% de amarillo Lucifer. Posteriormente, las monocapas se fijaron y se observaron en el microscopio. En la figura 6 se observa que el número de células vecinas a las que difundió el colorante aumenta en las células parentales tratadas con ouabaina. En cambio, en ausencia de ZO-2 esto no sucede.

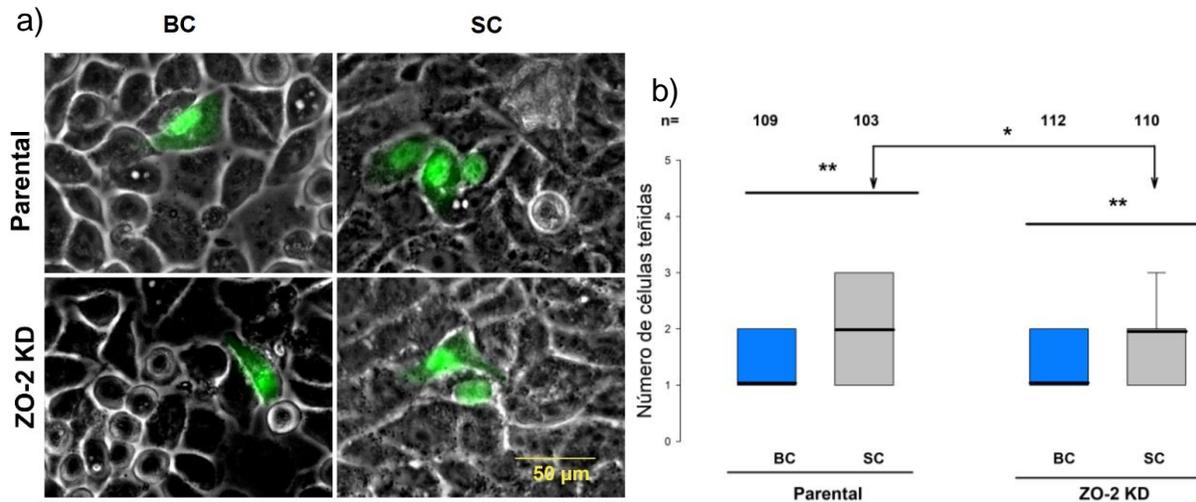


**Figura 6.** La ausencia de ZO-2 bloquea la GJIC inducida por ouabaina. a) Imágenes representativas de inmunofluorescencia. b) Diagrama de caja que comparan las medianas de los distintos grupos señalados. n, número de células inyectadas. Resultados de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de suma de rangos Mann-Whitney, \*\*\* $p < 0.001$ .

## 3. El cambio a calcio induce la GJIC y este proceso es sensible a la presencia de ZO-2

Cuando las células se cultivan en un medio con calcio normal (CN, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ ) las proteínas de la UE, incluida ZO-2, se desplazan al borde celular (Hernandez et al., 2007). Para analizar si es importante la presencia de ZO-2 en la periferia celular para la GJIC, analizamos si el switch de calcio induce la GJIC, y si este proceso se afecta en ausencia de ZO-2. Para ello, primero se sembraron las

células parentales y ZO-2 KD a confluencia en medio con CN para asegurar su adhesión al cubreobjetos de vidrio. Después de 1 hora, las monocapas se lavaron cuidadosamente con PBS sin calcio y se incubaron en medio con bajo calcio (BC, 1-5  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ ) por 20 horas. Después, unas monocapas se transfirieron a medio con CN por 3 horas. A este proceso se le denomina switch de calcio (SC). Las células parentales y ZO-2 KD cultivadas por 20 horas en BC o sometidas a un SC por 3 horas, se inyectaron con 1% de amarillo Lucifer. Las monocapas se fijaron y observaron al microscopio. La figura 7 muestra que, al hacer el SC, el número de células parentales comunicadas aumenta, mientras que en ausencia de ZO-2 es menor el incremento de la GJIC.

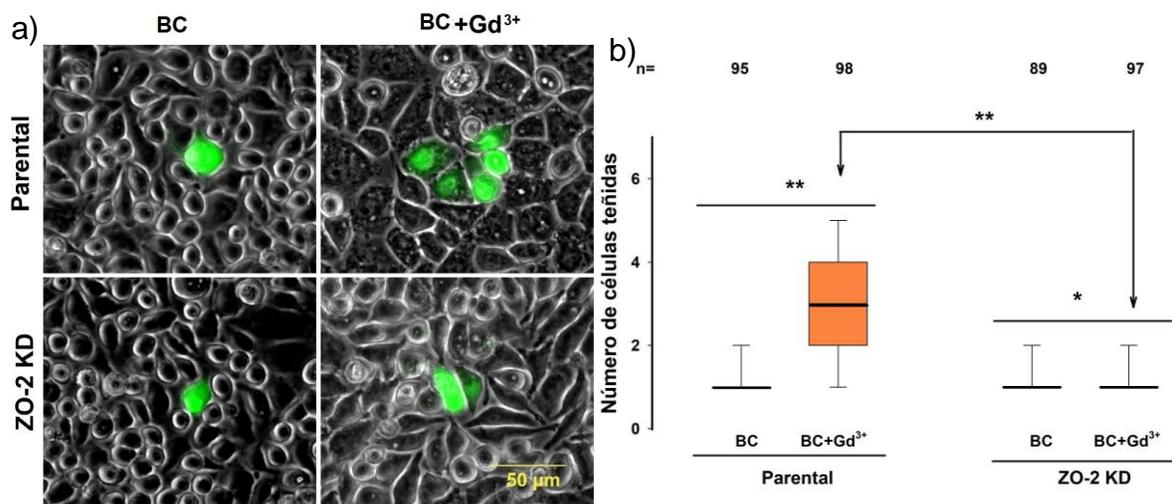


**Figura 7.** La ausencia de ZO-2 bloquea la GJIC inducida por el cambio a calcio. a) Imágenes de inmunofluorescencia representativas. b) Diagrama de caja que comparan las medianas de los distintos grupos señalados. n, número de células inyectadas. El análisis estadístico se realizó con la prueba de suma de rangos Mann-Whitney. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ .

#### 4. La activación del receptor sensor de calcio aumenta la GJIC y este proceso es sensible a la presencia de ZO-2

Cuando se hace un SC el receptor sensor de calcio (CaSR) se activa. Esto dispara una cadena de señalización que involucra a la subunidad  $\alpha_{q/11}$  de la proteína G que activa a la fosfolipasa C (PLC) y convierte el  $\text{PIP}_2$  en  $\text{IP}_3$  y diacilglicerol (DAG). El DAG activa a la  $\text{PKC}\epsilon$ , que fosforila a ZO-2 y WNK4. Esta cinasa a su vez fosforila a ZO-2 induciendo su liberación de 14-3-3 lo que permite a ZO-2 migrar al borde e integrarse a la UE (Amaya et al., 2019). Ahora, quisimos analizar si al activar al

CaSR con su agonista  $Gd^{3+}$  que induce el desplazamiento de ZO-2 a la membrana, aumenta la GJIC. Para ello, se sembraron a confluencia las células parentales y ZO-2 KD en CN. Después de 1 hora, las monocapas se lavaron suavemente con PBS sin  $Ca^{2+}$  y se incubaron en medio BC por 20 horas. Posteriormente, las monocapas se incubaron por 3 horas con o sin  $Gd^{3+}$ , y en seguida se inyectaron células individuales y al azar con 1% de amarillo Lucifer. En la figura 8 se observa un aumento en el número de células parentales comunicadas después de la activación del CaSR con  $Gd^{3+}$ . Sin embargo, en las células ZO-2 KD el aumento de la GJIC fue mínimo.

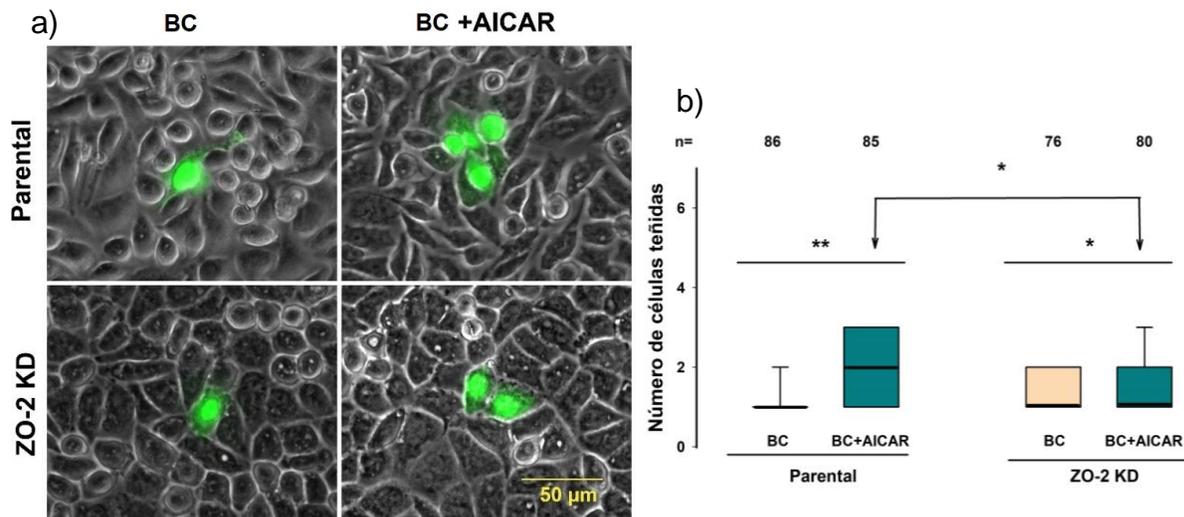


**Figura 8.** El movimiento de ZO-2 al borde celular por la activación del CaSR promueve la GJIC. a) Imágenes de inmunofluorescencia representativas. b) Diagrama de caja que comparan las medianas de los distintos grupos señalados. n, número de células inyectadas. El análisis estadístico se realizó con la prueba Mann-Whitney. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ .

## 5. El movimiento de ZO-2 al borde celular inducido por la AMPK promueve la GJIC

La AMPK es una enzima sensora del estado energético de la célula. La AMPK se activa durante el SC (Zhang et al., 2006) y en cultivos con BC la activación de la AMPK por 5-aminoimidazole-4carboxamide ribonucleosido (AICAR) relocaliza a ZO-2 al borde celular (Amaya et al., 2019). Por ello, para confirmar que el desplazamiento a la membrana de ZO-2 induce la GJIC, las células parentales y ZO-2 KD sembradas a confluencia se incubaron en medio con BC por 20 horas. Posteriormente, las monocapas se trataron o no por 3 horas con 4 mM de AICAR.

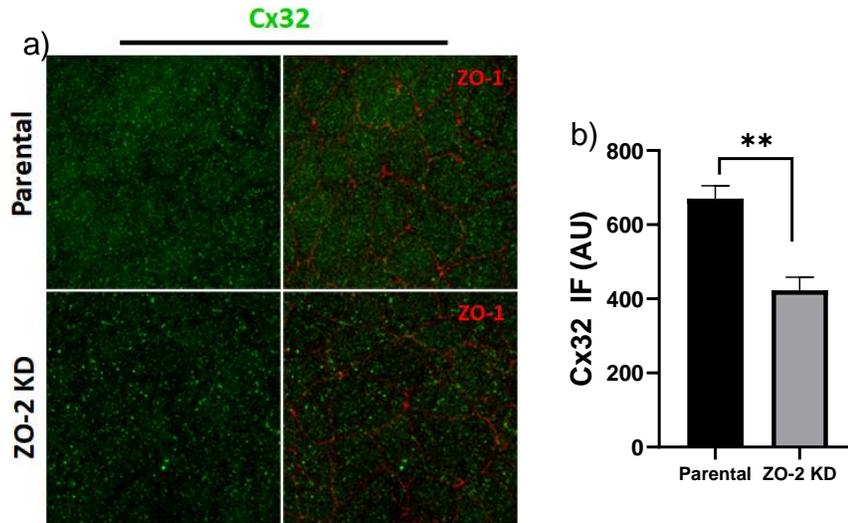
En seguida se inyectaron células individuales y elegidas al azar con amarillo Lucifer al 1%. Después, las monocapas se fijaron y observaron en un microscopio. En la figura 9 se observa que en las células parentales el tratamiento con AICAR en la condición de BC, promueve la GJIC. En cambio, en las células ZO-2 KD, el incremento de la GJIC es más discreto.



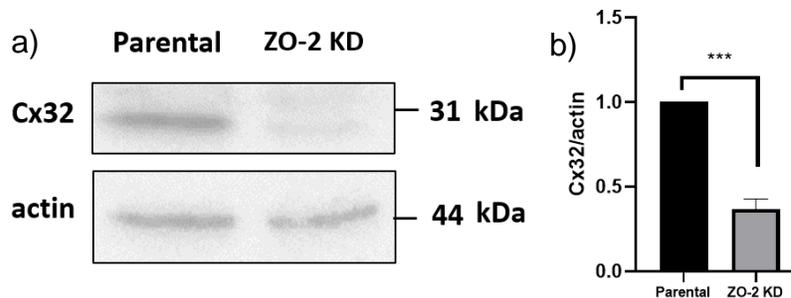
**Figura 9.** El movimiento de ZO-2 al borde celular promueve la GJIC. a) Imágenes de fluorescencia representativas. b) Diagrama de caja que comparan las medianas de los distintos grupos señalados. n, número de células inyectadas. El análisis estadístico se realizó con la prueba de suma de rangos Mann-Whitney. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ .

## 6. La expresión de la conexina 32 disminuye cuando no hay ZO-2

En seguida se estudió el impacto de ZO-2 sobre las conexinas 32 y 43. Se analizaron estas proteínas porque su expresión se había descrito previamente en las células MDCK (Larre et al., 2006; Ponce et al., 2014; Berthoud et al., 1992). Para analizar la importancia de ZO-2 en la expresión de la Cx32, se sembraron células parentales y ZO-2 KD a confluencia en medio con CN. Entre 18-19 horas después las monocapas se procesaron para inmunofluorescencia con anticuerpos contra Cx32 y un anticuerpo anti-ZO-1 para marcar el borde celular de las monocapas. En la figura 10 se observa por inmunofluorescencia que disminuye la expresión de la Cx32 en ausencia de ZO-2. Este resultado se confirmó por western blot (Fig. 11), ya que la intensidad de la banda correspondiente a la Cx32 disminuye en las células ZO-2 KD, en comparación con las parentales.



**Figura 10.** La ausencia de ZO-2 disminuye la expresión de la Cx32. a) Imagen representativa de inmunofluorescencia. b) Análisis cuantitativo hecho con ImageJ. Datos obtenidos de tres campos en cada condición experimental. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t* de Student.  $**p < 0.01$ .

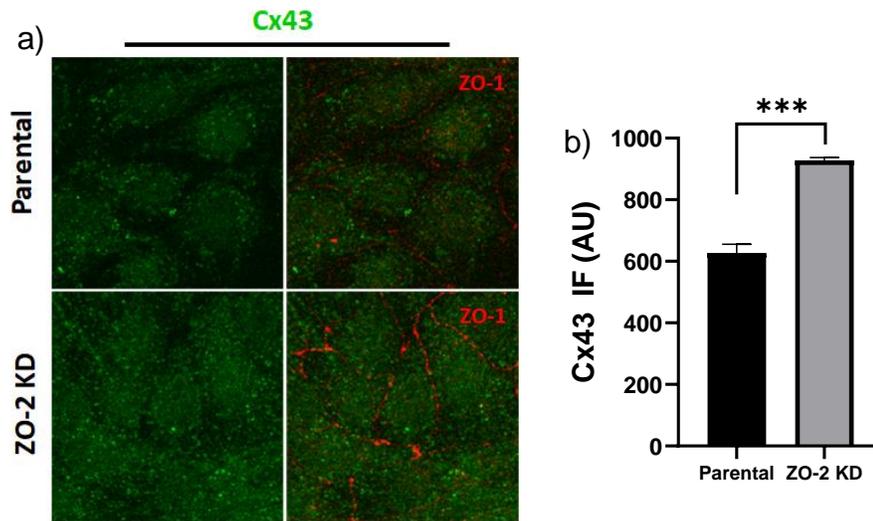


**Figura 11.** La ausencia de ZO-2 disminuye la expresión de la Cx32. a) Imagen representativa de western blot. b) Análisis cuantitativo de 5 experimentos independientes. Los resultados se representan como la media  $\pm$  SEM. Para el análisis estadístico se realizó una prueba *t* de Student con corrección de Welch.  $***p < 0.001$ .

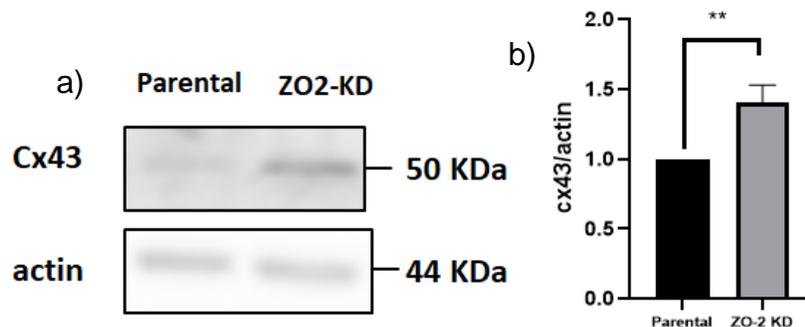
## 7. En ausencia de ZO-2 aumenta la expresión de la Cx43

Para determinar si la ausencia de ZO-2 altera la expresión de la Cx43 se sembraron células parentales y ZO-2 KD a confluencia en medio con CN. Después de 18-19 horas, las monocapas se procesaron para inmunofluorescencia con anticuerpos contra Cx43 y un anticuerpo anti-ZO-1 que marca al borde celular. En la figura 12 por inmunofluorescencia se observa un incremento de la Cx43 en las células ZO-2 KD, en comparación con las parentales. La figura 13 corrobora el incremento en la expresión de la Cx43 en las células ZO-2 KD al cuantificar la banda

obtenida por western blot para la Cx43 y compararla con el resultado de las células parentales.



**Figura 12.** La ausencia de ZO-2 aumenta la expresión de la Cx43. a) Imagen representativa de inmunofluorescencia. b) Análisis cuantitativo hecho con ImageJ. Datos obtenidos de tres campos en cada condición experimental. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t* de Student. \*\*\* $p < 0.001$ .



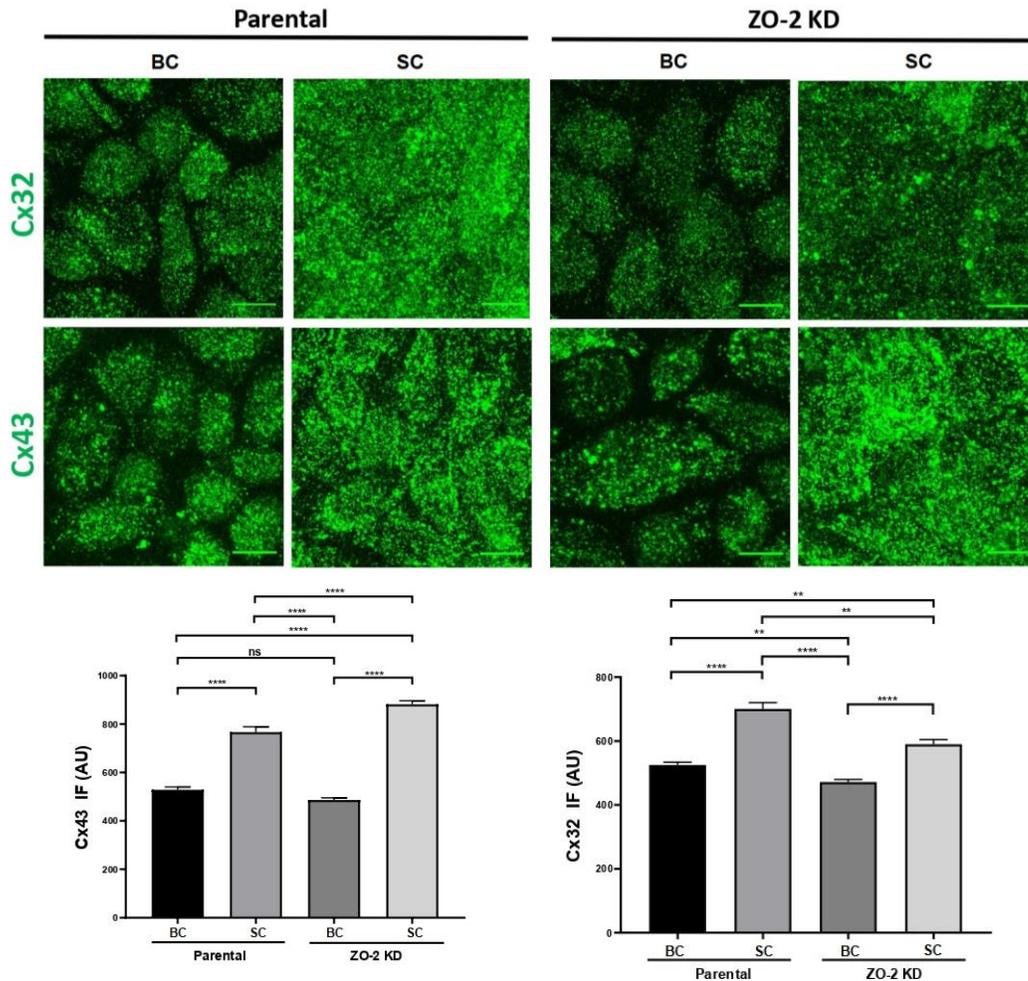
**Figura 13.** La ausencia de ZO-2 aumenta la expresión de la Cx43. a) Imagen representativa de western blot. b) Análisis cuantitativo de 5 experimentos independientes. Los resultados están representados como la media  $\pm$  SEM. Para el análisis estadístico se realizó una Student's *t*-test. \*\* $p < 0.01$ .

## 8. La ausencia de ZO-2 reduce el incremento en la expresión de la Cx32 inducido por el cambio a calcio, pero aumenta el contenido de la Cx43

En seguida nos preguntamos si al hacer un SC que induce la formación de las UEs (Gonzalez-Mariscal et al, 1985) se altera la expresión de las conexinas 32 y 43 y si este cambio depende de la presencia de ZO-2. Para ello, se cultivaron células parentales y ZO-2 KD a confluencia y se incubaron por 20 horas en medio

con BC. Posteriormente, las monocapas se transfirieron a un medio con CN por 3 horas. La inmunofluorescencia se hizo con anticuerpos contra las Cx32 y Cx43. En la figura 14 se observa que el SC induce un incremento de la Cx32 en las células parentales. En cambio, este aumento es menor en las células ZO-2 KD. Por ello, se sugiere que en el SC el incremento en la GJIC responde a un aumento en la expresión de la Cx32 modulado por ZO-2.

Con respecto a la Cx43, también se observa en las células parentales un incremento en su expresión al hacer un SC. Sin embargo, este aumento es más pronunciado en las células ZO-2 KD. Esto sugiere que ZO-2 limita la abundancia de la Cx43. En la tabla 2 se muestran las veces que se incrementó la fluorescencia de las conexinas 32 y 43 en el SC en las células parentales y ZO-2 KD.



**Figura 14.** En ausencia de ZO-2 durante un cambio a calcio se reduce el incremento en la expresión de la Cx32, pero aumenta el de la Cx43. Panel superior, imágenes representativas de inmunofluorescencia. Panel inferior, análisis cuantitativo de tres campos ópticos por condición

experimental en tres experimentos independientes. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó con el programa IBM-SPSS-statistics 25. Para la Cx32 se empleó una prueba de ANOVA Brown-Forsythe con corrección de Welch seguida por la prueba de comparaciones múltiples de Games-Howell. Para la Cx43 se empleó una prueba ANOVA de una vía seguida por una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ , ns, no significativa.

Tabla 2. Incremento de la fluorescencia por el SC

Cx	Parental	ZO-2 KD
32	1.33	1.25
43	1.45	1.82

## VIII Discusión

Existe una estrecha interacción entre las GJ y la UE ya que en las réplicas de crio-fractura de células recién sembradas, se observan agregados de partículas intramembranales con la apariencia típica de las GJ entre los filamentos de la UE. (Cereijido et al., 1984; Montesano et al., 1975; Robenek et al., 1980; Setoguti et al., 1982). Esta evidencia, junto con el análisis bioquímico de la interacción de ZO-2 con la conexinas (Singh and Lampe, 2003; Singh et al., 2005; Talhouk et al., 2008; Li et al., 2009), nos impulsó a analizar el papel de ZO-2 en la GJIC.

En las células MDCK, previamente se reportó que la GJIC disminuye conforme las monocapas maduran (Cereijido et al., 1984). En esta tesis, se observó que 12 horas después de sembrar a las células MDCK a confluencia, hay un pico de GJIC tanto en las células parentales como en las ZO-2 KD. Sin embargo, el número de células vecinas teñidas con amarillo Lucifer es menor en las células ZO-2 KD, lo que indica que la ausencia de ZO-2 obstaculiza el desarrollo de la GJIC.

También, en esta tesis se analizó la expresión de las Cx32 y Cx43 ya que se ha visto que estas conexinas participan en la GJIC en las células MDCK (Larre et al., 2014; Ponce et al., 2016). Observamos, que en ausencia de ZO-2, disminuye la expresión la Cx32 y se incrementa la Cx43. Esta observación es interesante porque previamente se vió que los canales formados por Cx43 intercambian 300 veces más rápido el ATP y 8 veces más, el ADP/AMP que las GJ formados por la Cx32 (Goldberg et al., 2002). Por lo tanto, podría presentarse un panorama en el que las células ZO-2 KD intercambien más ATP/ADP/AMP entre las vecinas que las células

parentales, lo que pudiera provocar una alteración energética en las células y modificar la expresión y/o activación de la cinasa AMPK, el sensor energético celular. Esto tiene particular importancia porque la AMPK que se activa cuando aumenta el cociente AMP/ATP, mantiene a las proteínas de la UE incluyendo a ZO-2 en el borde celular (Amaya et al., 2019; Zhang et al., 2006). Por ello, más adelante sería importante determinar si cuando no hay ZO-2 varía la actividad de la AMPK.

El tratamiento de las células MDCK con la concentración fisiológica de 10 nM de ouabaina (Ponce et al., 2016), provoca un incremento en la GJIC (Ponce et al., 2014) que no se observa en ausencia de ZO-2, lo que indica que ZO-2 participa de manera crucial en este proceso. La ouabaina aumenta la expresión de la Cx32 (Larre et al., 2006) y provoca la translocación de la Cx43 a la membrana plasmática donde forma agregados (Ponce et al., 2016). El efecto de la ouabaina sobre la Cx43 en la GJIC no requiere de síntesis de proteínas, y está mediado por la interacción de la ouabaina con la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa y la subsecuente activación de las cinasas c-Src y ERK1/2 (Ponce et al., 2014). Así mismo, se sabe que en los cardiomiocitos ventriculares de ratas neonatales, la cinasa ERK1/2 estimula la expresión de la Cx43 y la GJIC en respuesta a la endotelina-1 y la angiotensina-II (Polontchouk et al., 2002). Sin embargo, también se ha reportado que los canales de la GJ se cierran y disminuye la GJIC cuando se fosforila a la Cx43 en los residuos Y265 y Y247 en las células LA-25 transformadas con la cinasa v-Src (Solan and Lampe, 2008). También en las células epiteliales hepáticas IAR20 y WB-F344, la fosforilación por las MAPKs de la Cx43 en los aminoácidos S255 y S262 (Sirnes et al., 2009), o en los residuos S279 y S282 (Leykauf et al., 2003) apaga la GJIC. Estos resultados sugieren que el efecto de estas cinasas sobre la Cx43 y la GJIC varía dependiendo del contexto celular. Nosotros probaremos más adelante si en las células MDCK ZO-2 KD, el tratamiento con ouabaina 10 nM activa o no a las cinasas c-Src y ERK 1/2, con el fin de encontrar el mecanismo que explique porque en las células ZO-2 KD, la ouabaina no aumenta la GJIC.

El SC hace que las proteínas de la UE incluyendo a ZO-2, se muevan del citoplasma al borde celular (Hernandez et al., 2007). Aquí, hemos demostrado que es necesaria la migración de ZO-2 al borde celular para que se incremente la GJIC.

También observamos, que el incremento en la expresión de la Cx32 en el SC es mayor cuando está presente ZO-2. En cambio, el incremento de la Cx43 en el SC es menor en presencia de ZO-2. Esto indica que ZO-2 regula de manera opuesta la expresión de las Cx32 y Cx43, pues mientras que favorece la expresión de la primera, restringe la aparición de la Cx43.

Para entender porque el silenciamiento de ZO-2 disminuye el incremento en la Cx43 que se observa en el SC en las células parentales, cabe mencionar que ZO-1 favorece la endocitosis de la Cx43 (Akoyev et al., 2009). Así mismo, la interacción de ZO-1 con la Cx43 disminuye al inhibir al proteosoma, generando placas grandes de GJ en la membrana celular (Girao et al., 2007). Por ello, en el futuro se analizará la vida media de la Cx43 en las células parentales y ZO-2 KD. Al respecto se sabe que la vida media de las conexinas es por lo general menor o igual a 5 horas. Así, por ejemplo, en el corazón la vida media de la Cx45 es de 2.9 horas y de 1.9 horas para la Cx43 (Fallon et al., 1981) En el hígado la vida media de las Cx32 y Cx26 es de 5 horas (Darrow et al., 1995). Como excepción, se tiene al cristalino donde la vida media de la Cx46 es mayor a 24 horas (Jiang et al., 1993).

El SC activa al CaSR el cual desencadena una ruta de señalización que involucra a la subunidad  $\alpha_q/11$  de la proteína G que activa a la fosfolipasa C (PLC) y convierte al  $PIP_2$  en  $IP_3$  y diacilglicerol (DAG). El DAG activa a la  $PKC\epsilon$ , que fosforila a ZO-2 y WNK4. Esta cinasa a su vez fosforila a ZO-2 induciendo su liberación de 14-3-3 lo que permite a ZO-2 migrar al borde celular e integrarse a la UE (Amaya et al., 2019). Ahora, al activar al CaSR con su agonista el  $Gd^{3+}$  observamos un incremento en la GJIC, confirmando que es necesario que ZO-2 migre al borde celular para inducir la GJIC. Algo similar observamos al activar a la AMPK con AICAR. Al respecto, en los cardiomiocitos neonatales y los fibroblastos cardiacos de rata se ha observado que la AMPK estimula la GJIC e incrementa la expresión de la Cx43 (Chen et al., 2014; Li et al., 2018). Cabe mencionar que existe controversia sobre la expresión de ZO-2 en las células musculares cardiacas. Algunos reportes indican que ZO-2 co-localiza con ZO-1 en los discos intercalares que conectan a los cardiomiocitos (Itoh et al., 1999), mientras que otros reportan que ZO-1 solamente está presente en los discos intercalares (Jesaitis et al., 1994)

y que en cambio ZO-2 tiene una distribución citoplásmica difusa en el miocardio (Jenkins et al., 2016)

Aunque sabemos que ZO-2 interactúa con las conexinas 32 y 43, desconocemos en donde ocurre esta interacción. Para ello, en un futuro pensamos emplear la técnica de Duo-Link con anticuerpos contra ZO-2 y Cx32 o Cx43. Una posibilidad es que en la condición de BC, ZO-2 y las Cx32 y Cx43 no interactúen ni en el citoplasma ni en el borde celular. Otra posibilidad, es que en los cultivos en BC ZO-2 y las Cx32 y Cx43 sí estén asociadas y estos complejos se ubiquen en el citoplasma, y después de un SC se muevan juntas estas proteínas a la membrana. Otra opción sería que al hacer el SC las conexinas y ZO-2 se desplacen al borde celular y hasta ese momento se asocien entre sí.

También, quisiéramos estudiar con un Duo-Link, si al activar al CaSR con  $Gd^{3+}$  o a la AMPK con AICAR se induce la interacción de ZO-2 con las conexinas 32 y 43 y si esto sucede en el citoplasma o la membrana.

En resumen, en esta tesis de maestría logramos demostrar que la presencia de ZO-2 y su movimiento al borde celular promueve la GJIC. También vimos que el efecto de ZO-2 no es el mismo sobre la Cx32 que sobre la Cx43. En el doctorado pensamos explorar los mecanismos moleculares que regulan este proceso.

## X Referencias

- Aasen, T., Graham, S. V., Edward, M., & Hodgins, M. B. (2005). Reduced expression of multiple gap junction proteins is a feature of cervical dysplasia. *Molecular Cancer*, 4(1), 31
- Akoyev, V., & Takemoto, D. J. (2009). ZO-1 is required for protein kinase C gamma-driven disassembly of connexin 43. *Cellular Signalling*, 19(5), 958–967.
- Amaya, E., Alarcón, L., Martín-Tapia, D., Cuellar-Pérez, F., Cano-Cortina, M., Ortega-Olvera, J. M., Cisneros, B., Rodriguez, A. J., Gamba, G., & González-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(18), 2377–2398.
- Berthoud VM, Ledbetter ML, Hertzberg EL, Sáez JC; (1992). Connexin43 in MDCK cells: regulation by a tumor-promoting phorbol ester and  $Ca^{2+}$ . *European Journal of Cell Biology*, 57(1).

- Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J., & 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(1), 51–66.
- Cereijido, M., Robbins, E., Sabatini, D.D., and Stefani, E. (1984). Cell-to-cell communication in monolayers of epithelioid cells (MDCK) as a function of the age of the monolayer. *J Membr Biol* 81, 41-48
- Chamorro, D., Alarcon, L., Ponce, A., Tapia, R., Gonzalez-Aguilar, H., Robles-Flores, M., Mejia-Castillo, T., Segovia, J., Bandala, Y., Juaristi, E., et al. (2009). Phosphorylation of zona occludens-2 by protein kinase C epsilon regulates its nuclear exportation. *Molecular biology of the cell* 20, 4120-4129
- Chen F., Zhao WT., Chen FX., Fu GS., Mou Y., Hu SJ; (2014). High glucose promotes gap junctional communication in cultured neonatal cardiac fibroblasts via AMPK activation. *Molecular Biology*, 48(4):687-95. PMID: 25842853.
- Darrow, B. J., Laing, J. G., Lampe, P. D., Saffitz, J. E., & Beyer, E. C. (1995). Expression of Multiple Connexins in Cultured Neonatal Rat Ventricular Myocytes. *Circulation Research*, 76(3), 381–387.
- Enkvist, M. O. K., & McCarthy, K. D. (1992). Activation of Protein Kinase C Blocks Astroglial Gap Junction Communication and Inhibits the Spread of Calcium Waves. *Journal of Neurochemistry*, 59(2), 519–526.
- Enkvist, M. O., & McCarthy, K. D. (2002). Astroglial Gap Junction Communication Is Increased by Treatment with Either Glutamate or High K+ Concentration. *Journal of Neurochemistry*, 62(2), 489–495.
- Fallon, R. F., & Goodenough, D. A. (1981). Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *Journal of Cell Biology*, 90(2), 521–526.
- Farquhar MG, Palade GE. (1963). Juntional complex in various epithelia. *J Cell Biol* 17:375-412
- Gallego-Gutiérrez, H., González-González, L., Ramírez-Martínez, L., López-Bayghen, E., & González-Mariscal, L. (2021). Tight junction protein ZO-2 modulates the nuclear accumulation of transcription factor TEAD. *Molecular Biology of the Cell*, 32(15), 1347–1358.
- Goldberg, G. S., Moreno, A. P., & Lampe, P. D. (2002). Gap Junctions between Cells Expressing Connexin 43 or 32 Show Inverse Permselectivity to Adenosine and ATP. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36725–36730.
- Gonzalez-Mariscal, L. et al., (2014). Tight junctions and the regulation of gene expression. *Seminars in Cell and Developmental Biology*.
- Gonzalez-Mariscal, L., Chávez de Ramírez, B., & Cereijido, M. (1985). Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *The Journal of membrane biology*, 86(2), 113–125.
- González-Mariscal, L., Gallego-Gutiérrez, H., González-González, L., & Hernández-Guzmán, C. (2019). ZO-2 Is a Master Regulator of Gene Expression, Cell Proliferation, Cytoarchitecture, and Cell Size. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4128.

- Gonzalez-Mariscal, L., Pinto-Dueñas, D.C., Hernández-Guzmán, C., Gallego-Gutiérrez, H., González-González, L., Cano-Cortina, M. (2022). Intracellular Traffic and Non-canonical Roles of ZO-2 Protein. In: González-Mariscal, L. (eds) Tight Junctions. Springer, Cham.
- Gonzalez-Mariscal, L., Quiros, M., Diaz Coranguez, M., and Bautista, P. (2012). Tight Junctions. In Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology, P.S. Najman, ed. (InTech)
- Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3460-3464
- Hernandez, S., Chavez Munguia, B., & Gonzalez-Mariscal, L. (2007). ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. *Experimental Cell Research*, 313(8), 1533–1547.
- Hernández-Guzmán, C., Gallego-Gutiérrez, H., Chávez-Munguía, B., Martín-Tapia, D., & González-Mariscal, L. (2021). Zonula occludens 2 and Cell-Cell Contacts Are Required for Normal Nuclear Shape in Epithelia. *Cells*, 10(10), 2568.
- Hollman, A. (1985). Plants and cardiac glycosides. *Heart*, 54(3), 258–261.
- Huerta, M., Muñoz, R., Tapia, R., Soto-Reyes, E., Ramírez, L., Recillas-Targa, F., González-Mariscal, L., & López-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(12), 4826–4836.
- Islas, S., Vega, J., Ponce, L., & González-Mariscal, L. (2002). Nuclear Localization of the Tight Junction Protein ZO-2 in Epithelial Cells. *Experimental Cell Research*, 274(1), 138–148.
- Itoh, M., Morita, K., & Tsukita, S. (1999). Characterization of ZO-2 as a MAGUK Family Member Associated with Tight as well as Adherens Junctions with a Binding Affinity to Occludin and  $\alpha$  Catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5981–5986.
- Jamieson, S., Going, J. J., D'Arcy, R., & George, W. D. (1998). Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. *The Journal of Pathology*, 184(1), 37–43.
- Jenkins, E. L., Caputo, M., Angelini, G. D., & Ghorbel, M. T. (2016). Chronic hypoxia down-regulates tight junction protein ZO-2 expression in children with cyanotic congenital heart defect. *ESC Heart Failure*, 3(2), 131–137.
- Jesaitis, L., & Goodenough, D. (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. *Journal of Cell Biology*, 124(6), 949–961.
- Jiang, J. X., Paul, D. L., & Goodenough, D. A. (1993). Posttranslational phosphorylation of lens fiber connexin46: a slow occurrence. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34(13), 3558–3565.

- Kojima, T., Kokai, Y., Chiba, H., Yamamoto, M., Mochizuki, Y., and Sawada, N. (2001). Cx32 but not Cx26 is associated with tight junctions in primary cultures of rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 263, 193-201.
- Koval, M. (2002). Sharing signals: connecting lung epithelial cells with gap junction channels. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283(5), L875–L893.
- Lambiase, Pier D.; Tinker, Andrew (2015). Connexins in the heart. *Cell and Tissue Research*, 360(3), 675–684.
- Lampe, P. D., & Lau, A. F. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(7), 1171–1186.
- Larre, I., Ponce, A., Franco, M., and Cereijido, M. (2014). The emergence of the concept of tight junctions and physiological regulation by ouabain. *Seminars in cell & developmental biology* 36, 149-156.
- Leykauf, K., Durst, M., and Alonso, A. (2003). Phosphorylation and subcellular distribution of connexin43 in normal and stressed cells. *Cell Tissue Res* 311, 23-30.
- Li, X., Yu, L., Gao, J., Bi, X., Zhang, J., Xu, S., Wang, M., Chen, M., Qiu, F., & Fu, G. (2018). Apelin Ameliorates High Glucose-Induced Downregulation of Connexin 43 via AMPK-Dependent Pathway in Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Aging and Disease*, 9(1), 66.
- Li, X., Lu, S., J.L. Nagy. (2009). Direct association of connexin36 with zonula occludens-2 and zonula occludens-3, *Neurochip. Int.* 54, 393–402.
- Lodish, H. (2016). *Molecular cell biology*. W.H. Freeman and Co. pp.942-943
- Monaghan, P., Clarke, C., Perusinghe, N. P., Moss, D. W., Chen, X.-Y., & Evans, W. Howard. (1996). Gap Junction Distribution and Connexin Expression in Human Breast. *Experimental Cell Research*, 223(1), 29–38.
- Montesano, R., Friend, D.S., Perrelet, A., and Orci, L. (1975). In vivo assembly of tight junctions in fetal rat liver. *J Cell Biol* 67, 310-319.
- Nielsen, M. S., Nygaard Axelsen, L., Sorgen, P. L., Verma, V., Delmar, M., & Holstein-Rathlou, N. (2012). Gap Junctions. *Comprehensive Physiology*, 1981–2035.
- Ogazon Del Toro, A., Jimenez, L., Hinojosa, L., Martinez-Rendon, J., Castillo, A., Cereijido, M., and Ponce, A. (2019). Influence of Endogenous Cardiac Glycosides, Digoxin, and Marinobufagenin in the Physiology of Epithelial Cells. *Cardiol Res Pract* 2019, 8646787
- Oyamada, M., Takebe, K., & Oyamada, Y. (2013). Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(1), 118-133.
- Pahuja, M., Anikin, M., and Goldberg, G.S. (2007). Phosphorylation of connexin43 induced by Src: regulation of gap junctional communication between transformed cells. *Exp Cell Res* 313, 4083-4090.
- Polontchouk, L., Ebel, B., Jackels, M., and Dhein, S. (2002). Chronic effects of endothelin 1 and angiotensin II on gap junctions and intercellular communication in cardiac cells. *FASEB J* 16, 87-89.

- Postma, F.R., Hengeveld, T., Alblas, J., Giepmans, B.N., Zondag, G.C., Jalink, K., and Moolenaar, W.H. (1998). Acute loss of cell-cell communication caused by G protein-coupled receptors: a critical role for c-Src. *J Cell Biol* 140, 1199-1209.
- Quiros, M., Alarcón, L., Ponce, A., Giannakouros, T., and González-Mariscal, L. (2013). The intracellular fate of zonula occludens 2 is regulated by the phosphorylation of SR repeats and the phosphorylation/O-GlcNAcylation of S257. *Mol. Biol. Cell* 24, 2528–2543
- Robenek, H., Herwig, J., and Themann, H. (1980). The morphologic characteristics of intercellular junctions between normal human liver cells and cells from patients with extrahepatic cholestasis. *Am J Pathol* 100, 93-114.
- Saez, J. C., Nairn, A. C., Czernik, A. J., Spray, D. C., Hertzberg, E. L., Greengard, P., & Bennett, M. V. L. (1990). Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *European Journal of Biochemistry*, 192(2), 263–273.
- Saito, A. C., Higashi, T., Fukazawa, Y., Otani, T., Tauchi, M., Higashi, A. Y., Furuse, M., & Chiba, H. (2021). Occludin and tricellulin facilitate formation of anastomosing tight-junction strand network to improve barrier function. *Molecular Biology of the Cell*, 32(8), 722–738.
- Setoguti, T., Inoue, Y., and Suematsu, T. (1982). Intercellular junctions of the hen parathyroid gland. A freeze-fracture study. *J Anat* 135, 395-406.
- Singh, D., Solan, J.L., Taffet, S.M., Javier, R., and Lampe, P.D. (2005). Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *The Journal of biological chemistry* 280, 30416-30421.
- Singh, D, and Lampe, P.D. (2003). Identification of connexin-43 interacting proteins, *Cell Commun. Adhes.* 10, 215–220
- Sirnes, S., Kjenseth, A., Leithe, E., and Rivedal, E. (2009). Interplay between PKC and the MAP kinase pathway in Connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication. *Biochem Biophys Res Commun* 382, 41-45.
- Sohl, G., and Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular research* 62, 228-232
- Solan, J.L., and Lampe, P.D. (2008). Connexin 43 in LA-25 cells with active v-src is phosphorylated on Y247, Y265, S262, S279/282, and S368 via multiple signaling pathways. *Cell Commun Adhes* 15, 75-84.
- Staehelin, L.A., Mukherjee, T.M., and Williams, A.W. (1969). Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice. *Protoplasma* 67, 165-184
- Sugawara, T., Furuse, K., Otani, T., Wakayama, T., & Furuse, M. (2021) Angulin-1 seals tricellular contacts independently of tricellulin and claudins. *Journal of cell biology*, 220(9).
- Talhouk, R.S., Mroue, R., Mokalled, M., Abi-Mosleh, L., Nehme, R., Ismail, A., Khalil, A., Zaatari, M., and El-Sabban, M.E. (2008). Heterocellular

interaction enhances recruitment of alpha and beta-catenins and ZO-2 into functional gap-junction complexes and induces gap junction-dependant differentiation of mammary epithelial cells. *Experimental cell research* 314, 3275-3291.

- 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.
- Wetzelschaefer, F., Mittag, S., Cano-Cortina, M., Wagner, T., Krämer, O. H., Niedenthal, R., Gonzalez-Mariscal, L., & Huber, O. (2016). SUMOylation regulates the intracellular fate of ZO-2. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(2), 373–392.
- Yu, J., Bippes, C. A., Hand, G. M., Muller, D. J., & Sosinsky, G. E. (2007). Aminosulfonate Modulated pH-induced Conformational Changes in Connexin26 Hemichannels. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8895–8904.
- Zhang, L., Li, J., Young, L. H., & Caplan, M. J. (2006). AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), 17272–17277.