

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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**“ZO-2 modula el reclutamiento al borde celular de  
JAM-A y  $\gamma$ -actina, la tensión de la membrana apical y  
de la unión estrecha, y la respuesta celular a la  
rigidez y la topografía del substrato”**

**T E S I S**

Que presenta

**M. en C. Diana Cristina Pinto Dueñas**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

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

Directora de la Tesis:  
**Dra. Lorenza González Mariscal y Muriel**

Ciudad de México

Mayo, 2024

**Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel profesora titular del laboratorio 29 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becaria de CONAHCYT No. 615643).**

La célula [...] es un nexo: un punto de unión entre disciplinas,  
métodos, técnicas, conceptos, estructuras y procesos

Su importancia para la vida, y para las ciencias de la vida  
y de otro tipo, se debe a esta excepcional condición  
de nexo y a su potencial aparentemente inagotable  
para encontrarse en tales relaciones de interconexión.

Maureen A. O'Malley,  
filósofa de la microbiología

Staffan Müller-Wille  
Historiador de la ciencia, 2010

## **Agradecimientos**

A la Dra. Lorenza González-Mariscal por permitirme realizar un proyecto de investigación bajo su tutela, además quiero agradecerle profundamente por la dedicación prestada a mi enseñanza y desarrollo profesional.

A mi comité tutorial la Dra. Ma. Eugenia Mendoza Garrido por la revisión de mi trabajo de tesis y al Dr. Genaro Vázquez por permitirme hacer una colaboración en su laboratorio donde aprendí mucho. De igual manera menciono al Dr. Juan Méndez por su compromiso a mi enseñanza del área no biológica.

A mis compañeros de laboratorio presentes y ausentes por todos sus consejos y apoyo. Quiero mencionar especialmente a Sara, Karla y Diego porque además se han convertido en mis amigos y mi red de apoyo durante este proceso.

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 y disposición para la realización de mi proyecto.

A mis padres por todo su apoyo durante mi vida y especialmente a mi mamá por su esfuerzo para que salga adelante y cumpla todas mis metas. Quiero agradecer también a mi familia por estar al pendiente de mí y por su apoyo.

Finalmente, a todos mis amigos especialmente a Karina, Mayram, Gerardo, Dany, Argel y Luis.

## Índice de contenido

<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>9</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>13</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>14</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>15</b>
1. Los epitelios .....	15
2. Las uniones estrechas .....	15
3. Proteínas integrales de la unión estrecha .....	17
3.1 Claudinas .....	18
3.2 Ocludina.....	25
3.3 MarvelD3 .....	26
3.4 JAM .....	27
4. Proteínas periféricas de la unión estrecha.....	30
4.1 Proteínas MAGUK.....	31
4.2 ZO-1 .....	32
4.3 ZO-3 .....	34
4.4 Pals 1 .....	35
4.5 Proteínas MAGI .....	36
4.6 Proteínas con múltiples dominios PDZ.....	37
4.6.1 Patj.....	38
4.6.2 MUPP1.....	38
4.7 Par3, Par6 y AF-6/afadina.....	39
4.7.1 Par6.....	39
4.7.2 Par3.....	39
4.7.3 Afadina.....	40

5.	Cingulina y paracingulina .....	42
5.1	Cingulina .....	43
5.2	Paracingulina .....	44
6.	Uniones estrechas tricelulares .....	44
6.1	Tricelulina .....	45
6.2	Angulina .....	46
7.	ZO-2 .....	47
7.1	Localización y movimiento de ZO-2 .....	48
7.2	Función de ZO-2 en el núcleo .....	49
7.3	Función de ZO-2 en la membrana .....	50
8.	El citoesqueleto de actomiosina en las células epiteliales .....	51
8.1	ZO-2 y su efecto sobre las proteínas Rho, Rac y Cdc42 .....	55
8.2	GAP y GEFs que se relacionan con las UEs .....	57
8.3	Efecto del silenciamiento o noqueo de las proteínas ZO sobre: El perfil del borde celular y la distribución de la miosina .....	59
9.	Mecanotensión .....	59
9.1	La rigidez de la membrana apical .....	61
9.2	La tensión a nivel de la UE .....	61
9.3	La tensión a nivel de la UA .....	64
9.4	La matriz extracelular .....	67
9.4.1	Colágeno .....	67
9.4.2	Lamininas .....	67
9.4.3	Fibronectina .....	68
9.5	La rigidez del substrato .....	69
9.6	La topografía del substrato .....	71

<b>II) Planteamiento del problema.....</b>	<b>73</b>
<b>III) Objetivo general.....</b>	<b>74</b>
<b>IV) Hipótesis .....</b>	<b>74</b>
<b>V) Material y métodos.....</b>	<b>74</b>
1. Cultivo celular.....	74
2. Medición de la rigidez de la membrana apical por nanoindentación con un microscopio de fuerza atómica.....	75
3. Modelado del complejo ZO-2/JAM-A.....	76
3.1 Cálculos de la escala PARCH .....	77
3.2 Análisis de contacto.....	78
3.3 Dinámica molecular dirigida.....	78
4. Análisis y cuantificación de FRET .....	79
4.1 Construcciones .....	79
4.2 Adquisición de la imagen .....	80
4.3 Cuantificación del FRET .....	80
5. Western Blots.....	82
6. Inmunofluorescencia .....	83
7. Ensayo de ligación por proximidad .....	85
8. Hidrogeles de poliacrilamida con diferente grado de rigidez .....	85
9. Cuantificación del área y elongación celular .....	86
<b>VI) Resultados.....</b>	<b>86</b>
1. El silenciamiento de ZO-2 disminuye la tensión de la membrana apical modulada por los microtúbulos apicales .....	86
2. La falta de ZO-2 reduce la concentración de $\gamma$ -actina en la unión estrecha y en la membrana lateral y en su lugar promueve su acumulación en las fibras de estrés .....	89

3. El silenciamiento de ZO-2 incrementa la tensión mecánica en la UE .....	94
4. En las células MDCK ZO-2 KD, la expresión de JAM-A en el borde celular disminuye, mientras que aumenta la de p114RhoGEF .....	96
5. El análisis <i>in silico</i> muestra que JAM-A se une al dominio PDZ-2 de ZO-2 a través de interacciones hidrofóbicas .....	99
6. La expresión de afadina aumenta en las células MDCK ZO-2 KD .....	101
7. La ausencia de ZO-2 no afecta la tensión de la unión adherente.....	104
8. La ausencia de ZO-2 recluta a la vinculina a las uniones tricelulares .....	105
9. El incremento de la tensión en las células ZO-2 KD induce la aparición de huecos en las monocapas sembradas sobre hidrogeles .....	107
10. La ausencia de ZO-2 retarda la elongación de las células sembradas sobre colágeno IV y fibronectina, y la formación de agregados celulares en sustratos suaves y rígidos .....	108
11. En las células cultivadas sobre arreglos nanoestructurados de crestas, la ausencia de ZO-2 acentúa la acumulación de la claudina-4 en el citoplasma, y es suficiente para inducir la acumulación nuclear de snail y YAP .....	112
<b>VII) Discusión.....</b>	<b>116</b>
<b>VIII) Conclusión .....</b>	<b>122</b>
<b>IX) Perspectivas .....</b>	<b>122</b>
<b>IX) Figuras suplementarias .....</b>	<b>123</b>
<b>X) Referencias.....</b>	<b>125</b>

## **Lista de abreviaturas**

**ABR.-** región de unión a actina

**ABS.-** sitio de unión a actina

**AFM.-** microscopía de fuerza atómica

**AMPK.-** proteína cinasa activada por AMP

**ANOVA.-** análisis de varianzas

**aPKC.-** proteína cinasa C atípica

**APTES.-** (3-Aminopropil) trietoxisilano

**ARVCF.-** gen con repetido armadillo ausente en el síndrome de velo cardio facial

**ASE.-** potenciador de la señal del anticuerpo

**ATG9A.-** proteína 9A relacionada a la autofagia

**BC.-** bajo calcio

**bp.-** bipartita

**BSA.-** albúmina sérica bovina

**Caco-2.-** línea de células de adenocarcinoma colorrectal humano

**CAR.-** receptor del virus coxsackie y el adenovirus

**CaSR.-** receptor sensor de calcio

**CD1.-** ciclina D1

**Cdc42.-** homólogo de la proteína 42 de control de la división celular

**CDMEM.-** medio complementado de Eagle modificado por Dulbecco

**C/EBP.-** factores de transcripción que se unen a sitios potenciadores de CCAAT

**CFP.-** proteína fluorescente cian

**CK2.-** caseína cinasa 2

**CLMP.-** proteína de membrana semejante al receptor del virus coxsackie y el adenovirus

**COG.-** centro de geometría

**CRTAM.-** molécula de células T y citotóxicas

**CTD.-** dominio carboxilo terminal

**CTGF.-** factor de crecimiento del tejido conectivo

**DAPI.-** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DIL.-** dominio diluido

**Dlg.-** discos grandes

**DMSO.-** dimetilsulfóxido

**EC.-** dominio extracelular

**ECL.-** asa extracelular

**EDTA.-** ácido etilendiaminotetraacético

**EGF.-** factor de crecimiento epidérmico

**EMT.-** transición epitelio-mesénquima

**Eph4.-** línea celular de epitelio de mama de ratón

**ERK.-** cinasa regulada por señales extracelulares

**ESAM.-** molécula de adhesión selectiva a endotelio

**FAK.-** cinasa de adhesiones focales

**FBLIM1.-** proteína LIM 1 de unión a filamina

**FHA.-** dominio asociado a la cabeza de horquilla

**FRET.-** transferencia de energía de resonancia de Förster

**GAP.-** proteína activadora de las GTPasas

**GEF.-** factor intercambiador de nucleótidos de guanina

**GuK.-** guanilato cinasa

**HDMEC.-** células endoteliales de la microvasculatura de la dermis humana

**HEPES.-** ácido 4-[(2-hidroxietil)piperazina-1-il]etanosulfónico

**IgG.-** inmunoglobulina G

**JACOP.-** paracingulina o proteína asociada a la unión con un dominio de bobina enrollada

**JAM.-** molécula de adhesión de la unión

**KD.-** knockdown o silenciamiento

**KO.-** knockout o noqueo

**LAD1.-** ladinina 1

**LASP1.-** proteína 1 con dominios LIM y SH3

**LATS.-** cinasa supresora de tumores largos

**Lgl.-** larva gigante letal

**LPA.-** ácido lisofosfatídico

**LSR.-** receptor para proteínas ricas en triacilglicérido

**MAGI.-** proteína MAGUK invertida

**MAGUK.-** familia de proteínas asociadas a la membrana con homología a la guanilato cinasa

**MARVEL.-** dominio de proteínas para tráfico vesicular y anclaje a la membrana y MAL

**MD.-** dinámicas moleculares

**MDCK.-** células de riñón de perro de Madin-Darby

**MEC.-** matriz extracelular

**Mena.-** proteína habilitada para mamíferos

**MLCK.-** cinasa de la cadena ligera de la miosina

**MUPP1.-** proteína con múltiples dominios PDZ 1

**MYPT1.-** subunidad 1 blanco de la fosfatasa de la miosina

**NES.-** señal de exportación nuclear

**NLS.-** señal de localización nuclear

**NMII.-** miosina no muscular II

**NPT.-** isotérmico-isobárico

**NRA.-** arreglo de crestas a nanoescala

**NVT.-** isotérmico-isocórico

**PARCH.-** protocolo para asignar el carácter de hidropatía de un residuo

**PBS.-** solución amortiguadora de fosfatos

**PDZ.-** acrónimo de PSD95/DlgA/ZO1

**PFA.-** paraformaldehído

**PKA.-** proteína cinasa A

**PKCε.-** proteína cinasa C epsilon

**PLA.-** ensayo de ligación por proximidad

**pMLC.-** cadena ligera de la miosina fosforilada

**PP1.-** proteína fosfatasa 1

**RA.-** dominio asociado a Ras

**RET.-** resistencia eléctrica transepitelial

**RhoA.-** miembro A de la familia de homólogos de Ras

**ROCK.**- proteína cinasa asociada a RhoA

**RT.**- temperatura ambiente

**SBT.**- sangrado espectral

**SDS.**- dodecilsulfato de sodio

**SH3.**- homólogo a Src 3

**shRNA.**- ARN de horquilla corta

**SORBS2.**- proteína 2 con los dominios sorbin y SH3

**SRPK.**- proteína cinasa de serina y arginina

**sulfo-SANPAH.**- sulfosuccinimidil-6-(4´-azido-2´-nitrofenilamino)-hexanoato

**TAMP.**- proteínas Marvel asociadas a la unión estrecha

**TEMED.**- tetrametiletildiamina

**TFP.**- proteína fluorescente verde azulada

**UA.**- unión adherente

**UE.**- unión estrecha

**UEt.**- unión estrecha tricelular

**VASP.**- fosfoproteína estimulada por vasodilatadores

**VEGF.**- factor de crecimiento endotelial vascular

**WASP.**- proteína del síndrome neural de Wiskott-Aldrich

**WNK4.**- cinasa sin lisina 4

**WT1.**- proteína tumoral de Wilms 1

**YAP.**- proteína asociada a yes

**YFP.**- proteína fluorescente amarilla

**ZO.**- *Zonula occludens*

**ZONAB.**- proteína asociada a zónula occludens 1 de unión a ácidos nucleicos

## Resumen

En esta tesis se analizó la participación de la proteína ZO-2 de la unión estrecha (UE) en la mecanotensión. Mediante microindentación con el microscopio de fuerza atómica se encontró que la falta de ZO-2 en las células epiteliales renales MDCK reduce la rigidez de la membrana apical. Esto se debe a que en ausencia de ZO-2 se pierde la asociación de los microtúbulos apicales y la  $\gamma$ -actina a la UE. Además, en las células MDCK ZO-2 KD se incrementó la tensión mecánica de la UE medida mediante FRET con un biosensor de ZO-1. Esto ocurre porque la falta de ZO-2 disminuyó el reclutamiento de JAM-A al borde celular, y en su lugar facilitó la acumulación de p114RhoGEF y afadina lo que induce la contracción de la actomiosina. La interacción entre JAM-A y ZO-2 se confirmó *in silico* calculando la fuerza de interacción entre el dominio PDZ-2 de ZO-2 y la cola carboxilo terminal de JAM-A, e identificando los residuos involucrados en esta asociación. La ausencia de ZO-2 también incrementó la tensión de las UE tricelulares, pero no alteró la tensión de la unión adherente que se midió con un biosensor de E-cadherina. El incremento de la tensión en la UE redujo la adhesión célula-célula y por ello en las monocapas de células ZO-2 KD sembradas sobre hidrogeles de 20 kPa se desarrollaron hoyos que no aparecen en las células parentales. La ausencia de ZO-2 también indujo la formación de fibras de estrés y modificó la respuesta celular al sustrato. Así, las monocapas de células ZO-2 KD sembradas sobre hidrogeles mostraron una elongación y agrupación retardada en comparación con las células parentales. La ausencia de ZO-2 también alteró la respuesta a la topografía del sustrato, pues cuando las células ZO-2 KD se sembraron sobre arreglos nanoestructurados de crestas y surcos se incrementó en comparación con los sustratos planos de vidrio, la concentración nuclear de snail y YAP y la internalización de la claudina-4. Estos resultados indican que la ausencia de ZO-2 exacerba la transformación desencadenada por la topografía del sustrato.

## **Abstract**

This work analyzes the role of the tight junction (TJ) protein ZO-2 on mechanosensation. We found that the lack of ZO-2 reduced apical membrane rigidity measured with atomic force microscopy, inhibited the association of  $\gamma$ -actin and JAM-A to the cell border, and instead facilitated p114RhoGEF and afadin accumulation at the junction, leading to an enhanced mechanical tension at the TJ measured by FRET, with a ZO-1 tension probe, and increased tricellular TJ tension. Simultaneously, adherens junction tension measured with an E-cadherin probe was unaltered. The stability of JAM-A and ZO-2 binding was assessed by a collaborative *in silico* study. The absence of ZO-2 also impacted the cell response to the substrate, as monolayers plated in 20 kPa hydrogels developed holes not seen in parental cultures and displayed a retarded elongation and formation of cell aggregates. The absence of ZO-2 was sufficient to induce YAP and Snail nuclear accumulation in cells cultured over glass, but when ZO-2 KD cells were plated in nanostructured ridge arrays, they displayed an increased abundance of nuclear Snail and conspicuous internalization of claudin-4. These results indicate that the absence of ZO-2 also impairs the response of cells to substrate stiffness and exacerbates transformation triggered by substrate topography.

## **Introducción**

### **1. Los epitelios**

Los epitelios cubren la superficie del cuerpo, las cavidades y los ductos, y constituyen la barrera de los organismos multicelulares con el medio externo. Las células epiteliales tienen dos características distintivas: 1) están polarizadas, lo significa que tienen una membrana apical y otra basolateral morfológica y bioquímicamente distintas, y 2) poseen uniones estrechas (UE) [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012)].

Los epitelios, de acuerdo con su organización se clasifican en simples, estratificados y pseudoestratificados. Los primeros forman una capa única de células o monocapa. Los estratificados tienen dos o más capas de células y se localiza en regiones expuestas a alto estrés mecánico y químico (e.g. piel, cornea, vagina, tráquea); y los pseudoestratificados, aparentan tener varias capas celulares por la posición dispereja que tienen sus núcleos ya que a que algunas células no llegan hasta la región más apical. En realidad, estos epitelios son simples pues todas sus células están en contacto con la membrana basal (e.g. tracto respiratorio).

De acuerdo con la forma de las células los epitelios se clasifican en: escamosos, donde las células tienen poca altura y asemejan escamas (e.g. pulmón), cúbicos, con células de forma cúbica o hexagonal (e.g. riñón); columnar, donde las células son más altas que anchas (e. g. intestino); y de transición con células que cambian de forma escamosa a cúbica dependiendo de la condición del órgano (e.g. vejiga) [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012)].

### **2. Las uniones estrechas**

Las uniones estrechas (UEs) son estructuras de adhesión entre células adyacentes, que se localizan en el límite entre las membranas apical y basolateral (Fig. 1A). Las UEs también se llaman oclusoras porque impiden el paso de iones y sustancias por la ruta paracelular. Sin embargo, hoy se sabe que hay epitelios laxos o permeables que, aunque poseen UEs transportan una gran cantidad de agua y solutos por la ruta paracelular. Por ello, decimos que las UEs no son cemento inerte entre las células, sino estructuras

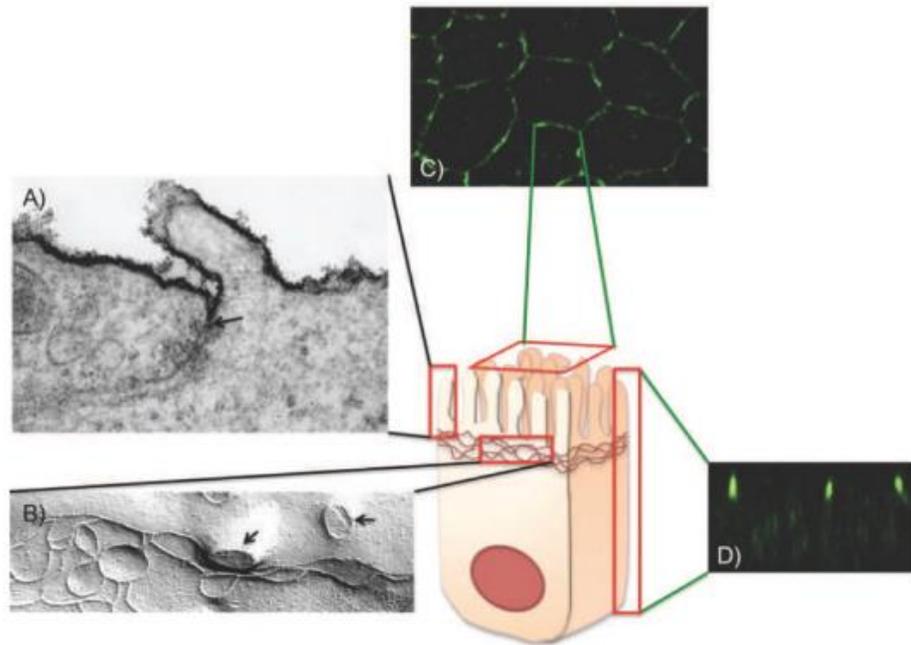
complejas con proteínas que forman poros que abren o cierran el tránsito paracelular en respuesta a factores fisiológicos, patológicos y experimentales [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012) (Larre et al. 2014) y (Cereijido et al. 2001)].

La técnica de criofractura permite observar por microscopía electrónica a la UE como una red de filamentos entrecruzados que circunda a las células por debajo de las microvellosidades apicales (Fig. 1B). (Staehelin et al. 1973). Por inmunofluorescencia en el plano lateral, la UE se observa como puntos en la porción superior de la membrana lateral, mientras que vista desde arriba o en fase la UE aparece en los bordes de las células, formando un patrón de “malla de gallinero” (Fig. 1C y D). [para revisiones, ver (González-Mariscal et al. 2012), (Larre et al. 2014)].

Una de las principales funciones de la UE es regular el flujo de agua, iones y moléculas a través de la vía paracelular. Esta función se denomina de “compuerta” y se evalúa midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TER) o el tránsito de moléculas que sólo pueden atravesar al epitelio por la vía paracelular (e.g. dextrán) [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012)].

Otra función canónica de las UEs es la de “cerca”, que radica en mantener la polaridad de la membrana plasmática al evitar el movimiento de lípidos y proteínas en el plano de la membrana, de la región apical a la basolateral y viceversa (Mandel et al. 1993). Esta función se puede evaluar observando la migración a la membrana basolateral de lípidos fluorescentes insertados en la membrana apical. También se puede estudiar analizando la distribución polarizada de una proteína de membrana marcada con biotina [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012)].

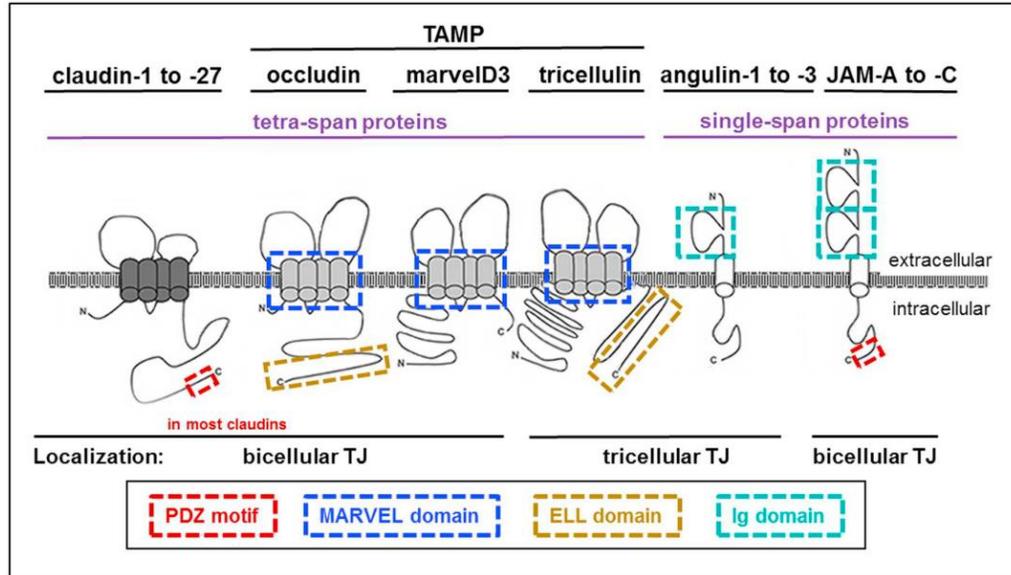
Las UEs forman un complejo proteico integrado por proteínas integrales y citoplásmicas que se describirá a continuación.



**Figura 1. Unión estrecha vista por diferentes técnicas. (A)** La unión estrecha (UE) se observa con cortes finos de microscopía electrónica como puntos en la región más apical de la membrana lateral. **(B)** Por criofractura la UE se observa como una red de filamentos que circunda la célula por debajo de las microvellosidades (flechas). **(C)** Por inmunofluorescencia vista desde arriba o en fase la UE se observa en el borde celular formando una malla de gallinero y vista en un corte lateral o en "z" **(D)** se observa como puntos en la parte superior de la membrana lateral [imagen tomada de (González-Mariscal et al. 2012)].

### 3. Proteínas integrales de la unión estrecha

Las proteínas integrales de las UEs establecen el contacto célula-célula en el espacio intercelular y se dividen en 2 grupos: el de proteínas con un solo dominio transmembranal, al que pertenecen angulina/LSR y JAMs y que se caracterizan por ser miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y el de las proteínas con cuatro dominios transmembranales. En este último grupo se encuentran las claudinas y las proteínas de la familia TAMP (Tight junction associated Marvel proteins) como ocludina, tricelulina y marvelD3 (Fig. 2). Estas proteínas tienen en común un dominio marvel que también está presente en proteínas que se asocian a microdominios ricos en colesterol [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012)]. A continuación, presento una breve descripción de las proteínas integrales de la UE.



**Figura 2. Proteínas transmembranales de la unión estrecha.** Nombre de las proteínas transmembranales de la unión estrecha (UE) y su clasificación de acuerdo con la cantidad de veces que atraviesan la membrana (morado). En la parte inferior se describe su localización y algunos de los dominios presentes en estas proteínas (Piontek et al. 2020).

### 3.1 Claudinas

Las claudinas constituyen una familia de 27 miembros (Mineta et al. 2011) y su nombre deriva del latín “claudere” que significa cerrar. La expresión de las claudinas en las células epiteliales varía entre los tejidos y algunas son más ubicuas que otras. Por ejemplo, la claudina-1 está presente en casi todos los epitelios, en cambio la claudina-5 se encuentra preferentemente en las células endoteliales (Nitta et al. 2003) y la claudina-11 se ubica en tejidos muy específicos como las células de Sertoli, las células basales de la estría vascularis en el oído (Gow et al. 2004) y los oligodendrocitos (Gow et al. 1999). Las claudinas al polimerizarse forman los filamentos de la UE que se observan por criofractura (Fig. 1B). Esto se sabe porque al transfectar claudinas en fibroblastos que carecen de UE, se forman filamentos de UE en la membrana (Furuse et al. 1998). Las claudinas al multimerizarse en *cis* y *trans* forman canales o barreras paracelulares que determinan la selectividad iónica de los epitelios. [para revisión, ver (González-Mariscal et al.2012)].

Las claudinas poseen un extremo amino terminal corto con alrededor de 7 aminoácidos. Tienen dos asas extracelulares, siendo la primera (ECL1) más larga que la

segunda (ECL2). La ECL1 determina la selectividad iónica de la ruta paracelular y la ECL2 interactúa con las claudinas de las células adyacentes y participa en la oligomerización de las claudinas de la misma membrana (Hempel et al. 2020). Las claudinas, al final de su extremo carboxilo terminal, tienen un motivo de unión a dominios PDZ con la secuencia K/R/H-X-Y-V, donde X es cualquier aminoácido (Fig. 3A) [para revisión, ver (Krause et al. 2008)].

Las claudinas en función de su secuencia se clasifican en clásicas y no clásicas. Las claudinas clásicas comprenden de la 1 a la 10, y las 14, 15, 17 y 19. Las claudinas no clásicas van de la 11 a la 13, más las 16, 18 y de la 20 a la 27 (Fig. 3B) [para revisión, ver (Krause et al. 2008)].

Las claudinas pueden formar barreras catiónicas (e.g. claudina-1), y aniónicas (e.g. claudina-7), así como poros catiónicos (e.g. claudina-2) y aniónicos (e.g. claudina-17) [para revisión, ver (Gunzel y Yu, 2013)]. La formación de estos poros y barreras depende de la polimerización de las claudinas. Este proceso comienza con la formación de dímeros en *cis* en cada membrana celular. Luego estos dímeros interactúan en *trans* con los dímeros de las células adyacentes para formar entre las cuatro moléculas de claudina un poro o barrera. A continuación, se van añadiendo más dímeros hasta formar los filamentos de la UE que se observan por criofractura. Dependiendo de los aminoácidos de la primera asa y de sus cargas, se podrán formar poros o barreras paracelulares a cationes o aniones (Fig. 3C) (Hempel et al. 2020). Así, por ejemplo, la claudina 10b que forma un poro catiónico, tiene 5 aminoácidos con carga negativa y 4 con carga positiva en su ECL1, lo que le da una carga neta negativa que permite el paso de cationes. En cambio, la claudina-3 que forma una barrera paracelular, tiene en su ECL1 3 aminoácidos negativos y 3 positivos cuyas cargas se neutralizan entre si [para revisión, ver (Gunzel y Yu, 2013)].

Todas las claudinas clásicas, con excepción de las claudinas -4, -8 y -17, forman filamentos que se organizan en una red. Sin embargo, el tipo de red depende de la claudina. Así, por ejemplo, las claudinas -7 (barreras), -10a (canal aniónico), -19a/b (barrera) y -20 (barrera) hacen grandes redes. Mientras que, las claudinas -2, -10b, -15 que forman canales de cationes, y las claudinas -3, -5, -14 que forman barreras hacen redes de

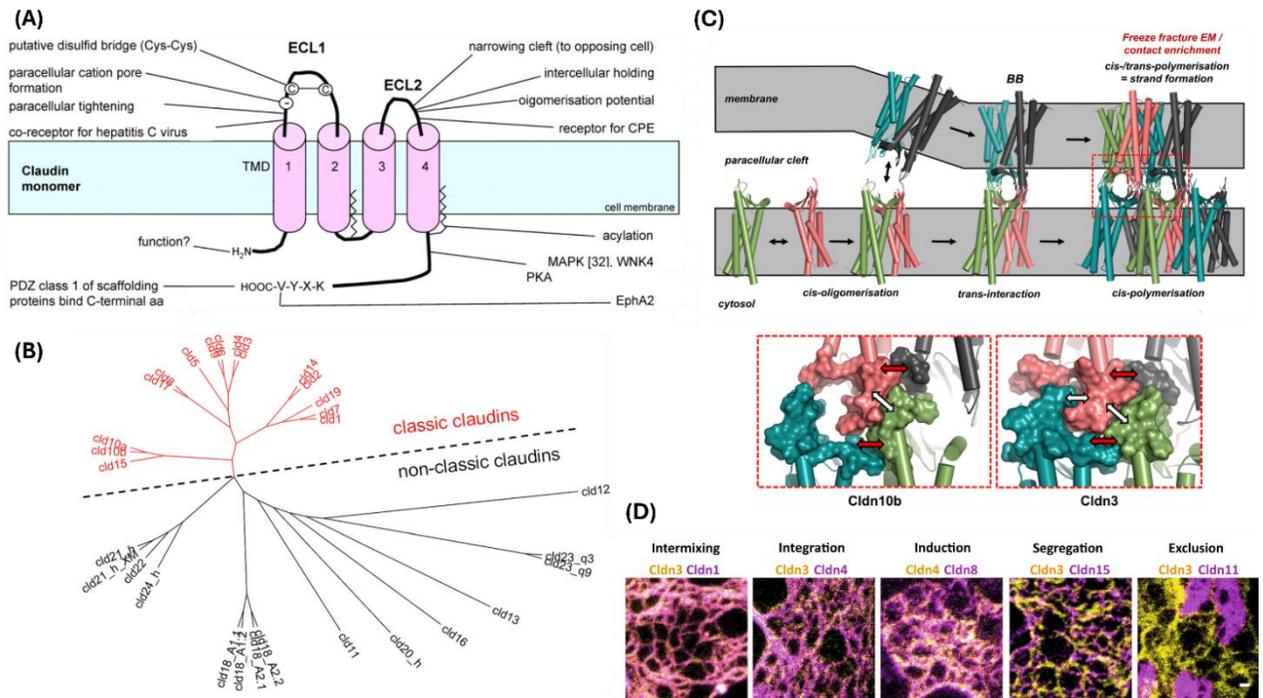
tamaño pequeño. En cambio, se forman redes densas de filamentos paralelos, con las claudinas -1, -6, -9 y -11 que forman barreras (Gonschior et al. 2022).

En contraste, las claudinas no clásicas con excepción de las claudinas -11 y -20, no forman redes. Dado que los epitelios suelen presentar varias claudinas, surgió el interés por saber cómo estas se integran para formar una red. Para ello, se analizaron las redes formadas en los fibroblastos L con diferentes claudinas transfectadas. Así se descubrieron cinco distintos comportamientos: 1) Intermezclado, se observa cuando se mezclan claudinas clásicas formadoras de barrera como las claudinas -1, -5, -6, -7, -9, -14 y -19b con la claudina-3. 2) Integración, pasa cuando la claudina-4 que no forma filamentos se incorpora a los filamentos formados por la claudina-3. 3) Inducción, sucede cuando se induce la formación de redes por claudinas que de manera individual no forman filamentos, como las claudinas -4 y -8. 4) Segregación, describe la formación de redes con áreas alternadas de claudinas que hacen poros (claudinas -2, 10a, 10b y 15) con otras integradas por claudinas que hacen barreras (claudina-3). 5) Exclusión, se forma cuando dos claudinas como las claudinas -3 y -11 se excluyen entre sí para formar redes independientes (Fig. 3D) (Gonschior et al. 2022).

Algunas claudinas como la -4 también exhiben otro comportamiento denominado interferencia. Esta conducta se descubrió al ver que al noquear a la claudina-4 sólo se generan cambios en la permeabilidad celular si están presentes otras claudinas formadoras de poros como la claudina-2. Lo que sucede es que la claudina-4 induce la endocitosis de las claudinas que forman poros, lo que aumenta la barrera paracelular de la UE (Shashikanth et al. 2022).

Para estudiar la función específica de ciertas claudinas se han generado ratones knockout (KO) y a continuación describiré los fenotipos murinos obtenidos, junto con algunas observaciones hechas en humanos con mutaciones en genes de las claudinas. El KO de claudina-1 induce la muerte en ratones al día posterior al nacimiento causada por deshidratación a través de la piel (Furuse et al. 2002). Con ello, se concluyó que en los ratones la claudina-1 es esencial para la barrera de la UE en la epidermis. En humanos en cambio, las mutaciones en el gen de claudina-1 generan ictiosis con colangitis

intrahepática esclerosante neonatal, lo que indica que esta claudina en humanos es esencial en la epidermis y la barrera hepatobiliar (Hadj-Rabia et al. 2004).

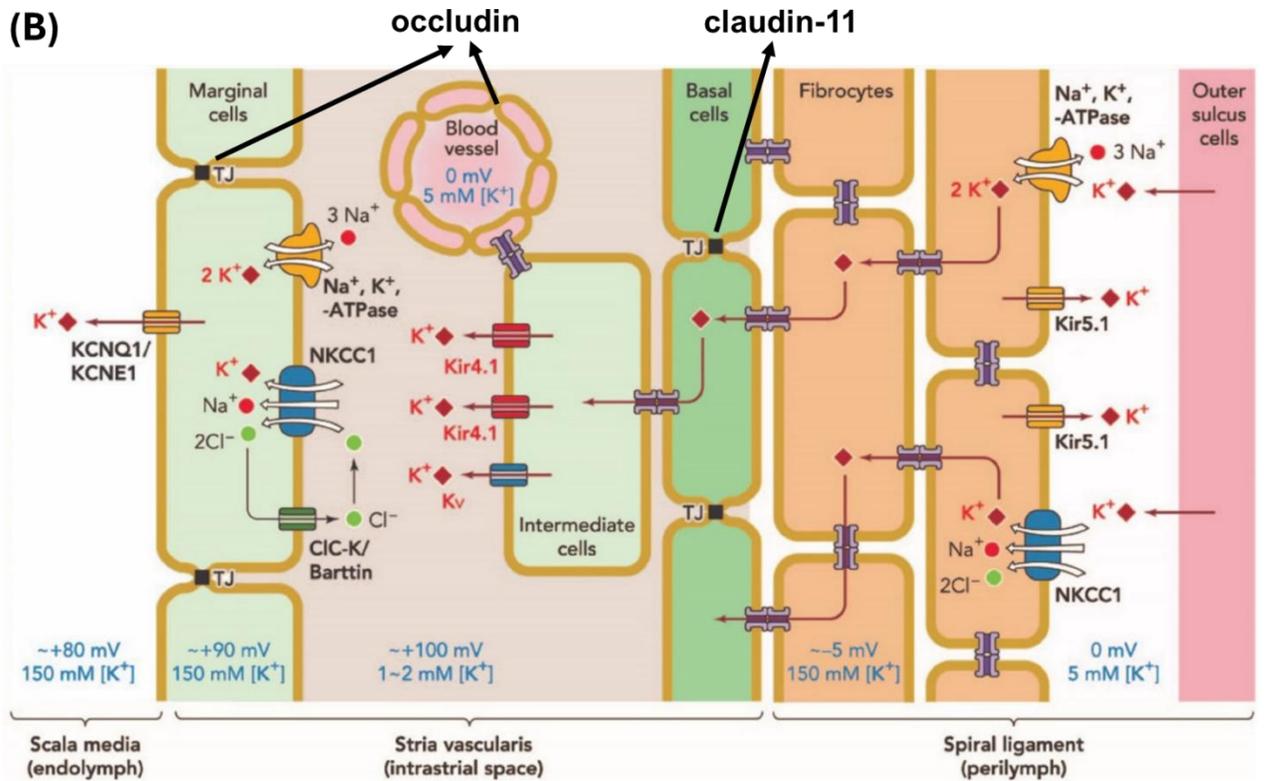
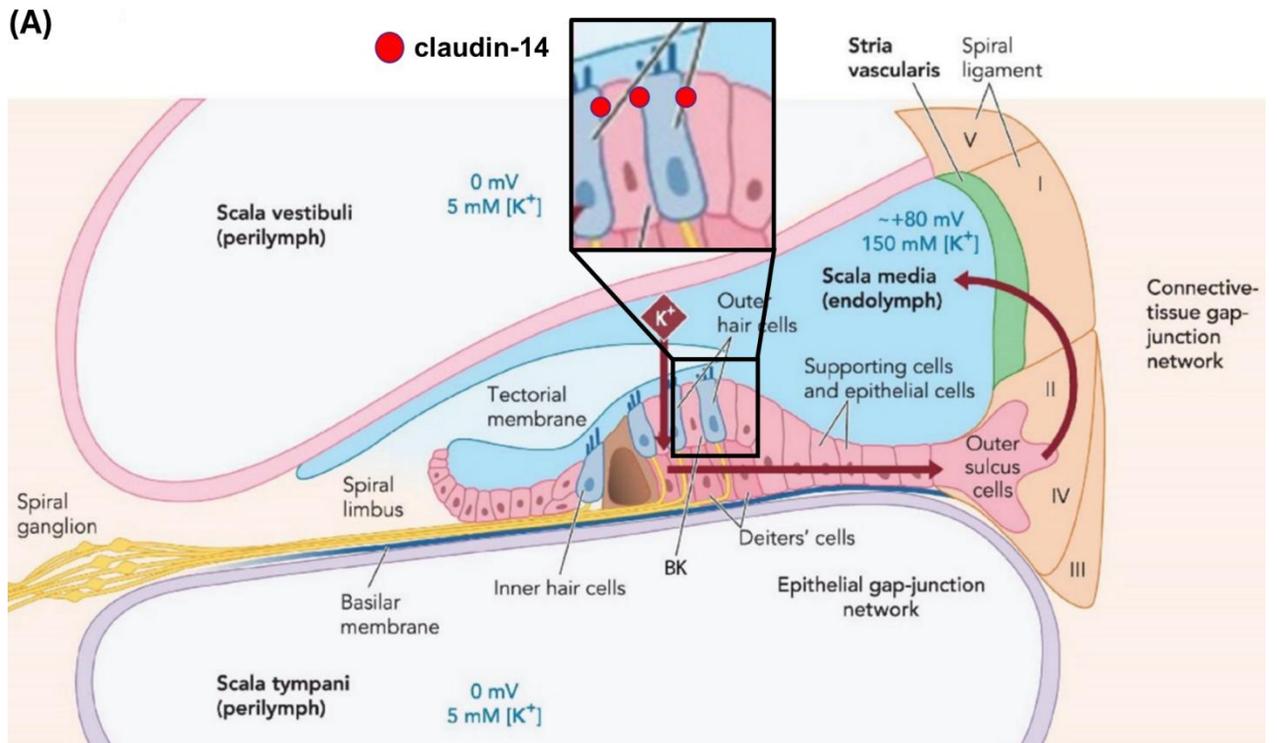


**Figura 3. Estructura, clasificación y polimerización de las claudinas.** (A) Esquema de la estructura de las claudinas. Las claudinas atraviesan cuatro veces la membrana y poseen dos asas extracelulares. La primera (ECL1) forma los poros paracelulares y es la receptora de moléculas o microorganismos, la segunda (ECL2) promueve la polimerización y la interacción con las claudinas de la membrana adyacente. El segmento carboxilo de las claudinas es blanco de diversas cinasas y posee en su extremo final un motivo de unión a dominios PDZ. (B) Árbol filogenético de las claudinas. Las claudinas clásicas se marcan en rojo y las claudinas no clásicas en negro [para revisión, ver (Krause et al. 2008)]. (C) Esquema de la polimerización de las claudinas. Este proceso comienza con la dimerización en *cis* de las claudinas y continúa con la interacción en *trans* con otro dímero de claudinas de la célula adyacente para entre las cuatro claudinas formar un poro o barrera. Finalmente, a este oligómero se irán integrando más claudinas en *cis* que a su vez interactuarán con otras claudinas en *trans*. El panel inferior muestra un poro formado por la claudina-10b y una barrera integrada por la claudina-3 (Hempel et al. 2020). (D) Interacciones entre claudinas: Intermezclado, se da entre las claudinas clásicas formadoras de filamentos. Integración, se observa cuando una claudina que no forma filamentos se integra a los filamentos formados por otra claudina. Inducción, se observa al mezclar dos claudinas que por sí mismas no forman filamentos. Segregación, se da al mezclar claudinas que forman poros con claudinas que forman barreras. Exclusión, se observa cuando las claudinas forman redes de filamentos independientes entre sí (Gonschior et al. 2022).

Los ratones KO de claudina-5 tienen abierta la barrera hematoencefálica, lo que indica que esta claudina es fundamental para el sellado de las UEs endoteliales (Nitta et al. 2003). En humanos, la mutación de la claudina-5 también altera el sellado de la barrera hemato-encefálica y genera convulsiones, microcefalia, calcificaciones cerebrales y problemas en el desarrollo neurológico (Deshwar et al. 2023).

En ratones, el KO de las claudinas -11 y -14 produce sordera, y para entender porque sucede esto, describiré brevemente al oído interno. En esta parte del oído, hay tres compartimientos: la escala vestibular, la escala media y la escala timpánica. El primero y el último están bañados por perilinfa con una alta concentración de  $\text{Na}^+$  (150 mM) y baja de  $\text{K}^+$  (5 mM). En cambio, la escala media está cubierta por endolinfa con una alta concentración de  $\text{K}^+$  (150 mM). Esto hace que, en la escala media, las células peludas y de soporte en el órgano de Corti, estén bañadas por el lado basolateral por perilinfa baja en  $\text{K}^+$ , y por el lado apical por endolinfa rica en  $\text{K}^+$ . La composición iónica de la endolinfa se mantiene gracias a la barrera de las UEs presentes en las células epiteliales que rodean a la escala media. En la cóclea, las células peludas transmiten los sonidos tocando de forma intermitente a la membrana tectorial. Por ello, la audición se pierde si las células peludas se mueren [para revisiones, ver (Gunzel y Yu, 2013) (Bazard et al. 2021)]. La claudina-14 se localiza en las UEs presentes entre las células peludas y entre estas y las células de soporte (Fig. 4A) (Ben-Yosef et al. 2003). La mutación del gen para la claudina-14 rompe la barrera de las UEs en la cóclea lo que induce la muerte de las células peludas, y produce sordera en humanos y ratones (Wilcox et al. 2001) (Ben-Yosef et al. 2003).

El potencial endococlear (80 mV) que mantiene la alta concentración de  $\text{K}^+$  en la endolinfa se genera en la pared lateral de la cóclea, por la estría vascularis. Esta estructura tiene una capa de células epiteliales denominadas marginales en contacto con la endolinfa, que en sus UEs expresan ocludina y a las claudinas -1, -3 y -4 (Florian et al. 2003). En la estría vascularis hay además células intermedias, vasos sanguíneos, y otra capa de células epiteliales llamadas basales con UEs con claudina-11 (Fig. 4B) (Liu et al. 2017). El ratón KO de claudina-11 es sordo, porque en ausencia de esta claudina la estría vascularis no puede mantener el potencial endococlear (Liu et al. 2017) (Gow et al. 2004).



**Figura 4. Composición celular de la cóclea. (A)** La cóclea posee tres compartimientos: la escala vestibular, la escala media y la escala timpánica. La escala media está bañada por la endolinfa alta en  $K^+$ , y en ella se encuentra el órgano de Corti compuesto por la membrana tectorial, las células de Dieter, las células de soporte y las células peludas exteriores e interiores. Estas células expresan a la claudina-14 (puntos rojos en la magnificación) que sella la barrera paracelular y de esta manera mantienen la diferencia en concentración de  $K^+$  entre la endolinfa y la perilinfa. **(B)** En el lado derecho de la escala media se encuentra la estría vascularis compuesta por células marginales que expresan a ocludina, el espacio intraestrial que contiene células intermedias y vasos sanguíneos que expresan a ocludina; y en el extremo derecho a las células basales que expresan a la claudina-11 [Modificado de (Bazard et al. 2021)].

La claudina-11 también se expresa en las UEs de los oligodendrocitos donde une entre sí a las capas sucesivas de mielina que envuelven a los axones del sistema nervioso central, y en las células de Sertoli en los túbulos seminíferos. Por ello, el ratón KO de claudina-11 presenta defectos en la conducción nerviosa provocados por desmielinización, y los machos son estériles, por la apertura de la barrera hemato-testicular (Gow et al. 1999).

La claudina-15 funciona como un poro catiónico para sodio. Esta claudina se expresa en el epitelio intestinal y su silenciamiento en ratones produce un megaintestino (Tamura et al. 2008). Cuando se silencia a la claudina-15 junto con la claudina-2, que también funciona como un poro para el sodio en el intestino, los ratones se mueren por desnutrición. Esto se debe a que en estos animales el sodio presente en el compartimiento basal no pasa al compartimiento apical por la vía paracelular. Esto impide que funcionen los cotransportadores apicales de  $Na^+$ /glucosa,  $Na^+$ /aminoácidos y  $Na^+$ /ácidos grasos y en consecuencia los animales no pueden absorber en el intestino los nutrientes que ingieren (Wada et al. 2013).

En el hígado, la claudina-2 forma un canal de agua. Esto explica porque en el ratón KO de claudina-2, la bilis se concentra y forma piedras en la vesícula biliar (Matsumoto et al. 2014). La claudina-2 también es un poro de  $Ca^{+2}$  y su expresión es abundante en el túbulo proximal del riñón. El noqueo de esta claudina en los ratones induce la formación de cálculos renales también conocida como nefrocalcinosis. En humanos, los individuos con variantes del gen que disminuyen la expresión de la claudina-2, también forman piedras en los riñones (Curry et al. 2020).

Las claudinas-16 y -19 forman en conjunto un poro de  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$  responsable de la reabsorción de estos cationes por la vía paracelular en el asa ascendente de Henle. En humanos, las mutaciones en los genes de las claudinas-16 o -19 producen hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis ya que el  $Mg^{+2}$  y el  $Ca^{+2}$  no se pueden reabsorber de forma adecuada en el riñón (Simon et al. 1999) (Hou et al. 2008).

La claudina-19 también se expresa en las células de Schwann donde forma un sello que permite mantener la envoltura de la mielina en los nervios del sistema nervioso periférico. Los ratones que carecen de claudina-19 nacen y crecen normalmente, pero sufren neuropatía periférica (Miyamoto et al. 2005).

### **3.2 Ocludina**

La ocludina fue la primera proteína transmembranal de la UE en ser descubierta y su nombre deriva del latín “occludere” que significa ocluir o cerrar. (Furuse et al. 1993).

La ocludina al igual que los demás miembros de la familia TAMP, atraviesa cuatro veces la membrana y sus segmentos transmembranales forman un dominio Marvel. La ocludina tiene un extremo amino citoplásmico con 66 aminoácidos, dos asas extracelulares y un extremo carboxilo terminal citoplasmático de 255 aminoácidos con un dominio de bobina enrollada al que se unen las proteínas ZO (Fig.2) (Furuse et al. 1994) [para revisión, ver (Cummins, 2012)].

Al transfectar a la ocludina en células que no tienen UE, como los fibroblastos L o las HEK-293, se forman pequeños nudos de filamentos en lugar de redes en la membrana. Pero, si la ocludina se cotransfecta junto con la claudina-1, no solo aparece a lo largo de las redes de filamentos de claudina-1 (Furuse et al. 1998) sino que, además, modifica el patrón de los filamentos de claudinas (Cording et al. 2013). Con esto se concluye que la ocludina modula la morfología de la red de filamentos en las UEs.

La expresión de ocludina sin su segmento carboxilo, incrementa la RET y de manera sorprendente, también el flujo paracelular de moléculas (Balda et al. 1996). Así mismo, se altera la función de cerca de la UE, ya que los lípidos fluorescentes insertados en la membrana apical pasan al dominio basolateral (Balda et al. 1996). Por esto, se concluyó

que la ocludina limita el tránsito paracelular de macromoléculas y mantiene la función de cerca de la UE.

El KO de ocludina en los ratones no genera un fenotipo claro ya que los animales exhiben UEs funcionales y de apariencia normal, pero presentan alteraciones en el crecimiento, inflamación crónica, hiperplasia del epitelio gástrico, calcificaciones en el cerebro y adelgazamiento del hueso compacto (Saitou et al. 2000). Cabe, sin embargo, destacar que los machos KO de ocludina son infértiles por atrofia de los túbulos seminíferos, lo que sugiere que la ocludina tiene una función crucial en la barrera hemato-testicular (Saitou et al. 2000).

Otras proteínas de la familia TAMP como MarvelD3 y tricelulina pueden reemplazar parcialmente la función de la ocludina. Así, se sabe que en las uniones tricelulares, el silenciamiento de ocludina o de tricelulina disminuye los sitios de intersección de la red de filamentos de la UE, y este efecto es más notorio cuando se hace el doble silenciamiento de ocludina y tricelulina (Saito et al. 2021). De estas observaciones se concluye que estas proteínas tienen la función redundante de entrecruzar la red de filamentos de claudinas (Saito et al. 2021).

### **3.3 MarvelD3**

MarvelD3 atraviesa cuatro veces la membrana y pertenece a la familia TAMP. MarvelD3 tiene a diferencia de la ocludina, un segmento amino terminal largo y un carboxilo corto (Fig. 2). MarvelD3 presenta dos isoformas cuya abundancia depende del tejido. Por ejemplo, en el ratón, la variante 1 es la más abundante en el hígado y la dos, en el riñón (Raleigh et al. 2010).

Cuando MarvelD3 se transfecta en células que carecen de UEs como las HEK-293 o los fibroblastos L, no se concentra en los sitios de contacto célula-célula. Lo que sugiere que no establece interacciones homofílicas en *trans*. En cambio, si forma interacciones heterofílicas en *cis* con ocludina y tricelulina (Cording et al. 2013). Marvel modifica el patrón de la red de filamentos de la UE que se observa por criofractura. Así, cuando las células HEK-293 se transfectan con claudina-1 y MarvelD3, se reduce el tamaño de la

mallas de filamentos de UE en comparación a cuando sólo se transfecta a la claudina-1, y en otros casos los filamentos forman un patrón de líneas paralelas (Cording et al. 2013).

La función de MarvelD3 en la UE es controversial ya que su silenciamiento disminuye la RET (Raleigh et al. 2010) y aumenta la permeabilidad a macromoléculas en las células epiteliales pancreáticas (Kojima et al. 2011), mientras que en las células Caco-2 sube la RET (Steed et al. 2009). La ausencia de MarvelD3 aumenta la proliferación y migración celular y si se reexpresa en células tumorales metastásicas, inhibe su proliferación y migración (Steed et al. 2014). Por lo que se concluye que MarvelD3 puede funcionar como supresora tumoral.

### 3.4 JAM

Las JAMs son proteínas que pertenecen a la subfamilia CTX de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y se caracterizan por atravesar una sola vez la membrana y tener dos repetidos tipo Ig. Las JAMs tienen un dominio Ig variable distal (dominio D1) y uno constante, proximal a la membrana (dominio D2), y en su extremo carboxilo terminal presentan un motivo FLV de unión a dominios PDZ (Fig. 2 y 5A) [para revisiones, ver (Piontek et al. 2020)] Las JAMs se subdividen en dos grupos. El primero lo forman las JAM -A, -B, y -C, y en el otro grupo se encuentran las proteínas CAR, ESAM, CRTAM, CLMP, JAM4 y JAML. Las JAMs se expresan en una gran variedad de tejidos y tipos celulares incluyendo epitelios, endotelios, leucocitos, plaquetas y eritrocitos. [para revisión, ver (Mandell y Parkos, 2005)].

Del grupo compuesto por las JAMs -A, -B y -C, JAM-A es la que tiene el patrón de expresión más amplio, ya que se expresa tanto en células epiteliales como endoteliales. En cambio, JAM-C sólo se expresa en las células endoteliales [para revisión, ver (Mandell y Parkos, 2005)], y JAM-B en las células endoteliales y el sinciotrofoblasto de la placenta humana (Miranda et al. 2019).

JAM-A establece interacciones homofílicas en *cis* y en *trans* (Kostrewa et al. 2001), mientras que las JAMs -B y -C pueden formar asociaciones heterofílicas en *cis* y *trans*. Por ejemplo, JAM-B se une a JAM-C, o a la integrina  $\alpha 4\beta 1$  (Cunningham et al. 2002), y JAM-C a CD11b/CD18 (Santoso et al. 2002). La dimerización en *cis* de JAM-A ocurre por la

interacción del motivo RVE presente en el dominio D1 de JAM-A con el mismo motivo en la JAM-A adyacente. Después de la dimerización en *cis*, viene la interacción en *trans* mediante los motivos NNP presentes en el dominio D1 de los dímeros de JAM. La interacción en *trans* se estabiliza por la glicosilación única en la arginina 185 del dominio D2 de JAM-A humana (Scott et al. 2015) (Fig. 5A) [para revisión, ver (Steinbacher et al. 2018)]. La dimerización de JAM-A es esencial para su función, pues si se inhibe, por un lado, JAM-A no se concentra en los sitios de contacto célula-célula y la función de barrera de la UE no se desarrolla (Mandell et al. 2004).

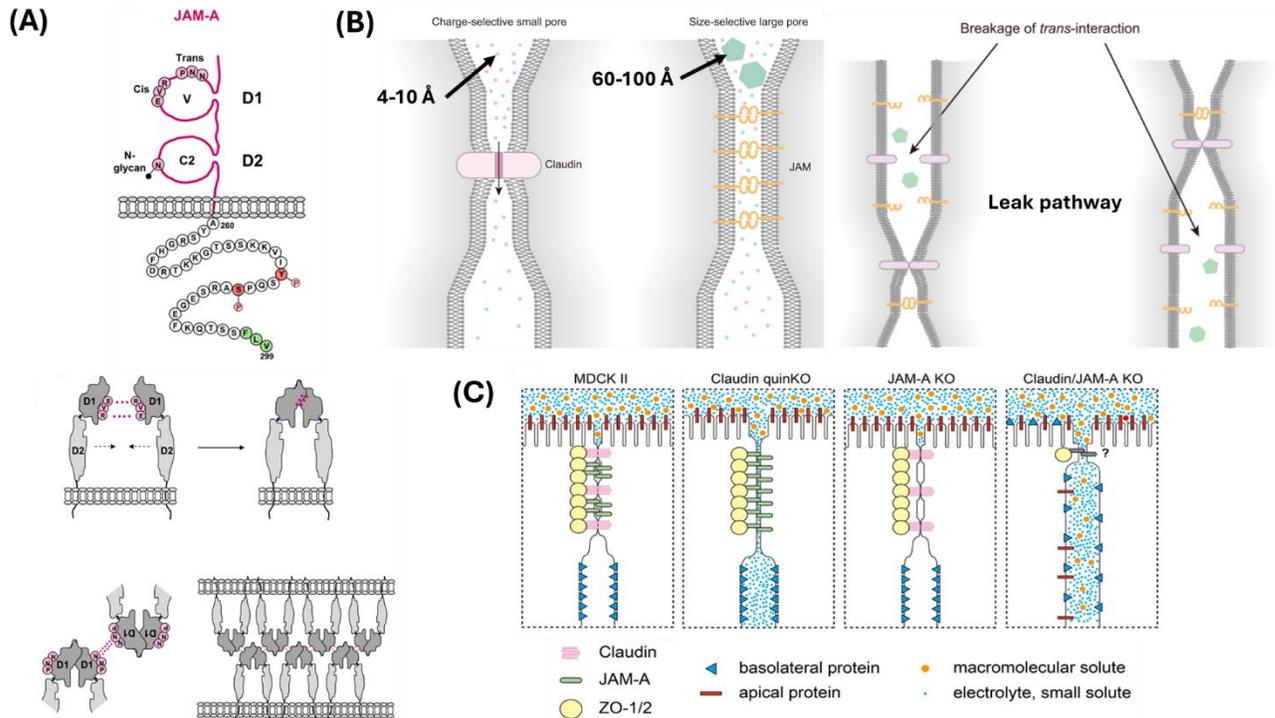
JAM-A con su motivo de unión a dominios PDZ interactúa con proteínas del complejo de unión apical como las proteínas con múltiples dominios PDZ, MUPP1 y PATJ; con proteínas de la UE como las claudinas y las ZOs, y con proteínas del complejo de polaridad como Par3 [para revisión, ver (Steinbacher et al. 2018)]. En un ensayo *in vitro* donde se colocaron 96 dominios PDZ de 48 proteínas diferentes se observó que la cola carboxilo de JAM-A con el motivo de unión a dominios PDZ interactúa de manera preferente con el dominio PDZ-2 de ZO-2. Esto es importante, porque *in vivo*, ZO-2 forma una plataforma que permite la dimerización de JAM-A y a este complejo a través de ZO-2 se unen varias otras proteínas como afadina, ZO-1, PDZ-GEF1 y Rap2c. Esta última inhibe a RhoA (Monteiro et al. 2013).

Cuando se establecen los primeros contactos célula-célula, el complejo aPKC/Par6/Lgl se recluta a la región de contacto. Entonces, Cdc42 se activa a través de la GEF ECT2 y se une a la proteína plataforma Par6 que recluta y activa a la aPKC $\lambda$ . Esta cinasa fosforila a Lgl promoviendo su disgregación del complejo y su integración a la membrana lateral. En seguida, a Par6 se le une Par3 en lugar de Lgl, y este nuevo complejo recluta a JAM-A a la región donde se formará la UE (Yamanaka et al. 2003) y (Plant et al. 2003).

El flujo de iones y moléculas por la vía paracelular se regula por dos vías. La primera depende de la carga iónica y ocurre a través de pequeños poros formados por las claudinas, con un diámetro de 4 a 10 Å aproximadamente. La segunda ruta es la que permite el tránsito de moléculas de 60 a 100 Å y selecciona en función del tamaño. Esta vía que se conoce también como de fuga o “leaky” en inglés la controla JAM-A (Fig. 5B) [para revisión, ver (Otani y Furuse, 2020)]. Esto se cree porque en las células MDCK la RET

disminuye, pero no aumenta el flujo paracelular de macromoléculas, cuando se hace un quintuple KO de las claudinas -1, -2, -3, -4 y -7 o cuando se silencia solo a JAM-A. Pero, en cambio el epitelio se vuelve permeable a macromoléculas cuando además del quintuple KO de claudinas se silencia a JAM-A. Además, en la región de la UE, en las células con el quintuple KO de claudinas, las membranas de las células vecinas se siguen viendo estrechamente asociadas entre sí, aun cuando no aparecen los sitios de fusión o “besos” clásicos de las UEs. En cambio, cuando las células carecen de claudinas y de JAM-A, en la región de la UE las membranas de las células adyacentes están separadas entre sí (Fig. 5C) (Otani et al. 2019). Si hiciéramos el símil con un embudo, la región de la UE sería como el cilindro del embudo, y el ancho de este cilindro sería el espacio entre las células vecinas, JAM-A se piensa que alinea las membranas de las células vecinas y al hacerlo define el ancho de este espacio, por ello se sugiere que JAM-A regula el paso de macromoléculas por la vía de fuga o “leaky” [para revisión, ver (Otani y Furuse, 2020)].

Por otra parte, cabe destacar que el ratón KO de JAM-A muestra defectos en la barrera intestinal (Laukoetter et al. 2007) y de los alveolos pulmonares (Mitchell et al. 2015), lo que refuerza la idea de que JAM-A es un componente esencial de la vía “leaky”.

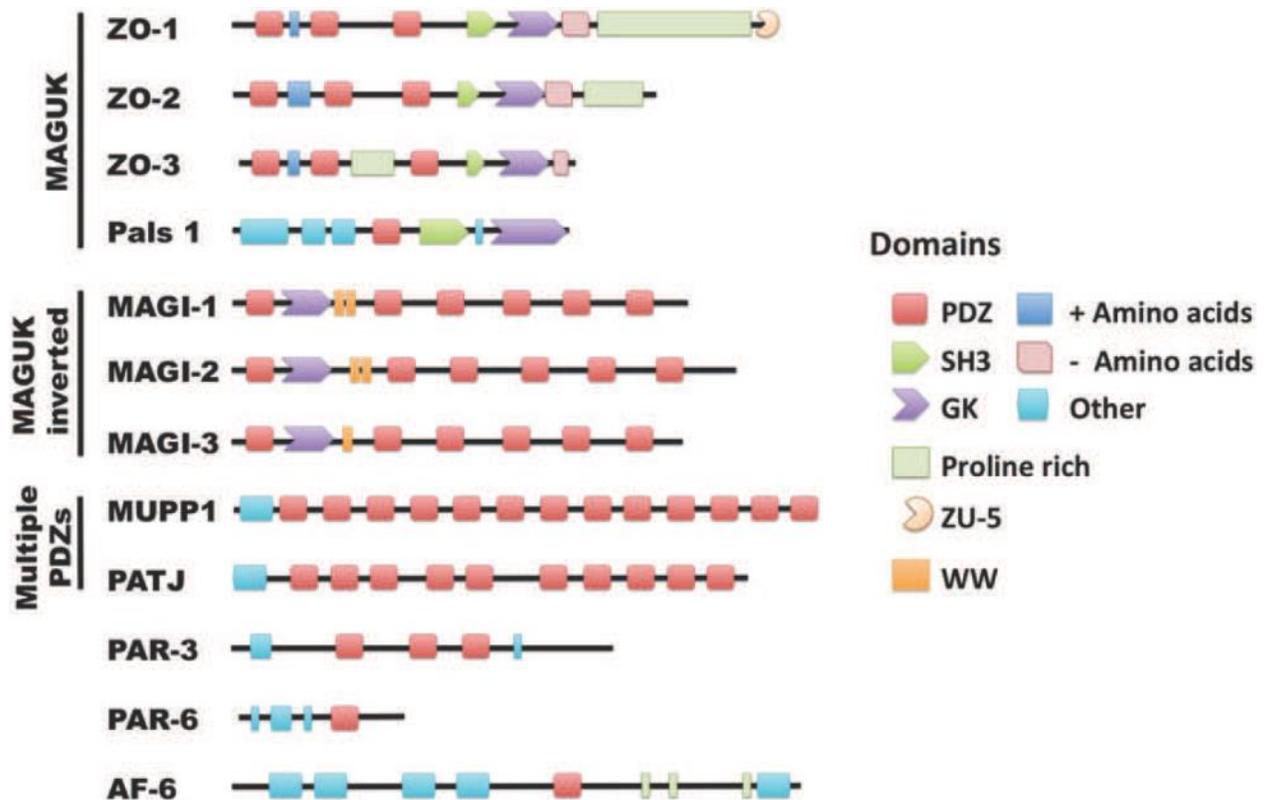


**Figura 5. Estructura y función de JAM-A. (A)** El panel superior muestra la estructura de JAM-A, con dos repetidos de tipo inmunoglobulina, uno distal (D1) con los motivos de dimerización en *cis* y *trans* y otro proximal (D) con una asparagina (N) cuya glicosilación estabiliza la dimerización en *trans*. JAM-A atraviesa una sola vez la membrana y en su extremo carboxilo terminal tiene un motivo de unión a dominios PDZ. El panel inferior muestra las interacciones en *cis* para formar los dímeros, y en *trans* para la asociación con la JAM-A de la célula vecina (Steinbacher et al. 2018). **(B)** El esquema izquierdo muestra que las claudinas forman poros que regulan el paso de iones y moléculas pequeñas de 4 a 10 Å, mientras que JAM alinea las membranas de las células vecinas regula el paso de macromoléculas que van de 60 a 100 Å por la vía “leaky”. El esquema derecho muestra como al romperse las interacciones en *trans* de JAM se incrementa la permeabilidad a las macromoléculas por la vía “leaky” [Modificado de (Otani y Furuse, 2020)] **(C)** En las células MDCK, al silenciar a cinco claudinas, se pierde la barrera a los iones. En cambio, cuando se silencia a JAM-A, las claudinas impiden la separación de las membranas de las células adyacentes, por lo que no hay fuga de iones, ni de macromoléculas. Sin embargo, al silenciar a las claudinas y a JAM-A simultáneamente, se produce la fuga de iones y macromoléculas debido a que las membranas se separan por la ausencia de claudinas y JAM-A (Otani et al. 2019).

#### 4. Proteínas periféricas de la unión estrecha

Existen más de 40 proteínas periféricas en la UE, y la mayoría de ellas poseen dominios PDZ (Fig. 6). Este módulo se denomina así por el nombre de las tres proteínas donde se describió por primera vez: PSD95, Dlg1 y ZO-1. Los dominios PDZ son módulos de 80-90 aminoácidos que interactúan de forma homotípica con dominios PDZ presentes en otras proteínas y de manera heterotípica con motivos de unión a dominios PDZ presentes en el extremo carboxilo terminal de diversas proteínas. Por ejemplo, con los motivos S/TXV o  $\phi X\phi$ , donde  $\phi$  corresponde a un aminoácido hidrofóbico y X a cualquier aminoácido [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012)].

Las proteínas de la UE con dominios PDZ se clasifican en MAGUKs o proteínas de membrana con homología al guanilato cinasa, MAGIs o MAGUK invertidas, proteínas con múltiples dominios PDZ, y proteínas con dominios PDZ que no caben en los grupos anteriores (Fig. 6) [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012)].



**Figura 6. Proteínas de la unión estrecha con múltiples dominios PDZ.** Dentro de esta clasificación se encuentran: la familia de las proteínas MAGUK, a la cuál pertenecen ZO-1, -2, -3 y 1 Pals 1 y se caracterizan porque además de dominios PDZ poseen un dominio SH3 y GuK. La familia de las proteínas MAGUK invertidas, donde se encuentran las proteínas MAGI-1, -2 y -3. La familia de las proteínas con múltiples dominios PDZ como MUPP1 y PATJ y finalmente se encuentran Par-3, -6 y AF-6 que no pertenecen a ninguna de estas familias [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012)].

#### 4.1 Proteínas MAGUK

Las proteínas MAGUKs, además de los dominios PDZ, tienen un módulo SH3 y un dominio guanilato cinasa (GuK) sin actividad catalítica, que funciona como sitio de unión a proteína. Las proteínas MAGUK de las UE son: ZO-1, ZO-2, ZO-3 y Pals 1 (Fig. 6) [para revisión, ver (González-Mariscal et al., 2012)].

Las proteínas ZO actúan como un puente entre el citoesqueleto de actina y las proteínas transmembranales de la UE, y forman a través de sus dominios PDZ homodímeros y los heterodímeros ZO-1/ZO-2 y ZO-1/ZO-3 pero no ZO-1/ZO-3 (Wittchen et al. 1999) [para revisión, ver (González-Mariscal et al., 2012)].

ZO-2 es el motivo de estudio en esta tesis y sus características y función se describirán *in extenso* en el apartado 7.

#### **4.2 ZO-1**

ZO-1 se descubrió en 1986 y fue la primera proteína de la UE que se identificó. Su nombre se deriva de las siglas de “*Zonula Occludens*” el nombre en latín para las UEs (Stevenson et al. 1986). ZO-1 tiene tres dominios PDZ, un módulo SGK que comprende a los dominios SH3 y GuK, una región de unión a actina y un dominio ZU5 en su segmento carboxilo terminal. ZO-1 es una proteína plataforma y por lo tanto se asocia a múltiples proteínas. Por ejemplo, ZO-1 se une a las claudinas con el dominio PDZ-1, a ocludina con el dominio GuK, con ZO-2 y ZO-3 a través del dominio PDZ-2, a cingulina con el dominio ZU5, a la afadina con el módulo SGK, a JAM-A con el dominio PDZ-3, a  $\alpha$ -catenina, vinculina y shroom2 con el módulo SGK y a la F-actina con un sitio crítico de unión a actina (ABS) compuesto por 28 aminoácidos (Belardi et al. 2020) [para revisión, ver (Rouaud et al. 2020)], ubicado en la región de unión a actina (ABR) (Fig. 7A) (Beutel et al. 2019).

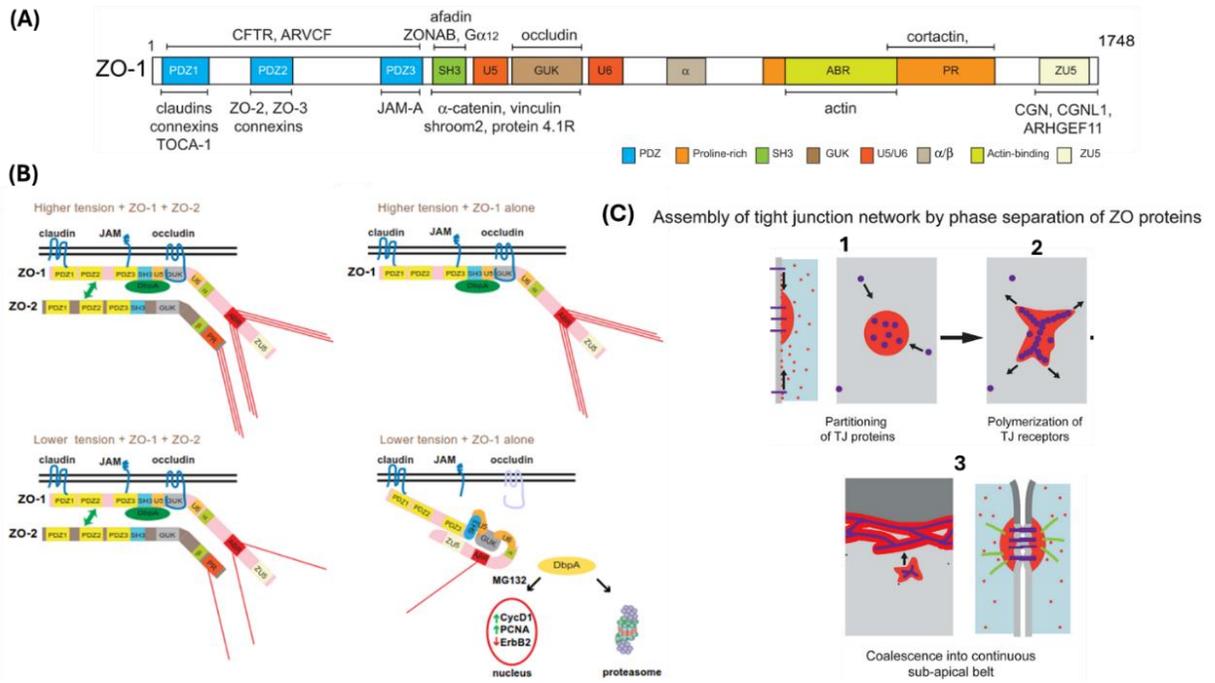
ZO-1 tiene un peso molecular de 220 kDa y está presente en epitelios, endotelios y en algunas células no epiteliales como los fibroblastos (Howarth et al. 1992). El KO de ZO-1 es letal en ratones y los animales mueren en la etapa embrionaria E10 por defectos en el desarrollo vascular (Katsuno et al. 2008). Esto último es interesante porque en la placenta humana ZO-1 se expresa de manera abundante en los vasos de las vellosidades coriónicas (Miranda et al. 2019), lo que sugiere que en los vertebrados ZO-1 es esencial para la formación de los vasos sanguíneos. El noqueo condicional de ZO-1 en el intestino de ratón no altera la estructura ni la función de barrera de la UE (Kuo et al. 2021), lo que indica que en este tejido hay redundancia funcional con alguna otra proteína, muy probablemente con ZO-2.

El silenciamiento de ZO-1 y ZO-2 impide la polimerización de las claudinas en filamentos de la UE y la reexpresión de cualquiera de estas proteínas restablece la formación de los filamentos de claudinas (Umeda et al. 2004) (Umeda et al. 2006).

ZO-1 adquiere dos conformaciones, una plegada y otra estirada, dependiendo de la presencia de ZO-2 y de la tensión del citoesqueleto. En la conformación estirada ZO-1

forma un heterodímero con ZO-2 a través de la interacción homotípica entre los dominios PDZ-2 de estas proteínas. Además, a través de su dominio SH3, ZO-1 interactúa con el factor de transcripción ZONAB; por medio del dominio PDZ3 interactúa con JAM-A; y mediante el dominio GUK se asocia con ocludina. Así mismo, la región de unión a actina de ZO-1 y se asocia al citoesqueleto de actomiosina. Cuando las células se tratan con blebistatina, un inhibidor de la miosina, ZO-1 mantiene su conformación estirada. Pero, cuando además de inhibir a la miosina se silencia a ZO-2, ZO-1 se pliega sobre sí misma y deja de interactuar con JAM-A, ocludina y ZONAB. Entonces, el factor de transcripción ZONAB queda libre en el citoplasma y si se inhibe su degradación en el proteosoma, viaja al núcleo e induce la transcripción de la ciclina D1 (Fig. 7B) (Spadaro et al. 2017).

ZO-1 exhibe transición de fase líquido-líquido y este proceso es crucial para el desarrollo de la UE. La separación de fases líquido-líquido permite la formación de compartimentos sin membranas que los rodeen. Cuando la concentración de una proteína llega al nivel de saturación puede ocurrir espontáneamente la separación de fases: una fase diluida y otra densa. En esta última se forman los condensados o gotas con propiedades semejantes a los líquidos. Así, durante la formación de la UE, ZO-1 forma gotas que se funden en agregados a lo largo del borde celular y a las que se unen otras proteínas de la UE, como claudinas, ocludina, afadina, cingulina y actina (Fig. 7C1). La acumulación de estas proteínas en el borde celular induce la polimerización de las claudinas y la formación de la UE (Fig. 7C2 y C3). La separación de fase de ZO-1 se inhibe por fosforilación, y requiere que ZO-1 se encuentre en la conformación estirada (Beutel et al. 2019).



**Figura 7. Estructura, conformación y separación de fases de ZO-1.** **(A)** Organización molecular de ZO-1. Las proteínas que interactúan con ZO-1 se indican arriba o abajo del segmento de ZO-1 al que se unen, que se marca con una línea [para revisión, ver (Rouaud et al. 2020)] **(B)** ZO-1 tiene dos conformaciones: estirada y plegada. Cuando el citoesqueleto de actomiosina se une a la región ABR de ZO-1 tensiona a ZO-1 lo que le permite unirse a las claudinas, JAM-A, ocludina, ZONAB y ZO-2. Cuando se inhibe a la miosina con blebistatina o se silencia a ZO-2, ZO-1 se mantiene estirada y puede unirse a las proteínas de la UE y a ZONAB. Sin embargo, si simultáneamente se inhibe a la miosina con blebistatina y se silencia a ZO-2, la tensión baja y ZO-1 se pliega sobre sí misma y ya no interacciona con JAM-A, ocludina y ZONAB. Si en esta condición se inhibe al proteosoma, ZONAB viaja al núcleo donde promueve la transcripción de ciclina D1y PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación) (Spadaro et al. 2017). **(C)** Ensamble de la UE inducido por la separación de fases de las proteínas ZO. **1.** Cuando inicia el proceso de formación de la UE, las proteínas ZO se acumulan en el borde celular lo que permite que se experimenten separación de fases líquido-líquido que se distingue por la formación de agregados o gotas. **2.** A estos agregados se integran las claudinas que comienzan a formar los filamentos de la UE. **3.** Los agregados proteicos coalescen y forman un cinturón continuo subapical (Beutel et al. 2019).

### 4.3 ZO-3

ZO-3 se descubrió en 1998 en un inmunoprecipitado de ZO-1. A diferencia de ZO-1 y ZO-2, la región rica en prolina de ZO-3 se ubica entre los dominios PDZ-2 y PDZ-3 en lugar del segmento carboxilo de la molécula (Fig. 6) (Haskins et al. 1998). ZO-3 se expresa en diversos epitelios incluyendo el hígado, el pulmón y el riñón. Sin embargo, no se localiza en todas las regiones de estos tejidos. Por ejemplo, en el riñón ZO-3 se localiza en los túbulos, pero no está presente en el endotelio (Inoko et al. 2003).

ZO-3 a diferencia de ZO-1 y ZO-2 no parece ser esencial para la formación de la UE. Esto se piensa porque en los ratones su noqueo no produce un fenotipo aparente (Adachi et al. 2006). Sin embargo, en el pez cebra el KO de ZO-3 genera edema, pérdida de la circulación sanguínea, malformaciones en la aleta caudal y pérdida de la barrera de la epidermis (Kiener, et al. 2008). Esto sugiere que la función de ZO-3 varía entre las especies. Aunque es poco lo que se ha estudiado de ZO-3, se sabe que su segmento carboxilo se asocia con el dominio PDZ-6 de PATJ que le permite formar un complejo con Pals-1 y Crumbs (Roh et al. 2002).

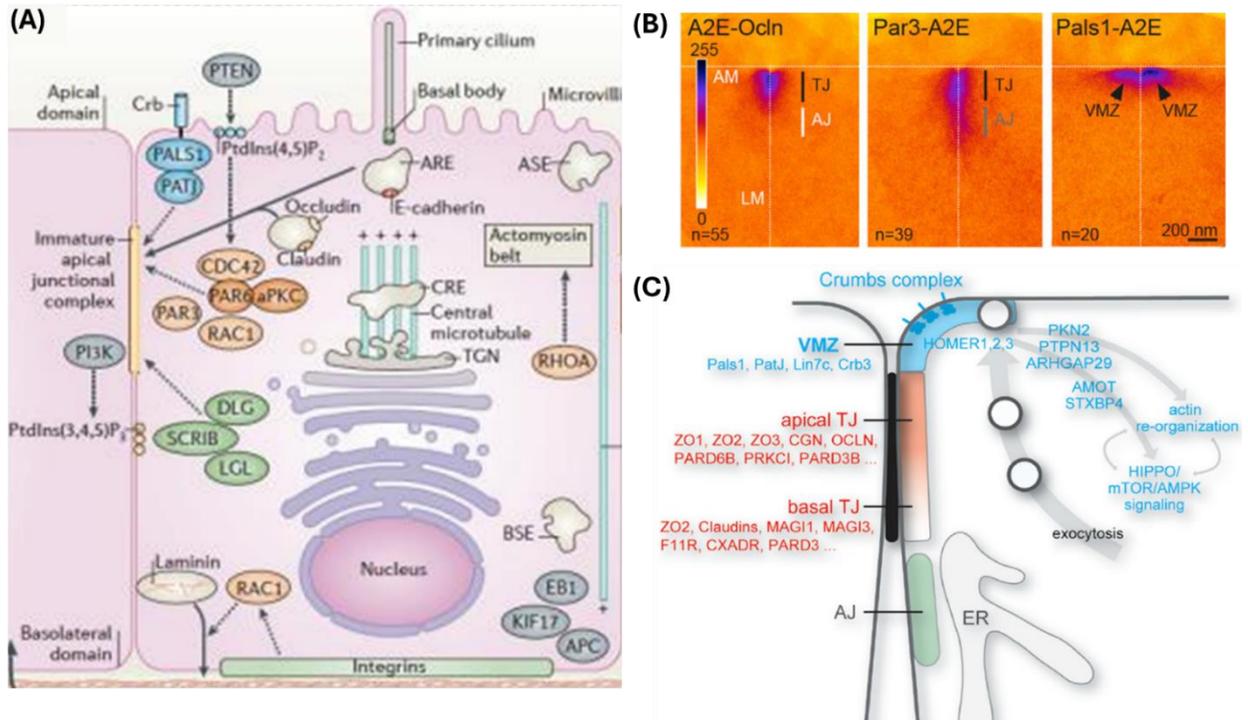
#### **4.4 Pals 1**

Pals 1 (proteína asociada con Lin71) es una proteína plataforma de 77 kDa. En su extremo amino terminal tiene una región sin similitud a otras proteínas llamada U1. Pals 1 posee dos dominios L27 uno ubicado hacia el extremo amino terminal (N) y otro hacia el carboxilo terminal (C). Pals 1 tiene también un dominio PDZ, un módulo SH3, un dominio 4.1B y un dominio GuK ubicado en el extremo carboxilo (Fig. 6) [para revisión, ver (Assémat et al. 2008)]. Los dominios U1 y L27N de Pals 1 son críticos para que la proteína se localice en la UE. Pals 1 se une a Patj a través de su dominio L27N y a Crumbs con su dominio PDZ (Roh et al. 2002).

La función principal de Pals 1 es el desarrollo de la polaridad epitelial. Esta se forma por la acción de tres complejos de polaridad. El primer complejo llamado Par, se forma por Par3, Par6 y aPKC, este complejo interactúa con los otros dos complejos. El segundo complejo de polaridad se denomina Crumbs y tiene como constituyentes a Pals 1, Patj y Crumbs (crb). Este complejo permite la formación de la UE. El tercer complejo de polaridad se llama Scrib y está constituido por hscrib, Lgl y Dlg1. Este complejo tiene la función de marcar y formar la membrana lateral (Fig. 8A) [para revisión, ver (Assémat et al. 2008) y (Rodriguez-Boulan y Macara, 2014)].

Cuando se silencia a Pals 1, las células MDCK presentes en cultivos en tres dimensiones forman quistes sin lúmenes (Straight et al. 2004), y en los cultivos en dos dimensiones no se ensambla la zona marginal de los vertebrados (Tan et al. 2020) y se deslocaliza la E-cadherina (Wang et al. 2007). Además, cuando se silencia a Pals 1 se

perde a Patj (Tan et al. 2020) pero no a Crumbs, aunque si disminuye la asociación de Crumbs con el complejo Par6/Par3/aPKC (Fig. 8B y C) (Straight et al. 2004).



**Figura 8. El complejo de polaridad epitelial. (A)** La polaridad epitelial se regula por tres complejos de polaridad. El primer complejo llamado Par lo forman Par3, Par6, aPKC y Cdc42. Este complejo interactúa con los otros dos complejos. El segundo complejo llamado Crumbs (crb) está integrado por Pals1, Crumbs y Patj, y permite la formación de la UE. El tercer complejo llamado Scrib se forma por hscrib, Lgl y Dlg, y tiene la función de marcar y formar la membrana lateral [para revisión, ver (Rodríguez-Boulan y Macara, 2014)] **(B)** Localización de ocludina, Par3 y Pals 1 en el borde apical-lateral de las células epiteliales. Membrana lateral, LM. Membrana apical, AM. En el primer panel la ocludina se localiza en la UE, en el segundo panel, Par3 se ubica en la UE y en la unión adherente (AJ), y en el tercer panel, Pals1 se localiza en la zona marginal de los vertebrados. **(C)** En los mamíferos, por arriba de la UE, se localiza la zona marginal de los vertebrados (VMZ) integrada por el complejo Crumbs. Por debajo de la UE se localiza la UA (Tan et al. 2020).

#### 4.5 Proteínas MAGI

Las proteínas MAGIs se caracterizan porque en ellas la mayoría de los dominios PDZ se encuentran en el segmento carboxilo y no en el amino, como sucede con las proteínas MAGUK. Además, en lugar de un dominio SH3 tienen el módulo WW llamado así por sus dos residuos conservados de triptófano. Tanto los dominios SH3 como WW interactúan con sitios ricos en prolina, siendo PPXP y PPXY los motivos canónicos respectivos de los módulos SH3 y WW. Existen tres proteínas en esta familia: MAGI-1, -2 y

-3 (Fig. 6) [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012)]. MAGI-1 y -3 son ubicuas mientras que MAGI-2 sólo se expresa en el cerebro, los podocitos, el páncreas, el corazón y el músculo esquelético. Las MAGI se asocian tanto a la UE como a la UA. Al ser proteínas plataforma, cuentan con muchos ligandos, algunos de ellos como  $\beta$ -catenina interactúan con las tres MAGI, mientras que otros como el receptor del factor de crecimiento nervioso sólo interactúan con MAGI-1. [para revisión, ver (Kotelevets y Chastre, 2021)].

De las tres MAGIs, la 1 fue la primera en ser descubierta y es la más estudiada (Dobrosotskaya et al. 1997). MAGI-1 exhibe tres isoformas a, b y c, que contienen dos señales de localización nuclear. En la UE MAGI-1 funciona como una plataforma para proteínas de adhesión a las que estabiliza en la membrana. Esto se sabe porque cuando en los fibroblastos L se transfectan a MAGI-1 y a JAM4, la primera estabiliza a JAM4 en la membrana, incrementa la agregación celular y disminuye la permeabilidad de manera más pronunciada que cuando solo se transfecta a JAM4 (Hirabayashi et al. 2003). Algo similar sucede en las células endoteliales, donde ESAM, una molécula de adhesión endotelial de tipo Ig similar a JAM4, recluta a MAGI-1 a la UE (Wegmann et al. 2004) activa a RhoA e induce la polimerización de la actina para la maduración de los contactos célula-célula (Kimura et al. 2010).

El KO de MAGI-1 en los ratones no es letal, pero produce glomeruloesclerosis si además de MAGI-1 se silencia a la nefrina, una proteína específica de la unión en hendidura presente en los podocitos glomerulares (Ni et al. 2016).

Respecto a MAGI-2 y -3, se sabe que regulan a la UE intestinal, ya que variantes genéticas de estas proteínas se asocian con enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerativa y enfermedad celiaca (Wapenaar et al. 2008) (McGovern et al. 2009) (Norén et al. 2017).

#### **4.6 Proteínas con múltiples dominios PDZ**

MUPP1 y Patj tienen respectivamente 13 y 10 dominios PDZ (Fig. 6). Estos dominios PDZ muestran una alta homología entre ambas proteínas y se unen a las mismas proteínas [para revisión, ver (Assémat et al. 2008)].

#### **4.6.1 Patj**

Patj forma junto con la proteína integral Crumbs, y la proteína periférica Pals 1 un complejo que se sitúa en la zona marginal de los vertebrados (Fig. 8A y C). Como se describió anteriormente, esta zona se ubica en la punta más apical de la membrana lateral por arriba de la UE e interactúa con ella (Tan et al. 2020).

Patj es una proteína de 196 kDa que se expresa principalmente en los epitelios, se asocia con su dominio L27 a Pals 1 y con sus dominios PDZ 6 y 8 interactúa con claudina-1 y ZO-3 (Roh et al. 2002). Si se silencia a Patj los cultivos en tres dimensiones no desarrollan quistes normales y en los cultivos en dos dimensiones disminuye la RET (Shin et al. 2005). El silenciamiento de Patj induce la deslocalización de Pals 1 y Crumbs de la UE (Michel et al. 2005) así como de ZO-3, ocludina y ZO-1 (Shin et al. 2005) (Michel et al. 2005).

El arribo de Patj a la membrana y su distribución a lo largo del borde celular es indispensable para que posteriormente los condensados de ZO-1 puedan fundirse entre sí y formar filamentos. En este proceso llamado “wetting”, Patj funciona como una plataforma para que ZO-1 en su forma líquida se ancle a la membrana y se forme el cinturón sobre el que se polimerizan las claudinas en filamentos de UE (Preprint disponible en <https://doi.org/10.1101/2022.12.16.520750>).

#### **4.6.2 MUPP1**

MUPP1 es una proteína de 219 kDa que se identificó originalmente por su interacción con el receptor 5-HT<sub>2C</sub>. MUPP1 se localiza en la UE y se ha detectado en el páncreas, el riñón, el músculo esquelético, el corazón, el hígado, el cerebro y la placenta (Ullmer et al. 1998). MUPP1 no se ha estudiado mucho, pero se sabe que actúa como plataforma de interacción con las claudinas y JAM (Hamazaki et al. 2002). MUPP1 se asocia al complejo de polaridad Crumbs a través de su unión con Pals 1 (van de Pavert et al. 2004).

#### **4.7 Par3, Par6 y AF-6/afadina**

Las proteínas Par3, Par6 y afadina contienen dominios PDZ, pero no pertenecen a los grupos de proteínas de la UE con dominios PDZ anteriormente descritos (Fig. 6) [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012)]. Par3 y Par6 como previamente se describió forman un complejo de polaridad junto con la aPKC (sección 4.4 JAM y 5.4 Pals 1).

##### **4.7.1 Par6**

Par6 es una proteína de 37 kDa con tres dominios conservados: el dominio PB1 con el cual se une a aPKC, el módulo CRIB con el que se une a Cdc42 y a Rac, y el dominio PDZ con el que se une a Par3 y a Crumbs [para revisión, ver (Assémat et al. 2008)]. En las células epiteliales, Par6 presenta tres isoformas con diferentes funciones y localización: Par6G y Par6A que se localizan en la UE y cuya sobreexpresión no afecta a la UE; y Par6B que se localiza en el citosol y cuando se sobreexpresa inhibe la formación de la UE (Gao y Macara, 2004). Esto último puede deberse a su fuerte unión a Pals 1 que interfiere con la unión de Pals 1 con Patj (Gao y Macara, 2004) (Wang et al. 2004). La función principal de Par6 es facilitar la interacción de aPKC con sus efectores Par3 y Lgl. Cuando Lgl se fosforila por aPKC se separa Par6 y aPKC permitiendo la formación del complejo Par6/Par3/aPKC que reclutará a JAM-A al sitio de formación de la UE (Fig. 8A y C) (Yamanaka et al. 2003).

##### **4.7.2 Par3**

En los mamíferos, hay dos genes de Par3 el A y el B, siendo la proteína Par3 A la más estudiada. Par3A se expresa en varios tejidos, siendo más abundante en riñón, corazón y cerebro (Lin et al. 2000). Par3 A interactúa con su primer dominio PDZ con Par6 y forma homodímeros a través de su región CR1. La formación de los homodímeros permite la localización de Par3 en la región apical. Si se sobreexpresa el dominio CR1 se deslocalizan Par6 y la aPKC y no se alcanza el pico inicial de RET después de un cambio a calcio (Mizuno et al. 2003). Una vez que Par3 se localiza en los contactos celulares se une con su primer dominio PDZ a JAM-A y allí funciona como una plataforma que recluta a Par6 y aPKC (Fig. 8A y C). (Ebnet et al. 2001).

### 4.7.3 Afadina

La afadina se identificó en 1997 como una proteína de unión a actina en un extracto de cerebro de rata (Mandai et al. 1997). La afadina exhibe dos isoformas: l-afadina que se expresa en los epitelios y se localiza en la UA y la UE, y s-afadina presente únicamente en el cerebro donde además de localizarse en los contactos celulares se ubica en el núcleo (Buchert et al. 2007).

En su extremo amino terminal, la afadina tiene dos dominios RA, seguidos por un dominio FHA, un módulo DIL, un dominio PDZ central, tres regiones ricas en prolina y una región de bobina enrollada. En el segmento carboxilo terminal la afadina posee un dominio de unión a actina (Fig. 9A) [para revisión, ver (Rouaud et al. 2020)].

En la UA la afadina es la principal proteína plataforma. La formación de la UE comienza con la interacción en *trans* de las nectinas de las células adyacentes. Las nectinas tienen tres repetidos tipo inmunoglobulina y marcan el sitio de formación de la UA. Las nectinas reclutan a la afadina que se une a la  $\alpha$ -catenina que a su vez recluta a la E-cadherina a los contactos celulares (Takai et al. 2008). Una vez que esto sucede, la afadina interactúa con Rap1 que estabiliza a la UA al unirse a la p120-catenina. Esto inhibe la endocitosis de la E-cadherina que aún no ha establecido interacciones en *trans* (Fig. 9B) (Sato et al. 2006)

El KO de afadina es letal en el ratón. Desde el día E7.5, las células del ectodermo están menos polarizadas y presentan anomalías en la longitud e integridad de las uniones. Los embriones mueren el día E10 (Zhadanov et al. 1999). El KO condicional de afadina en el epitelio intestinal, muestra un incremento en la permeabilidad intestinal y una respuesta inflamatoria exacerbada al dodecilsulfato de sodio (SDS) (Tanaka-Okamoto et al. 2011). En el cerebro murino, el KO de afadina produce hidrocefalia, y los ratones mueren poco después del nacimiento, exhibiendo deslocalización de nectina-1 y N-cadherina de la glía radial y de las células endimarias (Yamamoto et al. 2013). En el riñón, la falta de afadina daña la tubulogénesis, ya que disminuye el reclutamiento de nectina a la membrana lo que bloquea el desarrollo del complejo Par de polaridad apical/basal (Yang et al. 2013). Por último, la ausencia de afadina daña la angiogénesis, ya que disminuye la actividad del VEGF y de la esfingosina-1-fosfato lo que inhibe la formación de la red de capilares a través de la activación de Rap1 (Tawa et al. 2010).

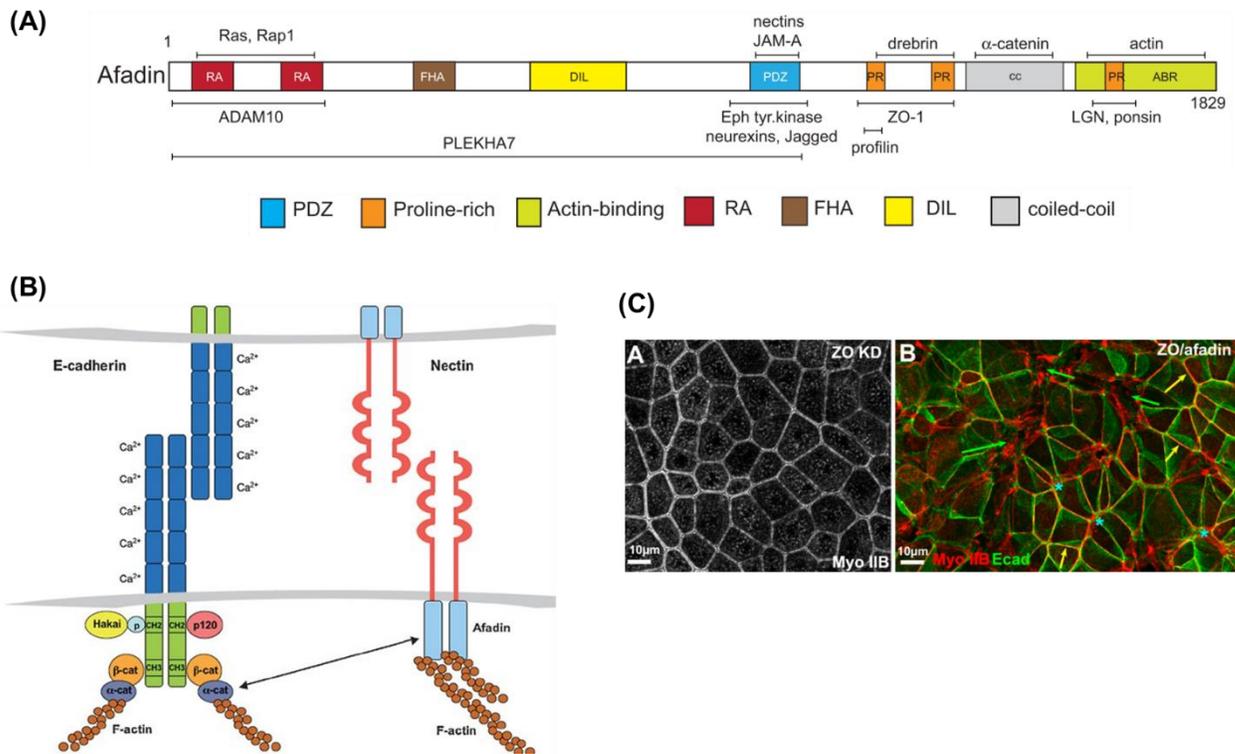
En los cuerpos embrionarios el silenciamiento de afadina deslocaliza al complejo de polaridad Par lo que bloquea la formación de las uniones celulares (Komura et al. 2008). El silenciamiento de afadina también induce la desorientación del uso mitótico y en los cultivos en tres dimensiones se forman quistes sin lúmenes bien definidos (Carminati et al. 2016).

Si se silencia afadina no se forman la UA ni la UE. En la UE, los segmentos ricos en prolina de la afadina se unen al dominio SH3 de ZO-1 y si se expresa afadina sin sus segmentos ricos en prolina no se une a ZO-1 y no se forma la UE pero si la UA (Ooshio et al. 2010).

La asociación de afadina con las nectinas es independiente del citoesqueleto de actomiosina, sin embargo, la integridad del citoesqueleto es necesaria para que estas dos proteínas puedan reclutar a las proteínas periféricas de la UA y la UE. Esto se demostró al tratar a las células MDCK con citocalasina D o latrunculina A, que inhiben la polimerización de la actina, y observar que la nectina-1 y la afadina se mantienen en el borde celular mientras que la E-cadherina y ZO-1 se deslocalizan al citoplasma (Yamada et al. 2004).

En los podocitos, el silenciamiento de afadina induce la pérdida de las fibras de estrés. Esto indica que la afadina a través de la activación de RhoA induce la formación de fibras de estrés (Saito et al. 2015).

Las proteínas ZO y la afadina regulan la tensión del citoesqueleto en los contactos celulares ya que cuando se silencia a ZO-1 y a ZO-2 sube la tensión del anillo cortical de actomiosina y aumenta la expresión de afadina. Afadina parece contrarrestar este incremento en la tensión ya que cuando además se silencia a afadina las células pierden su forma y la función de barrera evaluada por medio de la RET (Fig. 9C) (Choi et al. 2016).



**Figura 9. Estructura, localización y función de afadina.** **(A)** Organización molecular de afadina. Las proteínas que se unen a afadina se indican en el sitio de afadina al que se asocian [para revisión, ver (Rouaud et al. 2020)]. **(B)** Composición molecular de la unión adherente. Al inicio y de manera independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , las nectinas establecen contactos en *trans* a través de sus repetidos de Ig. Las nectinas reclutan a afadina, que estabiliza al citoesqueleto de actina y recluta a  $\alpha$ -catenina y a p120. Esta plataforma permite el ensamble de la E-cadherina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  [para revisión, ver (Fujita y Hogan, 2006)]. **(C)** Cuando se silencia a ZO-1 y a ZO-2 sube la tensión del anillo cortical de actomiosina (panel izquierdo), pero si además se silencia a la afadina (panel derecho), las células pierden su forma. Por lo tanto, se cree que la afadina contrarresta el incremento en la tensión provocado por la ausencia de las proteínas ZO (Choi et al. 2016).

## 5. Cingulina y paracingulina

Cingulina y paracingulina son proteínas periféricas de la UE sin dominios PDZ. El nombre de cingulina proviene del latín “*cingere*” que significa encintar o formar un cinturón alrededor. La estructura de estas proteínas es similar a la miosina, sin embargo, no actúan como motores dependientes de actina. Cingulina y paracingulina tienen una cabeza amino globular, un cuerpo que al homodimerizarse forma una bobina enrollada, y a diferencia de la miosina exhiben una cola globular pequeña en el extremo carboxilo terminal. La

paracingulina tiene un 40% de identidad de secuencia con la cingulina [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012)].

## 5.1 Cingulina

La cingulina se identificó por primera vez en 1988 (Citi et al. 1988), tiene un peso de 140 kDa y se localiza en las UEs. Interacciona con ZO-1 por un motivo conservado denominado ZIM que se ubica en su cabeza globular y que se une al ZU5 de ZO-1. Además, la cingulina con su cabeza globular interacciona con la actina, los microtúbulos, ZO-2 y ZO-3. Con su dominio de bobina enrollada, la cingulina interactúa con GEHF-H1, p114RhoGEF, MgcRacGAP y Tiam1. Este dominio de bobina enrollada se puede abrir por fosforilación mediada por AMPK [para revisión, ver (Rouaud et al. 2020)].

El KO de cingulina en ratones no genera un fenotipo aparente. Sin embargo, los animales mostraron un incremento de la claudina-2 en el duodeno y en el riñón lo que sugiere que la cingulina regula la expresión de claudina-2 (Guillemot et al. 2012). En los cuerpos embrionarios, el silenciamiento de cingulina incrementa la transcripción de la ocludina, y las claudinas -2, -6 y -7 (Guillemot et al. 2004). En el endotelio, la sobreexpresión de cingulina favorece la formación de la UE, y disminuye la permeabilidad a macromoléculas y en los ratones el KO de cingulina produce una barrera hematoencefálica defectuosa (Schosleitner et al. 2016).

La cingulina forma un puente entre ZO-1 y la miosina no muscular IIB (NMIIB). Esta interacción es crucial para que ZO-1 adquiera una conformación estirada y se acumule en la UE. Además, esta interacción permite mantener la tortuosidad del borde celular y la tensión de la membrana apical ya que facilita la acumulación de la  $\gamma$ -actina en la UE (Rouaud et al. 2023). La cingulina también se une a los microtúbulos a través de un conjunto de residuos básicos presentes en su cabeza globular. Cuando el dominio globular de la cabeza se fosforila por la AMPK ocurre un cambio conformacional en la cingulina que permite que se una a los microtúbulos apicales planares (Yano et al. 2013).

## **5.2 Paracingulina**

La paracingulina también conocida como JACOP, es una proteína de 148 kDa que se descubrió en el 2004 (Ohnishi et al. 2004). Se localiza tanto en la UE como en la UA a donde se recluta por ZO-1 y PLEKHA7 respectivamente. En la UA, la paracingulina se une a la NMIIB lo que le permite mantener la UA (Rouaud et al. 2023). La paracingulina también se asocia a los microtúbulos y cuando estos se desestabilizan, disminuye la marca de paracingulina de la membrana (Paschoud et al. 2011).

La paracingulina recluta e inactiva a GEF-H1 en la membrana celular, y esto disminuye la actividad de RhoA. Por otro lado, el silenciamiento de paracingulina retrasa la formación de la UE al disminuir la actividad de Rac1 de una manera dependiente de Tiam1. El silenciamiento de paracingulina también incrementa la expresión de claudina-2 (Guillemot et al. 2008). La paracingulina promueve la asociación de la VE-cadherina con el citoesqueleto de actina y así estabiliza la UA endotelial (Chrifi et al. 2017).

## **6. Uniones estrechas tricelulares**

Las uniones estrechas tricelulares (UET) son estructuras especializadas que se forman en el punto de contacto de tres o más células. Las UET están constituidas por los filamentos de las UE bicelulares que en los sitios tricelulares giran de manera perpendicular y se extienden hasta la región basal de tal manera que en ese borde lateral hay proteínas de la UE y la UA. Vistas por criofractura con microscopía electrónica, las UET tienen dos estructuras principales, un elemento central vertical de sellado intercelular y fibras perpendiculares asociadas al elemento central (Staehelin, 1973). El elemento central se forma por un filamento de cada célula que va desde la región más apical de la UE bicelular hasta la región basal. Las fibras asociadas son pequeños filamentos de UE que se conectan de forma perpendicular al elemento central de sellado y asemejan a los peldaños de una escalera (Fig. 10A). La función de las UET es sellar el espacio paracelular entre varias células adyacentes [para revisión, ver (Higashi y Furuse, 2022)].

En las UET se concentran dos proteínas específicas de estas uniones: tricelulina y angulina.

## 6.1 Tricelulina

La tricelulina es una proteína de 65 kDa de la familia TAMP. Posee dos asas extracelulares y sus cuatro segmentos que atraviesan la membrana forman un dominio Marvel. A diferencia de la ocludina, la tricelulina tiene un segmento amino largo y a semejanza de la ocludina, posee un carboxilo largo donde se localiza el dominio ELL (OCEL) (Fig. 2 y 10B). En las UEt la tricelulina es esencial para formar los filamentos cortos de la UEt que se unen al elemento central (Fig. 10A) (Sugawara et al. 2021). La tricelulina modifica el patrón de la red de filamentos de la UE que se observa por criofractura. Así, cuando las células HEK-293 se transfectan con claudina-1 y tricelulina, el tamaño de la malla de filamentos de UE se reduce y aparecen más ángulos rectos en comparación a cuando sólo se transfecta a la claudina-1, (Cording et al. 2013).

La tricelulina puede suplir a la ocludina, ya que cuando se silencia a la ocludina, la tricelulina se desplaza a las uniones bicelulares (Ikenouchi et al. 2008). En los contactos bicelulares, la falta de tricelulina disminuye el entrecruzamiento de la red de filamentos de la UE de manera similar a como ocurre cuando se silencia a ocludina. Y cuando se silencia simultáneamente a tricelulina y a ocludina, desaparecen los entrecruzamientos de la red, y los filamentos de la UE forman un patrón de hebras paralelas. Esto indica que ocludina y tricelulina tienen funciones semejantes en las UEs bicelulares (Saito et al. 2021).

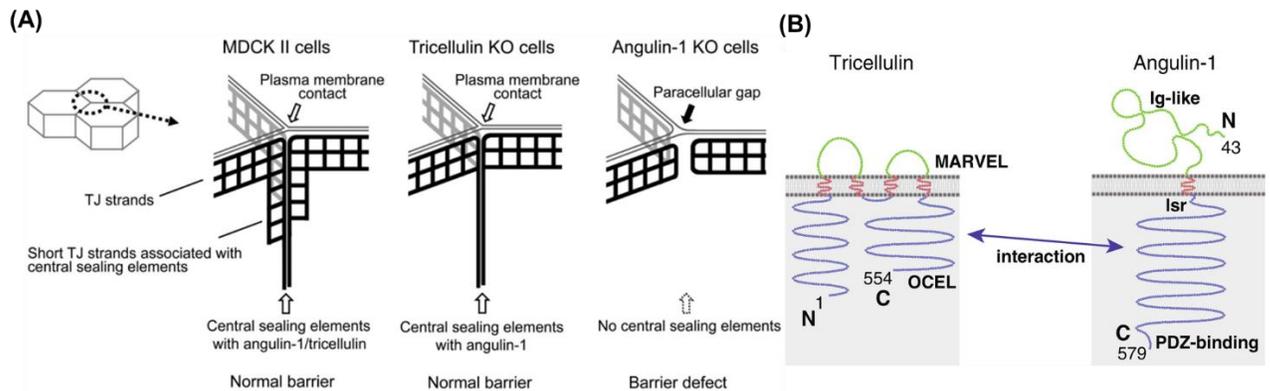
La tricelulina mantiene la función de barrera de la UE pues cuando se silencia disminuye la RET y aumenta la permeabilidad a macromoléculas y agua (Ikenouchi et al. 2005), (Krug, 2017), (Ayala-Torres et al. 2019) y (Raleigh et al. 2010).

El KO de tricelulina produce sordera por degeneración de las células peludas del órgano de Corti en la cóclea (Kamitani et al. 2015). A diferencia de lo que ocurre cuando se silencia a la claudina-11, el silenciamiento de tricelulina mantiene intacto el potencial endococlear y la degeneración de las células peludas ocurre después de la maduración del potencial endococlear (Kamitani et al. 2015).

## 6.2 Angulina

La angulina LSR, es una proteína integral de 585 aminoácidos, que atraviesa una sola vez la membrana, posee un dominio de inmunoglobulina en la región extracelular y en su extremo carboxilo terminal presenta un motivo LVV de unión a dominios PDZ (Fig. 2 y 10B). La familia de las angulinas tiene tres miembros: angulina -1, -2 y -3. La angulina-1 es la más ubicua y se expresa en los tejidos epiteliales incluyendo la piel, el intestino delgado, los túbulos proximales, el colon y el hígado. La angulina-2 se expresa en el páncreas, colon, riñón, vejiga y los túbulos distales y colectores del riñón. Finalmente, la angulina-3 se localiza en el epitelio pigmentario de la retina, los podocitos, el mesotelio y en el perineuro [para revisión, ver (Higashi y Furuse, 2022)].

Así como JAM-A define el sitio donde se formará la UE bicelular, la angulina marca el sitio de formación de la UEt, y a ese lugar recluta a la tricelulina a través de su dominio citoplásmico (Masuda et al. 2011). La angulina es indispensable para la formación de los elementos centrales de sellado de las UEt, ya que si se silencia éstos desaparecen (Fig. 10A) (Sugawara et al. 2021). La angulina recluta a ZO-1 a la UEt y esto permite que se recluten las claudinas a la región basolateral de las UEt [para revisión, ver (Higashi y Furuse 2022)].



**Figura 10. Esquema de las uniones estrechas tricelulares. (A)** En las UEt tricelulina y angulina LSR se localizan a lo largo del eje apicobasal. En las células KO de tricelulina, se pierde la conexión entre el elemento de sellado central y los filamentos de la UE bicelular. En las células KO de angulina no se forma el elemento de sellado central (Sugawara et al. 2021). **(B)** Estructura de tricelulina y angulina. Tricelulina pertenece a la familia TAMP pues posee un dominio Marvel con el que atraviesa cuatro veces la membrana. Además, posee dos asas extracelulares, un dominio amino y otro carboxilo ambos largos y citoplásmicos, y en este último se localiza el dominio ELL. La angulina atraviesa una sola vez la membrana, en su región extracelular tiene un dominio tipo inmunoglobulina y en su porción citoplásmica posee un motivo de unión a dominios PDZ [para revisión, ver (Higashi y Furuse 2022)].

## 7. ZO-2

ZO-2 es una proteína de 160 kDa que se descubrió porque co-inmunoprecipita con ZO-1 (Gumbiner et al. 1991). ZO-2 pertenece a la familia MAGUK ya que tiene 3 dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio GUK. Además, ZO-2 posee una región de aminoácidos cargados positivamente y una región rica en prolina donde se encuentra el sitio de unión a actina. Los dominios de ZO-2 están separados por regiones únicas (U). Finalmente, en el segmento carboxilo terminal de ZO-2 los tres últimos aminoácidos (TEL) forman un motivo de unión a dominios PDZ (Fig.11) [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2012)].

ZO-2 interacciona con una gran variedad de proteínas: Por ejemplo, coimmunoprecipita con proteínas nucleares como lámina B1 (Jaramillo et al. 2004), interactúa con los factores de transcripción Jun, Fos, C/EBP y Myc (Betanzos et al. 2004), con cinasas como PKA, SRPK y PKC (Avila-Flores et al. 2001), (Chamorro et al. 2009) (Quiros et al. 2013), con el fosfoinosítido PtdIns (4,5) P2 (Meerschaert et al. 2009) con la proteína supresora de tumores hScrib (Metais et al. 2005), con la oncoproteína LASP-1 (Mihlan et al. 2013), con proteínas del citoesqueleto como actina (Wittchen et al. 1999) y con proteínas de los contactos celulares como la  $\beta$ -catenina de la UA (Wetzel et al. 2017), ocludina (Itoh et al. 1999), ZO-1 (Gumbiner y Kim, 1991), JAMs (Monteiro et al. 2013) y claudinas (Itoh et al. 1999) de la UE, y con las conexinas 30, 32 (Talhouk et al. 2008), 36 (Li X et al. 2009) y 43 (Singh D et al. 2005) de las uniones comunicantes (Fig. 11) [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2017)].

Cuando ZO-2 se sobreexpresa en las células MDCK, se separa en fases y forma condensados. La formación de los condensados depende de los dominios PDZ3-SH3-GUK, que forman el supra dominio PSG. A medida que los condensados de ZO-2 aumentan de tamaño se elongan a lo largo del borde celular y permiten la formación de redes de filamentos de la UE. El proceso de separación de fases involucra la desfosforilación de ZO-2, ya que si se activa a la cinasa CK2 se inhibe la formación de los condensados de ZO-2, mientras que si se activa la fosfatasa PP1 se promueve su formación (Beutel et al. 2019).

ZO-2 es una de las primeras proteínas de la UE en llegar a los contactos celulares. En el ratón, en la etapa embrionaria de 8 células o blastómeros, la adhesión célula-célula comienza con la compactación que se caracteriza por la expresión de la E-cadherina en el

borde celular y el arribo del complejo de polaridad Par3/Par6/aPKC/Cdc42 a la región más apical de las células. En la siguiente etapa, donde la mórula tiene 16 células, ZO-2 y cingulina llegan a la porción más apical de la membrana lateral mezclándose con las proteínas de la UA. En la siguiente división celular se forma el blastocisto temprano de 32 células con una cavidad o blastocele. En esta etapa se insertan a la membrana las claudinas y la ocludina, y las proteínas de la UE se segregan de la UA formando dos dominios distintos (Eckert y Fleming, 2008). El desarrollo de estas estructuras permite el transporte vectorial de iones y agua a través del epitelio que da lugar a la formación del blastocele.

### **7.1 Localización y movimiento de ZO-2**

ZO-2 es una proteína presente en las UEs y el núcleo. El movimiento de ZO-2 se regula por señales de localización (NLS) y de exportación nuclear (NES) y por modificaciones postransduccionales. En la región U2, ZO-2 tiene dos NLS bipartitas (bp), una NLS monopartita y 16 repetidos de serina-arginina que al fosforilarse direccionan a ZO-2 a los moteados nucleares. ZO-2 posee también 4 NES. Para que ZO-2 salga del núcleo es necesario que se fosforile la NES-1 por la PKC $\epsilon$  (Chamorro et al. 2009) y que la bp NLS-2 se inactive por O-GlcNAcetilación (Quiros et al. 2013).

La localización nuclear de ZO-2 depende de la confluencia del cultivo ya que en los cultivos confluentes ZO-2 se localiza en el borde celular mientras que en los cultivos subconfluentes, además de localizarse en la UE, ZO-2 se concentra en el núcleo (Islas et al. 2002).

En los cultivos subconfluentes ZO-2 recién sintetizada viaja primero al núcleo, y después se mueve al borde celular (Chamorro et al. 2009). En cambio, en los cultivos confluentes ZO-2 recién sintetizada viaja directamente al borde celular, sin pasar por el núcleo (Quiros et al. 2013). El movimiento de ZO-2 del citoplasma a la membrana se induce por activación del receptor sensor de calcio (CaSR) acoplado a una proteína G heterotrimérica. Cuando el calcio activa al CaSR, la subunidad  $\alpha_{q/11}$  de la proteína G se separa de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , y activa a la fosfolipasa C que hidroliza al fosfatidil inositol bi-fosfato en inositol fosfato y diacilglicerol. Este último activa a la PKC $\epsilon$ , que fosforila a la

cinasa WNK4 y a ZO-2. WNK4 a su vez fosforila a ZO-2 y esta doble fosforilación de ZO-2 por PKC y WNK4 le permite separarse de 14-3-3 e integrarse a la UE (Amaya et al. 2019).

## **7.2 Función de ZO-2 en el núcleo**

ZO-2 en el núcleo ejerce varias funciones. Por una parte, ZO-2 inhibe la transcripción de genes. Así, se ha visto que, al asociarse a YAP, ZO-2 inhibe la transcripción de genes regulados por sitios TEAD como el gen CTGF (Dominguez-Calderon et al. 2016). ZO-2 también bloquea a la vía WNT ya que inhibe la actividad transcripcional regulada por el factor de transcripción TCF y la  $\beta$ -catenina (Wetzel et al. 2017) (Dominguez-Calderon et al. 2016). ZO-2 además se une a los factores de transcripción Jun y Fos e inhibe la transcripción de genes regulados por sitios AP-1 (Betanzos et al. 2004), e interactúa con el factor de transcripción c-myc para asociarse a la caja E del promotor de la ciclina D1 e inhibir su transcripción (Huerta et al. 2007).

Por otra parte, ZO-2 también actúa como un transportador de factores al núcleo. Al respecto, se sabe que el movimiento hacia adentro y fuera del núcleo de ZO-2, modula el tráfico intracelular del factor de transcripción TEAD a través de un proceso regulado por las nPKC $\delta$  y  $\epsilon$  (Gallego-Gutiérrez et al. 2021). La interacción del motivo de unión a dominios PDZ de la proteína ARVCF con el segmento amino terminal de ZO-2, facilita la entrada al núcleo de ARVCF (Kausalya et al. 2004). De manera similar, el PDZ-1 de ZO-2 se asocia al motivo de unión a dominios PDZ de YAP2 e induce su localización en el núcleo (Oka et al. 2010).

También se ha visto que ZO-2 mantiene la forma del núcleo ya que cuando se silencia, el núcleo pierde su forma ovalada y aparece lobulado con múltiples indentaciones. Esto se debe a que ZO-2 en el núcleo se une a la lámina B1 y a la proteína SUN-1. Esto permite que el nucleoesqueleto de láminas se conecte al complejo LINC integrado por las nesprinas y SUN. Este complejo del lado citoplasmático se une a la actina, vimentina y a los microtúbulos y por tanto es esencial para ligar al nucleoesqueleto de láminas con el citoesqueleto. Por ello encontramos que cuando falta ZO-2 se pierde la red de vimentina que envuelve y da rigidez al núcleo. Así mismo, vemos que si en las células ZO-2 KD se estabiliza a los microtúbulos con docetaxel, se recupera la forma

ovalada del núcleo, lo que sugiere que ZO-2 da estabilidad a los microtúbulos (Hernández-Guzmán et al. 2021).

### **7.3 Función de ZO-2 en la membrana**

El KO de ZO-2 es letal en el ratón, ya que los animales se mueren en la gastrulación temprana entre los días 6.5 y 7.5 (Xu et al. 2008). Para saber si esto se debe a que ZO-2 es necesaria para el embrión *per se* o para el desarrollo de la placenta, se generaron ratones quimera inyectando células madre que carecen de ZO-2 en blastocistos silvestres. Como se generaron ratones viables, se concluyó que ZO-2 es indispensable para el desarrollo del trofoblasto y la placenta y no para el embrión por sí mismo (Xu et al. 2008).

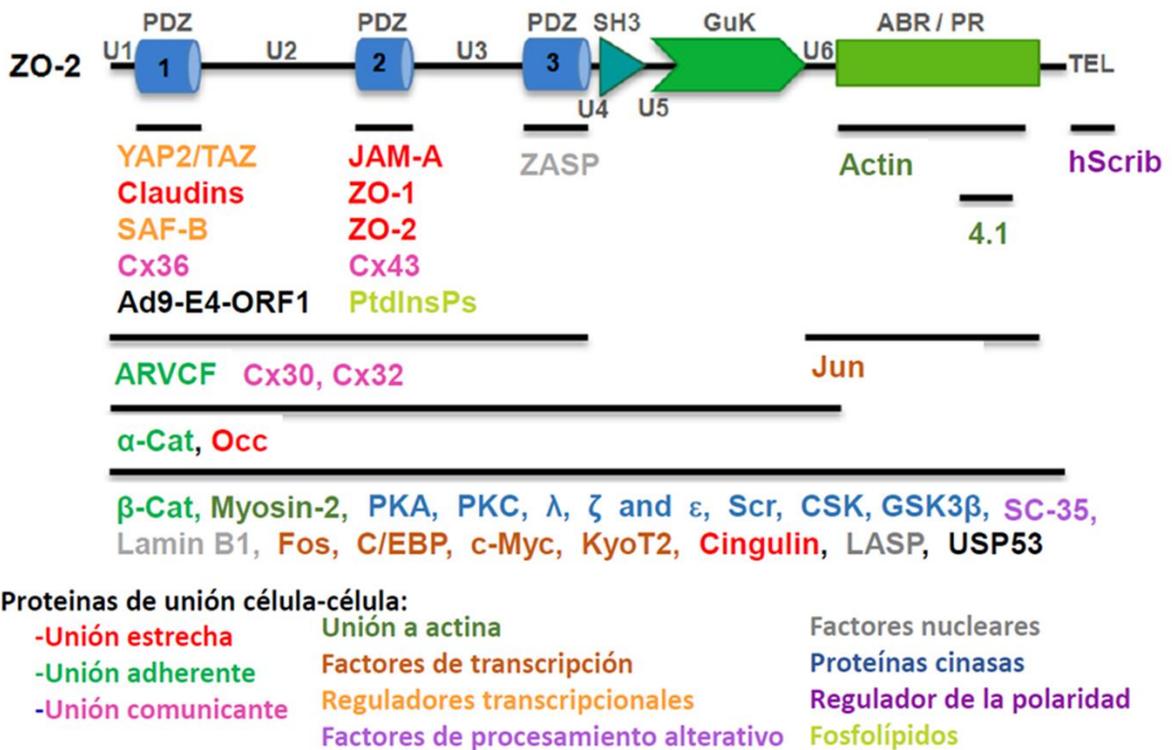
Aquí, es pertinente mencionar que en la placenta humana a término es muy intensa la presencia de ZO-2 en el sincitio trofoblasto, mientras que ZO-1 se expresa profusamente en los vasos coriónicos (Miranda et al. 2019).

ZO-1 y ZO-2 son indispensables para la polimerización de las claudinas ya que cuando se silencia a ambas proteínas no se forman las UEs y cuando se re-expresa a cualquiera de las dos, vuelven a formarse los filamentos de la UE (Umeda et al. 2006). Aunque ZO-1 y ZO-2 actúan de forma redundante en la polimerización de las claudinas, hay algunos tejidos donde la ausencia de ZO-2 es suficiente para impedir la formación de las UEs. Por ejemplo, en los ratones macho quimera de ZO-2 no se sella la barrera hematotesticular y por lo tanto los animales son infértiles (Xu et al. 2009). En el hígado, ZO-2 también es indispensable para el sellado de la barrera hematobiliar. Así en humanos, las mutaciones del gen TJP2 que evitan la expresión de ZO-2, inducen colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 4 que se caracteriza por la ausencia de claudina-1 y la consecuente fuga de bilis al plasma, lo que produce cirrosis no alcohólica y hepatocarcinoma en infantes (Sambrotta y Thompson, 2015). En las células con hipertrofia, ZO-2 se silencia (Dominguez-Calderon et al. 2016), y en el hígado de las ratas obesas con esteatosis, el silenciamiento ZO-2, pero no de ZO-1, es suficiente para que las sales biliares se fuguen al plasma (González-González et al. 2022).

En las células MDCK, la falta de ZO-2 no permite el desarrollo del pico máximo inicial de RET que se observa en las células parentales. Esto se debe específicamente a la

ausencia de ZO-2, porque cuando a las monocapas de células ZO-2 KD se les transfecta ZO-2, vuelven a presentar el pico máximo de resistencia inicial (Raya-Sandino et al. 2017). Sin embargo, aún desconocemos como se regula o de que otras proteínas depende el desarrollo del pico inicial máximo de RET.

Respecto a la permeabilidad por la ruta paracelular, se sabe que al silenciar a ZO-2 se incrementa la permeabilidad del dextran de 70 kDa, en comparación con las células control (Hernández et al. 2007).



**Figura 11. Estructura de ZO-2 y las proteínas con las que interacciona.** Representación esquemática de ZO-2 y sus dominios. Mediante un código de color se especifica la clasificación de las proteínas que se unen a ZO-2. Las líneas negras debajo del esquema de ZO-2 muestran la región con la que interaccionan las diversas proteínas [Modificado de (González-Mariscal et al. 2016)].

## 8. El citoesqueleto de actomiosina en las células epiteliales

El citoesqueleto de actomiosina está compuesto por actina y miosina. La actina es una proteína monomérica que se polimeriza espontáneamente en filamentos con una conformación de hélice (F-actina o actina filamentosa). En los mamíferos existen seis

isoformas de actina codificadas por diferentes genes y la mayoría de ellas se expresan en el tejido muscular [para revisión, ver (Lodish 2016; Ivanov et al. 2022)].

La polimerización de la actina depende de la concentración de los monómeros de actina (G-actina), requiere de  $Mg^{2+}$  y se realiza en tres fases. La primera es la de nucleación, la sigue la fase de elongación, hasta que se alcanza el estado estacionario. La actina es una molécula que presenta dos diferentes y opuestas regiones de polimerización, una de ellas está marcada por una hendidura que permite el ingreso del ATP y el  $Mg^{2+}$  y tiene una cinética de incorporación de actina mayor (polo positivo) que la región opuesta (polo negativo). Esto hace que el filamento se polimerice más rápidamente hacia el lado positivo, que hacia el negativo, en un proceso dependiente de ATP. Así, la G-actina unida al ATP se asocia al extremo positivo y el ATP se hidroliza generando ADP y P. El P se libera del filamento, generando un gradiente con subunidades de ATP-actina en el extremo positivo del filamento, una región con ADP-P-actina en la parte media y subunidades de ADP-actina en el extremo negativo del filamento, generando un filamento polarizado (Fig. 12A) [para revisiones, ver (Lodish 2016; Ivanov et al. 2022)].

En el ensamble de nuevos filamentos de actina, el inicio de la polimerización, la elongación de los filamentos y la formación de redes o manojos de actina participan más de 100 diferentes proteínas [para revisión, ver (Pollard, 2009)].

En las células epiteliales existen dos isoformas de actina que son casi idénticas pues sólo difieren en su secuencia por cuatro aminoácidos. A pesar de ello, estas isoformas de actina se localizan en distintos lugares de la célula y tienen funciones no redundantes. La segregación espacial de las isoformas de actina se puede explicar por diferencias en sus cinéticas de polimerización, modificaciones post transduccionales como la arginilación, la interacción con diferentes proteínas de unión a actina y por la región en la célula en la cual se transcriben [para revisión, ver (Ivanov et al. 2022)].

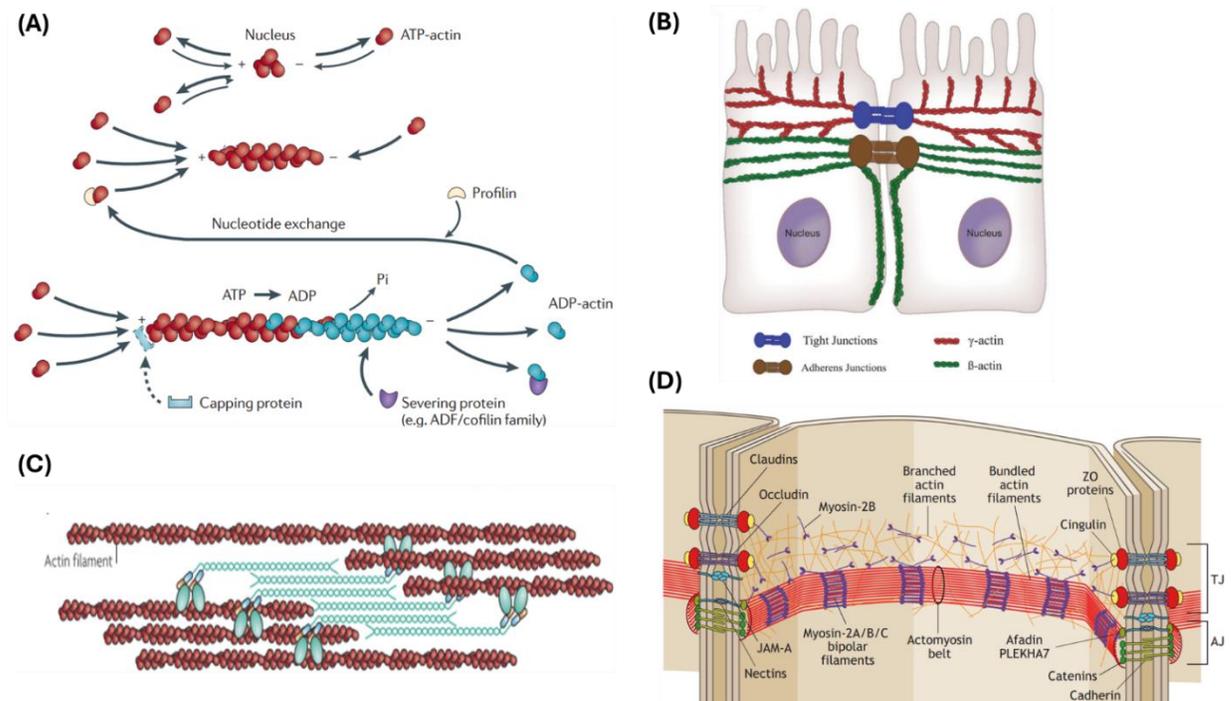
En las células epiteliales polarizadas  $\beta$ - y  $\gamma$ -actina se localizan respectivamente en la UA y la UE, y mantienen la integridad de estas estructuras. Sin embargo, para ensamblar la UE, después de a un cambio a calcio, se requiere de ambas isoformas de actina (Fig. 12B) [para revisión, ver (Ivanov et al. 2022)].

La miosina, es una proteína motora que “camina” sobre los filamentos de actina produciendo tensión, a través de un mecanismo dependiente de ATP. La mayoría de las miosinas, incluyendo la miosina no muscular II (NMII), pertenecen a la clase II. Las miosinas de esta clase se caracterizan porque tienen dos cadenas pesadas y cuatro ligeras y de estas últimas, dos son regulatorias y las otras dos, esenciales. Las miosinas poseen también un dominio globular de “cabeza”, donde se localizan los sitios de unión al ATP y a la actina. En el “cuello” de la miosina se encuentran las cadenas ligeras esenciales y regulatorias, mientras que el “cuerpo” se integra por las cadenas pesadas que forman un dominio de bobina enrollada que termina en una “cola” no enrollada. La actividad de ATPasa de la cabeza promueve un cambio conformacional en la molécula que permite su movimiento antiparalelo sobre los filamentos de actina. A los filamentos bipolares de miosina que interactúan con los filamentos de actina para producir tensión o generar movimiento se les conoce como filamentos de actomiosina (Fig. 12C) [para revisión, ver (Vicente-Manzanares et al. 2009)].

En los mamíferos existen 3 isoformas de miosina no muscular denominadas NMII A, B y C codificadas respectivamente por los genes MYH9, MYH10 y MYH14. La NMIIA hidroliza el ATP más rápidamente y por lo tanto es la más dinámica. Su función es remodelar al citoesqueleto y regular la adhesión. La NMII B es más estable y regula la polarización frontal y trasera durante la migración celular (Aguilar-Cuenca et al. 2020). Además, mantiene la tensión de la membrana apical (Wayt et al. 2021). La NMII C se localiza en las uniones tricelulares (Ebrahim et al. 2013) [para revisión, ver (Vicente-Manzanares et al. 2009)].

En las NMII, la fosforilación de la cadena ligera regulatoria en la S19 induce un cambio conformacional que permite a la miosina generar tensión. Las cinasas que fosforilan y activan a la NMII son MLCK, ROCK, ZIPK/DAPK3 y MRCK. ROCK también inhibe a la fosfatasa de la NMII y por lo tanto, aumenta la activación de la miosina. La NMII se inhibe por fosforilación por las cinasas PKC, CK II y TRPM7 que actúan en la cadena ligera regulatoria, en el dominio de bobina enrollado y en la cola de la NMII [para revisión, ver (Vicente-Manzanares et al. 2009; Sellers y Heissler, 2019)].

En las células epiteliales, la actomiosina se localiza en la base, rodeando al núcleo, y en la región apical. En esta última, la actomiosina forma un cinturón llamado anillo cortical de actomiosina que interacciona con la UE y la UA [para revisión, ver (Vicente-Manzanares et al. 2009)]. El anillo cortical de actomiosina está constituido por haces paralelos de filamentos de actina asociados de manera regular con filamentos bipolares de NMII en un arreglo que asemeja a un mini-sarcómero. Este arreglo de actomiosina se asocia a la UA a través de la  $\beta$ - y  $\alpha$ - catenina (Fig.12D). La NMIIA es la isoforma más abundante del anillo cortical de actomiosina (Naydenov et al. 2016), aunque las isoformas NMIIIB y C también pueden estar presentes, dependiendo del tejido en cuestión [para revisión, ver (Ivanov et al. 2022)]. Por arriba del anillo cortical de actomiosina se localiza una red de filamentos de actina ramificada que se une a la NMIIIB. Esta última a través de la cingulina se conecta a ZO-1 en la UE (Fig. 12D) (Rouaud et al. 2023). Sin embargo, esta observación es controversial porque otros estudios indican que la NMIIIB se ubica únicamente en los filamentos de actina asociados a la E-cadherina [para revisión, ver (Ivanov et al. 2022)].



**Figura 12. Actina y miosina en las células epiteliales.** **(A)** Polimerización de actina. Este proceso se inicia con la nucleación de los monómeros de actina unidos a ATP. Una vez que se forma un núcleo de actinas, los monómeros se unen rápidamente elongando al filamento, donde el lado positivo (+) crece más rápido que el negativo (-). Finalmente, en el estado estacionario, la hidrólisis de ATP origina en el filamento, una región de actina unida a ATP y otra unida a ADP, y al final del filamento se liberan las unidades de actina unida a ADP y fosfato (Pi) (Nürnberg et al. 2011). **(B)** Esquema de las isoformas de actina en las células epiteliales. La  $\gamma$ -actina se localiza en la región apical asociada a la UE y la  $\beta$ -actina que se ubica en la membrana lateral y en el anillo cortical de actomiosina asociada a la UA (Ivanov et al. 2022) **(C)** La miosina (azul) es una proteína motora con una cabeza globular, un cuerpo de bobina enrollada y una cola no enrollada que se posiciona de manera antiparalela sobre los filamentos de actina (rojo) para producir la contracción, similar a como sucede con los sarcómeros del músculo esquelético. (Vicente-Manzanares et al. 2009) **(D)** Organización del citoesqueleto de actina. En las células epiteliales, el citoesqueleto de actomiosina que se localiza en la región apical se asocia al complejo de unión apical compuesto por la UE y la UA. En la UE hay una red de filamentos de actina ramificada donde se localiza la NMIIIB, esta estructura se asocia a la UE a través de la cingulina que se une a ZO-1. La UA se une al anillo cortical de actomiosina, formado por un manojo de filamentos paralelos de actina donde la NMII A B y C se acomodan en segmentos regulares semejando a un sarcómero, esta estructura se asocia a las UA a través de las cateninas (Citi et al. 2024).

### **8.1 ZO-2 y su efecto sobre las proteínas Rho, Rac y Cdc42**

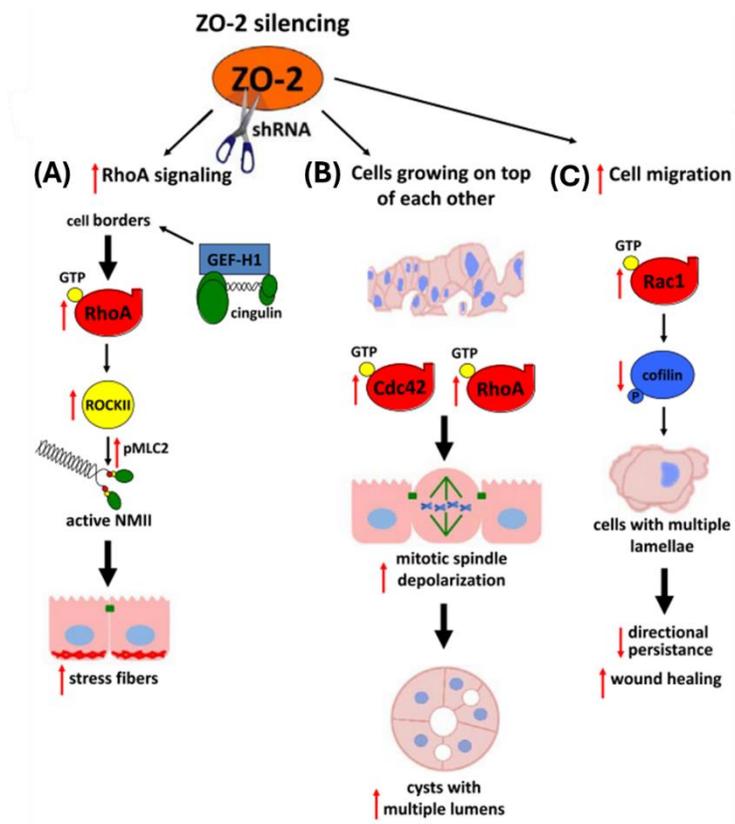
La superfamilia Ras tiene al menos 150 miembros que se clasifican en cinco familias: Ras, Rab, Ran, Arf y Rho. El citoesqueleto de actomiosina se regula por la familia de proteínas Rho, homólogas a Ras, que tiene 25 miembros de los cuales RhoA, Rac1 y Cdc42 son los más destacados y estudiados. Estas pequeñas proteínas G se caracterizan porque intercambian el GDP por GTP y porque se activan cuando están unidas al GTP y se inactivan cuando tienen GDP [para revisión, ver (Quiros et al. 2014) y (Citi et al. 2014)].

En ausencia de ZO-2, aumenta la cantidad de RhoA activa y de ROCKII, lo que lleva a un aumento en la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y a la formación de fibras de estrés. Sin embargo, cuando se activa a RhoA con ácido lisofosfatídico (LPA) las células ZO-2 KD no responden a esta activación, a diferencia de las células parentales. Esto sugiere que en ausencia de ZO-2, las células tienen a RhoA activado al máximo, tal vez para mantener selladas las UEs, y por ello pierden la capacidad de respuesta a la estimulación con LPA (Fig. 13A) (Raya-Sandino et al. 2017).

La falta de ZO-2 aumenta el nivel de Cdc42 activo y esto junto con el incremento de RhoA activo despolariza al uso mitótico promoviendo que las células crezcan unas encima

de otras y en cultivos en tres dimensiones induce la formación de quistes con múltiples lúmenes (Fig. 13B) (Raya-Sandino et al. 2017).

En ausencia de ZO-2, también aumenta el contenido de Rac1. Rac promueve la formación de lamelas y favorece la migración celular. Esto explica porque en las células ZO-2 KD se forman varias lamelas por célula y aumenta la migración. Aunque cabe resaltar que el movimiento que se induce es no direccionado. Además, la falta de ZO-2 disminuye la fosforilación de la cofilina, una proteína crucial para la formación de las lamelas que se activa al desfosforilarse (Fig. 13C) (Raya-Sandino et al. 2017).



**Figura 13. Efecto de ZO-2 sobre las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42.** (A) La ausencia de ZO-2 incrementa la actividad de RhoA activa lo que a su vez activa a la cinasa ROCKII que fosforila a la cadena ligera de la miosina (pMLC2) induciendo la formación de fibras de estrés en la región basal. (B) Al silenciar a ZO-2, aumenta la actividad de Cdc42 lo que produce la despolarización del uso mitótico y hace que las células crezcan unas encima de otras, y en cultivos en tres dimensiones se forman quistes con múltiples lúmenes. (C) Con la falta de ZO-2 aumenta la cantidad de Rac1 lo que disminuye la fosforilación de la cofilina y esto provoca la formación de múltiples lamelas por célula lo que resulta en una mayor migración, pero en una disminución de la direccionalidad del movimiento. Modificado de (Raya-Sandino et al. 2017).

## **8.2 GAP y GEFs que se relacionan con las UEs**

Las proteínas Rho se regulan positiva y negativamente por los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) y proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs), respectivamente. Las proteínas GEF facilitan el intercambio de GDP por GTP. En cambio, las proteínas GAP favorecen la ruptura del enlace fosfodiéster del GTP [para revisión, ver (Citi et al. 2014)] En la tabla 1 se resume la información de las proteínas del complejo de unión apical que regulan al citoesqueleto de actina a través de distintas GEFs y GAPs.

**Tabla.1** GEFs y GAPs que modulan la UE

	Proteína	Proteínas con las que interactúa	Efecto de la interacción	Tipo celular	Referencia
GEFs	GEF-H1	ZONAB	↑ ZONAB nuclear → ↑ transcripción CD1.	MDCK	(Nie et al. 2009)
		ZO-2	↓ asociación de GEF-H1 con cingulina en el borde celular → ↑ pGEF-H1 → ↓ fibras de estrés.	MDCK	(Raya-Sandino et al. 2017)
		cingulina	↓ GEF-H1 → ↓ RhoA .	MDCK	(Aijaz et al. 2005)
		paracingulina	↓ GEF-H1 en el borde celular → ↓ RhoA y claudina-2.	MDCK	(Guillemot et al. 2008)
	p114RhoGEF	cingulina	↑ RhoA en el borde celular ↑ formación UE.	Caco-2	(Terry et al. 2011)
		JAM-A	JAM-A → p114RhoGEF → ↓ RhoA.	MDCK	(Haas et al. 2020)
	p115RhoGEF	RhoA	LPS → ↑ p115RhoGEF → ↑ RhoA → ↓ RET ↓ ZO-1, claudina-5 y ocludina.	bEnd.3	(Xiaolu et al. 2011)
	Tiam1	paracingulina	paracingulina → ↑ Tiam1 al borde celular → ↑ Rac1 → ↑ RET.	MDCK	(Guillemot et al. 2008)
	PDZ-GEF1	JAM-A ZO-2	↑ Rap2c y → RhoA.	Células epiteliales intestinales de ratón	(Monteiro et al. 2013)
	RhoGEF11	ZO-1	↑ pMLC → ↑ anillo cortical de actina → ↑ RET.	EpH4	(Itoh et al. 2012)
	Tuba	ZO-1	↑ Cdc42 y N-WASP → mantiene forma celular.	Caco-2	(Otani et al. 2006)
	SGEF	scribble Dlg1	borde celular sinuoso → ↓ contracción anillo cortical actomiosina.	MDCK	(Awadia et al. 2019)
ECT2	Par6 Par3 aPKC	↑ Cdc42 → formación lumen en quiste.	MDCK	(Liu et al. 2006) y (Liu et al. 2004)	
GAPs	MgcRacGAP	cingulina paracingulina	En el borde celular → ↓ Rac1 → formación UE.	MDCK	(Guillemot et al. 2014)
	SH3BP1	paracingulina CD2AP CapZ	En el borde celular → Cdc42 → formación UE.	Caco-2	(Elbediwy et al. 2012)

↑, incrementa; ↓, disminuye; →, induce; →, induce.

### **8.3 Efecto del silenciamiento o noqueo de las proteínas ZO sobre: El perfil del borde celular y la distribución de la miosina**

Las células MDCK que no expresan a ZO-1 y a ZO-2 exhiben un anillo cortical de actina muy organizado a nivel de la UA con un patrón de punteado muy marcado de la NMII. La elevada contracción del anillo cortical de actomiosina observada en estas células, desencadena la expansión del dominio apical. Este proceso involucra el reclutamiento de ROCK al borde celular por Shroom3 y permite la acumulación de afadina, que ayuda a mantener la integridad del tejido ante la elevada tensión mecánica (Choi et al. 2016) [para revisión, ver (Hardin, 2016)].

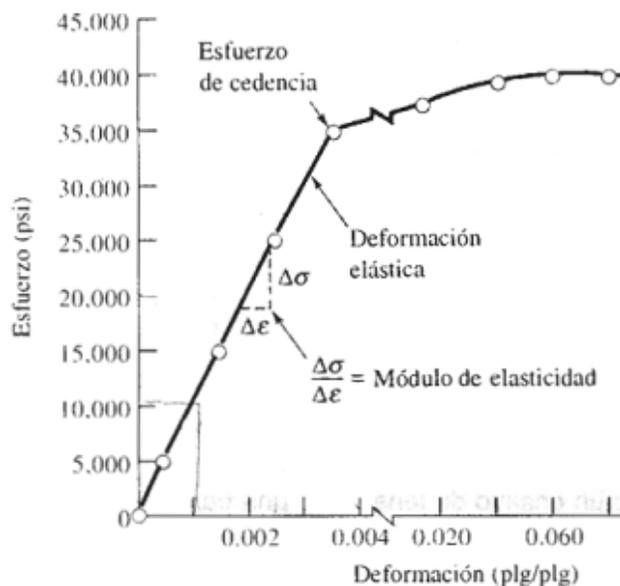
El patrón del borde celular también se afecta cuando ZO-1 (Van Itallie et al. 2009), (Tokuda et al. 2014) o ambas ZO-1 y ZO-2 (Fanning et al. 2012) se silencian o se noquean, de tal manera que disminuye la sinuosidad del borde celular y ahora los límites aparecen lineales, lo que le da a la célula una forma poligonal. En cambio, en las células que sobreexpresan a ZO-1 se incrementa la apariencia de zigzag en el borde celular (Tokuda et al. 2014). El incremento en la linearidad del borde celular también se alcanza en las células control y en las ZO-1 KO cuando se inhibe a la NMII con blebbistatina, pero esto no se observa cuando sólo se silencia o se noquea a ZO-2 (Fanning et al. 2012), (Tokuda et al. 2014). Esto sugiere que, aunque ZO-1 y ZO-2 se asocian a la actina, su impacto como proteínas mecanosensoras de la UE es diferente, lo que nos llevó en esta tesis a estudiar el rol de ZO-2 en la regulación de la tensión.

## **9. Mecanotensión**

La mecanobiología estudia cómo las células perciben y responden a los cambios mecánicos de su microambiente [para revisión, ver (Ladoux y Mège, 2017; Martino, 2023)]. Las proteínas que traducen los estímulos mecánicos se llaman mecanosensoras. El estímulo lo perciben las proteínas transmembranales como, por ejemplo, las integrinas, y pasan la información a proteínas citoplasmáticas que regulan al citoesqueleto. Estas últimas pueden ser proteínas adaptadoras presentes en la UE, la UA y las adhesiones focales (Martino, 2023).

Los estímulos mecánicos incluyen a fuerzas como la compresión, la rigidez, la elasticidad, la gravedad, la presión hidrostática y el estrés cizallante (shear stress en inglés) [para revisión, ver (Ladoux y Mège 2017; Martino, 2023)]. La rigidez se define como la resistencia de un material al ser sometido a una fuerza. En la curva de esfuerzo/deformación, en el eje de las “y” se grafica el esfuerzo ( $\sigma$ ), que es igual a la fuerza sobre el área y se describe en pascales (Pa = N/m<sup>2</sup>), y en el eje de las “x” se grafica la deformación del material ( $\epsilon$ ), que equivale al cambio de la longitud respecto a la longitud original. Este valor es adimensional (m/m), por eso al final la rigidez es igual a Pa porque sólo se consideran las unidades de esfuerzo (Fig. 14) (Askeland, 1998).

La pendiente de la curva esfuerzo-deformación constituye una medida de la rigidez de un material y se define como  $E = \sigma / \epsilon$  donde E es la constante de elasticidad o rigidez, también llamado módulo de Young,  $\sigma$  es la fuerza aplicada y  $\epsilon$  es la deformación. Al aumentar la fuerza aplicada se incrementa la deformación del material, aunque éste puede después regresar a su forma original. Sin embargo, llega un punto en la curva donde la deformación es tan grande que el material ya no puede regresar más a su forma original. A este punto se le llama esfuerzo de cedencia. Posteriormente, se llega al punto denominado esfuerzo de ruptura, donde el material cede al esfuerzo y se rompe (Fig. 14) (Askeland, 1998).



**Figura 14. Curva de esfuerzo/deformación.** Al incrementar el esfuerzo se incrementa la deformación del material. Dependiendo de las propiedades de cada material, la curva tiene mayor o menor inclinación lo que quiere decir que, si un material es muy rígido se necesitará más fuerza para deformarlo y su pendiente será más inclinada. El módulo de elasticidad corresponde a la parte de la curva en la cual el material puede regresar a su estado original después de la aplicación de una fuerza. El esfuerzo de cedencia corresponde al punto a partir del cual el material se deforma y no regresa a su estado basal. Modificado de (Askeland, 1998).

### **9.1 La rigidez de la membrana apical**

La rigidez de la membrana apical regula procesos celulares como la endocitosis (Dai et al. 1997), la exocitosis y la división celular (Raucher and Sheetz 1999) y le permite a la célula hacer frente a retos como la compresión, el estrés osmótico (Pietuch et al. 2013) o el estrés por cizallamiento que por ejemplo ejerce el flujo sanguíneo sobre la pared vascular (Li et al. 2018).

Existen diversas técnicas biofísicas para medir la rigidez de las células en cultivo. Para medir la tensión de la membrana apical, antes se utilizaba la aspiración con una micropipeta o se hacía un ensayo de tracción por correa (*tether pulling assay*). Ahora se utilizan pinzas ópticas o la microscopía de fuerza atómica (AFM) [para revisión, ver (Pontes et al. 2017)]. Esta última permite medir la rigidez de la membrana apical al realizar en ella indentaciones con un cantilever (Bruckner et al. 2018).

### **9.2 La tensión a nivel de la UE**

Aunque la UE se encuentra muy cerca de la UA estas uniones se encuentran sometidas a diferentes estreses. Así, en las células MDCK se observó que en un mismo momento el borde de la UE marcado con cingulina es sinuoso, mientras que el de la UA marcado con  $\beta$ -catenina es lineal (Rouaud et al. 2023). Esto indica que la tensión en la UE es diferente a la presente en la UA.

Diversas condiciones alteran la función de barrera de la UE modulando la tensión del citoesqueleto de actomiosina [para revisión, ver (Citi, 2019)]. Por ejemplo, el anillo de actomiosina debe tener cierta rigidez para que se forme la UE, pero si la tensión sube demasiado, las UEs se abren y se rompe la barrera epitelial [para revisión, ver (Turner, 2000)]. Ahora bien, cuando se rompe un filamento de la UE y hay que reparar la función de

barrera, se producen llamaradas de RhoA en los sitios de quiebre del filamento en el borde celular, que contraen al anillo de actomiosina y permiten la formación de un nuevo filamento de UE (Stephenson et al. 2019). También, en condiciones de hipoxia la proteína ATG9A, que participa en la formación del autofagosoma y la reparación de la membrana plasmática, mantiene la integridad de la UE, promoviendo la contracción del anillo cortical de actomiosina (Dowdell et al. 2020).

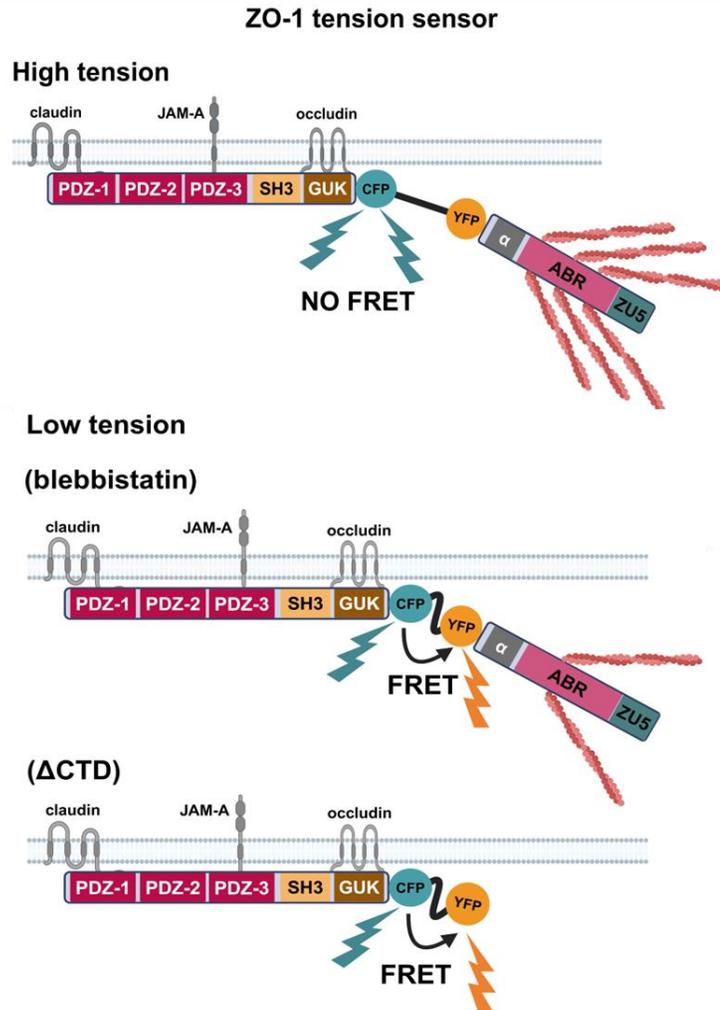
La regulación de la tensión a nivel de la UE se hace a través de las proteínas ZO ya que estas transmiten la fuerza desde las proteínas transmembranales hasta el anillo de actomiosina y viceversa [Pare revisión ver (Citi, 2019)].

Para medir la tensión a nivel de la UE se generó un biosensor de ZO-1. Para ello a ZO-1 humana se le insertó un módulo de FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster), después del dominio GuK y antes del dominio  $\alpha$ , que contiene a los fluoróforos CFP y a YFP unidos por una secuencia elástica derivada de los aminoácidos de la tela de araña. Cuando hay alta tensión del citoesqueleto de actomiosina tracciona a ZO-1 y esto hace que los fluoróforos se separen. Entonces al excitar a CFP, éste no alcanza a pasar su emisión a YFP y por lo tanto no hay FRET. En cambio, cuando disminuye la tensión del citoesqueleto de actina porque las células se trataron con blebbistatina o porque se utilizó una construcción de ZO-1 que carece del segmento carboxilo terminal de ZO-1, los fluoróforos permanecen juntos. Entonces, al excitar a CFP, éste puede pasar su emisión y excitar a YFP generando FRET. De esta manera, entre mayor tensión menor FRET y viceversa (Fig.15) (Haas et al. 2020).

Utilizando este sensor de tensión se demostró que al silenciar a JAM-A, sube la tensión a nivel de la UE. Esto se debe a que JAM-A inhibe a p114RhoGEF, y al no haber JAM-A, p114RhoGEF se acumula en el borde celular, activa a RhoA y a ROCK incrementando en consecuencia la contracción del anillo de actomiosina. Esto además se acompañó de un incremento en la cantidad de fibras de estrés basales (Haas et al. 2020).

El papel de ZO-2 como proteína mecanosensora de la UE se desconoce. Sin embargo, se cree que es importante porque al silenciar a ZO-2 aumentan las fibras de estrés (Raya-Sandino et al. 2017). Así mismo, cuando se silencia simultáneamente a ZO-1 y ZO-2 aumenta la tensión de la membrana apical y la reexpresión de ZO-1 no es suficiente para

revertir el incremento al nivel de las células control (Cartagena-Rivera et al. 2017). Por otro lado, la similitud entre la estructura de ZO-1 y ZO-2 sugiere que ZO-2 también puede oscilar entre la conformación estirada y plegada, y que este cambio depende de su homodimerización, la heterodimerización con ZO-1, y la tensión del citoesqueleto de actomiosina (Spadaro et al. 2017).



**Figura 15. Tensión mecánica en la UE.** Esquema del sensor de tensión de ZO-1. El panel superior representa la estructura de ZO-1, su unión con las proteínas de la UE y el módulo de FRET que se localiza después del dominio GuK y antes del dominio  $\alpha$ . Panel superior, no hay FRET cuando ZO-1 está sometida a la tensión del citoesqueleto. Panel medio, al disminuir la tensión del citoesqueleto con blebbistatina, hay FRET. Panel inferior, si se elimina el segmento carboxilo terminal de ZO-1 la proteína no se puede unir al citoesqueleto de actomiosina y por lo tanto los fluoróforos permanecen juntos y hay FRET máximo. Modificado de (Haas et al. 2020).

### 9.3 La tensión a nivel de la UA

La UA se localiza por debajo de la UE. Las proteínas transmembranales de la UA son las nectinas y la E-cadherina. La E-cadherina tiene cinco dominios extracelulares (EC) en tándem donde el EC1 es el más lejano de la membrana y el EC5 es el más próximo. Hay cuatro sitios de unión a calcio localizados entre cada uno de los repetidos extracelulares de E-cadherina, y esta unión a calcio es crucial pues estabiliza y lineariza a la molécula. La interacción en *cis* de E-cadherina se basa en la unión del dominio EC1 de una molécula con el dominio EC2 de la molécula adyacente en la misma membrana. En cambio, la interacción en *trans* depende de la unión de otra región en el dominio EC1 con la misma región en el dominio EC1 de una molécula de E-cadherina en la célula adyacente (Fig. 16A) [Par revisión ver (Lodish, 2016)].

Las nectinas son moléculas de adhesión celular y la familia está compuesta por 4 miembros: nectina -1, -2, -3 y -4. Poseen tres repetidos de tipo Ig en su región extracelular, atraviesan la membrana una sola vez y en la cola citoplasmática tienen sitios de unión a afadina y Par 3 (Fig. 9B). Las nectinas primero forman dímeros en *cis* y después interactúan en *trans* con su primer repetido de Ig. A diferencia de las cadherinas, la interacción entre las nectinas es independiente de calcio. Las nectinas, de forma similar a como lo hace JAM-A en la UE, marcan el sitio de unión donde se formará la UA. Las nectinas establecen adhesiones débiles, y es hasta que se recluta a la E-cadherina a la membrana que se forman UA fuertes [para revisión, ver (Takai et al. 2008)].

Las proteínas transmembranales de la UA se asocian al anillo cortical de actomiosina a través de proteínas plataforma. La afadina funciona como un puente que se une a la cola de las nectinas y a la F-actina. Además, la afadina recluta a varias proteínas que regulan al citoesqueleto, como Rap1. La E-cadherina, en su región citoplasmática tiene un sitio de unión a  $\beta$ -catenina y esta proteína se une a la  $\alpha$ -catenina que se asocia a la vinculina y el citoesqueleto de actomiosina (Fig. 9B) [Par revisión ver (Lodish 2016b)].

En la región de la UA existen dos acúmulos de actina, uno de F-actina que forma el anillo cortical y otro de G-actina que se encuentra adyacente al anillo cortical. La E-cadherina recluta a WAVE2 a la UA donde esta última activa al complejo Arp2/3 que nuclea a la G-actina que se incorporará a los filamentos del anillo cortical de actomiosina para

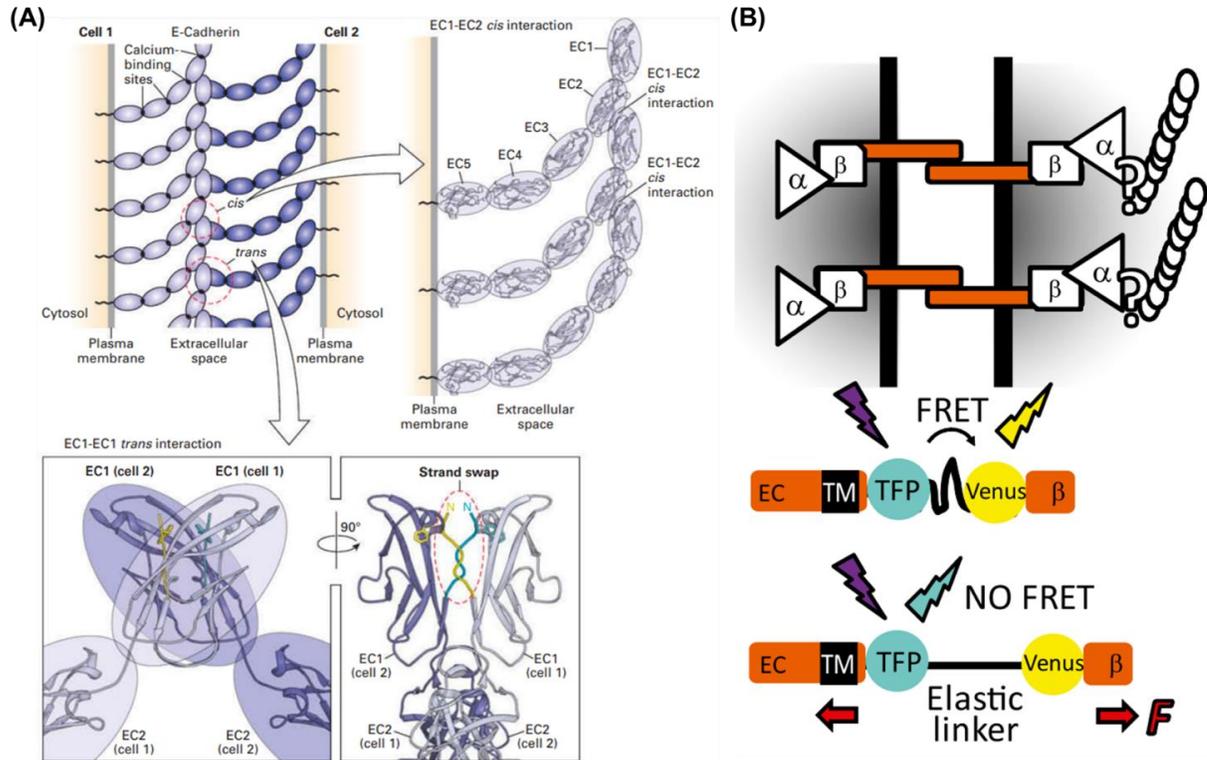
mantener la tensión (Verma et al. 2012). En este proceso SORBS2 colocaliza con la G-actina y recluta a N-WASP, vinculina y  $\alpha$ -actinina (Fredriksson-Lidman et al. 2017). Esta última se une a la E-cadherina y al hacerlo marca el sitio del ensamble de la actina. N-WASP por su parte, a través de una vía no canónica independiente de la nucleación de actina mediada por ARP2/3, estabiliza a los filamentos nacientes de actina y los incorpora al anillo existente en un mecanismo que involucra el reclutamiento de WIRE a la UA (Kovacs et al. 2011). Además, en esta región se concentran proteínas como VASP, mena, FBLIM1 y vinculina (Indra et al. 2020).

La contracción del citoesqueleto de actomiosina regula la tensión en la UA. Así, cuando esta sube, la E-cadherina se concentra en el borde celular (Liu et al. 2010), (Choi et al. 2016) y cuando la tensión disminuye, la E-cadherina se endocita de manera dependiente de p120 (Iyer et al. 2019).

Al igual que ZO-1, la E-cadherina es una proteína mecanosensora, y por ello se ha utilizado como biosensora de tensión en la UA. El biosensor de E-cadherina incorpora al módulo de FRET en la región citoplasmática de la molécula después de la región transmembranal y antes del sitio de unión a la  $\beta$ -catenina. El módulo de FRET consta de los fluoróforos TFP y YFP unidos mediante una liga elástica. A esta región le sigue el sitio de unión a  $\beta$ -catenina. A la  $\beta$ -catenina se le une la  $\alpha$ -catenina que se asocia directamente con la actomiosina. Cuando hay contracción, el citoesqueleto jala la cadena formada por la  $\alpha$ -catenina, la  $\beta$ -catenina y la E-cadherina, y entonces los fluoróforos se separan y no hay FRET. Cuando no hay tensión en el citoesqueleto, porque se inhibe la polimerización de actina con citocalasina D, o porque se elimina el segmento con el sitio de unión a la  $\beta$ -catenina, los fluoróforos permanecen juntos y hay FRET (Fig. 16B). Con este biosensor se demostró que la E-cadherina se encuentra bajo el esfuerzo del citoesqueleto de actomiosina (Borghi et al. 2012).

Con un biosensor similar, que utiliza a la VE-cadherina en lugar de la E-cadherina, se demostró que la tensión baja cuando se silencia a ZO-1 en las células endoteliales de la microvasculatura de la dermis humana, HDMEC (Tornavaca et al. 2015). Sin embargo, como las células endoteliales tienen una membrana lateral muy corta donde las UE y la

UA se encuentran mezcladas (Wallez y Huber, 2008), sólo se puede concluir que en ellas el silenciamiento de ZO-1 disminuye la tensión en la membrana lateral.



**Figura 16. Estructura y biosensor de la UA.** (A) Estructura molecular de la E-cadherina. Panel superior, la E-cadherina posee cinco dominios extracelulares (EC1-5). En presencia de calcio, la E-cadherina se elonga y se curva favoreciendo la interacción en *cis* entre el EC2 de una cadherina y el EC1 de la cadherina adyacente y así sucesivamente. Panel inferior, la interacción de la E-cadherina en *trans* se forma entre los dominios EC1 de las E-cadherinas de las células vecinas (Lodish, 2016). (B) Biosensor de E-cadherina. La E-cadherina tiene una región extracelular (EC) que establece la unión célula-célula, una región transmembranal (TM) y una porción citoplasmática que contiene al sitio de unión a la  $\beta$ -catenina ( $\beta$ ). La  $\beta$ -catenina se une a la  $\alpha$ -catenina que a su vez a través de la  $\alpha$ -catenina se une al anillo cortical de actomiosina. En el biosensor de FRET, los fluoróforos TFP y YFP se localizan después de la región transmembranal y antes del sitio de unión a la  $\beta$ -catenina. Los fluoróforos están unidos entre sí por una liga elástica que les permite acercarse cuando no hay tensión y alejarse cuando si la hay. Por lo tanto, con baja tensión del anillo cortical de actomiosina habrá más FRET mientras que con alta tensión habrá menos FRET (Borghetti et al. 2012).

## 9.4 La matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es un compartimento no celular que funciona como plataforma para la adhesión de las células. En las células epiteliales la MEC se compone de una membrana basal y una matriz extracelular intersticial. La membrana basal se localiza debajo de las células epiteliales y está compuesta por dos proteínas centrales, colágeno IV y lamininas, aunque también contiene glicoproteínas como el nidogen y proteoglicanos como el perlacan [para revisión, ver (LeBleu et al. 2007)]. La MEC intersticial constituye la mayor porción de la MEC en la mayoría de los tejidos y está compuesta por más de 300 proteínas siendo los componentes más abundantes los colágenos I, II, III y V, la elastina y la fibronectina (Fig.17A) [para revisión, ver (Barber et al. 2014)].

Las células reconocen a la MEC a través de las integrinas. Estas están formadas por heterodímeros con una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ . En los vertebrados, hay 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$  que pueden formar 24 heterodímeros diferentes (Fig.17B) [para revisión, ver (Barczyk et al. 2010)].

### 9.4.1. Colágeno

El colágeno tipo IV es una proteína que se forma por subunidades o cadenas  $\alpha$  que van de la 1 a la 6. El protómero es la unidad estructural básica del colágeno, y se forma cuando tres cadenas  $\alpha$  se unen entre sí. Cada subunidad  $\alpha$  posee tres dominios funcionales: el amino terminal rico en cisteínas, el central de triple hélice y el dominio carboxilo terminal globular no colagenoso [para revisión, ver (Barber et al. 2014)].

Las integrinas que se unen al colágeno reconocen la secuencia GFOGER presente en la triple hélice. La integrina  $\alpha 1\beta 1$  es la que se une con mayor afinidad al colágeno IV (Fig.17B) [para revisión, ver (Barczyk et al. 2010)].

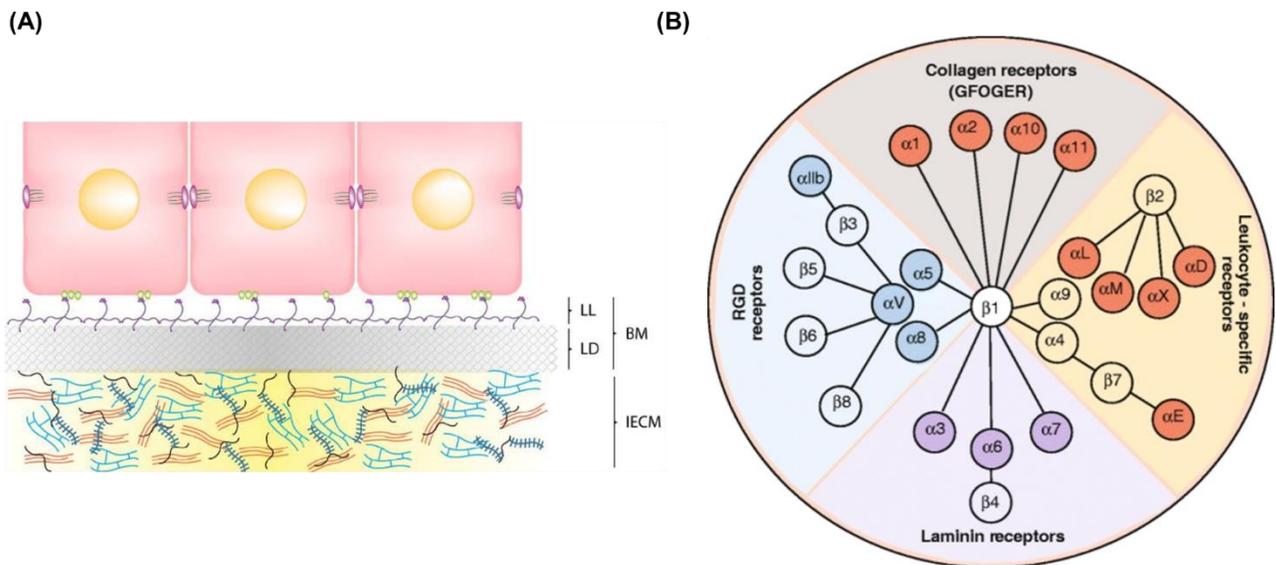
### 9.4.2. Lamininas

Las lamininas son glicoproteínas heterotriméricas con forma de cruz. Están formadas por cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  unidas a través de un dominio  $\alpha$ -hélice largo enrollado que forma el brazo largo de la cruz y en su extremo C-terminal tiene un dominio globular con

dominios LG. Los 3 brazos cortos del crucifijo se forman por los dominios N- terminales individuales de cada una de las cadenas. Las lamininas se secretan en forma de cadenas individuales y se ensamblan en la membrana basal [para revisión, ver (Barber et al. 2014) y (Eble et al. 2019)]. Varias integrinas incluyendo a las  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 4$  son receptores de las lamininas [para revisión, ver (Belkin y Stepp 2000)].

### 9.4.3. Fibronectina

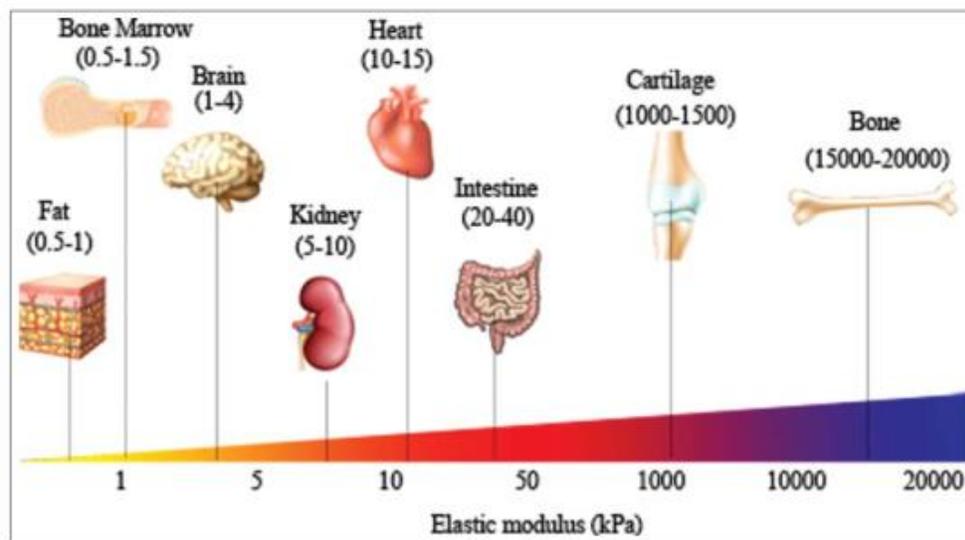
La fibronectina es una glicoproteína de alto peso molecular con múltiples dominios. Está formada por dos cadenas unidas por un puente disulfuro. Existen dos isoformas: una soluble, que se secreta por los hepatocitos y una insoluble, que secretan principalmente los fibroblastos. La integrina  $\alpha 5\beta 1$  es el receptor canónico que reconoce un sitio de unión en la fibronectina con la secuencia Arg-Gli-Asp (RGD) (Fig.17B). La unión de la integrina a la fibronectina activa a Rho y contrae a la actomiosina. Esto promueve el ensamble de subunidades de fibronectina en la matriz fibrilar y la formación de fibras de estrés en las células. La fibronectina se une al colágeno, a factores de crecimiento y a los proteoglicanos de la MEC [para revisión, ver (Barber et al. 2014), (Eble et al. 2019) y (Efthymiou et al. 2020)].



**Figura 17. Composición de la matriz extracelular e integrinas que la reconocen. (A)** En las células epiteliales, la matriz extracelular se compone de una membrana basal (BM) y una matriz extracelular intersticial (IECM) que se localiza por debajo. La membrana basal posee una lámina lúcida (LL) compuesta principalmente por laminina y una lámina densa (LD) que tiene colágeno tipo IV. La IECM se compone de fibronectina, elastina y colágeno fibrilar I, II, III y V. **(B)** Representación de la familia de las integrinas con 24 heterodímeros formados por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . En la parte izquierda se esquematizan las integrinas que reconocen a la secuencia RGD presente en la fibronectina. En la parte superior se encuentran los heterodímeros que reconocen a la secuencia GFOGER presente en el colágeno. De lado derecho, se esquematizan las integrinas específicas para leucocitos y en la parte inferior se muestran las integrinas que reconocen a la laminina. Modificado de (Barber et al. 2014) y (Barczyk et al. 2010).

### 9.5 La rigidez del sustrato

La rigidez del sustrato depende en parte de la MEC y en los vertebrados cada tejido y órgano tiene una rigidez específica. Por ejemplo, el hueso tiene una alta rigidez porque su función es la de proveer estructura al cuerpo y protegerlo, en cambio, los órganos como el intestino, el corazón, los riñones y el cerebro son menos rígidos (Fig. 18) [para revisión, ver (Handorf et al. 2015)].



**Figura 18. Rango de rigidez de los distintos órganos del cuerpo humano.** El color amarillo representa una baja tensión, y el color azul indica alta tensión (Handorf et al. 2015).

Las células son sensibles a la tensión del sustrato en el que se cultivan y en respuesta modifican su forma, estructuras de adhesión y comportamiento motriz. Si la

MEC es rígida, las células lo perciben y forman fibras de estrés incrementando el cociente de F-actina/G-actina [para revisión, ver (Handorf et al. 2015) y (Ohashi et al. 2017)].

Cuando las células epiteliales renales (Pelham et al. 1997), de ovario (McKenzie et al. 2018), páncreas (Rice et al. 2017), mama (Todorovski et al. 2020) y colon (Ali et al. 2014), así como las endoteliales, los fibroblastos, (Yeung et al. 2005) y las células derivadas de los gliomas (Ulrich et al. 2009), se siembran sobre sustratos suaves, no se extienden y mantienen una forma confinada (Pelham et al. 1997). En cambio, cuando las células epiteliales y de glioma se cultivan sobre sustratos rígidos, forman adhesiones focales ricas en fibras de estrés (Pelham et al. 1997) y con una alta expresión de vinculina (Ulrich et al. 2009) (Paszek et al. 2005) (Wozniak et al. 2003), paxilina, (McKenzie et al. 2018), PKA (McKenzie et al. 2020) y la cinasa de las adhesiones focales, FAK (Wozniak et al. 2003). Estos cambios dependen de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (Pelham et al. 1997) y de ROCK (Ulrich et al. 2009).

Sin embargo, existen excepciones a estas observaciones. Por ejemplo, los fibroblastos de riñón de mono tienen la misma forma y cantidad de fibras de estrés cuando se siembran sobre sustratos suaves (104 y 391 Pa) y rígidos ( $7 \times 10^7$  kPa) (Ali 2014). Así mismo, las células metastáticas de mama se vuelven insensibles a la rigidez del sustrato por que en ellas se activa la integrina  $\beta 1$ , se fosforila FAK y se sobreexpresa la integrina  $\alpha 3$  (Indra y Beningo, 2011).

Por otro lado, la rigidez del sustrato también impacta la proliferación celular. Así se ha visto que si las células epiteliales se siembran sobre sustratos con una rigidez superior a 5 kPa, las células que se localizan en el borde proliferan hasta alcanzar la confluencia, y si se tratan con EGF todas las células del cultivo proliferan (Kim et al. 2011). En cambio, si las células se siembran sobre sustratos suaves de 0.6 kPa se forman islotes donde las células se aglomeran y sólo proliferan aquellas que se localizan en el centro del agregado (Kaliman et al. 2014).

La rigidez de la MEC puede regular la tensión de la UE. Así, a medida que la rigidez de los hidrogeles sube de 1 kPa a 40 kPa o hasta 70 GPa en el caso de las células sembradas sobre cubreobjetos de vidrio, la tensión de la UE también aumenta (Haas et al. 2020).

Una característica distintiva del desarrollo tumoral y su agresividad es el aumento en la rigidez de la MEC. Esto ocurre por la deposición de varios componentes de la MEC incluyendo diferentes tipos de colágeno, proteoglicanos de heparán sulfato y fibronectina, [para revisión, ver (Handorf et al. 2015), (Bissell y Radisky, 2001), (Maman y Witz, 2018), (Eble y Niland, 2019) y (Zhang y Reinhart-King, 2020)]. también la rigidez provoca la migración celular en un fenómeno llamado durotaxis [para revisión, ver (Espina et al. 2022)].

## **9.6 La topografía del sustrato**

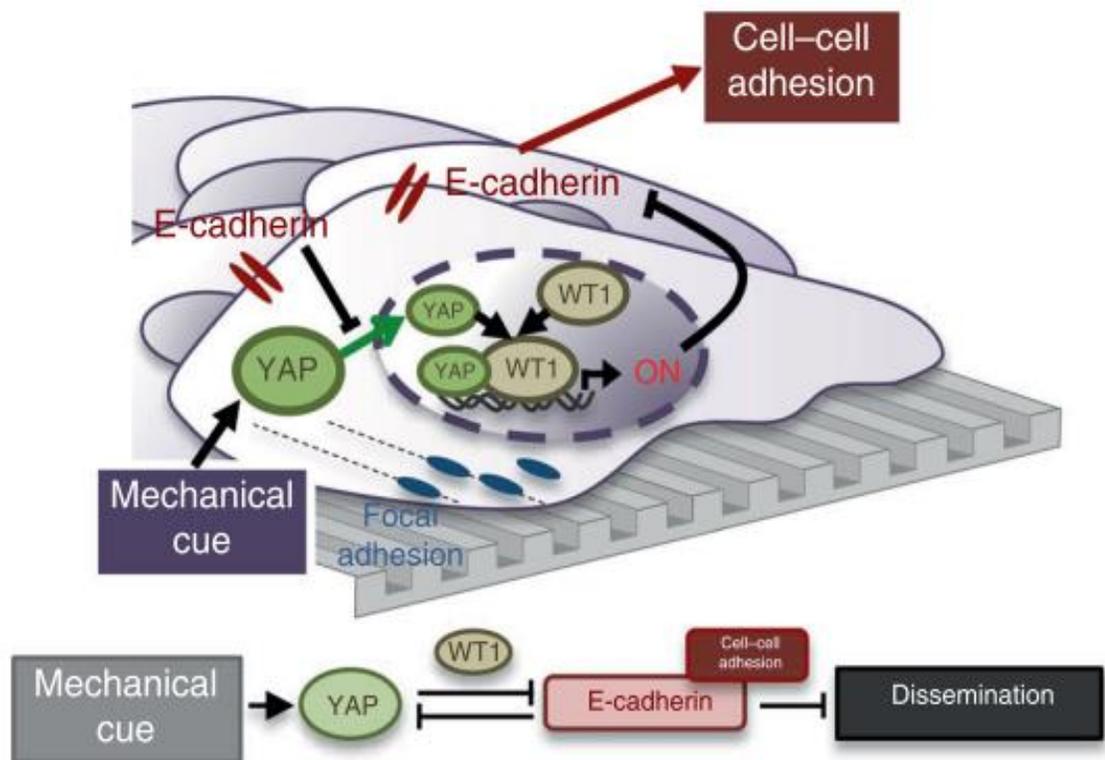
La topografía de la MEC también influencia la proliferación, la diferenciación [para revisión, ver (Janson y Putnam, 2015)], y la migración celular (Kollimada et al. 2016). La capacidad de las células de migrar sobre patrones marcados en el sustrato con fibras o surcos se llama migración guiada por contacto. La migración sobre estos patrones depende de las integrinas, la organización de las adhesiones focales y de las fibras de estrés que permiten la adhesión a lo largo del patrón (Wang et al. 2018) [para revisión, ver (Geiger et al. 2011)].

La topografía de la MEC es muy importante en el cáncer, ya que en los tumores, las fibras de colágeno se vuelven más gruesas y se alinean de forma perpendicular con respecto a los límites del tumor generando canales o pistas que favorecen la invasividad (Provenzano et al. 2006) [para revisión, ver (Handorf et al. 2015) y (Kai et al. 2019)]. Las células cancerosas que hacen metástasis aprovechan estas fibras para migrar por el espacio intersticial y una vez que una célula cancerosa encuentra estos canales, varias células más la siguen después (Provenzano et al. 2006) [para revisión, ver (Eble et al. 2019) (Kai et al. 2019)]. Además, a través de estas vías de colágeno estas mismas células traccionan a las fibras y jalan a las demás células (Ban et al. 2019). En los tumores de mama más agresivos el estroma es más rígido y presenta una mayor cantidad de colágeno fibroso linearizado, lo que correlaciona con una mayor agresividad y una pobre prognosis [para revisión, ver (Kai et al. 2019)].

En el proceso de transformación de epitelio a mesénquima (EMT), las células pierden sus características epiteliales y adquieren propiedades mesenquimales. Así, las

células dejan de ser poligonales y se vuelven alargadas, aumenta su motilidad e invasividad, y presentan resistencia a la apoptosis [para revisión, ver (Nieto et al. 2016)]. En este proceso se observa un gradiente decreciente de expresión de distintos marcadores epiteliales como E-cadherina, ZO-1, claudinas y citoqueratinas, acompañado de otro gradiente donde en cambio, van aumentando paulatinamente los marcadores mesenquimales como fibronectina, N-cadherina y vimentina y los factores de transcripción snail y slug así como el coactivador YAP. Estos factores nucleares promueven la transcripción de genes mesenquimales y apagan genes epiteliales [para revisión, ver (Nieto et al. 2016)].

Para explorar el efecto de la organización de la MEC sobre la EMT se emplean sustratos estructurados a nanoescala (NRA del inglés nanoridge arrays) de fibras alineadas, similares en tamaño y organización a las fibras de la MEC. Tanto las células MDCK, como las células de cáncer de riñón, al migrar sobre estos sustratos, experimentan una EMT. Así, en el borde de migración, las células expresan a la proteína de mesenquimal de los filamentos intermedios vimentina, y a los factores de transcripción snail, slug y twist. También, se activa YAP y la proteína tumoral de Wilms (WT1) lo que inhibe la transcripción de la E-cadherina (Fig. 19). Además, las células sembradas sobre los sustratos NRA migran más rápido porque YAP nuclear aumenta la expresión de la GEF TRIO y de la cinasa PAK (p21 activated kinase en inglés) lo que activa a Rac1. En esta ruta también participa merlín, el regulador negativo de YAP. Así, cuando las células se siembran sobre sustratos NRA, merlín se fosforila y se separa de AMOT en el borde celular, lo que induce la acumulación nuclear de YAP y en consecuencia incrementa la migración y diseminación celular (Park et al. 2019).



**Figura 19. Esquema de la transformación epitelio-mesénquima desencadenada por los sustratos NRA.** Las células MDCK que migran sobre los sustratos NRA, en el frente de migración se desencadena una transformación epitelio-mesénquima donde las células migran más rápido y se diseminan. Esto lo logran a través de la entrada de YAP al núcleo, el cual activa a WT1 que inhibe a la E-cadherina (Park et al. 2019).

## II) Planteamiento del problema

ZO-2 es una proteína de la UE que con su segmento C-terminal se une a la actina, y regula al citoesqueleto de actomiosina a través de las proteínas G pequeñas, Rho. ZO-1 y ZO-2 son proteínas similares de la familia MAGUK. ZO-1 es una proteína mecanosensora de la UE y el doble silenciamiento de ZO-1/ZO-2 induce cambios profundos en las propiedades mecánicas de las células. Ahora nos preguntamos si ZO-2 es también una proteína mecanosensora. Para ello exploramos si la ausencia de ZO-2 altera la rigidez de la membrana apical, de la UE bicelular y tricelular, y de la UA, y si modifica la respuesta celular ante cambios en la rigidez y topografía del sustrato.

### **III) Objetivo general**

Estudiar el rol de ZO-2 en la regulación de las propiedades mecánicas de la célula y en la respuesta celular a la rigidez y/o topografía del sustrato.

### **IV) Hipótesis**

Si ZO-2 es una proteína mecanosensora entonces en su ausencia se alterará la tensión en la unión estrecha y la rigidez de las membranas que a través del citoesqueleto interactúan con ZO-2.

### **V) Material y métodos**

#### **1. Cultivo celular**

Las células MDCK II parentales y ZO-2 KD generosamente donadas por Alan Fanning (Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, Carolina del Norte), se cultivaron como se describió previamente (Van Itallie C. M. 2009). Las células MDCK ZO-2 KD expresan de manera estable una mezcla de tres diferentes shRNA contra ZO-2 en el vector pSuper. En cambio, las células MDCK parentales sólo expresan al vector vacío. Se utilizó la clona estable IC5 de la línea celular MDCK ZO-2 KD que se obtuvo por su resistencia a zeocina (10  $\mu$ l/ml). La figura suplementaria 1 muestra por inmunofluorescencia y Western Blot, como las células ZO-2 KD no expresan a la proteína ZO-2.

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se cultivaron a confluencia ( $5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) o subconfluencia ( $4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) sobre cubreobjetos de vidrio, hidrogeles de poliacrilamida o sobre arreglos nanoestructurados de crestas (Circular NanoSurface coverglass Cat. No. ANFS-CS12, Curi Bio, Seattle, WA). Estos arreglos son cubreobjetos con un nanopatrón de surcos y crestas de tamaño submicrónico formado por una capa muy delgada de polímero.

## 2. Medición de la rigidez de la membrana apical por nanoindentación con un microscopio de fuerza atómica

Mediante nanoindentación en un microscopio de fuerza atómica (AFM) se midió la rigidez de la membrana apical de las células MDCK parentales y ZO-2 KD. El módulo de Young se determinó con un AFM (BioScope Catalyst AFM, Bruker, Billerica, USA) equipado con una cámara para fluidos y una platina de control térmico a 37°C, sobre la que se colocaron las monocapas sembradas a confluencia ( $2.3 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>) sobre portaobjetos de vidrio bañadas con PBS o PBS sin calcio (Fig. 20A). Antes de la indentación, las monocapas en la condición de bajo calcio (BC) se lavaron dos veces con PBS sin calcio y se incubaron por 20 minutos en PBS sin calcio con 2.4 mM de EDTA (Cat. 3002E, Research Organics, Cleveland, OH). En seguida, estas monocapas se incubaron con PBS sin calcio para la indentación. Antes de la indentación, otro grupo de células se incubó por 15 horas a 37°C con CDMEM con 100 µM de blebbistatina (Cat. 674289-55-5, TOCRIS Bioscience, Bristol, UK), o por 4 horas en CDMEM con 10 µM de docetaxel (Cat. 01885, Merck Millipore, Darmstadt, Germany). En seguida, estas monocapas se lavaron dos veces con PBS y se transfirieron a la cámara de fluidos del AFM donde se mantuvieron durante la indentación en PBS con 100 µM de blebbistatina o 10 µM de docetaxel.

La indentación se hizo con el cantilever DNP-10A (Bruker, Billerica, USA) con una punta de 20 nm de radio. La constante del resorte se calculó con el método de ajuste térmico (thermal tune method), que emplea el valor de la sensibilidad a la deflexión obtenido en una curva de fuerza al indentar a un portaobjeto de vidrio. La rigidez apical se midió con el modo Point and Shoot™ en un área de 5 X 5 µm a una velocidad de 6.7 µm/s y con una fuerza de 5 nN. El área de la superficie celular se seleccionó aleatoriamente, y en cada área se hicieron 100 mediciones en matrices cuadradas de indentación de 10 X 10.

El módulo de Young en kilopascales (kPa) se calculó con el software Nanoscope Analysis (Bruker 1.40). Primero, se hizo una corrección de la base de cada curva tomando solo las curvas con un valor de  $R^2 \geq 0.98$ . Después, cada curva se ajustó con el modelo de Sneddon para puntas cónicas. El módulo de Young se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$(1) F = \frac{2}{\pi} \frac{E}{(1-\nu^2)} \tan(\alpha) \delta^2$$

Donde, la fuerza ( $F$ ) en nN se obtuvo de cada curva de fuerza (Fig. 20B),  $E$  corresponde al módulo de Young en kPa,  $\nu$  al coeficiente de Poisson con un valor de 0.5 en las células,  $\alpha$  a  $18^\circ$  y equivale a la mitad del ángulo del indentador, y  $\delta$  es la distancia de indentación en nm.

En la gráfica de la figura 20C, cada punto representa un valor del módulo de Young obtenido de una curva de fuerza-indentación. El número total de curvas ajustadas al modelo de Sneddon empleadas para generar la figura se indica en la parte superior de la misma.

### **3. Modelado del complejo ZO-2/JAM-A**

Para analizar la interacción del dominio PDZ-2 de ZO-2 con la cola de JAM-A seguimos un proceso gradual que se basó en un estudio previo que mostró la unión de los últimos diez residuos (EFKQTSSFLV) de la cola de hJAM-A a los dominios SH3 y PDZ-3 de hZO-1 (PDB ID: 3TSZ) (Nomme et al. 2011). Para ello, primero se construyó el modelo del dominio PDZ-2 de hZO-2 con AlphaFold utilizando la secuencia de UniProt (Q9UDY2) (Jumper et al. 2021; 'UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023' 2023). Para representar la estructura del dominio PDZ-2 de ZO-2 se utilizó la secuencia, 306-IGVLLMKSRANEEYGLRLGSQ IFVKEMTRTGLATKDGNLHEGDIIKINGTVTENMSLTDARKLIEK SRGKLQLVVL RDSQ-386, de la proteína hZO-2 completa. En el dominio PDZ-2, AlphaFold predijo valores de confianza altos. Sólo los residuos S385 y Q386 fueron de baja confianza, con un puntaje de 67.5 y 60.0, respectivamente (Jumper et al. 2021). Después, se utilizó la estructura del cristal 3TSZ como templado para alinear en PyMOL a la estructura predicha del dominio PDZ-2 de ZO-2 con el dominio PDZ-3 de ZO-1 (DeLano, 2002). Finalmente, se eliminaron el dominio PDZ-3 de ZO-1 y los otros componentes de 3TSZ, dejando únicamente a los residuos EFKQTSSFLV de la cola de JAM-A y al dominio PDZ-2 de ZO-2 para su caracterización. En seguida, se utilizó al servidor CHARMM-GUI (Jo et al. 2008; Lee et al. 2016; Lee et al. 2020), y al complejo JAM-A/PDZ-2 de ZO-2 se le ubicó en una caja de 7 nm de longitud que se solvató en una solución de NaCl 0.15 M para equilibrarlo y minimizar la energía utilizando simulaciones dinámicas moleculares (MD) (Zorn-Kruppa et

al. 2018). La caja de simulación tenía 32, 129 moléculas de agua, 90 de Na<sup>+</sup> y 93 de Cl<sup>-</sup> para neutralizar las cargas del sistema y mantener una solución iónica de 0.15 M.

Las proteínas y los iones se modelaron utilizando los parámetros del campo de fuerza de Charmm36 (Huang et al. 2017), y el agua se modeló utilizando los parámetros TIP3P (Mark y Nilsson 2002). Este sistema se simuló en el paquete de simulación GROMACsv2019.4 (Abraham et al. 2015). Para la minimización de la energía se utilizó el algoritmo de descenso más pronunciado de 5000 pasos, seguido de un equilibrio isotérmico-isocórico (NVT) e isotérmico-isobárico (NPT), y de una etapa de producción de 70 ns con un paso de tiempo de 2 fs en un ensamble NPT. El equilibrio y las etapas de producción utilizaron el termostato de velocidad de reescala a 310.15 °K (Bussi et al. 2007) y una  $\tau_T$  de 1.0 ps. Para la producción, se utilizó un límite de Verlet de 1.2 nm, y un algoritmo de malla de partículas de Ewald (Darden et al. 1993; Essmann et al. 1995) con un límite de 1.2 nm. El termostato de la velocidad de reescala tuvo el mismo parámetro, y el baróstato de Parrinello-Rahman (Parrinello y Rahman, 1981) un acoplamiento de presión isotrópica a 1 bar, una compresibilidad a  $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$  y una  $\tau_P$  de 5.0 ps. Se colocaron restricciones de posición en todo el sistema durante el equilibrado y la minimización. En el corrido de la producción, las restricciones de posición se colocaron en el dominio PDZ para prevenir la pérdida de la estructura secundaria. No se impusieron restricciones a la cola de JAM-A.

### 3.1 Cálculos de la escala PARCH

En seguida, se realizaron los cálculos con la escala PARCH (Ji et al. 2023) del complejo JAM-A/PDZ-2 de ZO-2. Para ello, el complejo de las proteínas se extrajo y se colocó en una nueva caja de simulación, rodeada por una cubierta de agua con un grosor de  $d_{\text{shell}} = 0.415 \text{ nm}$ . La longitud de la caja cúbica se puso a 16.25 nm, derivada de la ecuación  $l = 2 \times (d_{\text{max}} + d_{\text{ion}} + d_b)$ , donde  $d_{\text{max}} = 3.125 \text{ nm}$  es el radio máximo de la proteína,  $d_{\text{ion}} = 3.0 \text{ nm}$  es la distancia entre los iones hidratados de la superficie de la proteína y  $d_b = 3.0 \text{ nm}$  es la distancia entre los iones hidratados y el borde periódico de la caja. El proceso de dinámica molecular se utilizó para incrementar la temperatura de 300 a 800° K con una tasa de recocido de 1 K/10 ps a un volumen constante. Las moléculas de agua que contactaron a los residuos se calcularon con un corte de 0.315 nm. Durante el proceso de

hibridación, se restringió la posición del complejo de proteínas y de los iones de contacto con una fuerza constante de  $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$  para asegurar que la conformación de las proteínas y los iones de contacto permaneciera constante. Los cálculos de PARCH se realizaron por triplicado, y el valor promedio de las tres corridas se utilizó para el reporte final. El proceso se repitió para el dominio PDZ-2 de ZO-2 sin la cola de JAM-A.

### **3.2 Análisis de contacto**

La conformación de la estructura final obtenida de la corrida de 70 ns se utilizó para el análisis de contacto entre el dominio PDZ-2 de ZO-2 y JAM-A. Para ello, se utilizó una distancia de corte de  $6.5 \text{ \AA}$  desde el centro de geometría (COG) de cada residuo del dominio PDZ-2 al COG de los residuos de la cola de JAM-A. El análisis de contacto se hizo utilizando un guion de Python 3.7.12 hecho en casa, el paquete de MD Analysis 2.1.0 (Gowers et al. ; Michaud-Agrawal et al. 2011), y una inspección cualitativa utilizando PyMOL 2.3.3 (DeLano 2002).

### **3.3 Dinámica molecular dirigida**

La energía de unión del decámero de la cola de JAM-A con el dominio PDZ-2 de ZO-2 se determinó utilizando dinámica molecular dirigida, con GROMACS versión 2022.2 (Abraham et al. 2015; Roux, 1995; Kumar et al. 1992). La dinámica molecular dirigida es una técnica estándar para analizar *in silico* la energía de unión entre moléculas que interaccionan. Este enfoque aplica una fuerza constante a grupos específicos de átomos mientras que restringe al resto del sistema. En este estudio, el esqueleto y las cadenas laterales del dominio PDZ-2 se restringieron con una fuerza constante de  $4 \text{ kJmol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ . Luego el decámero se jaló de manera perpendicular a su posición de reposo para sacarlo del dominio PDZ y sin inducir ninguna nueva interacción durante el jalado. Para este proceso se empleó una fuerza armónica constante de  $800 \text{ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$  y una tasa de jalado de  $1.25 \times 10^{-3} \text{ nm ps}^{-1}$ . Se seleccionaron ventanas espaciadas uniformemente de  $0.05 \text{ nm}$  para las simulaciones de muestreo. La energía de unión se calculó utilizando GROMACS (Abraham et al. 2015), con el método de análisis de histograma ponderado (Roux, 1995; Kumar et al. 1992) y el método Bayesiano de “bootstrap”.

## 4. Análisis y cuantificación de FRET

### 4.1 Construcciones

El sensor de tensión de la E-cadherina (E-cad TSMod) y los controles que le acompañan se describieron previamente (Borghini et al. 2012) y fueron donados generosamente por el Dr. Alexander R. Dunn de la Universidad de Stanford. Este sensor de tensión de E-cadherina contiene a TFP y YFP como fluoróforos separados por una liga elástica derivada de aminoácidos de la tela de araña. Este módulo sensor de tensión (TSMod) se insertó en el dominio citoplasmático de la E-cadherina entre el dominio transmembranal y el sitio de unión a la  $\beta$ -catenina. El sensor de tensión se une a la  $\beta$ -catenina, que a su vez se une a la  $\alpha$ -catenina que se asocia al citoesqueleto de actina y responde a la tensión del citoesqueleto estirando la liga elástica. Esto hace que los fluoróforos se separen entre sí disminuyendo la transferencia de energía o FRET (Transferencia de energía de resonancia de Förster) (Fig. 16B). El sensor E-cad TSMod $\Delta$ cyto es una construcción control en la cual se eliminó el sitio de unión a la  $\beta$ -catenina, por lo que los fluoróforos permanecen juntos y alcanzan el máximo FRET. La construcción E-cad TSMod $\Delta$ YFP sólo tiene como fluoróforo a TFP y la construcción E-cad TSMod $\Delta$ TFP sólo tiene a YFP. Estas dos construcciones se utilizaron para cuantificar el sangrado espectral (SBT, del inglés spectral bleed-through).

El sensor de tensión de ZO-1 (ZO-1 TS) y la construcción control correspondiente se describieron previamente (Haas et al. 2020) y fueron donados generosamente por la Dra. María S. Balda del University College de Londres. Para generar al sensor de ZO-1 se utilizó un módulo de FRET que contiene a los fluoróforos CFP y YFP separados por una liga elástica derivada de los aminoácidos de la tela de araña. El módulo de FRET se insertó entre el dominio N-terminal de ZO-1 que contiene los motivos de unión que interactúan con las proteínas de la unión estrecha y el dominio C-terminal (CTD) que incluye al sitio de unión a actina. ZO-1 exhibe dos conformaciones, una plegada y otra estirada. Esta última se adquiere por su asociación al citoesqueleto de actina. Así, al haber tensión en el citoesqueleto los fluoróforos se separan generando un bajo FRET. La construcción control

ZO-1 TS- $\Delta$ CTD contiene el módulo al FRET, pero no al dominio C-terminal de unión a actina y por lo tanto no responde a la tensión del citoesqueleto dando FRET máximo (Figura 15).

#### 4.2 Adquisición de la imagen

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD sembradas a subconfluencia sobre un cubreobjetos de vidrio se transfectaron con Lipofectamina 2000™ (Cat. 11668-019, Life Technologies, Eugene, OR) con los sensores de E-cadherina o ZO-1. Algunas monocapas 6 h después de la transfección se trataron durante 15 h con 100  $\mu$ M de blebbistatina (Cat. 674289-55-5, TOCRIS Bioscience, Bristol, UK). Una vez alcanzada la confluencia, las monocapas se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se montaron con Vectashield (Cat. No. H-1000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Las imágenes se adquirieron en el microscopio confocal Leica SP8 de la siguiente forma: Para el canal del donador (emisión del donador tras su excitación) TFP o CFP se excitaron con el láser de argón a una longitud de 462 nm, y la emisión se colectó entre 470 y 500 nm. Para el canal del aceptor (emisión del aceptor tras la excitación del aceptor) YFP se excitó con el láser de argón a una longitud de 514 nm, y la de emisión se colectó entre 530 y 600 nm. Finalmente, para el canal del FRET (emisión del aceptor al excitar al donador) TFP o CFP se excitaron con el láser de argón a una longitud de 462 nm, y la emisión se colectó entre 530 y 600 nm.

#### 4.3 Cuantificación del FRET

En todos los canales, a cada una de las imágenes se les restó el fondo de la misma forma. El coeficiente de sangrado espectral SBT se determinó utilizando las imágenes de las células transfectadas con E-cad TSMo $\Delta$ YFP o E-cad TSMo $\Delta$ TFP tomadas en los canales de FRET, donador y aceptor, y calculando la intensidad media de la fluorescencia en la membrana celular entre dos células adyacentes transfectadas. Estas zonas se seleccionan manualmente con la herramienta de *polygon selections* del programa imageJ versión 1.54f. El SBT del donador y del aceptor se calculó con las siguientes ecuaciones (Grashoff et al. 2010):

$$(2) \quad SBT_{donador} = \frac{IFRET}{I_{donador}}$$

$$(3) \quad SBT_{aceptor} = \frac{IFRET}{I_{aceptor}}$$

Donde IFRET es la intensidad media de fluorescencia del canal del FRET;  $I_{donador}$  es la intensidad media de fluorescencia del canal del donador; e  $I_{aceptor}$  es la intensidad media de fluorescencia del canal del aceptor.

Las imágenes de los sensores de tensión de E-cadherina y ZO-1 en seguida se utilizaron para calcular la intensidad media de fluorescencia. Para corregir el SBT en los datos experimentales se utilizó la siguiente ecuación (Grashoff et al. 2010):

$$(4) \quad cFRET = IFRET - SBT_{donador} (I_{donador})I_{donador} - SBT_{aceptor} (I_{aceptor})I_{aceptor}$$

Donde cFRET es el FRET corregido; IFRET es la intensidad media de la fluorescencia del canal del FRET;  $SBT_{donador}$  es el sangrado espectral del donador;  $SBT_{aceptor}$  es el sangrado espectral del aceptor;  $I_{donador}$  es la intensidad media de la fluorescencia del canal del donador; e  $I_{aceptor}$  es la intensidad media de la fluorescencia del canal del aceptor.

Finalmente, debido a las variaciones en la intensidad de fluorescencia, los valores de cFRET se normalizaron y se reportaron como índice de FRET con la siguiente ecuación (Grashoff et al. 2010):

$$(5) \quad FRET \text{ index} = \frac{cFRET}{I_{aceptor}}$$

Donde cFRET es el FRET corregido e  $I_{aceptor}$  es la intensidad media de la fluorescencia del canal del aceptor de los sensores de tensión de E-cadherina y ZO-1. Las imágenes de FRET representativas se obtuvieron utilizando la extensión *FRET and Colocalization Analyzer* del programa de ImageJ versión 1.54f (Hachet-Haas et al. 2006).

## 5. Western Blots

Los westerns blots se hicieron siguiendo procedimientos previamente reportados (Quiros 2013). Se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo contra p114RhoGEF (Cat. No.102223, dilución 1:1000, GeneTex, Irvine, CA), anti JAM-A (Cat. No. 361700, dilución 1:1000, Life Technologies, Carlsbad, CA), y anti afadina (Cat. No. A0224, dilución 1:2000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO,); o monoclonales de ratón contra vinculina (Cat. No. 13901, dilución 1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA),  $\beta$ -actina (Cat. MAS-15739, dilución 1:5000, Invitrogene, Waltham, MA), y  $\gamma$ -actina (Cat. Sc-65638, dilución 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). También se usaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa hechos en cabra contra la IgG de conejo (Cat. 62-6120, dilución 1:20,000, Invitrogen, Camarillo, CA); o contra la IgG de ratón (Cat. 62-6520, dilución 1:10,000, Invitrogen, Camarillo, CA) y el sistema de detección quimioluminiscente para western blot Immobilon™ (Merck Millipore, Cat. WBKLS 0500, Darmstadt, Germany).

Para obtener las fracciones solubles e insolubles en detergente, se empleó el protocolo previamente reportado (Watson et al. 2005) que se describe brevemente a continuación. Las monocapas de células MDCK parentales y ZO-2 KD se rasparon y levantaron con una solución amortiguadora con NaCl 120 mM, HEPES 25 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, NaF 25 mM, NaVO<sub>4</sub> 1 mM, Tritón X-100 al 1% (p/v) y el coctel inhibidor de proteasas Complete (Cat. 11697498001, Roche, Mannheim, Germany) al 5% (v/v). Los lisados se incubaron por 30 minutos en hielo y en seguida se centrifugaron a 13, 000 rpm por 30 minutos a 4°C. Después, se colectó el sobrenadante que corresponde a la fracción soluble en detergente. Al mismo tiempo, la pastilla que corresponde a la fracción insoluble en detergente se solubilizó por 3 segundos de sonificación en hielo en una solución amortiguadora con HEPES 25 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, NaF 25 mM, NaVO<sub>4</sub> 1 mM, el coctel inhibidor de proteasas Complete al 5% (v/v) y dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% (p/v). El contenido de proteína de las fracciones soluble e insoluble en detergente se determinó y las fracciones se almacenaron a -80°C hasta su uso.

## **6. Inmunofluorescencia**

Para obtener imágenes óptimas de inmunofluorescencia de las diferentes proteínas, se emplearon diversos protocolos de fijación, permeabilización y bloqueo, de acuerdo a los anticuerpos utilizados (Tabla 2). Después de la incubación con el anticuerpo secundario todas las monocapas se lavaron tres veces con PBS y se montaron con Vectashield/DAPI (Cat. No. H-1200, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Para la detección fluorescente de la F-actina, se utilizó faloidina rodaminada (Cat. No. R415, dilución 1:500, Invitrogen, Eugene, OR,), que se añadió a la monocapa por 2 h a temperatura ambiente al mismo tiempo que se hizo la incubación con el anticuerpo secundario contra vinculina.

También, se emplearon anticuerpos secundarios hechos en burro contra IgG de conejo acoplados a Alexa Fluor 488 (Cat. A-21206, dilución 1:1000, Life Technologies, Eugene, OR) o Alexa Fluor 594 (Cat. A-21207, dilución 1:1000, Life Technologies, Eugene, OR); o contra IgG de ratón acoplados a Alexa Fluor 488 (Cat. A-21202, dilución 1:1000, Invitrogene, Eugene, OR) o Alexa Fluor 594 (Cat. A-21203, dilución 1:1000, Life Technologies, Eugene, OR), y contra IgG de rata acoplado a Alexa Fluor 488 (Cat. A-21208, dilución 1:1000, Life Technologies, Eugene, OR).

**Tabla 2.** Protocolos de inmunofluorescencia para la detección de diferentes proteínas

Anticuerpo	Fijación	Permeabilización	Bloqueo	Solución de incubación anticuerpo primario (ON)	Solución de incubación anticuerpo secundario (ON)
<b>conejo <math>\alpha</math> NMIIB</b> (Cat. 909901, dilución 1:200, BioLegend, San Diego, CA).	PFA 1% (v/v), 12 min, RT ↓ metanol 100% (v/v), -20°C, 5 min	Tritón X-100 0.2% (v/v), 5 min, RT	BSA 2% (p/v), 30 min, RT	BSA 2% (p/v), 4 °C	BSA 1% (p/v), RT
<b>ratón <math>\alpha</math> <math>\beta</math>-actina</b> (Cat. MA5-15739, dilución 1:100, Invitrogen, Waltham, MA). <b>ratón <math>\alpha</math> <math>\gamma</math>-actina</b> (Cat.sc-65638, dilución 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). <b>rata <math>\alpha</math> ZO-1</b> (Cat. R26.4C, dilución 1:10, DSHB, University of Iowa, IA). <b>ratón <math>\alpha</math> vinculina*</b> (Cat. V4505, dilución 1:100, Sigma Aldrich, St Louis, MO).	PFA 4% (v/v), 10 min, RT ↓ metanol 100% (v/v), -20°C, 5* a 15 min		Solución de bloqueo ASE, 10 a 30* min, RT		
<b>conejo <math>\alpha</math> afadina</b> (Cat. A0224, dilución 1:400 Sigma Aldrich, St. Louis, MO). <b>conejo <math>\alpha</math> YAP</b> (dilución 1:1000, regalado generosamente por Marius Sudol, Mechanobiology Institute, National University of Singapore). <b>conejo <math>\alpha</math> snail*</b> (Cat. GTX125918, dilución 1:100, GeneTex, Irvine, CA). <b>conejo <math>\alpha</math> ZO-2</b> (Cat. 71-1400, dilución 1:100, Invitrogen, Waltham, MA).	PFA 4% (v/v), 10 min, RT	Tritón X-100 0.5% (v/v), 10 a 15* min, RT	BSA 1% (p/v), RT	BSA 1% (p/v), 4 °C	
<b>ratón <math>\alpha</math> claudina-4*</b> (Cat. 329400, dilución 1:200 Invitrogene, Camarillo, CA). <b>conejo <math>\alpha</math> p114RhoGEF</b> (Cat.102223, dilución 1:50, GeneTex, Irvine, CA). <b>conejo <math>\alpha</math> JAM-A*</b> (Cat. 361700, dilución 1:100, Life Technologies, Carlsbad, CA).	metanol 100% (v/v), -20°C, 10* a 20 min	Tritón X-100 0.2% (v/v), 10 min, RT	Solución de bloqueo ASE, 10 a 20* min, RT		

RT, temperatura ambiente; ON, toda la noche; solución de bloqueo ASE, (Antibody Signal Enhancer) [glicina 50 mM, Tritón X-100 0.1% (v/v), BSA 0.1% (v/v), Tween 20 0.05% (v/v), y suero de caballo 2% (v/v)]; BSA, albúmina sérica bovina libre de Ig (Cat. No. 1331A, Research Organics, Cleveland, OH).

## **7. Ensayo de ligación por proximidad**

El ensayo de ligación por proximidad (PLA) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (PLA Duolink, Cat. DUO92008, Sigma Aldrich, Uppsala, Sweden). Se utilizaron anticuerpos hechos en ratón contra  $\gamma$ -actina (Cat. sc-65638, dilution 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) y hechos en conejo contra ZO-1 (Cat. 61-7300, dilution 1:100, Invitrogen, Camarillo, CA). Para la detección del fondo, las células parentales se incubaron únicamente con el anticuerpo contra ZO-1.

## **8. Hidrogeles de poliacrilamida con diferente grado de rigidez**

Los hidrogeles de poliacrilamida se prepararon como se describió previamente (Serna-Márquez et al. 2020; Tse y Engler, 2010) con modificaciones menores. Primero, se hicieron dos mezclas de acrilamida/bis-acrilamida desgasificadas. Una, para sustratos suaves de 1 kPa con 3% de acrilamida (Cat No. A4058, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) y 1% de bis-acrilamida (Cat No. M1533, Sigma Aldrich, St. Louis, MO 63103, USA), y otra, para sustratos rígidos de 20 kPa con 8% de acrilamida y 0.264% de bis-acrilamida. Después, a cada mezcla se le agregaron 10% de persulfato de amonio y 1% de TEMED. Luego, rápidamente se colocaron 90  $\mu$ l de cada solución sobre un portaobjetos de vidrio previamente tratado con diclorometilsilano (Cat No. 440248, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) para generar una superficie no adherente. Las mezclas de acrilamida/bis-acrilamida se cubrieron inmediatamente con un cubreobjetos redondo de 20 mm de diámetro tratado previamente con 50  $\mu$ l de (3-Aminopropil) trietoxisilano (APTES) (Cat No. 440140, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) /glutaraldehído para generar una superficie adherente. La polimerización de la acrilamida/bis-acrilamida procedió durante un mínimo de 25 minutos a temperatura ambiente. En seguida, los hidrogeles se desprendieron cuidadosamente de la superficie no adherente y se pasaron a placas de cultivo donde se lavaron tres veces con agua destilada para retirar el exceso de acrilamida no polimerizada. Después, los hidrogeles se trataron con una solución de 0.5 mM sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)-hexanoato (sulfo-SANPAH) (Cat No. 803332, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en HEPES 50 mM pH 8.2 y 25% de DMSO. Para activar al sulfo-SANPAH, los hidrogeles se irradiaron con UV a 360 nm por 10 minutos. Luego, los hidrogeles se lavaron tres veces

con HEPES 50 mM pH 8.2. Los hidrogeles de poliacrilamida con el sulfo-SANPAH entrecruzado se incubaron toda la noche a 4°C con fibronectina humana (Cat. 356008, Corning, Bedford, MA) o colágeno IV de ratón (Cat. 354233, Corning, Bedford, MA) a una concentración de 20 µg/ml en HEPES 50 mM pH 8.2. Después, los hidrogeles se lavaron tres veces con HEPES 50 mM pH 8.2. La rigidez de los hidrogeles se midió en muestras representativas con un microindentador con una esfera de vidrio de 50 µm de diámetro montada en un sensor de fuerza como se describió previamente (Pérez-Calixto et al. 2021). El resto de los hidrogeles se esterilizó por irradiación UV durante 10 minutos en la campana de cultivo. Los hidrogeles se emplearon como sustrato para sembrar a las células MDCK parentales y ZO-2 KD.

### **9. Cuantificación del área y elongación celular**

Para la cuantificación del área y la elongación celular se utilizó el programa de ImageJ versión 1.54f. siguiendo los siguientes pasos: se tomó la opción de *Analyze*, luego *Set Measurements* y ahí se seleccionó la opción de área y *shape descriptors*. Después con la herramienta del polígono, se seleccionaron las células manualmente. Se siguió su contorno y en *Analyze* se pulsó la opción de *Measure* que dió los valores numéricos del área y la relación de aspecto. La elongación celular se calculó con la siguiente ecuación:

$$(6) \quad \text{relación de aspecto} = \frac{\text{Eje mayor}}{\text{Eje menor}}$$

## **VI) Resultados**

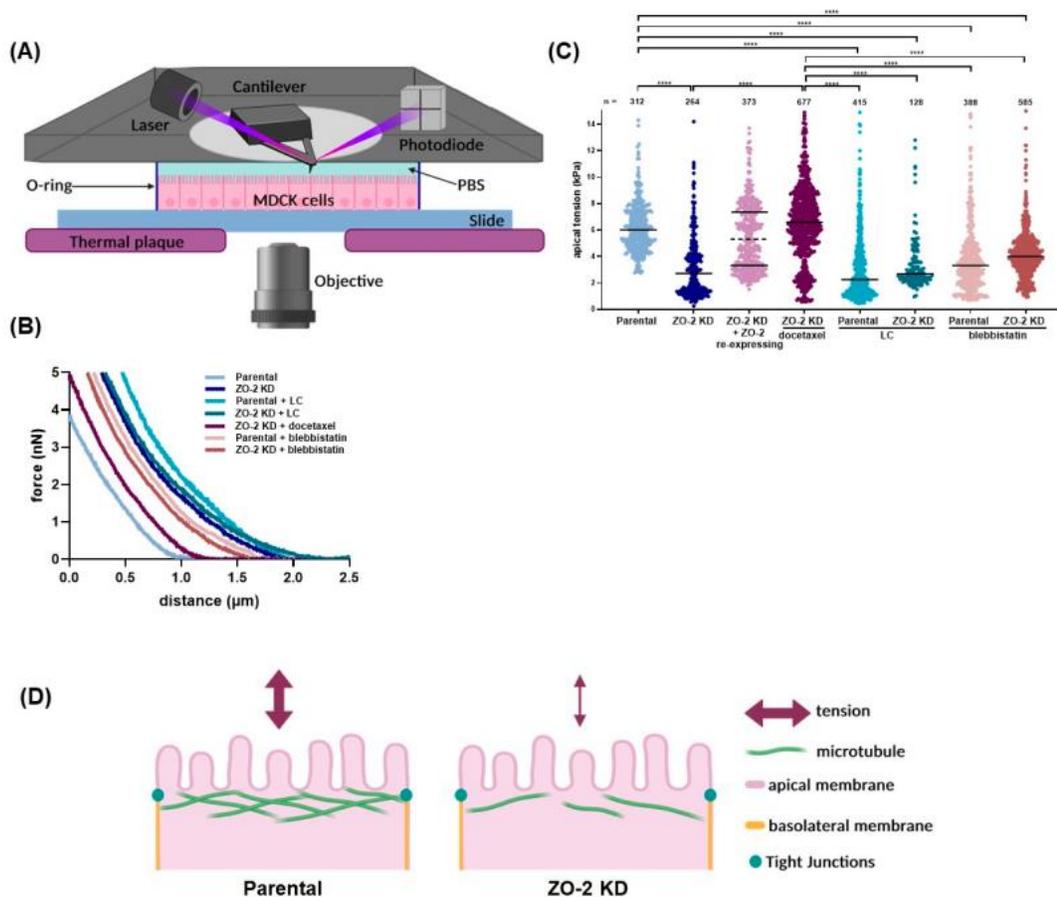
### **1. El silenciamiento de ZO-2 disminuye la tensión de la membrana apical modulada por los microtúbulos apicales**

La rigidez, que se mide con el módulo de Young, indica cuanto resiste un material a la deformación, en respuesta a una fuerza aplicada (para revisión, ver (Hoskins, 2012)). Para saber si ZO-2 regula la tensión mecánica de la membrana apical de las células epiteliales, se midió el módulo elástico o módulo de Young en la superficie de las células

MDCK parentales y ZO-2 KD utilizando la técnica de indentación con el microscopio de fuerza atómica. Esto se basa en la idea de que la fuerza que restaura la deformación se origina de la rigidez de la membrana apical. El AFM puede hacer referencia a la rigidez de manera indirecta debido a que se puede saber cuánto indenta el cantilever (mediante la deflexión del láser) y cuánto trabajo le costó desplazarse. Para hacer esta medición, las células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron sobre portaobjetos y se sometieron a nanoindentación, como se ilustra en el diagrama de la Figura 20A. Las curvas de fuerza representativas, ajustadas con el modelo de Sneddon para vigas voladas cónicas se muestran en la Figura 20B. El estudio se hizo también en monocapas de células parentales o ZO-2 KD que se incubaron con docetaxel para estabilizar a los microtúbulos; con o sin blebbistatina, un inhibidor permeable de la miosina no muscular IIB (NMIIB) (Limouze et al. 2004) o en una condición de bajo calcio (BC). Se encontró que la rigidez o módulo de Young de la superficie apical es menor en las células MDCK ZO-2 KD que en las células parentales. Esto es semejante a lo observado en las monocapas incubadas en BC (Figura 20C), donde la unión estrecha se desensambla (Cereijido et al.1981). En las células parentales, el tratamiento con blebbistatina disminuye la rigidez apical a valores similares a los detectados en las monocapas incubadas en BC.

Otros laboratorios han encontrado un ligero aumento en la rigidez de la membrana apical en las células MDCK que carecen de ZO-1 (Brückner y Janshoff, 2018), ZO-2 o ambas proteínas (Cartagena-Rivera et al. 2017). Por ello, quisimos confirmar que la disminución de la tensión de la membrana apical se debe a la falta de ZO-2. Para este propósito, se midió el módulo de Young en la superficie de monocapas de células ZO-2 KD que no recibieron un tratamiento periódico con zeocina y que por lo tanto empezaron a reexpresar a ZO-2 en algunas células de la monocapa (ZO-2 KD + ZO-2 reexpresión). En estas monocapas, se observó que los valores de la tensión apical pueden dividirse en dos grupos (Figura 20C, línea punteada): uno con una media parecida a la encontrada en las células MDCK parentales y otro con una media semejante a la observada en las células ZO-2 KD. Estos resultados sugieren que la presencia de ZO-2 es crítica para mantener la rigidez de la membrana apical en las células MDCK.

Por otra parte, al silenciar a cingulina disminuyó también la tensión de la membrana apical (Rouaud et al. 2023). Al respecto se sabe que para formar una red apical de microtúbulos planares no centrosomales se requiere la unión de los microtúbulos a la cingulina fosforilada por la AMPK presente en la unión estrecha (Yano et al. 2013). Previamente, se observó que ZO-2 favorece la fosforilación de cingulina por la AMPK y que la red planar de microtúbulos no se asocia al borde celular en las células ZO-2 KD (Raya-Sandino et al. 2017). Estos precedentes nos llevaron a probar si la tensión de la membrana apical de las células ZO-2 KD se puede restaurar al estabilizar a los microtúbulos. Para ello se utilizó docetaxel, un estabilizador de microtúbulos, que induce la aparición de manojos gruesos de microtúbulos alrededor del borde de las células epiteliales. La figura 20 B y C muestra que el tratamiento con 10  $\mu$ M de docetaxel por 4 horas restaura la tensión de la membrana apical en las células ZO-2 KD. Esto sugiere que la disminución de la tensión apical observada en las células ZO-2 KD se debe a la disociación de la red planar de los microtúbulos de la UE (Fig. 20D).



**Figura 20. En las células MDCK, la falta de ZO-2 disminuye la rigidez de la membrana apical.** En las monocapas de células parentales y ZO-2 la rigidez de la membrana apical en kPa se determinó por indentación con el microscopio de fuerza atómica. Las células se incubaron en medio con calcio normal, en bajo calcio (BC) con 2.4 mM de EDTA, en medio con calcio con 100  $\mu$ M de blebistatina durante 15 h previas al experimento y a lo largo del procedimiento de indentación; o en el caso de las células ZO-2 KD se trataron con 10  $\mu$ M de docetaxel durante 4 horas previas al experimento y a lo largo del procedimiento de indentación. También, se midió la rigidez de la membrana apical en monocapas de células ZO-2 KD donde ZO-2 se reexpresó en algunas células al retirarse el tratamiento con zeocina (ZO-2 KD + reexpresión de ZO-2). **A)** Representación esquemática del sistema de indentación. **B)** Curvas de fuerza-indentación representativas ajustadas con el modelo de Sneddon para vigas voladas con puntas cónicas. **C)** Rigidez o módulo de Young de la superficie apical de las células MDCK expresada en kPa. Cada punto de la gráfica representa un valor del módulo de Young obtenido de una curva de fuerza-indentación. Los resultados se obtuvieron de al menos dos experimentos independientes. n = número de curvas de fuerza-indentación ajustadas que se utilizaron para generar la figura. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba ANOVA de una vía con una prueba posterior de comparaciones múltiples de Dunn. Las líneas horizontales corresponden a las medianas. \*\*\*\* p < 0.0001. La línea punteada en el grupo ZO-2 KD + reexpresión de ZO-2 indica donde se dividieron los dos grupos de datos para obtener

## **2. La falta de ZO-2 reduce la concentración de $\gamma$ -actina en la unión estrecha y en la membrana lateral y en su lugar promueve su acumulación en las fibras de estrés**

La caída en la rigidez apical observada en las células epiteliales que carecen de cingulina se acompaña de una menor interacción de ZO-2 con  $\gamma$ -actina y una disminución de la miosina no muscular IIB (NMIIB) en la UE (Rouaud et al. 2023). Por lo tanto, nosotros analizamos si la falta de ZO-2 altera la distribución de la NMIIB. Encontramos que la NMIIB se localiza en las células MDCK abajo de la UE, a nivel de la unión adherente (UA), y que la falta de ZO-2 no tiene impacto sobre la distribución de la NMIIB en el borde celular (Fig. sup. 2).

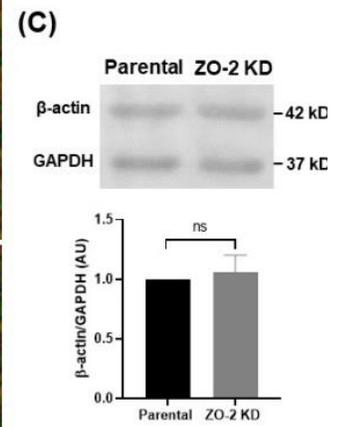
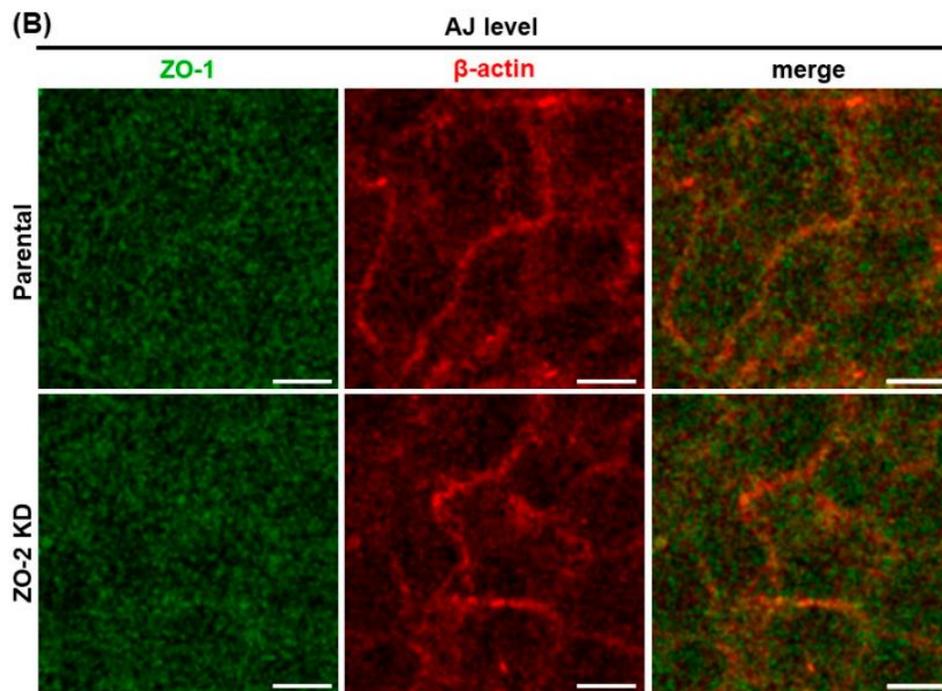
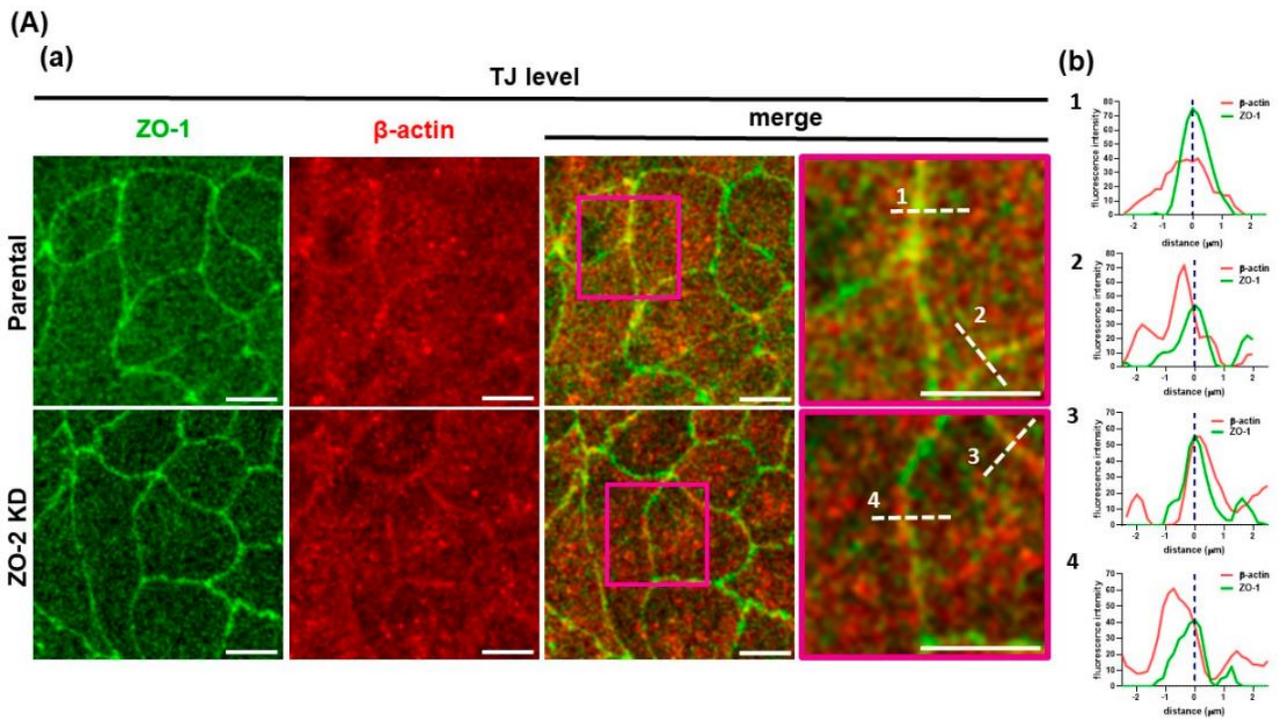
Luego, se analizó si la falta de ZO-2 altera la distribución de  $\beta$ - y  $\gamma$ -actina, que en las células epiteliales se localizan en las membranas basolateral y apical, respectivamente (Baranwal et al. 2012). Tanto en las células MDCK parentales como en las ZO-2 KD, la  $\beta$ -actina se distribuye en forma difusa en el citoplasma a nivel de la UE con una discreta concentración en el borde celular (Fig. 21Aa). El análisis del perfil de intensidad de la fluorescencia a través de la UE muestra que tanto en las células parentales como en las células ZO-2 KD, hay regiones en el borde celular donde los picos de la señal de ZO-1 y  $\beta$ -actina colocalizan (Fig. 21Ab1 y b3) y otros donde no (Fig. 21Ab2 y b4). La  $\beta$ -actina presente

debajo de la UE se concentra en la membrana lateral, y la ausencia de ZO-2 no cambia su patrón (Fig. 21B). Por western blot no se observó una diferencia en la cantidad de  $\beta$ -actina en las células MDCK parentales y ZO-2 KD (Fig. 21C).

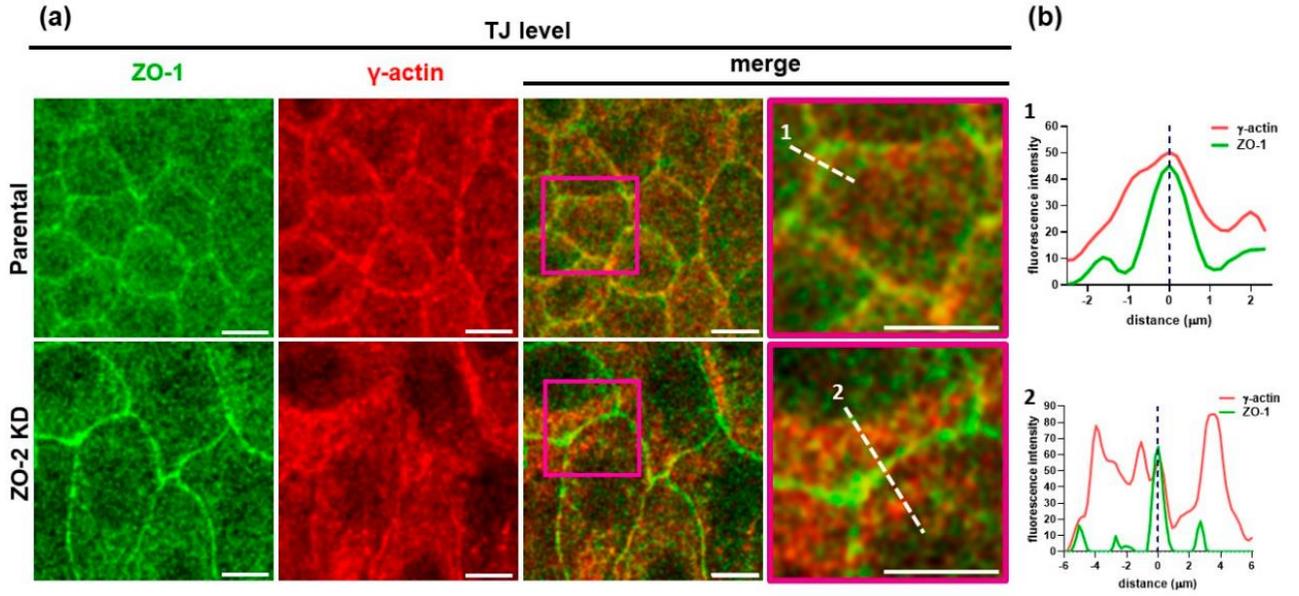
En las células epiteliales la  $\gamma$ -actina se presenta como una poza estable de haces en la periferia de las uniones (Dugina et al. 2009). En las células ZO-2 KD en comparación con las células parentales, la  $\gamma$ -actina tiene en la región de la UE, una distribución más difusa y ancha a lo largo del borde celular (Fig. 21Da). Esto se confirma con el perfil de intensidad de la fluorescencia a través de la UE (Fig. 21Db). En la membrana lateral, por debajo de la UE, la  $\gamma$ -actina forma fibras de estrés en las células que carecen de ZO-2, mientras que, en las células parentales, se concentra en la membrana lateral (Fig. 21E). Por western blot, no se detectó una diferencia en la cantidad de  $\gamma$ -actina entre las células MDCK parentales y ZO-2 KD (Fig. 21F).

Para analizar más a fondo el efecto inducido por la falta de ZO-2 en la concentración de  $\gamma$ -actina en la UE, se realizó un ensayo de ligación por proximidad (PLA) con anticuerpos contra ZO-1 y  $\gamma$ -actina en las células MDCK parentales y ZO-2 KD. La fig. 21G muestra que la falta de ZO-2 disminuye la interacción de la  $\gamma$ -actina con la proteína ZO-1 de la UE. Estas observaciones sugieren que la presencia de ZO-2 ancla a la  $\gamma$ -actina al borde celular, facilitando su interacción con ZO-1 en la UE.

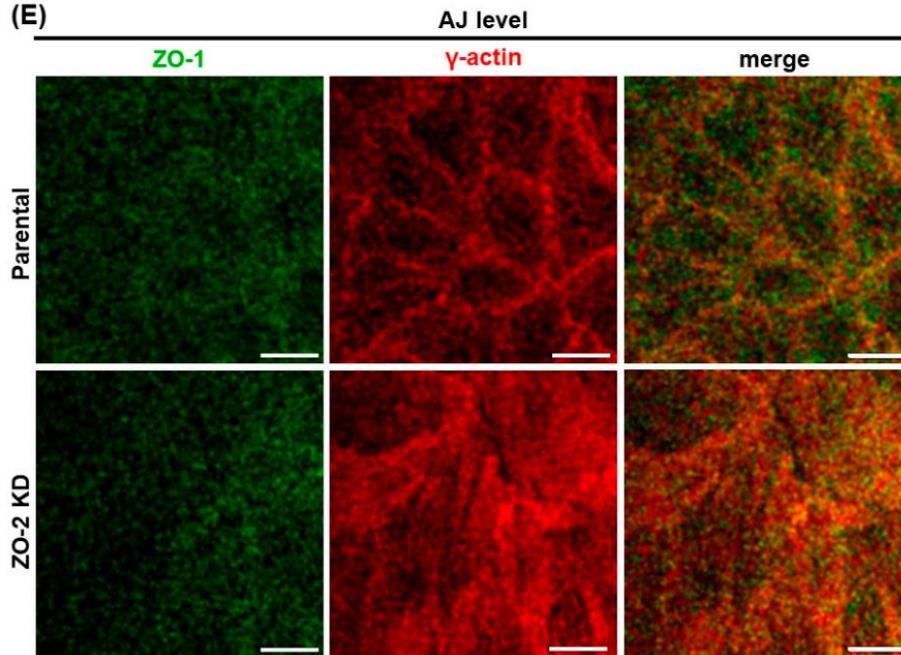
En conjunto, nuestros resultados sugieren que la disminución de la tensión apical en las células ZO-2 KD se debe a una menor interacción de la UE tanto con la  $\gamma$ -actina apical como con los microtúbulos corticales (Fig. 21H).



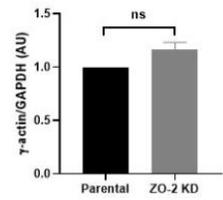
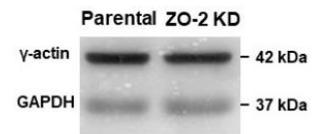
(D)



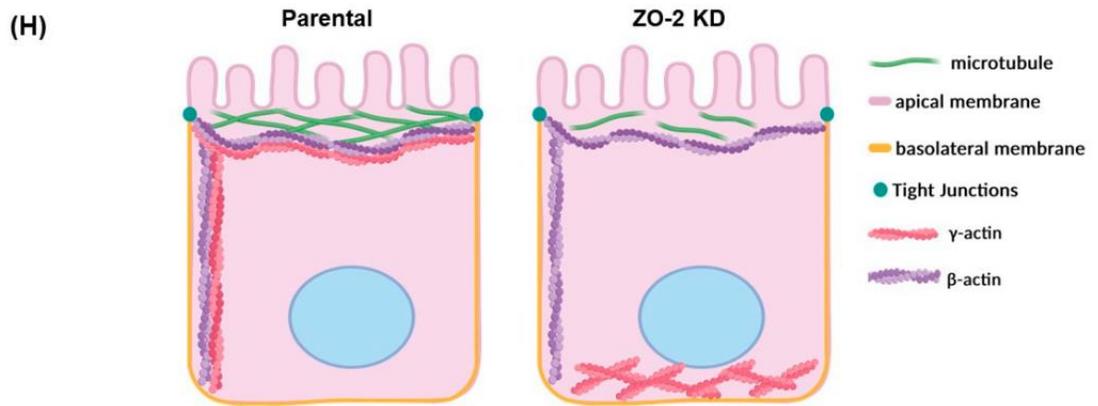
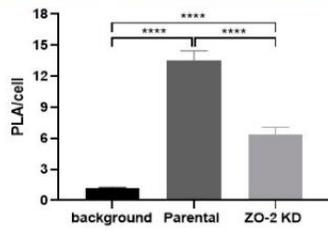
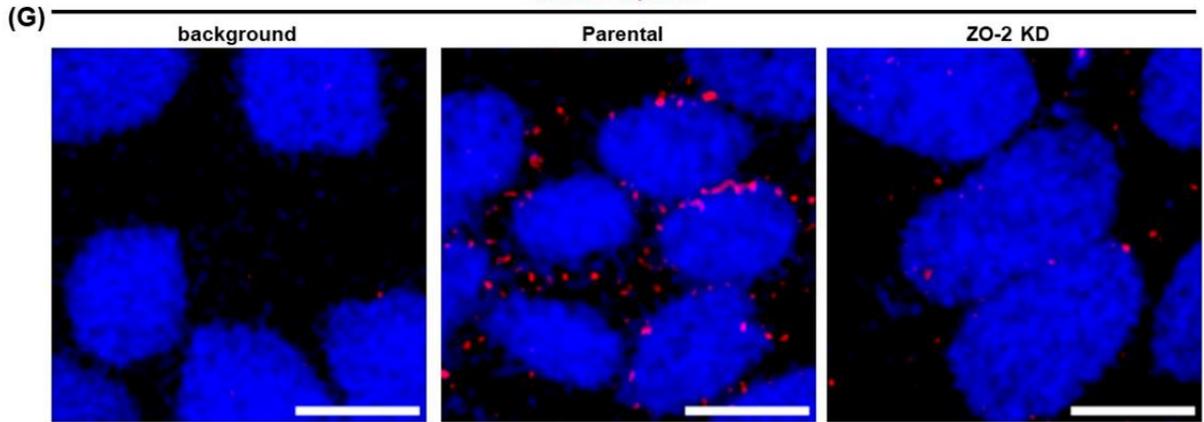
(E)



(F)



PLA ZO-1/ $\gamma$ -actin



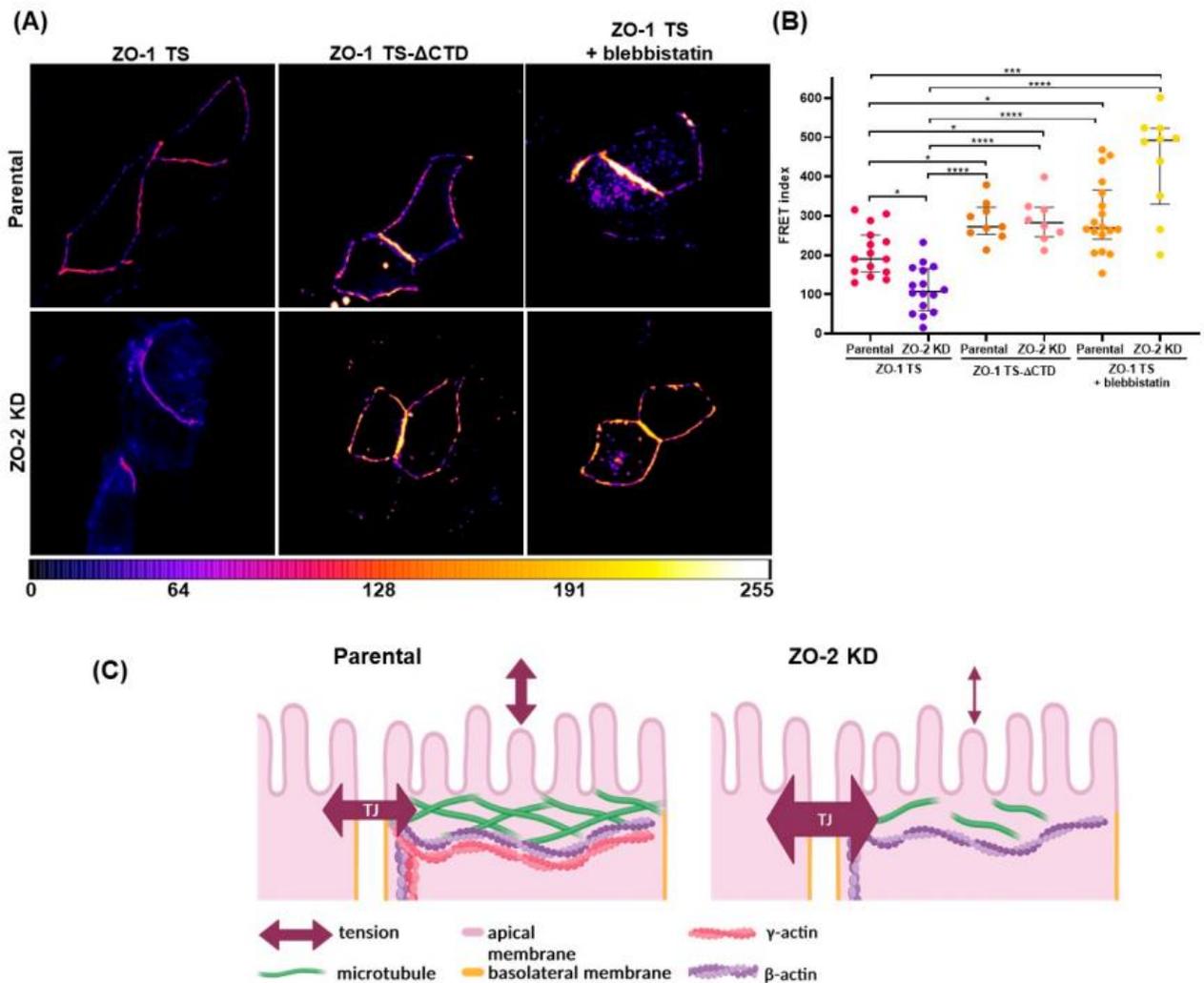
**Figura 21. La falta de ZO-2 no afecta la localización de la  $\beta$ -actina, pero disminuye la concentración de  $\gamma$ -actina en la UE e induce la proliferación de las fibras basales de estrés.** Inmunofluorescencia en las células parentales y ZO-2 con anticuerpos contra ZO-1 y  $\beta$ -actina (**A y B**), o ZO-1 y  $\gamma$ -actina (**D y E**). (**Aa y Da**) Apilado de cortes ópticos tomados a nivel de la UE (**A y D**), o a lo largo de la membrana lateral, desde la base de las células hasta la región inmediata inferior a la UE (**B y E**). Se muestran imágenes representativas de seis apilamientos de campos ópticos analizados por condición experimental, derivados de dos experimentos independientes. Barra, 10  $\mu\text{m}$ . Los cuadros rosas en Aa y Da corresponden a las áreas amplificadas que se muestran en la imagen adyacente enmarcada en rosa. Las líneas blancas punteadas indican la zona donde se hizo el análisis del perfil de la intensidad de fluorescencia. Los números en las gráficas del perfil de intensidad de fluorescencia en Ab y Db corresponden a la región donde se hizo el análisis que se marcó con una línea blanca punteada y se identificó con un número en Aa y Da. (**Ab y Db**) Análisis del perfil de la intensidad de fluorescencia en función de la distancia. La línea azul punteada indica el pico de la fluorescencia de ZO-1. (**C**) Western Blot de  $\beta$ -actina en las células parentales y ZO-2 KD. Como control de carga se empleó a GAPDH. El panel superior muestra la imagen representativa y el panel inferior muestra el análisis cuantitativo derivado de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de t de student. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar, ns, no significativo. (**F**) Western Blot de  $\gamma$ -actina en las células parentales y ZO-2 KD. Como control de carga se empleó a GAPDH. El panel superior muestra una imagen representativa y el panel inferior presenta el análisis cuantitativo derivado de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de t de student. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar, ns, no significativo. (**G**) La falta de ZO-2 disminuye la interacción de  $\gamma$ -actina con ZO-1. El ensayo de ligación por proximidad (PLA) se realizó en las células MDCK parentales y ZO-2 KD tratadas con anticuerpos, de ratón contra  $\gamma$ -actina y de conejo contra ZO-1. Los puntos rojos fluorescentes revelan por PLA la interacción positiva entre ZO-1 y  $\gamma$ -actina. Como control de fondo, el PLA se realizó en las células parentales sólo con el anticuerpo contra ZO-1. El núcleo se tiñó con DAPI. Barra, 10  $\mu\text{m}$ . El panel superior muestra las imágenes representativas, el panel inferior el análisis cuantitativo hecho con el programa BlobFinder versión v3.2. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba ANOVA de una vía con una prueba posterior de comparaciones múltiples de Tukey. Los resultados se obtuvieron de seis campos ópticos por condición experimental, derivados de dos experimentos independientes. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . (**H**) Esquema de resumen de resultados. La ausencia de ZO-2 inhibe la asociación de  $\gamma$ -actina con la UE e induce la formación de fibras basales estrés.

### **3. El silenciamiento de ZO-2 incrementa la tensión mecánica en la UE**

También analizamos si la ausencia de ZO-2 desencadena un cambio en la tensión mecánica de la UE. Para ello, se empleó al sensor de tensión de ZO-1 (ZO-1 TS) en el cual se insertó un módulo elástico de FRET después del segmento MAGUK que contiene a los tres dominios PDZ, los módulos SH3 y GuK; y el dominio carboxilo terminal con el segmento alternativo  $\alpha$ , la región de unión a actina (ABR) y el dominio ZU5 (Fig. 15). Este sensor se escogió porque previamente se demostró que se expresa eficientemente en la

UE y que sube la eficiencia del FRET cuando se inhibe la actividad de la miosina con blebbistatina (Haas et al. 2020).

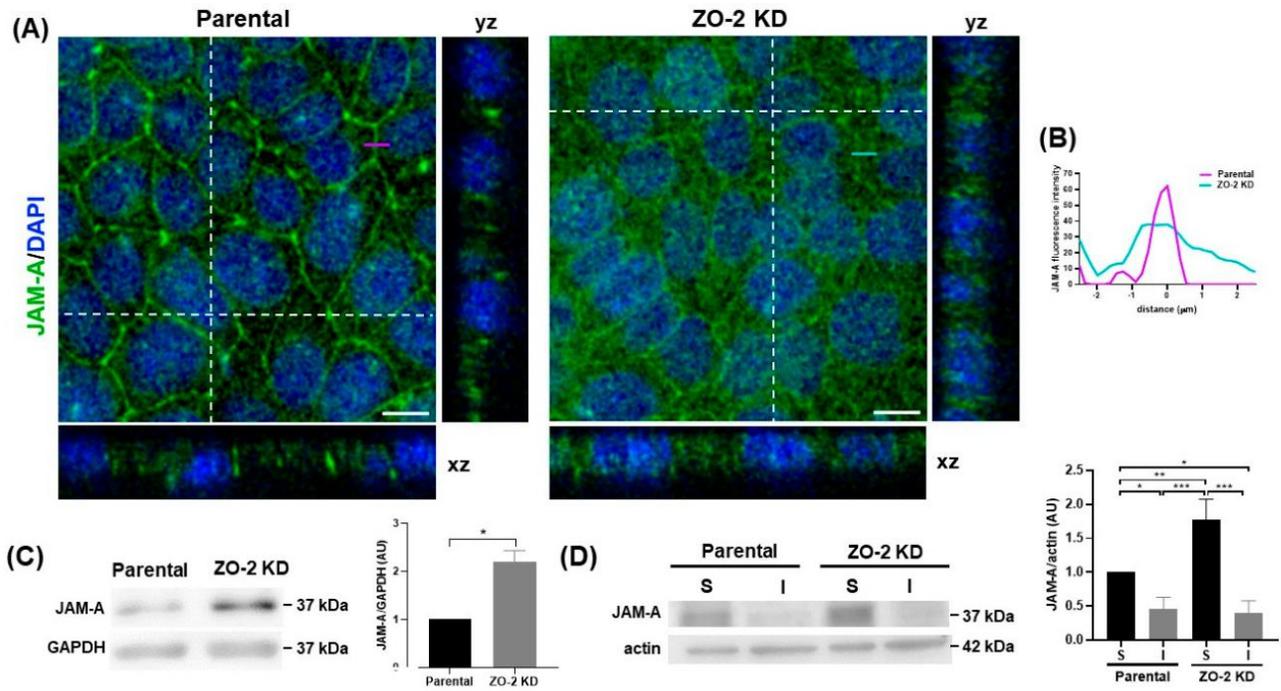
La figura 22 muestra que el índice de FRET del sensor de ZO-1 es menor en las células MDCK ZO-2 KD en comparación con las células parentales. Esto indica que la tensión en la UE es mayor en ausencia de ZO-2. Un mayor índice de FRET, que corresponde a una menor tensión, se observó cuando las células parentales y ZO-2 KD se trataron con 100  $\mu$ M de blebbistatina o cuando los experimentos se hicieron con una construcción de FRET que carece del dominio carboxilo terminal de ZO-1 (ZO-1 TS- $\Delta$ CTD) y que por lo tanto no puede percibir la tensión.



**Figura 22. La ausencia de ZO-2 aumenta la tensión en la UE.** Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se transfectaron con ZO-1 TS o ZO-1 TS- $\Delta$ CTD. Después de 6 horas de transfección con ZO-1 TS, las monocapas se trataron o no con blebbistatina 100  $\mu$ M durante 15 horas. **(A)** Las imágenes representativas de FRET en las células MDCK parentales y ZO-2 KD se muestran con un código de color, donde el FRET va de bajo a alto en una escala de colores fríos a cálidos. Los números que se indican en la escala de colores son valores arbitrarios **(B)** Índice de FRET en el borde de las células parentales y ZO-2 KD transfectadas y tratadas como se indica. Datos obtenidos de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba ANOVA de una vía con una prueba posterior de comparaciones múltiples no corregida de Dunn. Las líneas horizontales corresponden a la mediana y al rango intercuartílico. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$ . **(C)** Esquema de resumen de resultados. La ausencia de ZO-2 incrementa la tensión mecánica en la UE.

#### **4. En las células MDCK ZO-2 KD, la expresión de JAM-A en el borde celular disminuye, mientras que aumenta la de p114RhoGEF**

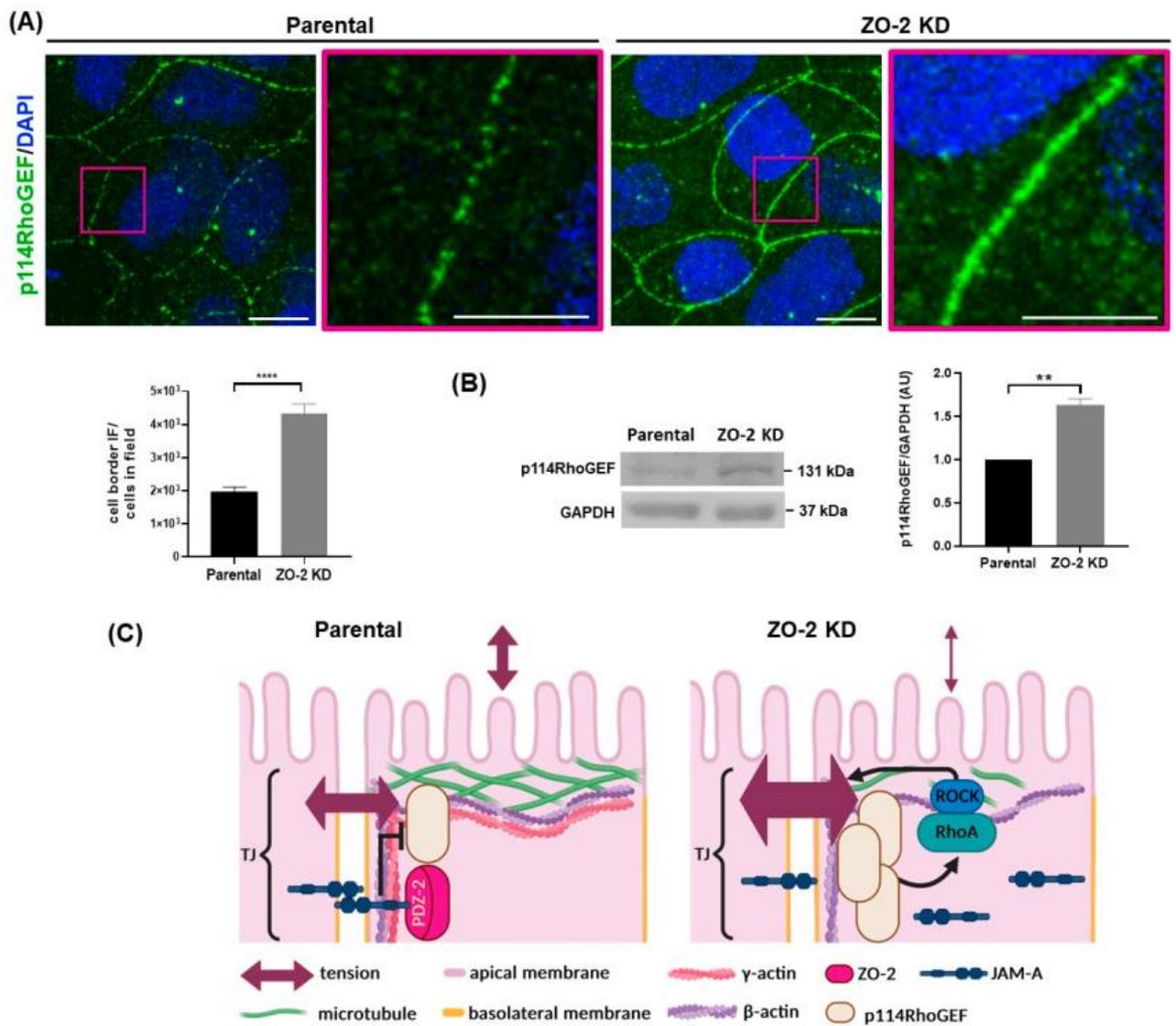
El aumento de la tensión en el sensor de ZO-1 observado al silenciar a ZO-2 es similar al encontrado cuando se silencia a JAM-A (Haas et al. 2020). Esto llamó nuestra atención, ya que el silenciamiento de JAM-A induce la fosforilación de la cadena ligera de la miosina e incrementa las fibras de estrés (Haas et al. 2020b). Por lo tanto, en seguida se analizó si la expresión de JAM-A se altera al silenciar a ZO-2. La figura 23A muestra por inmunofluorescencia, que en comparación a las células MDCK parentales, las células ZO-2 KD tienen menos JAM-A en el borde celular y en su lugar JAM-A exhibe una distribución citoplásmica difusa. Esto se confirmó en el perfil de intensidad de la fluorescencia a través de la UE (Fig. 23B). Por western blot, se detectó un incremento en la cantidad total de JAM-A en las células ZO-2 KD (Fig. 23C). Este resultado aparentemente contradictorio, se explicó en seguida al analizar por western blot a las fracciones de JAM-A solubles e insolubles en detergente, que corresponden respectivamente a las fracciones de la proteína asociadas al citoplasma y a la membrana. Se encontró que las células ZO-2 KD tienen una mayor cantidad de JAM-A soluble, es decir, presente en el citoplasma y no asociadas a la membrana, que las células parentales (Fig. 23D).



**Figura 23. La expresión de JAM-A en el borde celular disminuye en las células ZO-2 KD.** (A) Las monocapas de células MDCK parentales y ZO-2 KD se procesaron para inmunofluorescencia con un anticuerpo contra JAM-A. El núcleo se tiñó con DAPI. Barra, 10 μm. Imágenes representativas de cortes ópticos tomados con el microscopio confocal, con el programa ImageJ versión 1.54f. Las secciones en yz y xz se hicieron a lo largo de las líneas blancas punteadas. Se realizaron dos experimentos independientes y se analizaron tres campos ópticos por condición, en cada experimento. (B) Análisis del perfil de la intensidad de fluorescencia en función de la distancia. Las líneas magenta y verde en (A) indica la región donde se hizo el análisis. (C) Western Blot de JAM-A en las células MDCK parentales y ZO-2 KD. Como control de carga se empleó a GAPDH. El panel izquierdo muestra la imagen representativa y el panel derecho el análisis cuantitativo derivado de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t de student. Los resultados se muestran como la media ± la desviación estándar, \* p < 0.05. (D) Western Blot de las fracciones solubles (S) e insolubles (I) de JAM-A en células MDCK parentales y ZO-2 KD. Como control de carga se empleó a la actina. El panel izquierdo muestra una imagen representativa y el panel derecho el análisis cuantitativo derivado de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los resultados se muestran como la media ± la desviación estándar, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

La activación de la NMII que se observa en las células que carecen de JAM-A se atenúa por el silenciamiento de p114RhoGEF, lo que indica que la regulación de la actomiosina río debajo de JAM-A requiere de esta GEF para activar a RhoA y ROCK (Haas et al. 2020). Además, el incremento en la tensión del sensor de ZO-1 generado por el silenciamiento de JAM-A previamente se explicó aduciendo al bloqueo que ejerce JAM-A sobre la actividad de p114RhoGEF (Haas et al. 2020). Por ello, se analizó si el

silenciamiento de ZO-2 altera la expresión de p114RhoGEF. La figura 24A muestra que en ausencia de ZO-2, el patrón de p114RhoGEF en el borde celular es más continuo e intenso que el observado en las células MDCK parentales. En concordancia, el análisis hecho por western blot reveló un mayor contenido de p114RhoGEF en las células MDCK ZO-2 KD en comparación con las células parentales (Fig. 24B). En conjunto, estas observaciones sugieren fuertemente que la ausencia de ZO-2 inhibe la asociación de JAM-A al borde celular facilitando la acumulación de p114RhoGEF, lo que eleva la tensión en la UE.



**Figura 24. La expresión de p114RhoGEF aumenta en las células ZO-2 KD.** (A) Las monocapas de células MDCK parentales y ZO-2 KD se procesaron para inmunofluorescencia con un anticuerpo contra p114RhoGEF. Los cuadrados rosas corresponden a las áreas amplificadas en las imágenes adyacentes con un marco rosa. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Panel superior, imágenes representativas; barra 10  $\mu\text{m}$ . Panel inferior, cuantificación con el programa ImageJ versión 1.54f de la intensidad de fluorescencia en el borde celular. Los datos se obtuvieron analizando 16 campos ópticos por condición experimental provenientes de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de t de student. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . (B) Western Blot de p114RhoGEF en las células MDCK parentales y ZO-2 KD. Como control de carga se empleó a GAPDH. El panel izquierdo muestra la imagen representativa y el panel derecho el análisis cuantitativo derivado de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de t de student. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar, \*\*  $p < 0.001$ . (C) Esquema del resumen de resultados. La ausencia de ZO-2 inhibe la asociación de JAM-A a la UE y permite la concentración de p114RhoGEF en el borde celular, lo que activa la contracción de la actomiosina, incrementando así la tensión en la UE.

### **5. El análisis *in silico* muestra que JAM-A se une al dominio PDZ-2 de ZO-2 a través de interacciones hidrofóbicas**

Ya que la ausencia de ZO-2 disminuye la concentración de JAM-A en el borde celular, en seguida se analizó *in silico* la interacción entre la cola carboxilo terminal de JAM-A y el dominio PDZ-2 de ZO-2. Se estudiaron estos segmentos de ambas proteínas porque trabajos previos indicaban que son los responsables de la interacción JAM-A/ZO-2 (Monteiro et al. 2013). La hidropatía del complejo JAM-A/ZO-2 PDZ-2 se analizó utilizando la escala de 0 a 10 de PARCH (Ji et al. 2023), donde los valores bajos ( $<1$ ) indican el carácter hidrofóbico del aminoácido. El método de PARCH provee una evaluación cuantitativa de las interacciones agua-proteína, con base en la naturaleza química y topográfica de la proteína. Otros métodos, al evaluar la hidropatía pasan por alto la topografía a nanoescala de la proteína y asignan valores fijos a los 20 aminoácidos para clasificarlos como hidrofílicos o hidrofóbicos. En el complejo PDZ-2/JAM-A el rol de la topografía es crítico para evaluar la estabilidad de las interacciones y así utilizando el método PARCH se vio que los últimos siete residuos de JAM-A, QTSSFLV, son hidrofóbicos, mientras que los tres restantes del decámero, EFK, son hidrofílicos (Tabla 3). Llama la atención, el último residuo de la cola de JAM-A, la valina, que tiene un valor de PARCH un poco más alto que los otros seis residuos del segmento hidrofóbico de la cola. Se infiere que esto se debe a la presencia del residuo COO- y de los residuos hidrofílicos circundantes de ácido glutámico, presentes justo afuera del bolsillo hidrofóbico. La cola de JAM-A se estabiliza

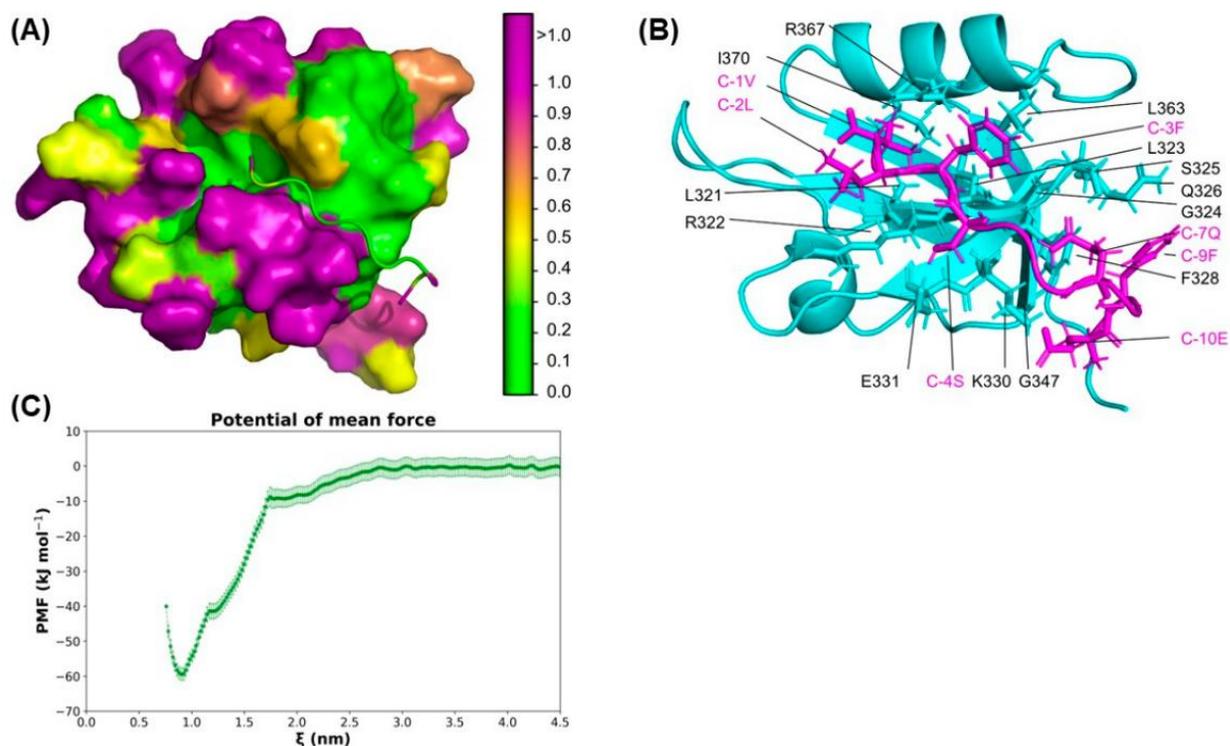
por el bolsillo hidrofóbico del PDZ-2 de ZO-2 formado por los residuos Y319 a V329 e I370 (Fig. 25A y B).

Los contactos residuales por pares también proporcionan información acerca de las interacciones entre el dominio PDZ-2 de ZO-2 y el decámero de la cola de JAM-A. De estos diez residuos de JAM-A, siete hacen contacto, y la mayoría de ellos hacen contactos múltiples con el bolsillo hidrofóbico del dominio PDZ-2 de ZO-2 (Tabla 3). La energía de unión de JAM-A al dominio PDZ-2 de ZO-2 es de  $-59.4 \pm 1.75$  kJ/mol. Al ser ésta una energía negativa se sugiere fuertemente una interacción. Los mínimos en la curva de energía libre a una distancia intermolecular  $\xi = 0.9$  nm, corresponden a la unión de los aminoácidos FLV en las simulaciones de dinámica dirigida (Fig. 25C).

**Tabla 3. Valores de PARCH y contactos residuales de la cola carboxilo terminal de JAM-A con el dominio PDZ-2 de ZO-2.**

JAM-A		PDZ-2 ZO-2 <sup>a</sup>	
Posición	Residuo	Valor PARCH	Contacto
C-1	V	0.9	L321 L323 I370 R367
C-2	L	0.4	R322
C-3	F	0.1	G324 L363 R367
C-4	S	0.2	R322 K330 E331
C-5	S	0.0	-
C-6	T	0.2	-
C-7	Q	0.1	G347 S325 K330
C-8	K	1.3	-
C-9	F	0.3	Q326 F328
C-10	E	2.2	G347

Los residuos EFKQTSSFLV de la secuencia carboxilo terminal de JAM-A se presentan de tal forma que C-1 = V denota al primer residuo del extremo carboxilo terminal. El límite de contacto registrado desde el centro de geometría de cada residuo es de 6.5 Å. <sup>a</sup> secuencia del dominio PDZ-2 de ZO-2: 306-IGVLLMKSRANEEYGLRLGSQIFVKEMTRTGLAT KDGNLHEGDIILKINGTVTENMSLTDARKLIEKSRGKLQLVLRDSQ-386.



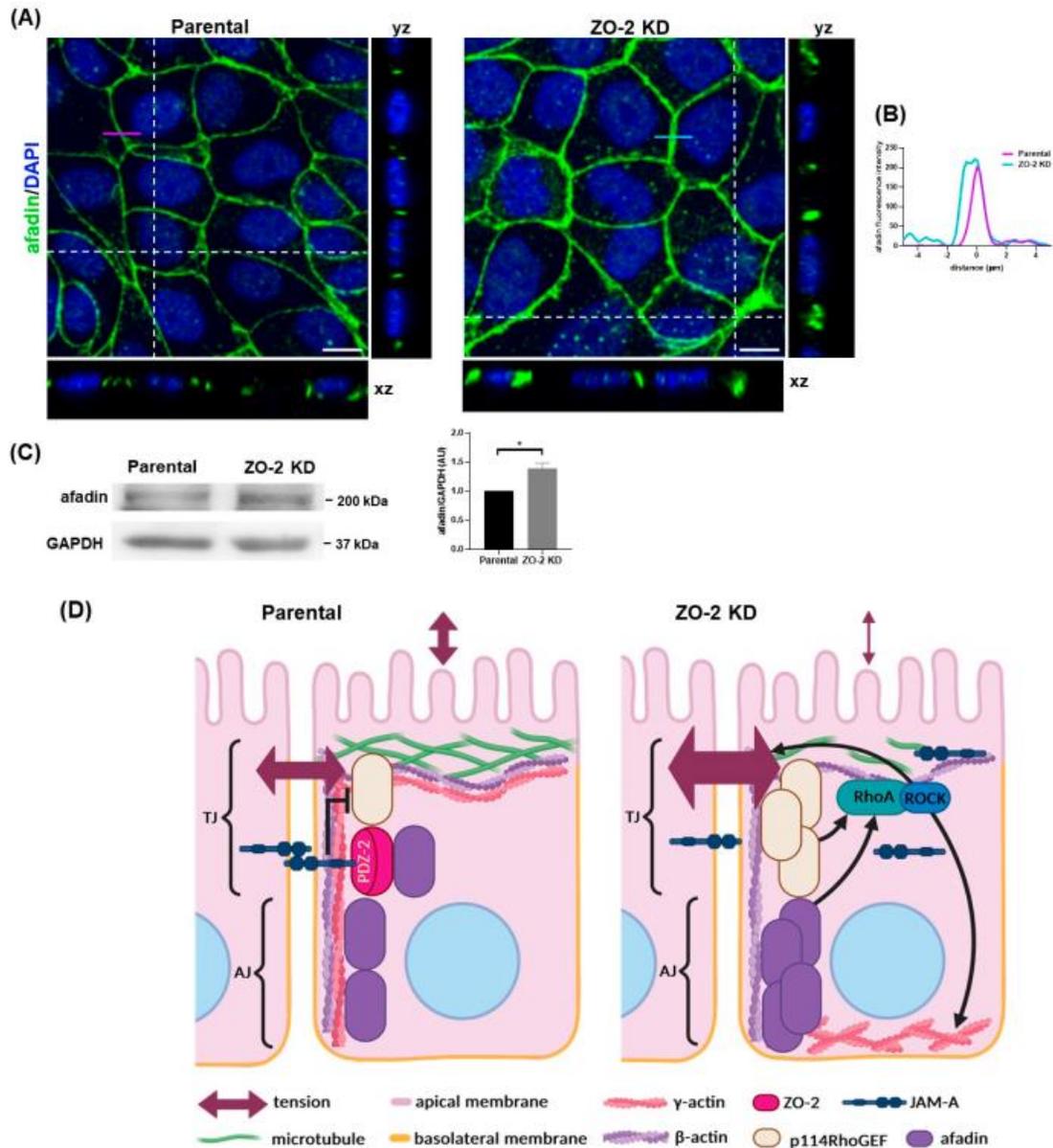
**Figura 25. Análisis *in silico* del complejo PDZ-2 de ZO-2 y la cola de JAM-A.** (A) Los cálculos en la escala PARCH se realizaron para el dominio PDZ-2 de ZO-2 en complejo con los 10 últimos residuos de la cola C-terminal de JAM-A (EFKQTSSFLV). Se muestra al complejo utilizando una representación de superficie para el dominio PDZ-2 de ZO-2 y una representación de caricatura para JAM-A. El color de los residuos corresponde a la escala de color de los valores de PARCH (derecha). El dominio PDZ-2 de ZO-2 forma un bolsillo largo hidrofóbico que facilita la unión de los residuos FLV de la cola de JAM-A. (B) Los residuos clave de JAM-A (magenta) y ZO-2 (cian) se muestran en una representación de caricatura y bastones. (C) Se muestra el potencial medio de la curva de fuerza requerido para separar la cola de JAM-A del dominio PDZ-2 de ZO-2. Las barras de error se calcularon con el método Bayesiano de Bootstrap utilizando GROMACS con la opción de WHAM. La energía de unión del complejo del dominio PDZ-2 y la cola de JAM-A es de  $-59.4 \pm 1.75$  kJ/mol.

## 6. La expresión de afadina aumenta en las células MDCK ZO-2 KD

ZO-2 se asocia con afadina, una proteína de unión a actina, y junto con JAM-A, estas proteínas forman un complejo donde la interacción de afadina con JAM-A es a través de ZO-2 (Monteiro et al. 2013). Por otro lado, también se sabe que la afadina se requiere para

la formación de fibras de estrés dependiente de RhoA/ROCK y que su silenciamiento inactiva a RhoA y reduce la fosforilación de la NMII (Saito et al. 2015). Además, afadina aumenta en el borde celular en respuesta a la elevada contracción de las células con el doble silenciamiento de ZO-1 y ZO-2 (Choi et al. 2016). Por lo tanto, a continuación, se analizó si la expresión de afadina cambia en las células que solo carecen de ZO-2. La figura 26A muestra, por inmunofluorescencia, una banda más ancha de afadina en el borde celular de las células MDCK ZO-2 KD en comparación con las células parentales. El análisis del perfil de intensidad de la fluorescencia de afadina a través de la UE confirmó que en las células ZO-2 KD la banda de afadina es más ancha que en las células parentales (Figura 26B). El análisis por western blot también reveló que hay una mayor concentración de afadina en las células ZO-2 KD (Figura 26C).

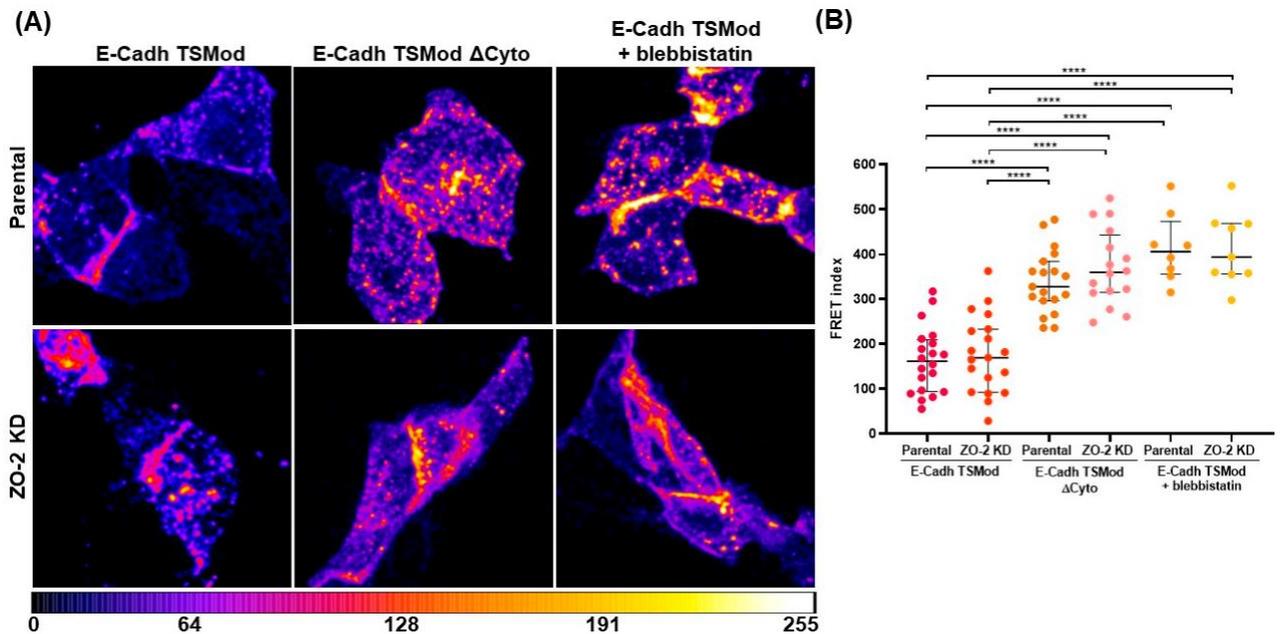
Estos resultados indican que en ausencia de ZO-2, la asociación de JAM-A al borde celular disminuye, mientras que el reclutamiento de afadina y p114RhoGEF aumenta, lo que sube la tensión mecánica de la UE e induce la formación de fibras basales de estrés (Fig. 26D).



**Figura 26. En las células ZO-2 KD aumenta la expresión de afadina.** (A) Las monocapas de células MDCK parentales y ZO-2 KD se procesaron para inmunofluorescencia con un anticuerpo contra afadina. Los núcleos se tiñeron con DAPI. (A) Imágenes representativas tomadas con el microscopio confocal, con el programa ImageJ versión 1.54f. Las secciones en yz y xz se hicieron a lo largo de las líneas blancas punteadas. Las líneas morada y verde indican la región donde se hizo el análisis del perfil de intensidad de fluorescencia. Se realizaron tres experimentos independientes y se analizaron tres campos ópticos por condición en cada experimento. Barra, 10  $\mu$ m. (B) Análisis del perfil de la intensidad de fluorescencia en función de la distancia. El 0 en el eje x corresponde al sitio con el máximo de fluorescencia de afadina (C) Western Blot de afadina en las células MDCK parentales y ZO-2 KD. Como control de carga se empleó a GAPDH. El panel izquierdo muestra la imagen representativa y el panel derecho el análisis cuantitativo derivado de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de t de student. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar, \* p < 0.05 (D) Esquema del resumen de resultados. En las células ZO-2 KD, afadina se recluta al borde celular, y a través de la activación de Rho/ROCK aumenta la tensión en la UE y se forman abundantes fibras de estrés.

## 7. La ausencia de ZO-2 no afecta la tensión de la unión adherente

En seguida, nos preguntamos si la ausencia de ZO-2 altera la tensión mecánica en la UA. Para este propósito, las células MDCK parentales y ZO-2 KD se transfectaron con el sensor de tensión de E-cadherina (E-Cadh TSMod) que entre los dominios transmembranal y de unión a  $\beta$ -catenina, contiene un módulo sensor de tensión (TSMod) con los fluoróforos TFP y YFP separados por una liga elástica, como se describió previamente (Fig. 16B). (Borghì et al. 2012). La figura 27 muestra que el índice de FRET en las células ZO-2 KD no cambia en comparación con las células parentales. Esto indica que la ausencia de ZO-2 no altera la tensión mediada por la E-cadherina. Como control, se hicieron mediciones de FRET en las células MDCK parentales y ZO-2 KD transfectadas con E-Cadh TSMod y tratadas con 100  $\mu$ M de blebbistatina por 15 h, o con células transfectadas con E-cad TSMod $\Delta$ cyto, que por la falta del dominio de unión a la  $\beta$ -catenina, no puede percibir la tensión. Como era de esperarse, se obtuvo un FRET máximo con estos experimentos control y no se encontró diferencia alguna entre las células parentales y ZO-2 KD.



**Figura 27. La ausencia de ZO-2 no afecta la tensión en la UA.** Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se transfectaron con E-cad TSMoD o E-cad TSMoD $\Delta$ cyto. Después de 6 horas de transfección con E-cad TSMoD, las monocapas se trataron o no con blebbistatina 100  $\mu$ M durante 15 horas. **(A)** Las imágenes representativas del FRET en las células MDCK parentales y ZO-2 KD se muestran con un código de color, donde el FRET va de bajo a alto en una escala de colores fríos a cálidos. **(B)** Índice de FRET en el borde de las células parentales y ZO-2 KD. La construcción y el tratamiento empleado se indican en la parte inferior. Datos obtenidos de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba ANOVA de una vía con una prueba posterior de comparaciones múltiples no corregida de Dunn. Las líneas horizontales corresponden a la mediana y al rango intercuartílico. \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

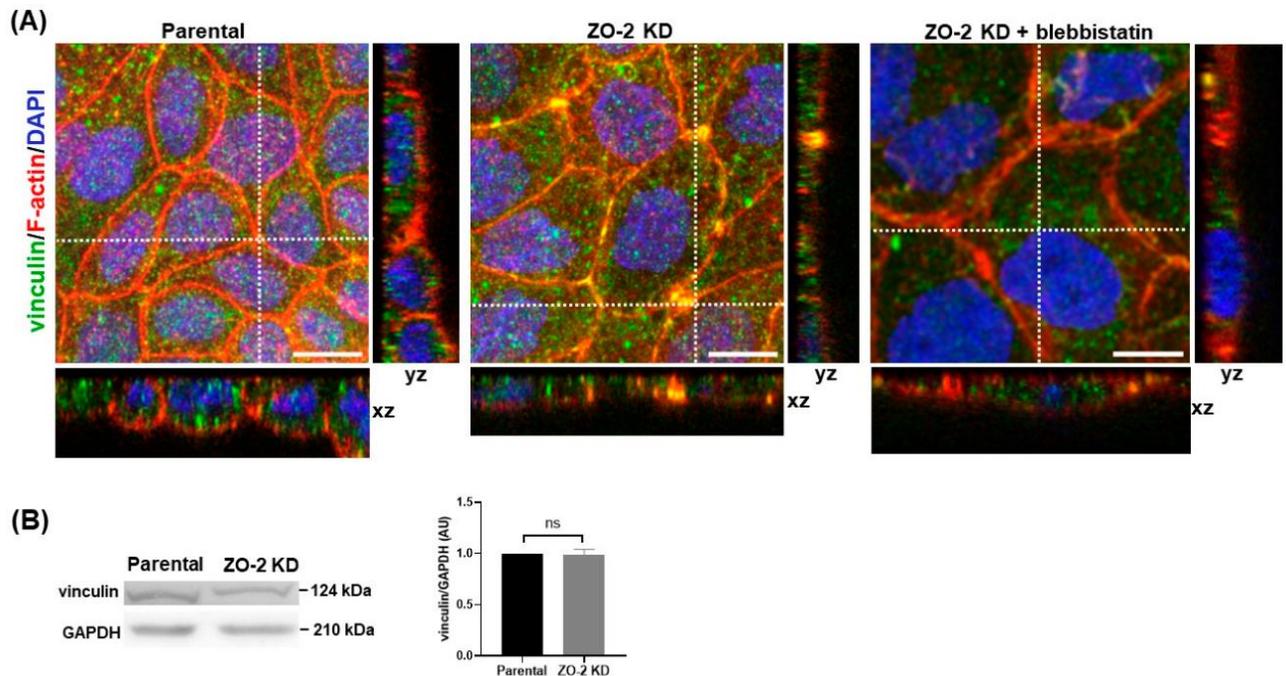
## **8. La ausencia de ZO-2 recluta a la vinculina a las uniones tricelulares**

A pesar de que no observamos un incremento en la tensión de la membrana lateral en las células ZO-2 KD comparado con las células parentales, nos preguntamos si en las células ZO-2 KD cambia la tensión en las uniones tricelulares (UEt). Estas últimas son UE especializadas que obliteran el espacio extracelular en los contactos tricelulares o multicelulares y están constituidas por las hebras de la UE más apicales de las uniones bicelulares que se unen en la zona de los contactos tricelulares, giran hacia abajo y se extienden en dirección basal, alineando y sellando el espacio tricelular para construir una barrera de difusión paracelular (Staehein, 1973). En las UEt, la tricelulina se une a la  $\alpha$ -catenina, lo que permite el reclutamiento de vinculina a esta unión dependiente de la tensión (Cho et al. 2022). Por lo tanto, a continuación, se analizó si la expresión de vinculina en las UEt se altera en ausencia de ZO-2. La figura 28A revela que la ausencia de ZO-2 es suficiente para inducir la aparición de vinculina en el borde celular y su notoria concentración en las uniones tri- y multicelulares.

La exposición del sitio de unión a la vinculina en la  $\alpha$ -catenina, requiere el estiramiento de la  $\alpha$ -catenina por fuerzas mecánicas aplicadas a su extremo carboxilo terminal derivadas de la contracción del citoesqueleto de actomiosina (Yonemura et al. 2010; Miyake et al. 2006). Por lo tanto, a continuación, se evaluó si al inhibir la actividad de la NM II con blebbistatina se bloquea el reclutamiento de la vinculina a las UEt. Nuestros resultados indican que el tratamiento de las células MDCK ZO-2 KD con 100  $\mu$ M de blebbistatina suprime la concentración de vinculina en las UEt (Fig. 28A). Estas observaciones sugieren que en ausencia de ZO-2, aumenta la tensión mecánica en las UEt.

El análisis de western blot no muestra diferencia alguna en la cantidad de vinculina entre las células MDCK ZO-2 KD y las parentales (Fig. 28B). Una situación similar se encontró previamente en las células epiteliales mamarias Eph4 cuando se silenció a la tricelulina (Cho et al. 2022). Esto indica que el reclutamiento de vinculina a las UEt no se acompaña de un cambio en el nivel de expresión de la proteína.

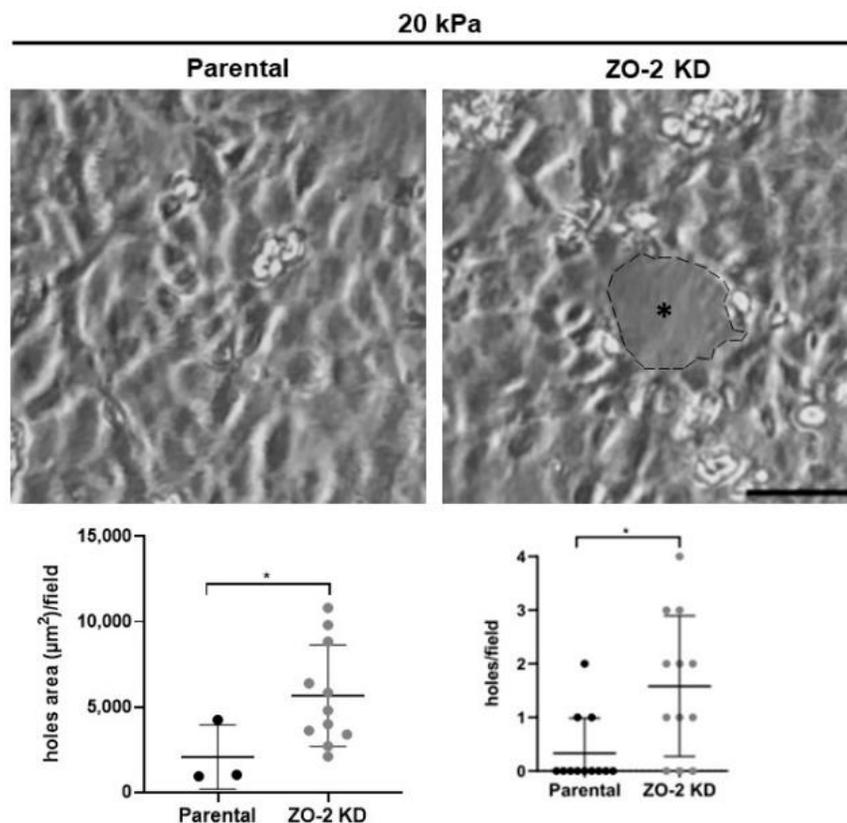
En conjunto, nuestros resultados muestran que la ausencia de ZO-2 en las células MDCK aumenta la tensión de las UEt por la contracción del citoesqueleto de actomiosina, favoreciendo la conformación abierta de la  $\alpha$ -catenina y el reclutamiento de la vinculina.



**Figura 28. En las células ZO-2 KD la vinculina se concentra en las uniones tri- y multi- celulares. (A)** Las monocapas de las células MDCK parentales y ZO-2 KD se trataron o no con 100  $\mu$ M de blebbistatina por 15 horas y se procesaron para inmunofluorescencia con un anticuerpo contra vinculina (verde) y faloidina rodamina para detectar a la F-actina (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Imágenes representativas tomadas con el microscopio confocal, con el programa ImageJ versión 1.54f. Las secciones en yz y xz se hicieron a lo largo de las líneas blancas punteadas. Se realizaron dos experimentos independientes y se analizaron tres campos ópticos por condición, en cada experimento. Barra, 10  $\mu$ m. **(B)** Western Blot de vinculina en las células MDCK parentales y ZO-2 KD. Como control de carga se empleó a GAPDH. El panel izquierdo muestra una imagen representativa y el panel derecho el análisis cuantitativo derivado de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de t de student. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar, ns, no significativo.

## 9. El incremento de la tensión en las células ZO-2 KD induce la aparición de huecos en las monocapas sembradas sobre hidrogeles

Cuando las monocapas de células epiteliales se siembran sobre hidrogeles suaves de 2.3 a 8.6 kPa de rigidez se forman huecos de manera espontánea debido a un incremento en la tensión del complejo de unión célula-célula (Sonam et al. 2023). Como la tensión de las UEs bicelulares, medida con el sensor de tensión de ZO-1, y de las tricelulares, detectada por el reclutamiento de vinculina, aumenta en las células MDCK ZO-2 KD, nos preguntamos si esta situación podría inducir la formación de hoyos en las monocapas de células ZO-2 KD sembradas sobre hidrogeles. Para este propósito, las células se sembraron sobre hidrogeles con una rigidez de 20 kPa recubiertos con fibronectina. Se eligió esta rigidez porque previamente se mostró que las monocapas de las células MDCK no desarrollan hoyos cuando se siembran sobre hidrogeles con una rigidez entre 16 y 55 kPa (Sonam et al. 2023). La figura 29 muestra que la falta de ZO-2 induce la formación de huecos en las monocapas de células MDCK. Estos resultados, por lo tanto, confirman que en las células ZO-2 KD sus uniones se encuentran en un estado de alta tensión.



**Figura 29. La falta de ZO-2 induce la formación de hoyos en las células MDCK cultivadas sobre hidrogeles de 20 kPa.** Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron a confluencia sobre hidrogeles con una rigidez de 20 kPa, cubiertos con fibronectina. La formación de hoyos se analizó 24 h después. El panel superior muestra unas imágenes representativas, barra, 50  $\mu\text{m}$ . \*, hoyo delineado con una línea discontinua. El panel inferior muestra la cuantificación del número de hoyos por campo, y el área ocupada por los hoyos por campo. Los resultados se obtuvieron de al menos dos experimentos independientes, y se analizaron 12 campos por condición. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Mann-Whitney. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar, \*  $p < 0.05$ .

### **10. La ausencia de ZO-2 retarda la elongación de las células sembradas sobre colágeno IV y fibronectina, y la formación de agregados celulares en substratos suaves y rígidos**

La rigidez de la matriz extracelular (MEC) es un parámetro que impacta significativamente el comportamiento celular [para revisión, ver (Handorf et al. 2015)], y la transducción de la rigidez de la MEC en una respuesta celular está mediada por los heterodímeros de integrinas [para revisión, ver (Ohashi et al. 2017)]. Las integrinas se asocian con sus ligandos de la MEC y forman agrupaciones que desencadenan el ensamble de adhesiones focales entre la célula y la MEC. Las células que crecen en matrices rígidas en comparación con las suaves, incrementan su esparcimiento, y el número de adhesiones focales (McKenzie et al. 2018; Kim et al. 2011), y muestran un incremento en la activación de ROCK, lo que lleva a la contracción del citoesqueleto, la activación de FAK y la formación de fibras de estrés (McKenzie et al. 2018; Paszek et al. 2005). En las células ZO-2 KD disminuye la expresión de la integrina  $\beta 1$ , se eleva la actividad de RhoA/ROCK, y abundan las fibras de estrés en la membrana basal (Raya-Sandino et al. 2017). Los dos últimos puntos, ahora los explicamos por la acumulación en el borde celular de p114RhoGEF y afadina.

Estas observaciones en seguida nos llevaron a estudiar si la agregación y el esparcimiento celular se alteran por la falta de ZO-2 en substratos de diferente rigidez. Estudiamos la agregación celular ya que ZO-2 es una proteína de la UE cuya ausencia se espera que disminuya la adhesión célula-célula, y analizamos el esparcimiento celular

porque es el resultado de un balance entre la adhesión célula-célula y la adhesión al substrato (Ryan et al. 2001), y en las células ZO-2 KD observamos abundantes fibras basales de estrés (Raya-Sandino et al. 2017).

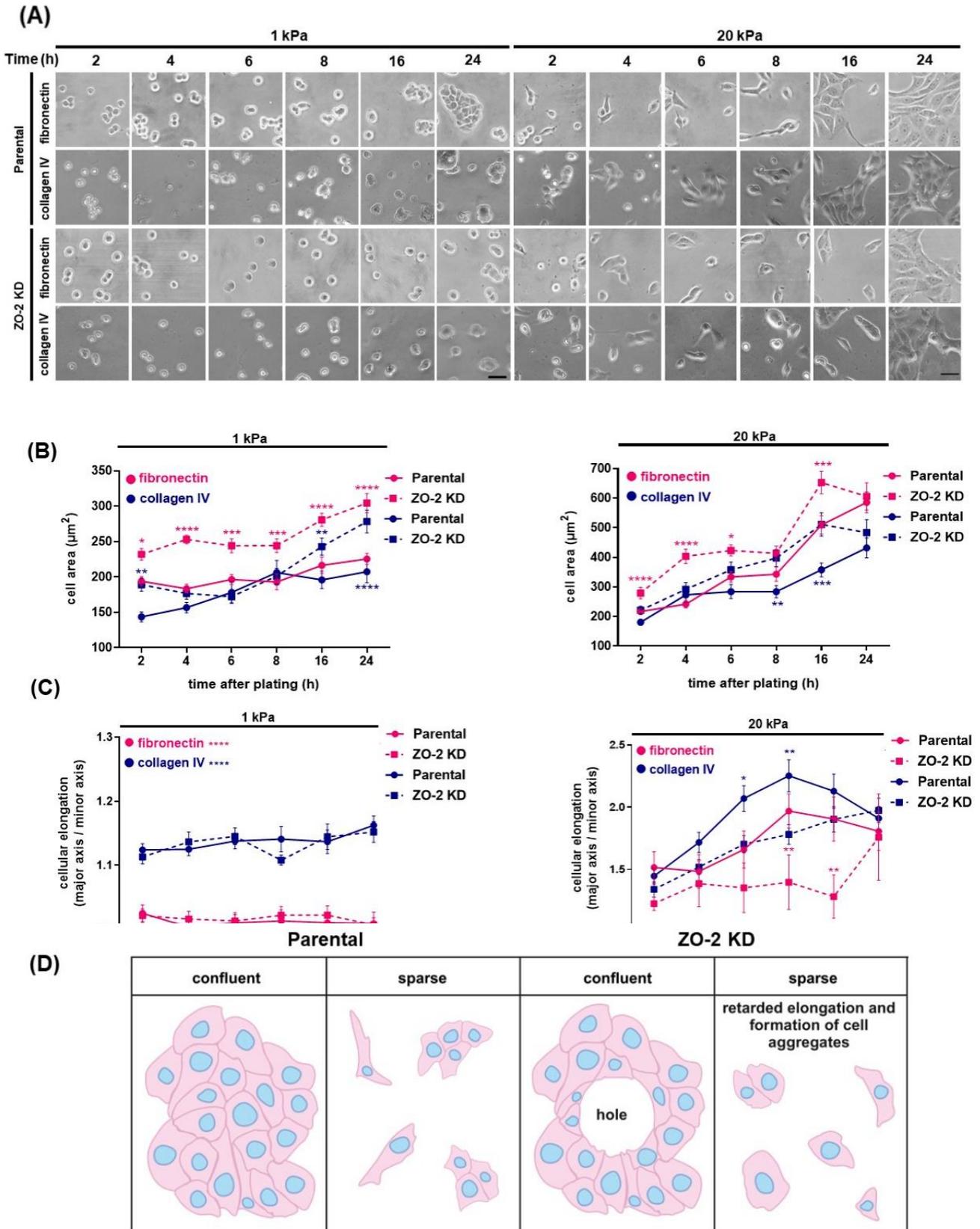
Las figuras 30A y B muestran que las células ZO-2 KD exhiben un área mayor que las células parentales, independientemente de la rigidez del substrato o de la naturaleza de la proteína de la matriz extracelular (MEC) sobre la cual se siembran. Estas observaciones concuerdan con un trabajo previo donde se vio que la falta de ZO-2 desencadena hipertrofia en las células MDCK (Dominguez-Calderon et al. 2016).

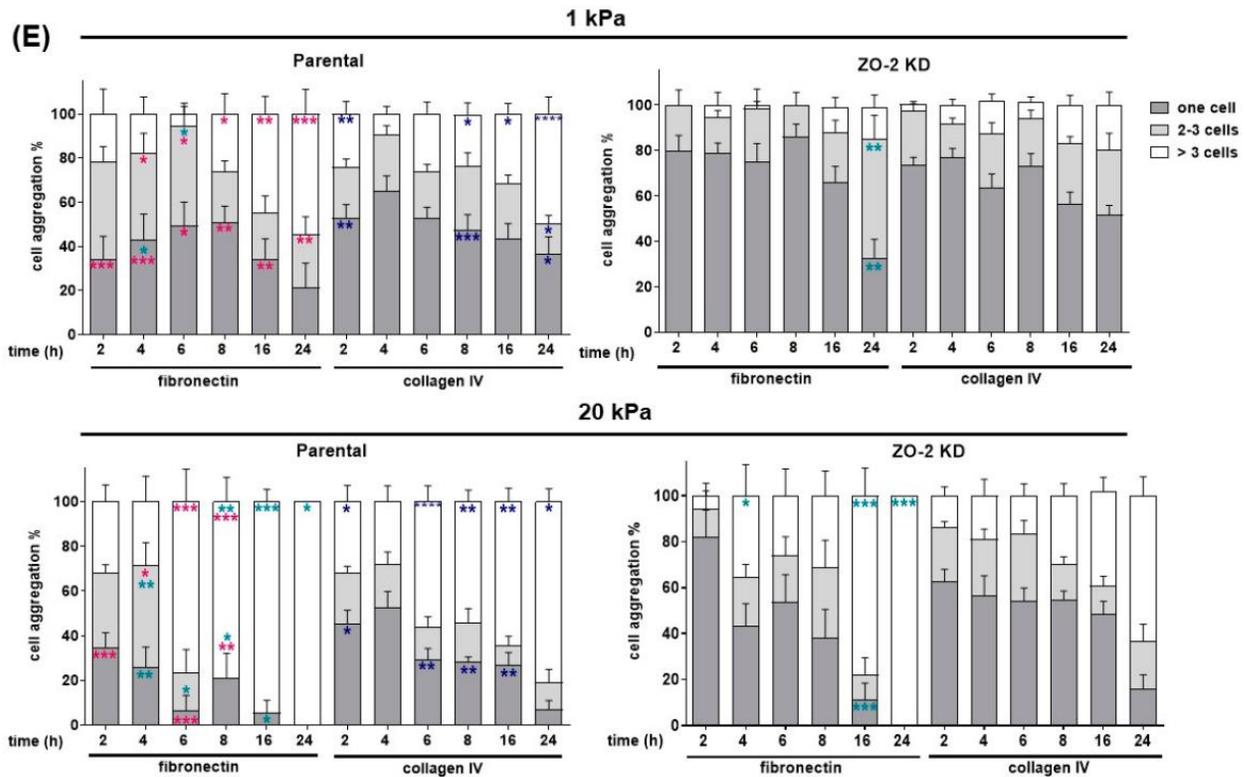
La elongación celular se restringe severamente en las células sembradas sobre hidrogeles de 1 kPa de rigidez, independientemente de la presencia de ZO-2 o de la naturaleza de la proteína de la MEC sobre la que se siembren (Fig. 30A y C). Esta observación concuerda con otra donde se vio que el área de las células individuales sembradas sobre substratos de 0.6 kPa es 6 veces menor que la de las células sembradas sobre vidrio (Kaliman et al. 2014).

Las células MDCK parentales y ZO-2 KD sembradas sobre substratos con 20 kPa de rigidez, se elongan con el tiempo, y la superficie de colágeno IV permite una mayor elongación que la de fibronectina. La ausencia de ZO-2 retarda la elongación celular cuando se siembran tanto en colágeno IV como en fibronectina (Fig. 30D). Sin embargo, este efecto es más pronunciado en las células sembradas sobre fibronectina (Fig. 30A y C). Las células sembradas sobre hidrogeles con una rigidez de 1 kPa, recubiertos con fibronectina o colágeno IV, no se elongan a través del tiempo después del sembrado (Fig. 30A y C).

También analizamos si la agregación celular se altera por la falta de ZO-2 en las células cultivadas sobre substratos suaves (1 kPa) y rígidos (20 kPa) recubiertos con colágeno IV o fibronectina. Las figuras 30A y E muestran que en las células parentales y ZO-2 KD aumenta la agregación celular con el tiempo después del sembrado, y este efecto es más pronunciado en los substratos de 20 kPa que en los de 1 kPa. Además, la agregación celular es mayor en los substratos rígidos cubiertos con fibronectina que en las superficies cubiertas con colágeno IV. Sin embargo, la falta de ZO-2 retarda la formación

de agregados celulares en sustratos suaves y rígidos, y en hidrogeles recubiertos con colágeno IV y fibronectina (Fig. 30A, D y E).





**Figura 30. La falta de ZO-2 disminuye la elongación de las células sembradas sobre sustratos rígidos cubiertos con colágeno IV o fibronectina, y disminuye la agregación celular en sustratos suaves y rígidos. (A)** Imágenes de microscopía de campo claro de las células MDCK parentales y ZO-2 KD tomadas a diferentes tiempos después de su siembra sobre hidrogeles de Ac/Bis Ac con 1 o 20 kPa de rigidez, cubiertos con fibronectina o colágeno IV. Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Barra, 30  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación del área celular a diferentes tiempos después del sembrado. El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Fisher LSD. Se analizaron de 27 a 60 células por condición y por tiempo. Los resultados de tres experimentos independientes se muestran como la media  $\pm$  el error estándar. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Se compararon las células ZO-2 KD con las parentales cultivadas sobre fibronectina (rosa) o colágeno IV (azul). **(C)** Cuantificación de la elongación celular a diferentes tiempos después del sembrado. El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Fisher LSD. Se analizaron de 27 a 60 células por condición y por tiempo. Los resultados de tres experimentos independientes se muestran como la media  $\pm$  el error estándar. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Se compararon las células ZO-2 KD con las parentales cultivadas sobre fibronectina (rosa) o colágeno IV (azul). **(D)** Esquema que muestra el resumen de resultados. La ausencia de ZO-2 en las células subconfluentes retarda la elongación y reduce la agregación celular y en células en confluencia induce la formación de hoyos cuando se siembran sobre hidrogeles de 20 kPa. **(E)** Cuantificación de la agregación celular a diferentes tiempos después del sembrado. El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Fisher LSD. Se analizaron de 27 a 60 células por condición y por tiempo. Los resultados de tres experimentos independientes se muestran como la media  $\pm$  el error estándar. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; cian \*, fibronectina contra colágeno IV; rosa \*, parental contra ZO-2 KD sobre fibronectina; azul \*, parental contra ZO-2 KD sobre colágeno IV.

**11. En las células cultivadas sobre arreglos nanoestructurados de crestas, la ausencia de ZO-2 acentúa la acumulación de la claudina-4 en el citoplasma, y es suficiente para inducir la acumulación nuclear de snail y YAP**

Finalmente, analizamos si la falta de ZO-2 afecta la sensibilidad de las células MDCK a la topografía del sustrato. Para ello, sembramos células parentales y ZO-2 KD sobre arreglos a nanoescala de crestas (NRA). Estas crestas asemejan en tamaño y organización a las fibras de la MEC, y al estar alineadas desencadenan el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) y el esparcimiento celular (Park et al. 2019).

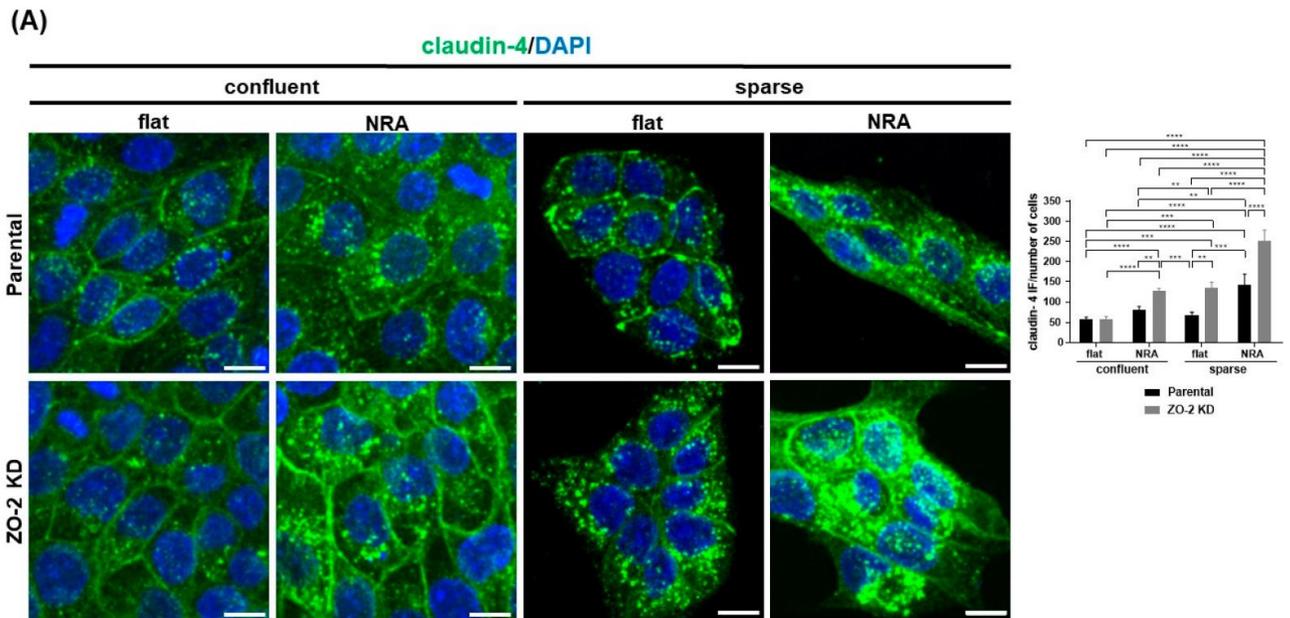
Durante la EMT, las células pierden la adhesión célula-célula, y alteran el patrón de expresión de sus claudinas [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2020)]. Por lo tanto, se analizó si la ausencia de ZO-2 cambia la expresión de la claudina-4 en las células cultivadas sobre sustratos NRA. Analizamos a la claudina-4 por reportes previos que demostraron que es más abundante en las células MDCK que expresan de manera estable a la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano 16 (Uc et al. 2020), y porque su expresión se altera en una amplia variedad de carcinomas [para revisión, ver (González-Mariscal et al. 2020)]. La figura 31A muestra que cuando las células MDCK parentales y ZO-2 KD se siembran a confluencia o subconfluencia sobre NRA, en comparación a cuando se siembran sobre cubreobjetos planos, aumenta la expresión de la claudina-4 en las vesículas citoplásmicas. Sin embargo, en las células MDCK ZO-2 KD, este efecto es más acentuado. Este resultado sugiere que la falta de ZO-2 aumenta el reciclamiento de la claudina-4 desencadenado por la topografía del sustrato (Fig. 31B).

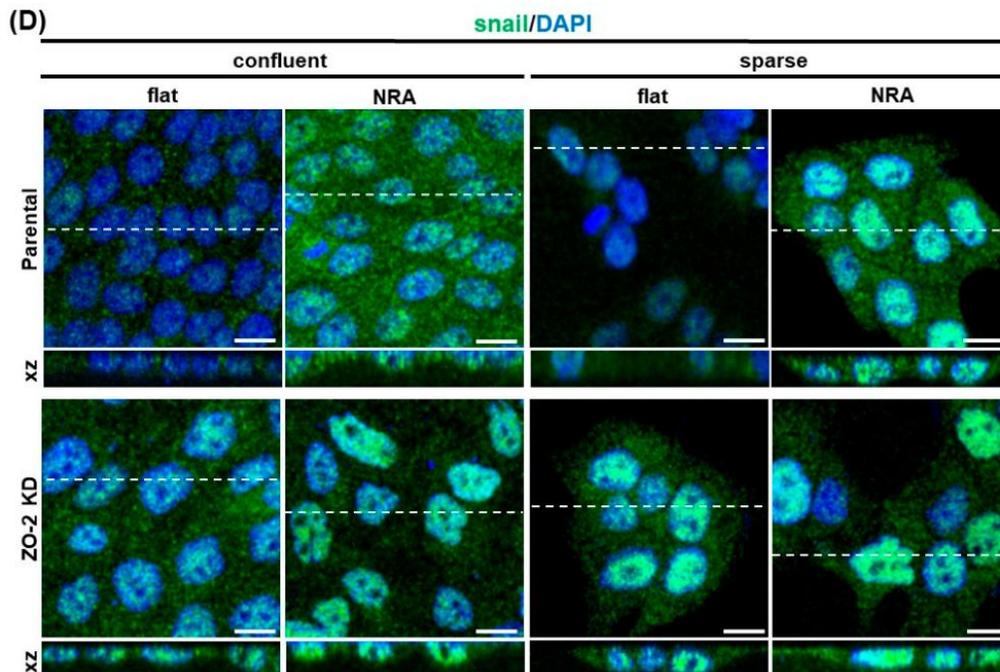
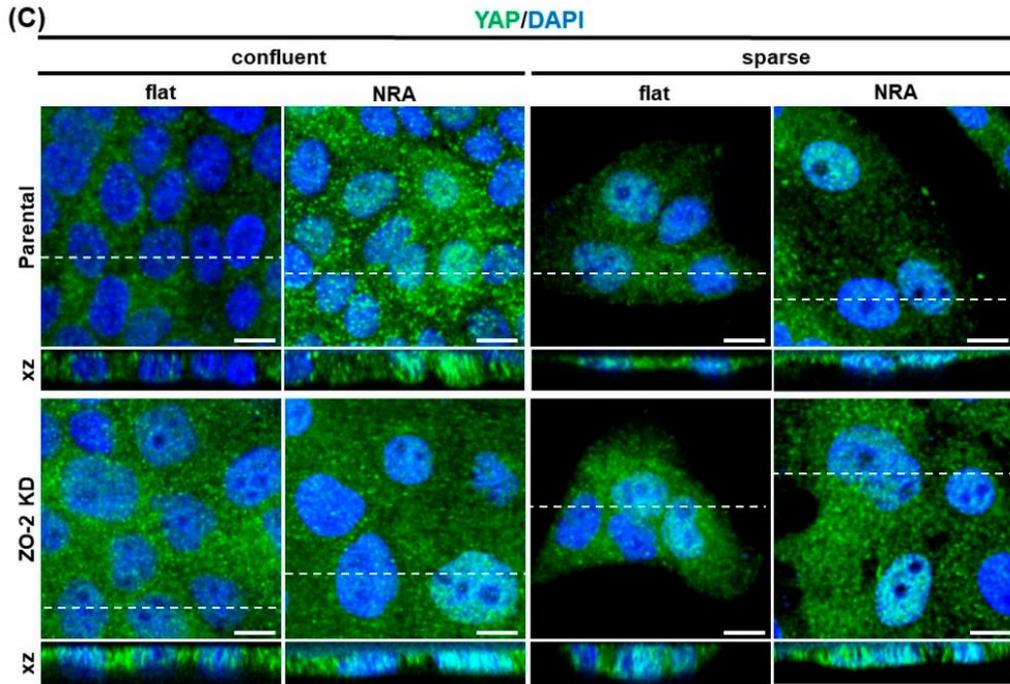
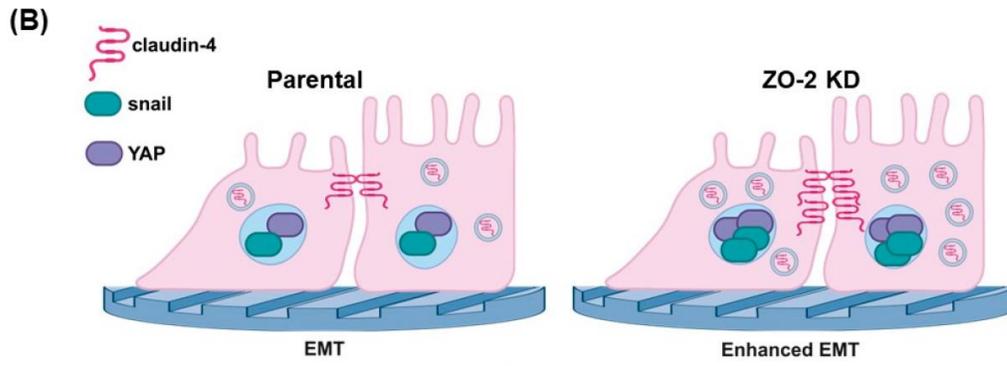
En seguida, se analizó en las células MDCK parentales y ZO-2 KD sembradas sobre NRA o cubreobjetos planos, la expresión nuclear de YAP (proteína asociada a yes), y del factor de transcripción snail. Estudiamos a snail porque es un prominente inductor de la EMT [para revisión, ver (Wang et al. 2013)], y a YAP porque cuando no se fosforila por la cinasa LATS de la vía hippo, viaja al núcleo donde regula la transcripción de genes involucrados en la EMT (Park et al. 2019). También se ha visto que YAP viaja al núcleo cuando las células están en la condición de subconfluencia (Domínguez-Calderón et al., 2016) o cuando aumenta la contracción de la actomiosina (Aragona et al., 2013). La figura 31C muestra que la falta de ZO-2 es suficiente para inducir la concentración de YAP en el

núcleo. En las células parentales este fenotipo sólo se presenta en los cultivos subconfluentes, o cuando las monocapas se siembran sobre NRA, como se mostró previamente (Park et al. 2019; Zhao et al. 2007).

La figura 31D muestra que la falta de ZO-2 induce la acumulación nuclear de snail, y que este efecto es más pronunciado cuando las células se siembran sobre NRA. Este resultado indica que la ausencia de ZO-2 acentúa la sensibilidad de las células epiteliales hacia la EMT inducida por la topografía del sustrato.

En resumen, nuestros resultados revelan que ZO-2 modula la tensión de la membrana apical y la UE, al permitir la interacción de la  $\gamma$ -actina y los microtúbulos con la UE y al propiciar el reclutamiento de JAM-A que inhibe la acumulación de p114RhoGEF y afadina en el borde celular (Fig. 26D). ZO-2 también se requiere para que las células tengan una respuesta adecuada a los cambios en la rigidez y la topografía del sustrato (Fig 30D y 31B).





**Figura 10. Al sembrar a las células MDCK ZO-2 KD sobre sustratos NRA la claudina-4 se acumula en vesículas, y la falta de ZO-2 es suficiente para inducir la concentración nuclear de YAP y snail.** Las células parentales y ZO-2 KD se sembraron a confluencia ( $5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) o subconfluencia ( $3.7 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) sobre cubreobjetos de vidrio o arreglos NRA y se analizaron 24 h después. **(A)** Las monocapas de las células MDCK parentales y ZO-2 KD se procesaron para inmunofluorescencia con un anticuerpo contra claudina-4. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Izquierda, imágenes representativas; barra, 10  $\mu$ m; derecha, cuantificación de la inmunofluorescencia. Los resultados se obtuvieron de dos experimentos independientes, donde se analizaron tres campos ópticos por condición en cada experimento. El análisis estadístico se hizo con una prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple no corregida de Fisher LSD. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  el error estándar. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  **(B)** Representación esquemática del resumen de resultados. Las células ZO-2 KD sembradas sobre sustratos NRA exhiben una acumulación más intensa de claudina-4 en vesículas citoplasmáticas en comparación con las células parentales. La ausencia de ZO-2 es suficiente para inducir la concentración nuclear de YAP y snail, y al sembrar a las células sobre sustratos NRA se incrementa este efecto. **(C)** Las monocapas de células MDCK parentales y ZO-2 KD se procesaron para inmunofluorescencia con un anticuerpo contra YAP. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Izquierda, imágenes tomadas con el microscopio confocal, con el programa ImageJ versión 1.54f. Las secciones en xz se hicieron a lo largo de las líneas blancas punteadas. Barra, 10  $\mu$ m. Derecha, cuantificación de la inmunofluorescencia. Los números entre paréntesis indican el número de núcleos analizados. Los resultados se obtuvieron de dos experimentos independientes, donde se analizaron tres campos ópticos por condición en cada experimento. El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple no corregida de Fisher LSD. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  el error estándar. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . **(D)** Las monocapas de células MDCK parentales y ZO-2 KD se procesaron para inmunofluorescencia con un anticuerpo contra snail. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Izquierda, imágenes representativas tomadas con el microscopio confocal. Las secciones en xz se hicieron a lo largo de las líneas blancas punteadas con el programa ImageJ versión 1.54f. Barra, 10  $\mu$ m. Derecha, cuantificación de la inmunofluorescencia. Los números entre paréntesis indican el número de núcleos analizados. Los resultados se obtuvieron de dos experimentos independientes, donde se analizaron tres campos ópticos por condición en cada experimento. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple no corregida de Fisher LSD. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  el error estándar. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## VII) Discusión

Los resultados de indentación con el microscopio de fuerza atómica revelaron que la rigidez de la membrana apical disminuye en ausencia de ZO-2 y se reestablece al re-expresarla o cuando los microtúbulos se estabilizan con docetaxel. Por ello, pensamos que ZO-2 mantiene la rigidez apical al facilitar la interacción de la red de microtúbulos planares no centrosomales con la UE. Además, cabe resaltar que ZO-2 es necesaria para que la cingulina se fosforile por la AMPK y ancle en la UE al cinturón de microtúbulos al que se asocian la red planar de microtúbulos apicales (Raya-Sandino et al. 2017).

Cuando se silencia a la cingulina también disminuye la rigidez de la membrana apical y esto se acompaña de una menor interacción de ZO-2 con la  $\gamma$ -actina (Rouaud et al. 2023). Por lo tanto, nosotros analizamos si la falta de ZO-2 altera la distribución de  $\beta$ -y  $\gamma$ -actina que se asocian a la UA y la UE, respectivamente (Baranwal et al. 2012). Encontramos que ZO-2 es necesaria para que la  $\gamma$ -actina se concentre en la UE y que en ausencia de ZO-2, desaparece de la membrana lateral y forma fibras de estrés. Por todas estas evidencias creemos que en las células ZO-2 KD, la disminución de la rigidez de la membrana apical se debe a la disociación de los microtúbulos y la  $\gamma$ -actina de la UE.

La formación de fibras de estrés basales de  $\gamma$ -actina en las células ZO-2 KD es interesante a la luz de reportes previos que muestran que en las células malignas hay menos fibras de estrés de  $\beta$ -actina en comparación con las células normales, y en cambio, aparecen redes de fibras de estrés de  $\gamma$ -actina [para revisión, ver (Dugina et al. 2022)]. Además, se ha visto que al aumentar la expresión de  $\gamma$ -actina se incrementa la migración celular [para revisión, ver (Dugina et al. 2022)]. Al respecto, cabe mencionar que las células ZO-2 KD exhiben una profusión de fibras estrés y una acumulación basal de NMIIA, y que se mueven más que las células parentales, pero de manera menos direccionada (Raya-Sandino et al. 2017).

En ZO-1 humana hay una región de unión a actina (ABR) (Fanning et al. 2002), dentro de la cual, se identificó un sitio mínimo de unión a actina (ABS) con una afinidad menor para la actina, que la que presentan otras proteínas de las uniones celulares como la  $\alpha$ -catenina (Belardi et al. 2020). Esta particular afinidad por la actina se cree que es esencial para mantener la función de barrera de la UE (Belardi et al. 2020). Ello se explica porque a

través de ZO-1 las claudinas se alinean con la actina polimerizada. Considerando que la actina actúa como un polímero estático, entonces al adicionar a otro polímero, en este caso de moléculas de ZO-1, si estas últimas tienen una afinidad media por el polímero estático de actina, podrán moverse con mayor libertad hasta lograr alinearse de manera óptima con el polímero estático. En cambio, si la afinidad de ZO-1 por la actina es muy alta, la alineación óptima será mucho más lenta (Belardi et al. 2020). Esto es importante en el caso de la UE donde los filamentos de las claudinas se arman y desensamblan continuamente, y se diferencia de lo que ocurre por ejemplo en la UA donde las interacciones célula-célula del complejo E-cadherina/cateninas son mucho más estables.

ZO-2 se asocia con la actina (Wittchen et al. 1999) a través de su segmento carboxilo (Itoh et al. 1999). La porción ABR de ZO-2 es semejante a la de ZO-1, y en ella hay 12 aminoácidos con una identidad del 67% con el ABS de ZO-1 (Fig. supl. 3). Sin embargo, aún no se ha probado la afinidad de la actina al ABS putativo de ZO-2.

La tensión en la UE medida con el biosensor de ZO-1 se incrementó en las células ZO-2 KD. Esto sugiere que ZO-2, a través de su heterodimerización con ZO-1 mantiene la tensión mecánica de la UE. ZO-1 es una proteína mecanosensora que exhibe dos conformaciones, una abierta y otra cerrada. La interacción del dominio ZU5 de ZO-1 con el extremo amino terminal de cingulina promueve la conformación extendida de ZO-1 lo que permite su interacción con la ocludina y el factor de transcripción ZONAB (Vasileva et al. 2022). La adquisición de la forma extendida de ZO-1 también depende de ZO-2. Así ZO-1 sólo se pliega cuando las células se tratan con blebbistatina, si ZO-2 está silenciada. Esto sugiere que la heterodimerización de ZO-1 con ZO-2 estabiliza la conformación abierta de ZO-1 (Spadaro et al. 2017). Por otro lado, la NMIIIB interacciona con ZO-1 en la UE a través de la cingulina (Rouaud et al. 2023), y cuando se silencia a ZO-2, aumenta la cantidad de ZO-1 y cingulina (Raya-Sandino et al. 2017), lo que podría ser una respuesta compensatoria a la falta de ZO-2.

La tensión de la membrana en el borde celular es fundamental para reparar el rompimiento de los filamentos de la UE. De este modo, las pequeñas rupturas de la barrera a lo largo del borde celular se reparan por llamaradas de Rho que desencadenan la

contracción de la actomiosina en el borde celular y el subsecuente reclutamiento de las proteínas de la UE al sitio dañado (Stephenson et al. 2019). El incremento en la tensión de la UE desencadenado por la ausencia de ZO-2 coincide con un aumento en la activación de Rho/ROCK previamente observado en las células MDCK ZO-2 KD (Raya-Sandino et al. 2017). Por lo tanto, el incremento en la expresión de p14RhoGEF en el borde celular de las células ZO-2 KD puede reflejar el intento de la monocapa por reparar huecos en la UE. Al respecto, se ha visto que al silenciar a ZO-1 y ZO-2 (Fanning et al. 2012; Choi et al. 2016) o solamente a ZO-2 (Hernández et al., 2007) aumenta el flujo paracelular de moléculas grandes.

La menor expresión de JAM-A en el borde celular de las células ZO-2 KD concuerda con un reporte previo que muestra que JAM-A se asocia directamente con el dominio PDZ-2 de ZO-2 (Monteiro et al. 2013). Esta observación nos indujo a analizar *in silico* la interacción entre el dominio PDZ-2 de ZO-2 y el segmento carboxilo terminal de JAM-A. Calculamos los valores de hidropatía del complejo formado por la cola de JAM-A y el dominio PDZ-2 de ZO-2, así como del dominio PDZ-2 de ZO-2 con el fin de determinar la región de unión hidrofóbica, la cual concuerda con la conformación de la estructura cristalográfica de la cola de JAM-A con el dominio PDZ-3 de ZO-1. Los contactos específicos que contribuyen a la estabilidad de esta conformación se examinaron utilizando un análisis de contacto entre proteínas con un corte de 6.5 Å. Los últimos tres residuos de JAM-A son predominantemente hidrofóbicos y se unen al bolsillo hidrofóbico del dominio PDZ-2 de ZO-2 con una energía de unión de  $-59.4 \pm 1.75$  kJ/mol. La estabilidad y la conformación del complejo formado por la cola de JAM-A y el dominio PDZ-2 de ZO-2 es consistente con la estructura del cristal formada por el complejo de la cola de JAM-A con el dominio PDZ-3 de ZO-1 (Nomme et al. 2011).

Sabemos que JAM-A es crítica para mantener la función de barrera a las macromoléculas, ya que las células MDCK con quintuple silenciamiento de claudinas no forman filamentos de UE y pierden la barrera paracelular a los iones, pero preservan la función de barrera a moléculas grandes a menos que JAM-A también se silencie (Otani et al. 2019). Estas observaciones, junto con nuestros resultados que muestran que ZO-2 ancla a JAM-A al borde celular, indican que ZO-1 y ZO-2 son cruciales no solo para la

polimerización de las claudinas y la barrera paracelular a los iones, como se demostró previamente (Umeda et al. 2006), sino para el desarrollo de la barrera paracelular a las macromoléculas.

Observamos también que la falta de ZO-2 provoca la acumulación de vinculina en las UEt. Ello confirma que las células ZO-2 KD, se encuentran en un estado de alta tensión ya que la presencia de vinculina en estas uniones depende de la conformación estirada de la  $\alpha$ -catenina que ocurre por la contracción de la NMII (Cho et al., 2022).

En los invertebrados también se han identificado proteínas mecanosensoras asociadas a las uniones célula-célula. En el disco imaginal del ala de *Drosophila*, la proliferación celular heterogénea genera una distribución dispar de la tensión celular, donde en el centro del disco hay una alta densidad y las células están comprimidas, mientras que las células de la periferia están estiradas y a baja densidad. El estiramiento de las células aumenta la tensión en las uniones celulares, lo que se evidencia por un incremento en la miosina fosforilada (LeGoff et al., 2013). Cuando no hay tensión, la cinasa Warts, ortóloga de LATS en vertebrados, fosforila a Yorkie (Yki), el ortólogo de YAP, impidiendo su ingreso al núcleo. Al aumentar la tensión en las células del disco imagal, Jub se recluta a la UA donde secuestra a Warts. Esto hace que Yki no se fosforile y entre al núcleo donde promueve la proliferación celular. Jub se recluta a la UA por la  $\alpha$ -catenina. Así, cuando se tensa el citoesqueleto de actomiosina la  $\alpha$ -catenina se estira induciéndose su conformación abierta que expone los dominios de unión a Jub. El silenciamiento de Yki o Jub rescata el crecimiento excesivo del ala de *Drosophila*, por lo que se concluye que la  $\alpha$ -catenina es una proteína mecanosensora que controla el crecimiento del disco imagal a través de los efectores de la vía Hippo (Sarpal et al., 2019) [para revisión ver, (Agarwal y Zaidel-Bar, 2021)].

La tensión en la membrana lateral que se regula por la interacción de la actomiosina con el complejo de la E-cadherina/ $\beta$ -catenina/ $\alpha$ -catenina no se altera por la ausencia de ZO-2. Esto indica que ZO-2 regula la tensión a nivel de la UE y no a nivel de la UA. En contraste, la depleción de ZO-1 reduce la tensión de la cadherina vascular endotelial (VE-cadherina) en las células endoteliales de la microvasculatura de la dermis humana (Tornavaca et al. 2015). Esta diferencia se puede deber a que ZO-1 y ZO-2

comparten algunas funciones, pero no son completamente redundantes, y también a la forma plana de las células endoteliales que hace que en la membrana lateral de los endotelios se entremezclen la UE y la UA, haciendo difícil la distinción espacial entre ellas (Wallez y Huber 2008).

En las células ZO-2 KD sembradas sobre hidrogeles de 20 kPa observamos la formación de hoyos. Esto indica que la monocapa está sometida a una alta tensión, ya que los huecos no se forman en las monocapas de las células parentales y sólo aparecen en las células MDCK sembradas sobre hidrogeles suaves de 2.3 a 8.6 kPa que acumulan vinculina en las uniones intercelulares (Sonam et al. 2023).

La rigidez de la MEC es un parámetro que impacta significativamente el comportamiento celular [para revisión, ver (Handorf et al. 2015)]. Así durante el envejecimiento, la rigidez de los vasos es una característica de la aterosclerosis (Huynh et al. 2011). También, en las enfermedades fibróticas como la fibrosis pulmonar (Suki y Bates 2008), y la cirrosis hepática (Issa et al. 2004) se observa una deposición excesiva de MEC que indica un incremento en la rigidez del tejido epitelial y la disfunción de los órganos. Además, la pérdida de la sensibilidad a la rigidez del sustrato permite la supervivencia de las células metastáticas que invaden tejidos con diferente grado de rigidez (Indra y Beningo, 2011). En esta tesis, analizamos si la falta de ZO-2 altera la elongación celular y la formación de agregados celulares cuando se modifica la rigidez del sustrato.

Observamos que las células que carecen de ZO-2 siguen siendo sensibles a la rigidez del sustrato y a su recubrimiento ya que no hubo elongación celular en las células sembrada sobre hidrogeles de 1 kPa recubiertos con colágeno tipo IV o fibronectina, independientemente de la presencia de ZO-2. Una falta de elongación similar se encontró previamente en hepatocitos primarios sembrados sobre hidrogeles de 1 kPa (Serna-Márquez et al. 2020). Además, se observó que tanto las células parentales como las células ZO-2 KD sembradas sobre hidrogeles de 20 kPa se elongan más sobre colágeno IV que sobre las superficies recubiertas con fibronectina. Sin embargo, las células ZO-2 KD, en comparación con las células parentales, retardan su elongación. Para explicar esta

diferencia sería importante en el futuro hacer experimentos de microscopía de fuerza de tracción (TFM) en las células parentales y ZO-2 KD.

El retraso en la elongación de las células ZO-2 KD sembradas sobre sustratos de 20 kPa se puede deber a la disminución de integrina  $\beta 1$  previamente reportada en las células ZO-2 KD (Raya-Sandino et al. 2017). Al respecto, es importante mencionar que las células MDCK expresan a los siguientes heterodímeros de integrinas:  $\beta 1\alpha 2$ ,  $\beta 1\alpha 3$ ,  $\beta 1\alpha x$ ,  $\beta 3\alpha v$  y  $\beta 4\alpha 6$  (Schoenenberger et al. 1994). Por otra parte, la lenta elongación de las células que carecen de ZO-2 también puede deberse a que en ellas la dupla RhoA/ROCK está sobreactivada, lo que podría disminuir su capacidad de respuesta a la rigidez del sustrato, como sucede con la falta a la activación de RhoA por el ácido lisofosfatídico (LPA) en estas células (Raya-Sandino et al. 2017).

Las células parentales y ZO-2 KD se agregan menos en los hidrogeles de 1 kPa que en los de 20 kPa. Esto concuerda con lo previamente observado en hepatocitos (Serna-Márquez et al. 2020). Las células parentales y ZO-2 KD forman más agregados en los hidrogeles de 20 kPa recubiertos con fibronectina que en los de colágeno IV. Sin, embargo la formación de agregados celulares de mayor tamaño se retrasa en las células ZO-2 KD, tal vez, por la elevada tensión en las UEs presente en estas células. Por otro lado, este resultado indica que ZO-2 facilita la adhesión célula-célula, lo cual se espera de una proteína de la UE, y concuerda con un resultado previo que muestra que la falta de ZO-2 ensancha el espacio entre las células adyacentes por debajo de las UEs (Hernandez et al. 2007), y favorece su disgregación después del tratamiento con tripsina (Raya-Sandino et al. 2017).

Finalmente, probamos si la falta de ZO-2 afecta la sensibilidad de las células MDCK a sustratos con topografía a nanoescala de fibras semejantes en tamaño y organización a las de la MEC. Observamos que, en comparación con las células parentales, en las células ZO-2 KD aumenta la presencia de claudina-4 en vesículas citoplásmicas, lo que indica que la ausencia de ZO-2 en las células cultivadas sobre NRA provoca inestabilidad en la UE favoreciendo la internalización de la claudina-4. También, encontramos que la falta de ZO-2 es suficiente para inducir la concentración nuclear de YAP, independientemente de la densidad celular o la topografía del sustrato. Este resultado

concuenda con observaciones previas que muestran que la asociación de ZO-2 con LATS, la cinasa responsable de fosforilar a YAP y bloquear su importación al núcleo, promueve el reclutamiento de LATS al borde celular y su activación (González-González et al. 2022). Así mismo, observamos que la falta de ZO-2 favorece la concentración nuclear de snail, lo que sugiere que se acentúa la sensibilidad de las células a la EMT. Por todo ello, se concluye que ZO-2 es muy importante para el mantenimiento del fenotipo epitelial.

## **VIII) Conclusión**

ZO-2 modula la tensión mecánica en las células epiteliales. La ausencia de ZO-2 en las células MDCK produce inestabilidad de los microtúbulos y reduce la concentración de  $\gamma$ -actina en la UE, lo que puede explicar la disminución de la tensión en la membrana apical. El análisis *in silico* confirma la interacción del dominio PDZ-2 de ZO-2 con la cola de JAM-A. Por ello, la falta de ZO-2 inhibe el anclaje de JAM-A al borde celular, y produce la acumulación de p114RhoGEF y afadina lo que aumenta la tensión en la UE, pero no en la UA. Este incremento de tensión de la UE en las células ZO-2 KD favorece la formación de huecos en las células sembradas sobre hidrogeles de 20 kPa. La ausencia de ZO-2 también retarda la elongación celular y la formación de agregados celulares en las monocapas sembradas sobre hidrogeles y exacerba la EMT desencadenada por la topografía del substrato.

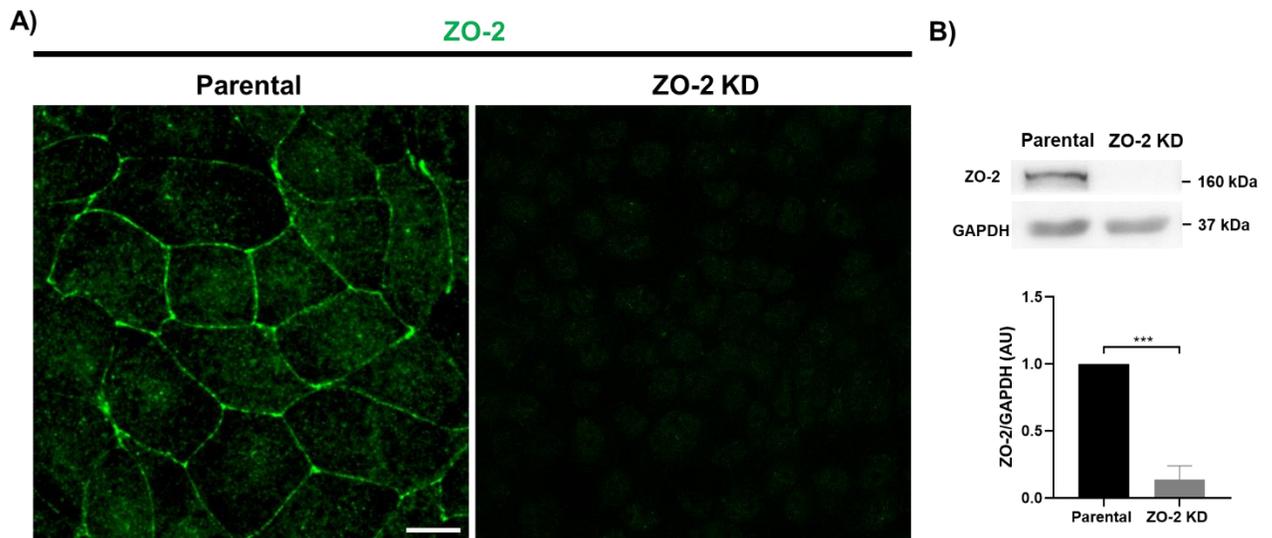
## **IX) Perspectivas**

Eliminar en el PDZ-2 de hZO-2 el segmento que va de Y319 a V329 que interacciona con JAM-A para ver el efecto de la falta de asociación ZO-2/JAM-A sobre la formación de la UE y el desarrollo de la RET.

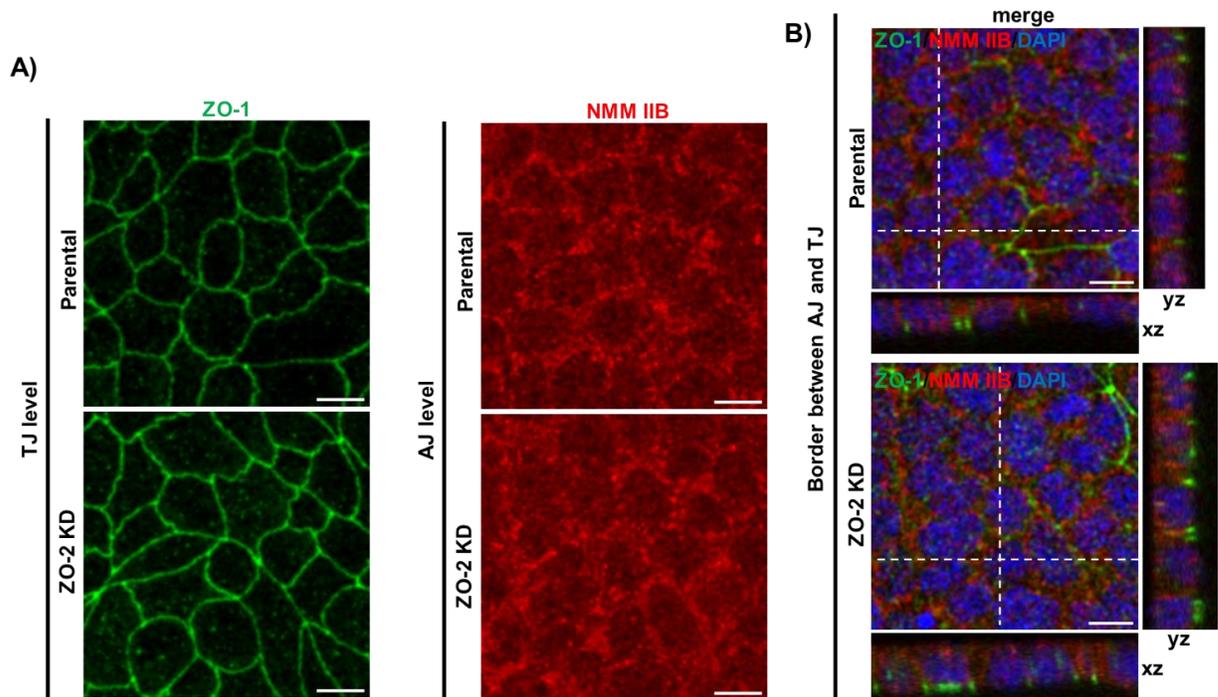
Hacer un análisis de microscopía de fuerza de tracción en las células parentales y ZO-2 KD para medir si la ausencia de ZO-2 altera la fuerza de adhesión de la célula al substrato.

Analizar el efecto de la eliminación/mutación del sitio de unión a actina en ZO-2 sobre la función de barrera de la UE.

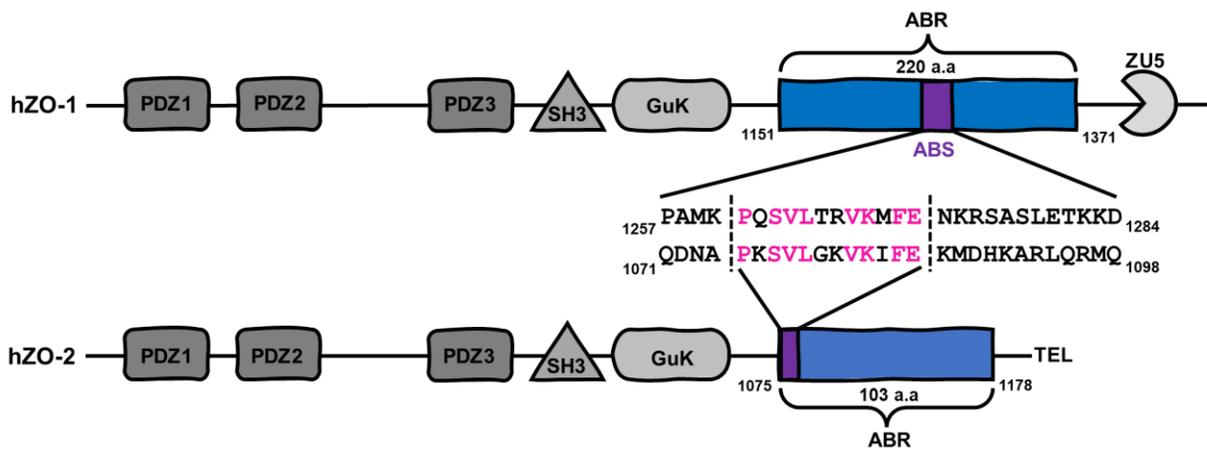
### IX) Figuras suplementarias



**Figura suplementaria 1. ZO-2 no se detecta en las células ZO-2 KD por inmunofluorescencia o Western Blot.** **A)** Imagen representativa de la inmunofluorescencia de ZO-2 en las células parentales y ZO-2. **B)** Detección de ZO-2 por Western blot en las células parentales y ZO-2 KD. Como control de carga se utilizó a GAPDH. El análisis estadístico se realizó con una prueba de t de Student. Los resultados muestran la media  $\pm$  la desviación estándar, \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura suplementaria 2. La falta de ZO-2 no afecta la concentración de la NMIIB en la UA de las células epiteliales.** Detección por inmunofluorescencia de ZO-1 y NMIIB en monocapas de células parentales y ZO-2 KD. **(A)** Imágenes representativas de dos experimentos independientes. Se apilaron los cortes ópticos a nivel de la UE o de la UA con image J versión 1.54f. **(B)** Superposición de imágenes hecha con image J versión 1.54f. de una sección tomada con el confocal en el límite entre la UE y la UA. Las secciones en los planos yz y xz se hicieron en la zona indicada con las líneas blancas punteadas. Barra, 10  $\mu$ m.



Actin Binding Site (ABS)  
Actin Binding Region (ABR)

**Figura suplementaria 3. hZO-2 tiene un sitio putativo de unión a actina similar al de hZO-1.** El esquema ilustra la búsqueda en BLAST (NCBI) que compara la región de unión a actina (ABR) y el sitio de unión a actina (ABS) presentes en hZO-1 (Uniprot: Q07157) con las putativas en ZO-2 (Uniprot: Q9UDY2).

## X) Referencias

- Abraham, Mark James, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, and Erik Lindahl. 2015. 'GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers', *SoftwareX*, 1-2: 19-25.
- Adachi, M., A. Inoko, M. Hata, K. Furuse, K. Umeda, M. Itoh, and S. Tsukita. 2006. 'Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein', *Mol Cell Biol*, 26: 9003-15.
- Agarwal P, Zaidel-Bar R. Mechanosensing in embryogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*. 2021 Feb;68:1-9. DOI: 10.1016/j.ceb.2020.08.007. PMID: 32898827.
- Aguilar-Cuenca, R., C. Llorente-Gonzalez, J. R. Chapman, V. C. Talayero, M. Garrido-Casado, C. Delgado-Arevalo, M. Millan-Salanova, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, J. R. Sellers, S. M. Heissler, and M. Vicente-Manzanares. 2020. 'Tyrosine Phosphorylation of the Myosin Regulatory Light Chain Controls Non-muscle Myosin II Assembly and Function in Migrating Cells', *Curr Biol*, 30: 2446-58 e6.
- Aijaz, S., F. D'Atri, S. Citi, M. S. Balda, and K. Matter. 2005. 'Binding of GEF-H1 to the tight junction-associated adaptor cingulin results in inhibition of Rho signaling and G1/S phase transition', *Dev Cell*, 8: 777-86.
- Ali, M. Y., Chuang, C. Y. and Saif, M. T. 2014. 'Reprogramming cellular phenotype by soft collagen gels', *Soft Matter*, 10: 8829-37.
- Amaya, E., L. Alarcón, D. Martín-Tapia, F. Cuellar-Pérez, M. Cano-Cortina, J. M. Ortega-Olvera, B. Cisneros, A. J. Rodríguez, G. Gamba, and L. González-Mariscal. 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', *Mol Biol Cell*, 30: 2377-98.
- Aragona M, Panciera T, Manfrin A, Giullitti S, Michielin F, Elvassore N, Dupont S, Piccolo S. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell*. 2013 Aug 29;154(5):1047-1059. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.042. Epub 2013 Aug 15. PMID: 23954413.
- Assémat, E., E. Bazellières, E. Pallesi-Pocachard, A. Le Bivic, and D. Massey-Harroche. 2008. 'Polarity complex proteins', *Biochim Biophys Acta*, 1778: 614-30.
- Avila-Flores, A., Rendon-Huerta, E., Moreno, J., Islas, S., Betanzos, A., Robles-Flores, M. and Gonzalez-Mariscal, L. 2001. 'Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C', *Biochem J*, 360: 295-304.
- Awadia S., Huq F., Arnold T. R., Goicoechea S. M., Sun Y. J., Hou T., Kreider-Letterman G., Massimi P., Banks L., Fuentes E. J., Miller A. L. and Garcia-Mata R. 2019.

- 'SGEF forms a complex with Scribble and Dlg1 and regulates epithelial junctions and contractility', *J Cell Biol*, 218: 2699-725.
- Ayala-Torres, C., S. M. Krug, J. D. Schulzke, R. Rosenthal, and M. Fromm. 2019. 'Tricellulin Effect on Paracellular Water Transport', *Int J Mol Sci*, 20.
- Balda, M. S., J. A. Whitney, C. Flores, S. González, M. Cereijido, and K. Matter. 1996. 'Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein', *J Cell Biol*, 134: 1031-49.
- Ban E, Wang H, Franklin JM, Liphardt JT, Janmey PA, Shenoy VB. Strong triaxial coupling and anomalous Poisson effect in collagen networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Apr 2;116(14):6790-6799. doi: 10.1073/pnas.1815659116. Epub 2019 Mar 20. PMID: 30894480; PMCID: PMC6452734.
- Baranwal, S., N. G. Naydenov, G. Harris, V. Dugina, K. G. Morgan, C. Chaponnier, and A. I. Ivanov. 2012. 'Nonredundant roles of cytoplasmic  $\beta$ - and  $\gamma$ -actin isoforms in regulation of epithelial apical junctions', *Mol Biol Cell*, 23: 3542-53.
- Barber, T., Esteban-Pretel, G., Marin, M. P. and Timoneda, J. 2014. 'Vitamin a deficiency and alterations in the extracellular matrix', *Nutrients*, 6: 4984-5017.
- Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg. 2010. 'Integrins', *Cell Tissue Res*, 339: 269-80.
- Barri Gumbiner, Theodore Lowenkopf and Dale Apatira. 1991. 'Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 3460-64.
- Bazard, Parveen, Robert D. Frisina, Alejandro A. Acosta, Sneha Dasgupta, Mark A. Bauer, Xiaoxia Zhu, and Bo Ding. 2021. 'Roles of Key Ion Channels and Transport Proteins in Age-Related Hearing Loss', *Int J Mol Sci*, 22: 6158.
- Belardi, B., T. Hamkins-Indik, A. R. Harris, J. Kim, K. Xu, and D. A. Fletcher. 2020a. 'A Weak Link with Actin Organizes Tight Junctions to Control Epithelial Permeability', *Dev Cell*, 54: 792-804.e7.
- Belkin, A. M., and M. A. Stepp. 2000. 'Integrins as receptors for laminins', *Microsc Res Tech*, 51: 280-301.
- Ben-Yosef, T., I. A. Belyantseva, T. L. Saunders, E. D. Hughes, K. Kawamoto, C. M. Van Itallie, L. A. Beyer, K. Halsey, D. J. Gardner, E. R. Wilcox, J. Rasmussen, J. M. Anderson, D. F. Dolan, A. Forge, Y. Raphael, S. A. Camper, and T. B. Friedman. 2003. 'Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration', *Hum Mol Genet*, 12: 2049-61.
- Betanzos, A, Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J and Gonzalez-Mariscal, L. 2004. 'The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells', *Exp Cell Res*, 292: 51-66.
- Beutel O., Maraspin, R., Pombo-Garcia K., Martin-Lemaitre C. and Honigsmann A. 2019. 'Phase Separation of Zonula Occludens Proteins Drives Formation of Tight Junctions', *Cell*, 179: 923-36 e11.
- Bissell, M. J., and D. Radisky. 2001. 'Putting tumours in context', *Nat Rev Cancer*, 1: 46-54.
- Borghini, Nicolas, Maria Sorokina, Olga G. Shcherbakova, William I. Weis, Beth L. Pruitt, W. James Nelson, and Alexander R. Dunn. 2012. 'E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts

- upon externally applied stretch', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 12568-73.
- Brückner, Bastian Rouven, and Andreas Janshoff. 2018. 'Importance of integrity of cell-cell junctions for the mechanics of confluent MDCK II cells', *Sci Rep*, 8: 14117.
- Buchert, M., C. Poon, J. A. King, T. Baechi, G. D'Abaco, F. Hollande, and C. M. Hovens. 2007. 'AF6/s-afadin is a dual residency protein and localizes to a novel subnuclear compartment', *J Cell Physiol*, 210: 212-23.
- Bussi, G., D. Donadio, and M. Parrinello. 2007. 'Canonical sampling through velocity rescaling', *J Chem Phys*, 126: 014101.
- Carminati, Manuel, Sara Gallini, Laura Pirovano, Andrea Alfieri, Sara Bisi, and Marina Mapelli. 2016. 'Concomitant binding of Afadin to LGN and F-actin directs planar spindle orientation', *Nature Structural & Molecular Biology*, 23: 155-63.
- Cartagena-Rivera, A. X., Van Itallie, C. M., Anderson, J. M. and Chadwick, R. S. 2017. 'Apical surface supracellular mechanical properties in polarized epithelium using noninvasive acoustic force spectroscopy', *Nat Commun*, 8: 1030.
- Cereijido, M. and Anderson, J. M. 2001. *Tight Junctions*, (Cell biology). (USA).
- Cereijido, M., I. Meza, and A. Martínez-Palomo. 1981. 'Occluding junctions in cultured epithelial monolayers', *Am J Physiol*, 240: C96-102.
- Chamorro, D., Alarcon, L., Ponce, A., Tapia, R., Gonzalez-Aguilar, H., Robles-Flores, M., Mejia-Castillo, T., Segovia, J., Bandala, Y., Juaristi, E. and Gonzalez-Mariscal, L. 2009. 'Phosphorylation of zona occludens-2 by protein kinase C epsilon regulates its nuclear exportation', *Mol Biol Cell*, 20: 4120-9.
- Cho, Yuma, Daichi Haraguchi, Kenta Shigetomi, Kenji Matsuzawa, Seiichi Uchida, and Junichi Ikenouchi. 2022b. 'Tricellulin secures the epithelial barrier at tricellular junctions by interacting with actomyosin', *Journal of Cell Biology*, 221.
- Choi W., Acharya B. R., Peyret G., Fardin M. A., Mege R. M., Ladoux B., Yap A. S., Fanning A. S. and Peifer M. 2016. 'Remodeling the zonula adherens in response to tension and the role of afadin in this response', *J Cell Biol*, 213: 243-60.
- Chrifi, I., D. Hermkens, M. M. Brandt, C. G. M. van Dijk, P. E. Bürgisser, R. Haasdijk, J. Pei, E. H. M. van de Kamp, C. Zhu, L. Blonden, J. M. Kros, D. J. Duncker, H. J. Duckers, and C. Cheng. 2017. 'Cgln1, an endothelial junction complex protein, regulates GTPase mediated angiogenesis', *Cardiovasc Res*, 113: 1776-88.
- Citi S, Fromm M, Furuse M, González-Mariscal L, Nusrat A, Tsukita S, Turner JR. A short guide to the tight junction. *J Cell Sci*. 2024 May 1;137(9):jcs261776. doi: 10.1242/jcs.261776. Epub 2024 May 7. PMID: 38712627.
- Citi, S. 2019. 'The mechanobiology of tight junctions', *Biophys Rev*, 11: 783-93.
- Citi S., Guerrero D., Spadaro D. and Shah J. 2014. 'Epithelial junctions and Rho family GTPases: the zonular signalosome', *Small GTPases*, 5: 1-15.
- Citi, Sandra, Helena Sabanay, Ross Jakes, Benjamin Geiger, and John Kendrick-Jones. 1988. 'Cingulin, a new peripheral component of tight junctions', *Nature*, 333: 272-76.
- Cording, J., J. Berg, N. Käding, C. Bellmann, C. Tscheik, J. K. Westphal, S. Milatz, D. Günzel, H. Wolburg, J. Piontek, O. Huber, and I. E. Blasig. 2013. 'In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization', *J Cell Sci*, 126: 554-64.
- Cummins, P. M. 2012. 'Occludin: one protein, many forms', *Mol Cell Biol*, 32: 242-50.

- Cunningham, S. A., J. M. Rodriguez, M. P. Arrate, T. M. Tran, and T. A. Brock. 2002. 'JAM2 interacts with alpha4beta1. Facilitation by JAM3', *J Biol Chem*, 277: 27589-92.
- Curry, J. N., M. Saurette, M. Askari, L. Pei, M. B. Filla, M. R. Beggs, P. S. Rowe, T. Fields, A. J. Sommer, C. Tanikawa, Y. Kamatani, A. P. Evan, M. Totonchi, R. T. Alexander, K. Matsuda, and A. S. Yu. 2020. 'Claudin-2 deficiency associates with hypercalciuria in mice and human kidney stone disease', *J Clin Invest*, 130: 1948-60.
- Dai, J., H. P. Ting-Beall, and M. P. Sheetz. 1997. 'The secretion-coupled endocytosis correlates with membrane tension changes in RBL 2H3 cells', *J Gen Physiol*, 110: 1-10.
- Darden, Tom, Darrin York, and Lee Pedersen. 1993. 'Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems', *The Journal of Chemical Physics*, 98: 10089-92.
- DeLano, Warren L. 2002. 'Pymol: An open-source molecular graphics tool', *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr*, 40: 82-92.
- Deshwar, A. R., C. Cytrynbaum, H. Murthy, J. Zon, D. Chitayat, J. Volpatti, R. Newbury-Ecob, S. Ellard, H. L. Allen, E. P. Yu, R. Noche, S. Walker, S. W. Scherer, S. Mahida, C. M. Elitt, G. Nicolas, A. Goldenberg, P. Saugier-veber, F. Lecoquierre, I. Dabaj, H. Meddaugh, M. Marble, K. M. Keppler-Noreuil, L. Drayson, K. W. Barañano, A. Chassevent, K. Agre, P. Létard, F. Bilan, G. Le Guyader, A. Laquerrière, K. Ramsey, L. Henderson, L. Brady, M. Tarnopolsky, M. Bainbridge, J. Friedman, Y. Capri, L. Athayde, F. Kok, J. Gurgel-Giannetti, L. L. P. Ramos, S. Blaser, J. J. Dowling, and R. Weksberg. 2023. 'Variants in CLDN5 cause a syndrome characterized by seizures, microcephaly and brain calcifications', *Brain*, 146: 2285-97.
- Dobrosotskaya, Irina, Rodney K. Guy, and Guy L. James. 1997. 'MAGI-1, a Membrane-associated Guanylate Kinase with a Unique Arrangement of Protein-Protein Interaction Domains\*', *Journal of Biological Chemistry*, 272: 31589-97.
- Dominguez-Calderon, A., A. Avila-Flores, A. Ponce, E. Lopez-Bayghen, J. V. Calderon-Salinas, J. Luis Reyes, B. Chavez-Munguia, J. Segovia, C. Angulo, L. Ramirez, H. Gallego-Gutierrez, L. Alarcon, D. Martin-Tapia, P. Bautista-Garcia, and L. Gonzalez-Mariscal. 2016. 'ZO-2 silencing induces renal hypertrophy through a cell cycle mechanism and the activation of YAP and the mTOR pathway', *Mol Biol Cell*, 27: 1581-95.
- Dowdell, A. S., I. M. Cartwright, M. S. Goldberg, R. Kostecky, T. Ross, N. Welch, L. E. Glover, and S. P. Colgan. 2020. 'The HIF target ATG9A is essential for epithelial barrier function and tight junction biogenesis', *Mol Biol Cell*, 31: 2249-58.
- Dugina, V. B., G. S. Shagieva, and P. B. Kopnin. 2022. 'Cytoplasmic Beta and Gamma Actin Isoforms Reorganization and Regulation in Tumor Cells in Culture and Tissue', *Front Pharmacol*, 13: 895703.
- Dugina, Vera, Ingrid Zwaenepoel, Giulio Gabbiani, Sophie Clément, and Christine Chaponnier. 2009. 'β- and γ-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity', *J Cell Sci*, 122: 2980-88.
- Eble, J. A. and Niland, S. 2019. 'The extracellular matrix in tumor progression and metastasis', *Clin Exp Metastasis*, 36: 171-98.

- Ebnet, K., A. Suzuki, Y. Horikoshi, T. Hirose, M. K. Meyer Zu Brickwedde, S. Ohno, and D. Vestweber. 2001. 'The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM)', *Embo j*, 20: 3738-48.
- Ebrahim S., Fujita T., Millis B. A., Kozin E., Ma X., Kawamoto S., Baird M. A., Davidson M., Yonemura S., Hisa Y., Conti M. A., Adelstein R. S., Sakaguchi H. and Kachar B. 2013. 'NMII forms a contractile transcellular sarcomeric network to regulate apical cell junctions and tissue geometry', *Curr Biol*, 23: 731-6.
- Eckert, J. J., and T. P. Fleming. 2008. 'Tight junction biogenesis during early development', *Biochim Biophys Acta*, 1778: 717-28.
- Efthymiou, G., Saint, A., Ruff, M., Rekad, Z., Ciais, D. and Van Obberghen-Schilling, E. 2020. 'Shaping Up the Tumor Microenvironment With Cellular Fibronectin', *Front Oncol*, 10: 641.
- Elbediwy, A., C. Zihni, S. J. Terry, P. Clark, K. Matter, and M. S. Balda. 2012. 'Epithelial junction formation requires confinement of Cdc42 activity by a novel SH3BP1 complex', *J Cell Biol*, 198: 677-93.
- Espina, J.A., Marchant, C.L. and Barriga, E.H. (2022), Durotaxis: the mechanical control of directed cell migration. *FEBS J*, 289: 2736-2754. <https://doi.org/10.1111/febs.15862>
- Essmann, Ulrich, Lalith Perera, Max L. Berkowitz, Tom Darden, Hsing Lee, and Lee G. Pedersen. 1995. 'A smooth particle mesh Ewald method', *Journal of Chemical Physics*, 103: 8577-93.
- Fanning, A. S., T. Y. Ma, and J. M. Anderson. 2002. 'Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1', *FASEB J*, 16: 1835-7.
- Fanning A. S., Van Itallie C. M. and Anderson J. M. 2012. 'Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia', *Mol Biol Cell*, 23: 577-90.
- Florian, P., S. Amasheh, M. Lessidrensky, I. Todt, A. Bloedow, A. Ernst, M. Fromm, and A. H. Gitter. 2003. 'Claudins in the tight junctions of stria vascularis marginal cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 304: 5-10.
- Fredriksson-Lidman K., Van Itallie C. M., Tietgens A. J., and Anderson, J. M. 2017. 'Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 (SORBS2) is a component of the acto-myosin ring at the apical junctional complex in epithelial cells', *PLoS One*, 12: e0185448.
- Fujita, Yasuyuki, and Catherine Hogan. 2006. 'Adherens Junction.' in, *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita. 2002. 'Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice', *J Cell Biol*, 156: 1099-111.
- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1993. 'Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions', *J Cell Biol*, 123: 1777-88.
- Furuse, M., M. Itoh, T. Hirase, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1994. 'Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions', *J Cell Biol*, 127: 1617-26.

- Furuse, M., H. Sasaki, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998. 'A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts', *J Cell Biol*, 143: 391-401.
- Gallego-Gutiérrez, H., L. González-González, L. Ramírez-Martínez, E. López-Bayghen, and L. González-Mariscal. 2021. 'Tight junction protein ZO-2 modulates the nuclear accumulation of transcription factor TEAD', *Mol Biol Cell*, 32: 1347-58.
- Gao, L., and I. G. Macara. 2004. 'Isoforms of the polarity protein par6 have distinct functions', *J Biol Chem*, 279: 41557-62.
- Geiger B., Yamada K. M. 2011. 'Molecular architecture and function of matrix adhesions', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- Gonschior, H., C. Schmied, R. E. Van der Veen, J. Eichhorst, N. Himmerkus, J. Piontek, D. Günzel, M. Bleich, M. Furuse, V. Haucke, and M. Lehmann. 2022. 'Nanoscale segregation of channel and barrier claudins enables paracellular ion flux', *Nat Commun*, 13: 4985.
- González-González, Laura, Helios Gallego-Gutiérrez, Dolores Martin-Tapia, José Everardo Avelino-Cruz, Christian Hernández-Guzmán, Sergio Israel Rangel-Guerrero, Luis Marat Alvarez-Salas, Erika Garay, Bibiana Chávez-Munguía, María Concepción Gutiérrez-Ruiz, Dinorah Hernández-Melchor, Esther López-Bayghen, and Lorenza González-Mariscal. 2022. 'ZO-2 favors Hippo signaling, and its re-expression in the steatotic liver by AMPK restores junctional sealing', *Tissue Barriers*, 10: 1994351.
- Gonzalez-Mariscal L, Quiros M, Diaz-Coranguez M and Bautista P. 2012. 'Tight Junctions', *Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology InTech*.
- González-Mariscal, L., J. Miranda, H. Gallego-Gutiérrez, M. Cano-Cortina, and E. Amaya. 2020. 'Relationship between apical junction proteins, gene expression and cancer', *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862: 183278.
- Gonzalez-Mariscal L., Miranda J., Raya-Sandino A., Dominguez-Calderon A and Cuellar-Perez, F. 2017. 'ZO-2, a tight junction protein involved in gene expression, proliferation, apoptosis, and cell size regulation', *Ann N Y Acad Sci*, 1397: 35-53.
- Gonzalez-Mariscal, Lorenza, Jael Miranda, Jose Mario Ortega-Olvera, Helios Gallego-Gutierrez, Arturo Raya-Sandino, and Orlando Vargas-Sierra. 2016. 'Involvement of Tight Junction Plaques Proteins in Cancer', *Current Pathobiology Reports*, 4: 117-33.
- Gonzalez-Mariscal, Miguel Quiros, Mónica Diaz-Coranguez and Pablo Bautista. 2012. 'Tight Junctions', *Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology InTech*.
- Gow, A., C. Davies, C. M. Southwood, G. Frolenkov, M. Chrustowski, L. Ng, D. Yamauchi, D. C. Marcus, and B. Kachar. 2004. 'Deafness in Claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function', *J Neurosci*, 24: 7051-62.
- Gow, A., C. M. Southwood, J. S. Li, M. Pariali, G. P. Riordan, S. E. Brodie, J. Danias, J. M. Bronstein, B. Kachar, and R. A. Lazzarini. 1999. 'CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice', *Cell*, 99: 649-59.
- Gowers, Richard, Max Linke, Jonathan Barnoud, Tyler Reddy, Manuel Melo, Sean Seyler, Jan Domański, David Dotson, Sébastien Buchoux, Ian Kenney, and Oliver Beckstein. "MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations." In.: SciPy.

- Grashoff, Carsten, Brenton D. Hoffman, Michael D. Brenner, Ruobo Zhou, Maddy Parsons, Michael T. Yang, Mark A. McLean, Stephen G. Sligar, Christopher S. Chen, Taekjip Ha, and Martin A. Schwartz. 2010. 'Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics', *Nature*, 466: 263-66.
- Guillemot, L., D. Guerrero, D. Spadaro, R. Tapia, L. Jond, and S. Citi. 2014. 'MgcRacGAP interacts with cingulin and paracingulin to regulate Rac1 activation and development of the tight junction barrier during epithelial junction assembly', *Mol Biol Cell*, 25: 1995-2005.
- Guillemot, L., E. Hammar, C. Kaister, J. Ritz, D. Caille, L. Jond, C. Bauer, P. Meda, and S. Citi. 2004. 'Disruption of the cingulin gene does not prevent tight junction formation but alters gene expression', *J Cell Sci*, 117: 5245-56.
- Guillemot, L., S. Paschoud, L. Jond, A. Foglia, and S. Citi. 2008. 'Paracingulin regulates the activity of Rac1 and RhoA GTPases by recruiting Tiam1 and GEF-H1 to epithelial junctions', *Mol Biol Cell*, 19: 4442-53.
- Guillemot, Laurent, Yann Schneider, Paola Brun, Ignazio Castagliuolo, Daniela Pizzuti, Diego Martines, Lionel Jond, Massimo Bongiovanni, and Sandra Citi. 2012. 'Cingulin is dispensable for epithelial barrier function and tight junction structure, and plays a role in the control of claudin-2 expression and response to duodenal mucosa injury', *J Cell Sci*, 125: 5005-14.
- Gumbiner, Lowenkopf, and Apatira. 1991. 'Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 3460-4.
- Gunzel, D., and A. S. Yu. 2013. 'Claudins and the modulation of tight junction permeability', *Physiol Rev*, 93: 525-69.
- Haas, Alexis J., Ceniz Zihni, Artur Ruppel, Christian Hartmann, Klaus Ebnet, Masazumi Tada, Maria S. Balda, and Karl Matter. 2020b. 'Interplay between Extracellular Matrix Stiffness and JAM-A Regulates Mechanical Load on ZO-1 and Tight Junction Assembly', *Cell Rep*, 32: 107924.
- Hachet-Haas, Muriel, Noël Converset, Olivier Marchal, Hans Matthes, Sophie Gioria, Jean-Luc Galzi, and Sandra Lecat. 2006. 'FRET and colocalization analyzer--a method to validate measurements of sensitized emission FRET acquired by confocal microscopy and available as an ImageJ Plug-in', *Microsc Res Tech*, 69: 941-56.
- Hadj-Rabia, S., L. Baala, P. Vabres, D. Hamel-Teillac, E. Jacquemin, M. Fabre, S. Lyonnet, Y. De Prost, A. Munnich, M. Hadchouel, and A. Smahi. 2004. 'Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease', *Gastroenterology*, 127: 1386-90.
- Hamazaki, Yoko, Masahiko Itoh, Hiroyuki Sasaki, Mikio Furuse, and Shoichiro Tsukita. 2002. 'Multi-PDZ Domain Protein 1 (MUPP1) Is Concentrated at Tight Junctions through Its Possible Interaction with Claudin-1 and Junctional Adhesion Molecule\*', *Journal of Biological Chemistry*, 277: 455-61.
- Handorf, A. M., Zhou, Y., Halanski, M. A. and Li, W. J. 2015. 'Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression', *Organogenesis*, 11: 1-15.
- Hardin, J. 2016. 'Regulating cell-cell junctions from A to Z', *J Cell Biol*, 213: 151-3.
- Haskins, J., L. Gu, E. S. Wittchen, J. Hibbard, and B. R. Stevenson. 1998. 'ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin', *J Cell Biol*, 141: 199-208.

- Hempel, C., J. Protze, E. Altun, B. Riebe, A. Piontek, A. Fromm, I. M. Lee, T. Saleh, D. Günzel, G. Krause, and J. Piontek. 2020. 'Assembly of Tight Junction Strands: Claudin-10b and Claudin-3 Form Homo-Tetrameric Building Blocks that Polymerise in a Channel-Independent Manner', *Journal of Molecular Biology*, 432: 2405-27.
- Hernández-Guzmán, C., H. Gallego-Gutiérrez, B. Chávez-Munguía, D. Martín-Tapia, and L. González-Mariscal. 2021. 'Zonula occludens 2 and Cell-Cell Contacts Are Required for Normal Nuclear Shape in Epithelia', *Cells*, 10.
- Hernandez, S., B. Chavez Munguia, and L. Gonzalez-Mariscal. 2007. 'ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture', *Exp Cell Res*, 313: 1533-47.
- Higashi, Tomohito, and Mikio Furuse. 2022. 'Tricellular Tight Junctions.' in Lorenza González-Mariscal (ed.), *Tight Junctions* (Springer International Publishing: Cham).
- Hirabayashi, S., M. Tajima, I. Yao, W. Nishimura, H. Mori, and Y. Hata. 2003. 'JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1', *Mol Cell Biol*, 23: 4267-82.
- Hoskins, Peter R. 2012. 'Principles of ultrasound elastography', *Ultrasound*, 20: 8-15.
- Hou, J., A. Renigunta, M. Konrad, A. S. Gomes, E. E. Schneeberger, D. L. Paul, S. Waldegger, and D. A. Goodenough. 2008. 'Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex', *J Clin Invest*, 118: 619-28.
- Howarth, A. G., M. R. Hughes, and B. R. Stevenson. 1992. 'Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 262: C461-C69.
- Huang, J., S. Rauscher, G. Nawrocki, T. Ran, M. Feig, B. L. de Groot, H. Grubmüller, and A. D. MacKerell, Jr. 2017. 'CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins', *Nat Methods*, 14: 71-73.
- Huerta, M., R. Muñoz, R. Tapia, E. Soto-Reyes, L. Ramírez, F. Recillas-Targa, L. González-Mariscal, and E. López-Bayghen. 2007. 'Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc', *Mol Biol Cell*, 18: 4826-36.
- Huynh, John, Nozomi Nishimura, Kuldeepsinh Rana, John M. Peloquin, Joseph P. Califano, Christine R. Montague, Michael R. King, Chris B. Schaffer, and Cynthia A. Reinhart-King. 2011. 'Age-Related Intimal Stiffening Enhances Endothelial Permeability and Leukocyte Transmigration', *Science Translational Medicine*, 3: 112ra22-12ra1.
- Ikenouchi, J., M. Furuse, K. Furuse, H. Sasaki, S. Tsukita, and S. Tsukita. 2005. 'Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells', *J Cell Biol*, 171: 939-45.
- Ikenouchi, J., H. Sasaki, S. Tsukita, M. Furuse, and S. Tsukita. 2008. 'Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin', *Mol Biol Cell*, 19: 4687-93.
- Indra, I., and K. A. Beningo. 2011. 'An in vitro correlation of metastatic capacity, substrate rigidity, and ECM composition', *J Cell Biochem*, 112: 3151-8.
- Indra I., Troyanovsky R. B., Shapiro L., Honig B. and Troyanovsky S. M. 2020. 'Sensing Actin Dynamics through Adherens Junctions', *Cell Rep*, 30: 2820-33 e3.
- Inoko, A., M. Itoh, A. Tamura, M. Matsuda, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. 'Expression and distribution of ZO-3, a tight junction MAGUK protein, in mouse tissues', *Genes Cells*, 8: 837-45.

- Islas, S., J. Vega, L. Ponce, and L. González-Mariscal. 2002. 'Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells', *Exp Cell Res*, 274: 138-48.
- Issa, R., X. Zhou, C. M. Constandinou, J. Fallowfield, H. Millward-Sadler, M. D. Gaca, E. Sands, I. Suliman, N. Trim, A. Knorr, M. J. Arthur, R. C. Benyon, and J. P. Iredale. 2004. 'Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking', *Gastroenterology*, 126: 1795-808.
- Itoh M, Tsukita S, Yamazaki Y and Sugimoto H. 2012. 'Rho GTP exchange factor ARHGEF11 regulates the integrity of epithelial junctions by connecting ZO-1 and RhoA-myosin II signaling', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 9905-10.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. and Tsukita, S. 1999. 'Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins', *J Cell Biol*, 147: 1351-63.
- Itoh M., Morita K. and 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', *J Biol Chem*, 274: 5981-6.
- Ivanov, A. I., S. Lechuga, A. Marino-Melendez, and N. G. Naydenov. 2022. 'Unique and redundant functions of cytoplasmic actins and nonmuscle myosin II isoforms at epithelial junctions', *Ann N Y Acad Sci*, 1515: 61-74.
- Iyer K. V., Piscitello-Gomez R., Paijmans J., Julicher F. and Eaton S. 2019. 'Epithelial Viscoelasticity Is Regulated by Mechanosensitive E-cadherin Turnover', *Curr Biol*, 29: 578-91 e5.
- Janson, I. A., and A. J. Putnam. 2015. 'Extracellular matrix elasticity and topography: material-based cues that affect cell function via conserved mechanisms', *J Biomed Mater Res A*, 103: 1246-58.
- Jaramillo, Ponce, Moreno, Betanzos, Huerta, Lopez-Bayghen and Gonzalez-Mariscal, L. 2004. 'Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells', *Exp Cell Res*, 297: 247-58.
- Ji, Jingjing, Britnie Carpentier, Arindam Chakraborty, and Shikha Nangia. 2023. 'An Affordable Topography-Based Protocol for Assigning a Residue's Character on a Hydrophathy (PARCH) Scale', *Journal of Chemical Theory and Computation*.
- Jo, S., T. Kim, V. G. Iyer, and W. Im. 2008. 'CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM', *J Comput Chem*, 29: 1859-65.
- Jumper, J., R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Žídek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, and D. Hassabis. 2021. 'Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold', *Nature*, 596: 583-89.
- Kai, F., Drain, A. P. and Weaver, V. M. 2019. 'The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey', *Dev Cell*, 49: 332-46.
- Kaliman, S., Jayachandran, C., Rehfeldt, F. and Smith, A. S. 2014. 'Novel growth regime of MDCK II model tissues on soft substrates', *Biophys J*, 106: L25-8.
- Kamitani, Toru, Hirofumi Sakaguchi, Atsushi Tamura, Takenori Miyashita, Yuji Yamazaki, Reitaro Tokumasu, Ryuhei Inamoto, Ai Matsubara, Nozomu Mori, Yasuo Hisa, and Sachiko Tsukita. 2015. 'Deletion of Tricellulin Causes Progressive Hearing Loss Associated with Degeneration of Cochlear Hair Cells', *Sci Rep*, 5: 18402.

- Katsuno, T., K. Umeda, T. Matsui, M. Hata, A. Tamura, M. Itoh, K. Takeuchi, T. Fujimori, Y. Nabeshima, T. Noda, S. Tsukita, and S. Tsukita. 2008. 'Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells', *Mol Biol Cell*, 19: 2465-75.
- Kausalya, P. Jaya, Dominic C.Y. Phua, and Walter Hunziker. 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', *Mol Biol Cell*, 15: 5503-15.
- Kiener, T. K., I. Selptsova-Friedrich, and W. Hunziker. 2008. 'Tjp3/zo-3 is critical for epidermal barrier function in zebrafish embryos', *Dev Biol*, 316: 36-49.
- Kim, J. H. and Asthagiri, A. R. 2011. 'Matrix stiffening sensitizes epithelial cells to EGF and enables the loss of contact inhibition of proliferation', *J Cell Sci*, 124: 1280-7.
- Kimura, R., T. Ishida, M. Kuriyama, K. Hirata, and Y. Hayashi. 2010. 'Interaction of endothelial cell-selective adhesion molecule and MAGI-1 promotes mature cell-cell adhesion via activation of RhoA', *Genes Cells*, 15: 385-96.
- Kojima, T., A. Takasawa, D. Kyuno, T. Ito, H. Yamaguchi, K. Hirata, M. Tsujiwaki, M. Murata, S. Tanaka, and N. Sawada. 2011. 'Downregulation of tight junction-associated MARVEL protein marvelD3 during epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells', *Exp Cell Res*, 317: 2288-98.
- Kollimada, S. A., Kulkarni, A. H., Ravan, A. and Gundiah, N. 2016. 'Advancing Edge Speeds of Epithelial Monolayers Depend on Their Initial Confining Geometry', *PLoS One*, 11: e0153471.
- Komura, Hitomi, Hisakazu Ogita, Wataru Ikeda, Akira Mizoguchi, Jun Miyoshi, and Yoshimi Takai. 2008. 'Establishment of cell polarity by afadin during the formation of embryoid bodies', *Genes to Cells*, 13: 79-90.
- Kostrewa, D., M. Brockhaus, A. D'Arcy, G. E. Dale, P. Nelboeck, G. Schmid, F. Mueller, G. Bazzoni, E. Dejana, T. Bartfai, F. K. Winkler, and M. Hennig. 2001. 'X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif', *Embo j*, 20: 4391-8.
- Kotelevets, L., and E. Chastre. 2021. 'A New Story of the Three Magi: Scaffolding Proteins and lncRNA Suppressors of Cancer', *Cancers (Basel)*, 13.
- Kovacs E. M., Verma S., Ali R. G., Ratheesh A., Hamilton N. A., Akhmanova A. and Yap A. S. 2011. 'N-WASP regulates the epithelial junctional actin cytoskeleton through a non-canonical post-nucleation pathway', *Nat Cell Biol*, 13: 934-43.
- Krause, G., L. Winkler, S. L. Mueller, R. F. Haseloff, J. Piontek, and I. E. Blasig. 2008. 'Structure and function of claudins', *Biochim Biophys Acta*, 1778: 631-45.
- Krug, S. M. 2017. 'Contribution of the tricellular tight junction to paracellular permeability in leaky and tight epithelia', *Ann N Y Acad Sci*, 1397: 219-30.
- Kumar, Shankar, John M. Rosenberg, Djamal Bouzida, Robert H. Swendsen, and Peter A. Kollman. 1992. 'THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method', *Journal of Computational Chemistry*, 13.
- Kuo, W. T., L. Zuo, M. A. Odenwald, S. Madha, G. Singh, C. B. Gurniak, C. Abraham, and J. R. Turner. 2021. 'The Tight Junction Protein ZO-1 Is Dispensable for Barrier Function but Critical for Effective Mucosal Repair', *Gastroenterology*, 161: 1924-39.

- Ladoux, Benoit, and René-Marc Mège. 2017. 'Mechanobiology of collective cell behaviours', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18: 743-57.
- Larre I, Ponce A, Franco M and Cereijido M. 2014. 'The emergence of the concept of tight junctions and physiological regulation by ouabain', *Semin Cell Dev Biol*, 36: 149-56.
- Laukoetter, M. G., P. Nava, W. Y. Lee, E. A. Severson, C. T. Capaldo, B. A. Babbin, I. R. Williams, M. Koval, E. Peatman, J. A. Campbell, T. S. Dermody, A. Nusrat, and C. A. Parkos. 2007. 'JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo', *J Exp Med*, 204: 3067-76.
- LeBleu, V. S., B. Macdonald, and R. Kalluri. 2007. 'Structure and function of basement membranes', *Exp Biol Med (Maywood)*, 232: 1121-9.
- Lee, J., X. Cheng, J. M. Swails, M. S. Yeom, P. K. Eastman, J. A. Lemkul, S. Wei, J. Buckner, J. C. Jeong, Y. Qi, S. Jo, V. S. Pande, D. A. Case, C. L. Brooks, 3rd, A. D. MacKerell, Jr., J. B. Klauda, and W. Im. 2016. 'CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field', *J Chem Theory Comput*, 12: 405-13.
- Lee, J., M. Hitzenberger, M. Rieger, N. R. Kern, M. Zacharias, and W. Im. 2020. 'CHARMM-GUI supports the Amber force fields', *J Chem Phys*, 153: 035103.
- Li, W., X. Yu, F. Xie, B. Zhang, S. Shao, C. Geng, A. U. R. Aziz, X. Liao, and B. Liu. 2018. 'A Membrane-Bound Biosensor Visualizes Shear Stress-Induced Inhomogeneous Alteration of Cell Membrane Tension', *iScience*, 7: 180-90.
- Li X., Lu S. and Nagy, J. I. 2009. 'Direct association of connexin36 with zonula occludens-2 and zonula occludens-3', *Neurochem Int*, 54: 393-402.
- Limouze, J., A. F. Straight, T. Mitchison, and J. R. Sellers. 2004. 'Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II', *J Muscle Res Cell Motil*, 25: 337-41.
- Lin, D., A. S. Edwards, J. P. Fawcett, G. Mbamalu, J. D. Scott, and T. Pawson. 2000. 'A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity', *Nat Cell Biol*, 2: 540-7.
- Liu, W., A. Schrott-Fischer, R. Glueckert, H. Benav, and H. Rask-Andersen. 2017. 'The Human "Cochlear Battery" - Claudin-11 Barrier and Ion Transport Proteins in the Lateral Wall of the Cochlea', *Front Mol Neurosci*, 10: 239.
- Liu, X. F., H. Ishida, R. Raziuddin, and T. Miki. 2004. 'Nucleotide exchange factor ECT2 interacts with the polarity protein complex Par6/Par3/protein kinase Czeta (PKCzeta) and regulates PKCzeta activity', *Mol Cell Biol*, 24: 6665-75.
- Liu, X. F., S. Ohno, and T. Miki. 2006. 'Nucleotide exchange factor ECT2 regulates epithelial cell polarity', *Cell Signal*, 18: 1604-15.
- Liu Z., Tan J. L., Cohen D. M., Yang M. T., Sniadecki N. J., Ruiz S. A., Nelson C. M. and Chen C. S. 2010. 'Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 9944-9.
- Lodish, H. 2016. *Molecular cell biology* (W. H. Freeman.: New York).
- LeGoff, Hervé Rouault, Thomas Lecuit; A global pattern of mechanical stress polarizes cell divisions and cell shape in the growing *Drosophila* wing disc. *Development* 1 October 2013; 140 (19): 4051–4059.
- Maman, S., and I. P. Witz. 2018. 'A history of exploring cancer in context', *Nat Rev Cancer*, 18: 359-76.
- Mandai, K., H. Nakanishi, A. Satoh, H. Obaishi, M. Wada, H. Nishioka, M. Itoh, A. Mizoguchi, T. Aoki, T. Fujimoto, Y. Matsuda, S. Tsukita, and Y. Takai. 1997.

- 'Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction', *J Cell Biol*, 139: 517-28.
- Mandel, Bacallao and Zampighi, G. 1993. 'Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions', *Nature*, 361: 552-5.
- Mandell, K. J., and C. A. Parkos. 2005. 'The JAM family of proteins', *Adv Drug Deliv Rev*, 57: 857-67.
- Mandell, Kenneth J., Ingrid C. McCall, and Charles A. Parkos. 2004. 'Involvement of the Junctional Adhesion Molecule-1 (JAM1) Homodimer Interface in Regulation of Epithelial Barrier Function\*', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 16254-62.
- Mark, P., and L. Nilsson. 2002. 'Structure and dynamics of liquid water with different long-range interaction truncation and temperature control methods in molecular dynamics simulations', *J Comput Chem*, 23: 1211-9.
- Martino, Sabata. 2023. 'Mechanobiology in Cells and Tissues', *Int J Mol Sci*, 24: 8564.
- Masuda, S., Y. Oda, H. Sasaki, J. Ikenouchi, T. Higashi, M. Akashi, E. Nishi, and M. Furuse. 2011. 'LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells', *J Cell Sci*, 124: 548-55.
- Matsumoto, K., M. Imasato, Y. Yamazaki, H. Tanaka, M. Watanabe, H. Eguchi, H. Nagano, H. Hikita, T. Tatsumi, T. Takehara, A. Tamura, and S. Tsukita. 2014. 'Claudin 2 deficiency reduces bile flow and increases susceptibility to cholesterol gallstone disease in mice', *Gastroenterology*, 147: 1134-45.e10.
- McGovern, D. P., K. D. Taylor, C. Landers, C. Derkowski, D. Dutridge, M. Dubinsky, A. Ippoliti, E. Vasiliauskas, L. Mei, E. Mengesha, L. King, S. Pressman, S. R. Targan, and J. I. Rotter. 2009. 'MAGI2 genetic variation and inflammatory bowel disease', *Inflamm Bowel Dis*, 15: 75-83.
- McKenzie, A. J., Hicks, S. R., Svec, K. V., Naughton, H., Edmunds, Z. L. and Howe, A. K. 2018. 'The mechanical microenvironment regulates ovarian cancer cell morphology, migration, and spheroid disaggregation', *Sci Rep*, 8: 7228.
- McKenzie A. J., Svec K. V., Williams T. F. and Howe A. K. 2020. 'Protein kinase A activity is regulated by actomyosin contractility during cell migration and is required for durotaxis', *Mol Biol Cell*, 31: 45-58.
- Meerschaert, K., Tun, M. P., Remue, E., De Ganck, A., Boucherie, C., Vanloo, B., Degeest, G., Vandekerckhove, J., Zimmermann, P., Bhardwaj, N., Lu, H., Cho, W. and Gettemans, J. 2009. 'The PDZ2 domain of zonula occludens-1 and -2 is a phosphoinositide binding domain', *Cell Mol Life Sci*, 66: 3951-66.
- Metais, Christel Navarro, Marie-Josée Santoni Stéphane Audebert and Jean-Paul Borg. 2005. 'hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells', *FEBS Lett*, 579: 3725-30.
- Michaud-Agrawal, N., E. J. Denning, T. B. Woolf, and O. Beckstein. 2011. 'MDAnalysis: a toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations', *J Comput Chem*, 32: 2319-27.
- Michel, D., J. P. Arsanto, D. Massey-Harroche, C. Béclin, J. Wijnholds, and A. Le Bivic. 2005. 'PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells', *J Cell Sci*, 118: 4049-57.
- Mihlan, S., Reiss, C., Thalheimer, P., Herterich, S., Gaetzner, S., Kremerskothen, J., Pavenstadt, H. J., Lewandrowski, U., Sickmann, A. and Butt, E. 2013. 'Nuclear import of LASP-1 is regulated by phosphorylation and dynamic protein-protein interactions', *Oncogene*, 32: 2107-13.

- Mineta, Katsuhiko, Yasuko Yamamoto, Yuji Yamazaki, Hiroo Tanaka, Yukiyo Tada, Kuniaki Saito, Atsushi Tamura, Michihiro Igarashi, Toshinori Endo, Kosei Takeuchi, and Sachiko Tsukita. 2011. 'Predicted expansion of the claudin multigene family', *FEBS Lett*, 585: 606-12.
- Miranda, J., D. Martín-Tapia, Y. Valdespino-Vázquez, L. Alarcón, A. Espejel-Nuñez, M. Guzmán-Huerta, J. E. Muñoz-Medina, M. Shibayama, B. Chávez-Munguía, G. Estrada-Gutiérrez, S. Lievano, J. E. Ludert, and L. González-Mariscal. 2019. 'Syncytiotrophoblast of Placentae from Women with Zika Virus Infection Has Altered Tight Junction Protein Expression and Increased Paracellular Permeability', *Cells*, 8.
- Mitchell, L. A., C. Ward, M. Kwon, P. O. Mitchell, D. A. Quintero, A. Nusrat, C. A. Parkos, and M. Koval. 2015. 'Junctional adhesion molecule A promotes epithelial tight junction assembly to augment lung barrier function', *Am J Pathol*, 185: 372-86.
- Miyake, Y., N. Inoue, K. Nishimura, N. Kinoshita, H. Hosoya, and S. Yonemura. 2006. 'Actomyosin tension is required for correct recruitment of adherens junction components and zonula occludens formation', *Exp Cell Res*, 312: 1637-50.
- Miyamoto, Tatsuo, Kazumasa Morita, Daisuke Takemoto, Kosei Takeuchi, Yuka Kitano, Tsuyoshi Miyakawa, Kiyomi Nakayama, Yasushi Okamura, Hiroyuki Sasaki, Yoshiki Miyachi, Mikio Furuse, and Shoichiro Tsukita. 2005. 'Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice', *Journal of Cell Biology*, 169: 527-38.
- Mizuno, K., A. Suzuki, T. Hirose, K. Kitamura, K. Kutsuzawa, M. Futaki, Y. Amano, and S. Ohno. 2003. 'Self-association of PAR-3 mediated by the conserved N-terminal domain contributes to the development of epithelial tight junctions', *J Biol Chem*, 278: 31240-50.
- Monteiro, A. C., Sumagin, R., Rankin, C. R., Leoni, G., Mina, M. J., Reiter, D. M., Stehle, T., Dermody, T. S., Schaefer, S. A., Hall, R. A., Nusrat, A. and Parkos, C. A. 2013. 'JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function', *Mol Biol Cell*, 24: 2849-60.
- Naydenov, N. G., A. Feygin, D. Wang, J. F. Kuemmerle, G. Harris, M. A. Conti, R. S. Adelstein, and A. I. Ivanov. 2016. 'Nonmuscle Myosin IIA Regulates Intestinal Epithelial Barrier in vivo and Plays a Protective Role During Experimental Colitis', *Sci Rep*, 6: 24161.
- Ni, J., S. Bao, R. I. Johnson, B. Zhu, J. Li, J. Vadaparampil, C. M. Smith, K. N. Campbell, F. Grahmmer, T. B. Huber, J. C. He, V. D. D'Agati, A. Chan, and L. Kaufman. 2016. 'MAGI-1 Interacts with Nephrin to Maintain Slit Diaphragm Structure through Enhanced Rap1 Activation in Podocytes', *J Biol Chem*, 291: 24406-17.
- Nie, M., S. Aijaz, I. V. Leefa Chong San, M. S. Balda, and K. Matter. 2009. 'The Y-box factor ZONAB/DbpA associates with GEF-H1/Lfc and mediates Rho-stimulated transcription', *EMBO Rep*, 10: 1125-31.
- Nieto M. A., Huang R. Y., Jackson R. A. and Thiery J. P. 2016. 'Emt: 2016', *Cell*, 166: 21-45.
- Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. 'Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice', *J Cell Biol*, 161: 653-60.
- Nomme, J., A. S. Fanning, M. Caffrey, M. F. Lye, J. M. Anderson, and A. Lavie. 2011a. 'The Src homology 3 domain is required for junctional adhesion molecule binding

- to the third PDZ domain of the scaffolding protein ZO-1', *J Biol Chem*, 286: 43352-60.
- Norén, E., S. Almer, and J. Söderman. 2017. 'Genetic variation and expression levels of tight junction genes identifies association between MAGI3 and inflammatory bowel disease', *BMC Gastroenterol*, 17: 68.
- Nürnberg, Alexander, Thomas Kitzing, and Robert Grosse. 2011. 'Nucleating actin for invasion', *Nature Reviews Cancer*, 11: 177-87.
- Ohashi, K., Fujiwara, S. and Mizuno, K. 2017. 'Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction', *J Biochem*, 161: 245-54.
- Ohnishi, Hiroe, Takuo Nakahara, Kyoko Furuse, Hiroyuki Sasaki, Shoichiro Tsukita, and Mikio Furuse. 2004. 'JACOP, a Novel Plaque Protein Localizing at the Apical Junctional Complex with Sequence Similarity to Cingulin\*', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 46014-22.
- Oka, T., Remue, E., Meerschaert, K., Vanloo, B., Boucherie, C., Gfeller, D., Bader, G. D., Sidhu, S. S., Vandekerckhove, J., Gettemans, J. and Sudol, M. 2010. 'Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling', *Biochem J*, 432: 461-72.
- Ooshio, Takako, Reiko Kobayashi, Wataru Ikeda, Muneaki Miyata, Yuri Fukumoto, Naomi Matsuzawa, Hisakazu Ogita, and Yoshimi Takai. 2010. 'Involvement of the Interaction of Afadin with ZO-1 in the Formation of Tight Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Cells\*', *Journal of Biological Chemistry*, 285: 5003-12.
- Otani, T., and M. Furuse. 2020. 'Tight Junction Structure and Function Revisited', *Trends Cell Biol*, 30: 805-17.
- Otani, T., Ichii, T., Aono, S. and Takeichi, M. 2006. 'Cdc42 GEF Tuba regulates the junctional configuration of simple epithelial cells', *J Cell Biol*, 175: 135-46.
- Otani, T., T. P. Nguyen, S. Tokuda, K. Sugihara, T. Sugawara, K. Furuse, T. Miura, K. Ebnet, and M. Furuse. 2019. 'Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity', *J Cell Biol*, 218: 3372-96.
- Park, J., D. H. Kim, S. R. Shah, H. N. Kim, Kshitiz, P. Kim, A. Quinones-Hinojosa, and A. Levchenko. 2019. 'Switch-like enhancement of epithelial-mesenchymal transition by YAP through feedback regulation of WT1 and Rho-family GTPases', *Nat Commun*, 10: 2797.
- Parrinello, M., and A. Rahman. 1981. 'Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method', *Journal of Applied Physics*, 52: 7182-90.
- Paschoud, S., D. Yu, P. Pulimeno, L. Jond, J. R. Turner, and S. Citi. 2011. 'Cingulin and paracingulin show similar dynamic behaviour, but are recruited independently to junctions', *Mol Membr Biol*, 28: 123-35.
- Paszek, M. J., N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakins, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. A. Reinhart-King, S. S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D. A. Hammer, and V. M. Weaver. 2005. 'Tensional homeostasis and the malignant phenotype', *Cancer Cell*, 8: 241-54.
- Pelham, R. J., Jr. and Wang, Yi. 1997. 'Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 13661-5.
- Pérez-Calixto, Daniel, Samuel Amat-Shapiro, Diego Zamarrón-Hernández, Genaro Vázquez-Victorio, Pierre-Henri Puech, and Mathieu Hautefeuille. 2021. 'Determination by Relaxation Tests of the Mechanical Properties of Soft Polyacrylamide Gels Made for Mechanobiology Studies', *Polymers*, 13: 629.

- Pietuch, Anna, Bastian R. Brückner, and Andreas Janshoff. 2013. 'Membrane tension homeostasis of epithelial cells through surface area regulation in response to osmotic stress', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833: 712-22.
- Piontek, J., S. M. Krug, J. Protze, G. Krause, and M. Fromm. 2020. 'Molecular architecture and assembly of the tight junction backbone', *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862: 183279.
- Plant, P. J., J. P. Fawcett, D. C. Lin, A. D. Holdorf, K. Binns, S. Kulkarni, and T. Pawson. 2003. 'A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl', *Nat Cell Biol*, 5: 301-8.
- Pollard, T. D. and Cooper, J. A. 2009. 'Actin, a central player in cell shape and movement', *Science*, 326: 1208-12.
- Pontes, Bruno, Pascale Monzo, and Nils C. Gauthier. 2017. 'Membrane tension: A challenging but universal physical parameter in cell biology', *Semin Cell Dev Biol*, 71: 30-41.
- Provenzano, P. P., K. W. Eliceiri, J. M. Campbell, D. R. Inman, J. G. White, and P. J. Keely. 2006. 'Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion', *BMC Med*, 4: 38.
- Quiros, M., Alarcon, L., Ponce, A., Giannakouros, T. and Gonzalez-Mariscal, L. 2013. 'The intracellular fate of zonula occludens 2 is regulated by the phosphorylation of SR repeats and the phosphorylation/O-GlcNAcylation of S257', *Mol Biol Cell*, 24: 2528-43.
- Quiros, M., Nusrat, A. 2014. 'RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the epithelial Apical Junctional Complex', *Semin Cell Dev Biol*, 36: 194-203.
- Raleigh, D. R., A. M. Marchiando, Y. Zhang, L. Shen, H. Sasaki, Y. Wang, M. Long, and J. R. Turner. 2010. 'Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions', *Mol Biol Cell*, 21: 1200-13.
- Raucher, Drazen, and Michael P. Sheetz. 1999. 'Membrane Expansion Increases Endocytosis Rate during Mitosis', *Journal of Cell Biology*, 144: 497-506.
- Raya-Sandino, A., A. Castillo-Kauil, A. Dominguez-Calderon, L. Alarcon, D. Flores-Benitez, F. Cuellar-Perez, B. Lopez-Bayghen, B. Chavez-Munguia, J. Vazquez-Prado, and L. Gonzalez-Mariscal. 2017. 'Zonula occludens-2 regulates Rho proteins activity and the development of epithelial cytoarchitecture and barrier function', *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864: 1714-33.
- Rice, A. J., Cortes, E., Lachowski, D., Cheung, B. C. H., Karim, S. A., Morton, J. P. and Del Rio Hernandez, A. 2017. 'Matrix stiffness induces epithelial-mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells', *Oncogenesis*, 6: e352.
- Rodriguez-Boulau, E., and I. G. Macara. 2014. 'Organization and execution of the epithelial polarity programme', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 225-42.
- Roh, M. H., C. J. Liu, S. Laurinec, and B. Margolis. 2002. 'The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions', *J Biol Chem*, 277: 27501-9.
- Roh, M. H., O. Makarova, C. J. Liu, K. Shin, S. Lee, S. Laurinec, M. Goyal, R. Wiggins, and B. Margolis. 2002. 'The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost', *J Cell Biol*, 157: 161-72.

- Rouaud, F., W. Huang, A. Flinois, K. Jain, E. Vasileva, T. Di Mattia, M. Mauperin, D. A. D. Parry, V. Dugina, C. Chaponnier, I. Méan, S. Montessuit, A. Mutero-Maeda, J. Yan, and S. Citi. 2023. 'Cingulin and paracingulin tether myosins-2 to junctions to mechanoregulate the plasma membrane', *J Cell Biol*, 222.
- Rouaud, F., S. Sluysmans, A. Flinois, J. Shah, E. Vasileva, and S. Citi. 2020. 'Scaffolding proteins of vertebrate apical junctions: structure, functions and biophysics', *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862: 183399.
- Roux, Benoît. 1995. 'The calculation of the potential of mean force using computer simulations', *Computer Physics Communications*, 91: 275-82.
- Ryan, Peter L., Ramsey A. Foty, Joachim Kohn, and Malcolm S. Steinberg. 2001. 'Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell–cell vs. cell–substratum adhesivity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 4323-27.
- Saito, A. C., T. Higashi, Y. Fukazawa, T. Otani, M. Tauchi, A. Y. Higashi, M. Furuse, and H. Chiba. 2021. 'Occludin and tricellulin facilitate formation of anastomosing tight-junction strand network to improve barrier function', *Mol Biol Cell*, 32: 722-38.
- Saito, K., T. Shiino, H. Kurihara, Y. Harita, S. Hattori, and Y. Ohta. 2015. 'Afadin regulates RhoA/Rho-associated protein kinase signaling to control formation of actin stress fibers in kidney podocytes', *Cytoskeleton (Hoboken)*, 72: 146-56.
- Saitou, M., M. Furuse, H. Sasaki, J. D. Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda, and S. Tsukita. 2000. 'Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands', *Mol Biol Cell*, 11: 4131-42.
- Sambrotta, M., and R. J. Thompson. 2015. 'Mutations in TJP2, encoding zona occludens 2, and liver disease', *Tissue Barriers*, 3: e1026537.
- Santoso, S., U. J. Sachs, H. Kroll, M. Linder, A. Ruf, K. T. Preissner, and T. Chavakis. 2002. 'The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1', *J Exp Med*, 196: 679-91.
- Sarpal R, Yan V, Kazakova L, Sheppard L, Yu JC, Fernandez-Gonzalez R, et al. (2019) Role of  $\alpha$ -Catenin and its mechanosensing properties in regulating Hippo/YAP-dependent tissue growth. *PLoS Genet* 15(11): e1008454. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008454>
- Sato, T., N. Fujita, A. Yamada, T. Ooshio, R. Okamoto, K. Irie, and Y. Takai. 2006. 'Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells', *J Biol Chem*, 281: 5288-99.
- Schoenenberg, C. -A. Zuk, A. Zinkl, G. M. Kendall, D. and Matlin K.S. 1994. Integrin expression and localization in normal MDCK cells and transformed MDCK cells lacking apical polarity, *Journal of Cell Science*, 107: 527-54.]
- Schossleitner, Klaudia, Sabine Rauscher, Marion Gröger, Heinz Peter Friedl, Richard Finsterwalder, Andreas Habertheuer, Maria Sibia, Christine Brostjan, Dagmar Födinger, Sandra Citi, and Peter Petzelbauer. 2016. 'Evidence That Cingulin Regulates Endothelial Barrier Function In Vitro and In Vivo', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36: 647-54.
- Scott, D. W., C. E. Tolbert, D. M. Graham, E. Wittchen, J. E. Bear, and K. Burridge. 2015. 'N-glycosylation controls the function of junctional adhesion molecule-A', *Mol Biol Cell*, 26: 3205-14.
- Sellers, J. R. and Heissler, S. M. 2019. 'Nonmuscle myosin-2 isoforms', *Curr Biol*, 29: R275-R78.

- Serna-Márquez, N., A. Rodríguez-Hernández, M. Ayala-Reyes, L. O. Martínez-Hernández, M. A. Peña-Rico, J. Carretero-Ortega, M. Hautefeuille, and G. Vázquez-Victorio. 2020a. 'Fibrillar Collagen Type I Participates in the Survival and Aggregation of Primary Hepatocytes Cultured on Soft Hydrogels', *Biomimetics (Basel)*, 5.
- Shashikanth, Nitesh, Marion M. France, Ruyue Xiao, Xenia Haest, Heather E. Rizzo, Jose Yeste, Johannes Reiner, and Jerrold R. Turner. 2022. 'Tight junction channel regulation by interclaudin interference', *Nat Commun*, 13: 3780.
- Shin, K., S. Straight, and B. Margolis. 2005. 'PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells', *J Cell Biol*, 168: 705-11.
- Simon, D. B., Y. Lu, K. A. Choate, H. Velazquez, E. Al-Sabban, M. Praga, G. Casari, A. Bettinelli, G. Colussi, J. Rodriguez-Soriano, D. McCredie, D. Milford, S. Sanjad, and R. P. Lifton. 1999. 'Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption', *Science*, 285: 103-6.
- Singh D., Solan J. L. Taffet S. M. Javier R. and Lampe P. D. 2005. 'Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner', *J Biol Chem*, 280: 30416-21.
- Sonam, S., L. Balasubramaniam, S. Z. Lin, Y. M. Y. Ivan, I. P. Jaumà, C. Jebane, M. Karnat, Y. Toyama, P. Marcq, J. Prost, R. M. Mège, J. F. Rupprecht, and B. Ladoux. 2023. 'Mechanical stress driven by rigidity sensing governs epithelial stability', *Nat Phys*, 19: 132-41.
- Spadaro, D., Le, S., Laroche, T., Mean, I., Jond, L., Yan, J. and Citi, S. 2017. 'Tension-Dependent Stretching Activates ZO-1 to Control the Junctional Localization of Its Interactors', *Curr Biol*, 27: 3783-95 e8.
- Staehein, L. A. 1973. 'Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions', *J Cell Sci*, 13: 763-86.
- Steed, E., N. T. Rodrigues, M. S. Balda, and K. Matter. 2009. 'Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family', *BMC Cell Biol*, 10: 95.
- Steed, Emily, Ahmed Elbediwy, Barbara Vacca, Sébastien Dupasquier, Sandra A. Hemkemeyer, Tesha Suddason, Ana C. Costa, Jean-Bernard Beaudry, Ceniz Zihni, Ewen Gallagher, Christophe E. Pierreux, Maria S. Balda, and Karl Matter. 2014. 'MarvelD3 couples tight junctions to the MEKK1–JNK pathway to regulate cell behavior and survival', *Journal of Cell Biology*, 204: 821-38.
- Steinbacher, T., D. Kummer, and K. Ebnet. 2018. 'Junctional adhesion molecule-A: functional diversity through molecular promiscuity', *Cell Mol Life Sci*, 75: 1393-409.
- Stephenson, R. E., T. Higashi, I. S. Erofeev, T. R. Arnold, M. Leda, A. B. Goryachev, and A. L. Miller. 2019. 'Rho Flares Repair Local Tight Junction Leaks', *Dev Cell*, 48: 445-59.e5.
- Stevenson, B. R., J. D. Siliciano, M. S. Mooseker, and D. A. Goodenough. 1986. 'Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia', *J Cell Biol*, 103: 755-66.
- Straight, S. W., K. Shin, V. C. Fogg, S. Fan, C. J. Liu, M. Roh, and B. Margolis. 2004. 'Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects', *Mol Biol Cell*, 15: 1981-90.

- Sugawara, Taichi, Kyoko Furuse, Tetsuhisa Otani, Tomohiko Wakayama, and Mikio Furuse. 2021. 'Angulin-1 seals tricellular contacts independently of tricellulin and claudins', *Journal of Cell Biology*, 220.
- Suki, B., and J. H. Bates. 2008. 'Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases', *Respir Physiol Neurobiol*, 163: 33-43.
- Takai, Y., W. Ikeda, H. Ogita, and Y. Rikitake. 2008. 'The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24: 309-42.
- Talhok, R. S., R. Mroue, M. Mokalled, L. Abi-Mosleh, R. Nehme, A. Ismail, A. Khalil, M. Zaatari, and M. E. El-Sabban. 2008. 'Heterocellular interaction enhances recruitment of alpha and beta-catenins and ZO-2 into functional gap-junction complexes and induces gap junction-dependant differentiation of mammary epithelial cells', *Exp Cell Res*, 314: 3275-91.
- Tamura, A., Y. Kitano, M. Hata, T. Katsuno, K. Moriwaki, H. Sasaki, H. Hayashi, Y. Suzuki, T. Noda, M. Furuse, S. Tsukita, and S. Tsukita. 2008. 'Megaintestine in claudin-15-deficient mice', *Gastroenterology*, 134: 523-34.
- Tan, B., Smjm Yatim, S. Peng, J. Gunaratne, W. Hunziker, and A. Ludwig. 2020. 'The Mammalian Crumbs Complex Defines a Distinct Polarity Domain Apical of Epithelial Tight Junctions', *Curr Biol*, 30: 2791-804.e6.
- Tanaka-Okamoto, M., K. Hori, H. Ishizaki, Y. Itoh, S. Onishi, S. Yonemura, Y. Takai, and J. Miyoshi. 2011. 'Involvement of afadin in barrier function and homeostasis of mouse intestinal epithelia', *J Cell Sci*, 124: 2231-40.
- Tawa, Hideto, Yoshiyuki Rikitake, Motonori Takahashi, Hisayuki Amano, Muneaki Miyata, Seimi Satomi-Kobayashi, Mitsuo Kinugasa, Yuichi Nagamatsu, Takashi Majima, Hisakazu Ogita, Jun Miyoshi, Ken-ichi Hirata, and Yoshimi Takai. 2010. 'Role of Afadin in Vascular Endothelial Growth Factor- and Sphingosine 1-Phosphate-Induced Angiogenesis', *Circulation Research*, 106: 1731-42.
- Terry, S. J., C. Zihni, A. Elbediwy, E. Vitiello, I. V. Leefa Chong San, M. S. Balda, and K. Matter. 2011. 'Spatially restricted activation of RhoA signalling at epithelial junctions by p114RhoGEF drives junction formation and morphogenesis', *Nat Cell Biol*, 13: 159-66.
- Todorovski, V., Fox, A. H. and Choi, Y. S. 2020. 'Matrix stiffness-sensitive long noncoding RNA NEAT1 seeded paraspeckles in cancer cells', *Mol Biol Cell*, 31: 1654-62.
- Tokuda S., Higashi T. and Furuse M. 2014. 'ZO-1 knockout by TALEN-mediated gene targeting in MDCK cells: involvement of ZO-1 in the regulation of cytoskeleton and cell shape', *PLoS One*, 9: e104994.
- Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L. O., Conway, D. E., Randi, A. M., Schwartz, M. A., Matter, K. and Balda, M. S. 2015. 'ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation', *J Cell Biol*, 208: 821-38.
- Tse, Justin R., and Adam J. Engler. 2010. 'Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties', *Current protocols in cell biology*, Chapter 10: Unit 10.16.
- Turner, J. R. 2000. 'Putting the squeeze' on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation', *Semin Cell Dev Biol*, 11: 301-8.
- Uc, P. Y., J. Miranda, A. Raya-Sandino, L. Alarcón, M. L. Roldán, R. Ocadiz-Delgado, E. M. Cortés-Malagón, B. Chávez-Munguía, G. Ramírez, R. Asomoza, L. Shoshani, P. Gariglio, and L. González-Mariscal. 2020. 'E7 oncoprotein from human

- papillomavirus 16 alters claudins expression and the sealing of epithelial tight junctions', *Int J Oncol*, 57: 905-24.
- Ullmer, C., K. Schmuck, A. Figge, and H. Lübbert. 1998. 'Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein', *FEBS Lett*, 424: 63-8.
- Ulrich, T. A., de Juan Pardo, E. M. and Kumar, S. 2009. 'The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells', *Cancer Res*, 69: 4167-74.
- Umeda, K., J. Ikenouchi, S. Katahira-Tayama, K. Furuse, H. Sasaki, M. Nakayama, T. Matsui, S. Tsukita, M. Furuse, and S. Tsukita. 2006. 'ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation', *Cell*, 126: 741-54.
- Umeda, Kazuaki, Takeshi Matsui, Mayumi Nakayama, Kyoko Furuse, Hiroyuki Sasaki, Mikio Furuse, and Shoichiro Tsukita. 2004. 'Establishment and Characterization of Cultured Epithelial Cells Lacking Expression of ZO-1\*', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 44785-94.
- UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023'. 2023. *Nucleic Acids Res*, 51: D523-d31.
- van de Pavert, S. A., A. Kantardzhieva, A. Malysheva, J. Meuleman, I. Versteeg, C. Levelt, J. Klooster, S. Geiger, M. W. Seeliger, P. Rashbass, A. Le Bivic, and J. Wijnholds. 2004. 'Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure', *J Cell Sci*, 117: 4169-77.
- Van Itallie C. M., Fanning A. S., Bridges A. and Anderson J. M. 2009. 'ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton', *Mol Biol Cell*, 20: 3930-40.
- Vasileva, E., D. Spadaro, F. Rouaud, J. M. King, A. Flinois, J. Shah, S. Sluysmans, I. Méan, L. Jond, J. R. Turner, and S. Citi. 2022. 'Cingulin binds to the ZU5 domain of scaffolding protein ZO-1 to promote its extended conformation, stabilization, and tight junction accumulation', *J Biol Chem*, 298: 101797.
- Verma S., Han S. P., Michael M., Gomez G. A., Yang Z., Teasdale R. D., Ratheesh A., Kovacs E. M., Ali R. G. and Yap A. S. 2012. 'A WAVE2-Arp2/3 actin nucleator apparatus supports junctional tension at the epithelial zonula adherens', *Mol Biol Cell*, 23: 4601-10.
- Vicente-Manzanares M., M. X., Adelstein, R. S. and Horwitz A. R. 2009. 'Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 778-90.
- Wada, M., A. Tamura, N. Takahashi, and S. Tsukita. 2013. 'Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na<sup>+</sup> flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition', *Gastroenterology*, 144: 369-80.
- Wallez, Yann, and Philippe Huber. 2008b. 'Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778: 794-809.
- Wang, A. T. Pearson, M. L. Kutys, C. K. Choi, M. A. Wozniak, B. M. Baker, and C. S. Chen. 2018. 'Extracellular matrix alignment dictates the organization of focal adhesions and directs uniaxial cell migration', *APL Bioeng*, 2: 046107.
- Wang, Q., X. W. Chen, and B. Margolis. 2007. 'PALS1 regulates E-cadherin trafficking in mammalian epithelial cells', *Mol Biol Cell*, 18: 874-85.

- Wang, Q., T. W. Hurd, and B. Margolis. 2004. 'Tight junction protein Par6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust', *J Biol Chem*, 279: 30715-21.
- Wang, Y., J. Shi, K. Chai, X. Ying, and B. P. Zhou. 2013. 'The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis', *Curr Cancer Drug Targets*, 13: 963-72.
- Wapenaar, M. C., A. J. Monsuur, A. A. van Bodegraven, R. K. Weersma, M. R. Bevoa, R. K. Linskens, P. Howdle, G. Holmes, C. J. Mulder, G. Dijkstra, D. A. van Heel, and C. Wijmenga. 2008. 'Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis', *Gut*, 57: 463-7.
- Watson, Christopher J., Catherine J. Hoare, David R. Garrod, Gordon L. Carlson, and Geoffrey Warhurst. 2005. 'Interferon- $\gamma$  selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores', *J Cell Sci*, 118: 5221-30.
- Wayt J., Cartagena-Rivera A., Dutta D., Donaldson J. G. and Waterman C. M. 2021. 'Myosin II isoforms promote internalization of spatially distinct clathrin-independent endocytosis cargoes through modulation of cortical tension downstream of ROCK2', *Mol Biol Cell*, 32: 226-36.
- Wegmann, F., K. Ebnet, L. Du Pasquier, D. Vestweber, and S. Butz. 2004. 'Endothelial adhesion molecule ESAM binds directly to the multidomain adaptor MAGI-1 and recruits it to cell contacts', *Exp Cell Res*, 300: 121-33.
- Wetzel, F., S. Mittag, M. Cano-Cortina, T. Wagner, O. H. Krämer, R. Niedenthal, L. Gonzalez-Mariscal, and O. Huber. 2017. 'SUMOylation regulates the intracellular fate of ZO-2', *Cell Mol Life Sci*, 74: 373-92.
- Wilcox, E. R., Q. L. Burton, S. Naz, S. Riazuddin, T. N. Smith, B. Ploplis, I. Belyantseva, T. Ben-Yosef, N. A. Liburd, R. J. Morell, B. Kachar, D. K. Wu, A. J. Griffith, S. Riazuddin, and T. B. Friedman. 2001. 'Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29', *Cell*, 104: 165-72.
- Wittchen, E. S., J. Haskins, and B. R. Stevenson. 1999. 'Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3', *J Biol Chem*, 274: 35179-85.
- Wozniak, M. A., Desai, R., Solski, P. A., Der, C. J. and Keely, P. J. 2003. 'ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix', *J Cell Biol*, 163: 583-95.
- Xiaolu, D., P. Jing, H. Fang, Y. Lifen, W. Liwen, Z. Ciliu, and Y. Fei. 2011. 'Role of p115RhoGEF in lipopolysaccharide-induced mouse brain microvascular endothelial barrier dysfunction', *Brain Res*, 1387: 1-7.
- Xu, J., F. Anuar, S. M. Ali, M. Y. Ng, D. C. Phua, and W. Hunziker. 2009. 'Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility', *Mol Biol Cell*, 20: 4268-77.
- Xu, J., P. J. Kausalya, D. C. Phua, S. M. Ali, Z. Hossain, and W. Hunziker. 2008. 'Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development', *Mol Cell Biol*, 28: 1669-78.
- Yamada, A., K. Irie, A. Fukuhara, T. Ooshio, and Y. Takai. 2004. 'Requirement of the actin cytoskeleton for the association of nectins with other cell adhesion

- molecules at adherens and tight junctions in MDCK cells', *Genes Cells*, 9: 843-55.
- Yamamoto, H., T. Maruo, T. Majima, H. Ishizaki, M. Tanaka-Okamoto, J. Miyoshi, K. Mandai, and Y. Takai. 2013. 'Genetic deletion of afadin causes hydrocephalus by destruction of adherens junctions in radial glial and ependymal cells in the midbrain', *PLoS One*, 8: e80356.
- Yamanaka, T., Y. Horikoshi, Y. Sugiyama, C. Ishiyama, A. Suzuki, T. Hirose, A. Iwamatsu, A. Shinohara, and S. Ohno. 2003. 'Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity', *Curr Biol*, 13: 734-43.
- Yang, Z., S. Zimmerman, P. R. Brakeman, G. M. Beaudoin, 3rd, L. F. Reichardt, and D. K. Marciano. 2013. 'De novo lumen formation and elongation in the developing nephron: a central role for afadin in apical polarity', *Development*, 140: 1774-84.
- Yano, T., T. Matsui, A. Tamura, M. Uji, and S. Tsukita. 2013. 'The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK', *J Cell Biol*, 203: 605-14.
- Yeung, T., P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, and P. A. Janmey. 2005. 'Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion', *Cell Motil Cytoskeleton*, 60: 24-34.
- Yonemura, Shigenobu, Yuko Wada, Toshiyuki Watanabe, Akira Nagafuchi, and Mai Shibata. 2010. ' $\alpha$ -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development', *Nat Cell Biol*, 12: 533-42.
- Zhadanov, A. B., D. W. Provance, Jr., C. A. Speer, J. D. Coffin, D. Goss, J. A. Blixt, C. M. Reichert, and J. A. Mercer. 1999. 'Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development', *Curr Biol*, 9: 880-8.
- Zhang, J., and C. A. Reinhart-King. 2020. 'Targeting Tissue Stiffness in Metastasis: Mechanomedicine Improves Cancer Therapy', *Cancer Cell*, 37: 754-55.
- Zhao, B., X. Wei, W. Li, R. S. Udan, Q. Yang, J. Kim, J. Xie, T. Ikenoue, J. Yu, L. Li, P. Zheng, K. Ye, A. Chinnaiyan, G. Halder, Z. C. Lai, and K. L. Guan. 2007. 'Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control', *Genes Dev*, 21: 2747-61.
- Zorn-Kruppa, M., Y. Sy S. Vidal, P. Houdek, E. Wladykowski, S. Grzybowski, R. Gruber, C. Gorzelanny, J. Harcup, S. W. Schneider, A. Majumdar, and J. M. Brandner. 2018. 'Tight Junction barriers in human hair follicles - role of claudin-1', *Sci Rep*, 8: 12800.