



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

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**“Búsqueda de proteínas requeridas para la distribución  
continua de ZO-2 en el borde celular y para establecer el  
pico máximo de resistencia transepitelial en las  
células MDCK”**

**T E S I S**

**Que presenta:**

**Lic. Mayrelis Fernández Hernández**

**Para obtener el grado de**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE**

**FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**Directora de tesis:**

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

**Ciudad de México**

**Julio, 2024**

**Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT), bajo la tutoría de la Dra. Lorenza González Mariscal del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV.**

## **Agradecimientos**

Al CINVESTAV y la coordinación de la Maestría en Fisiología Biofísica y Neurociencias por permitirme venir a México.

A la Dra. Lorenza Gonzalez Mariscal y Muriel por su cálida acogida en su laboratorio y confiar en mí para desarrollar este proyecto. Por brindarme todo su conocimiento como excelente científica, por su paciencia y empeño en que sea mejor cada día.

A mi Comité Tutoral por dedicar tiempo a revisar mi tesis y por sus observaciones y comentarios.

A Dolores Martín Tapia (Lolita) por su gran apoyo en todos los experimentos, por su enorme cariño desde que llegué al laboratorio, por siempre tener una sonrisa dibujada para mí y porque es parte de mi familia mexicana. A María de Lourdes Alarcón Mortera (Lulú), por siempre tener la voluntad de ayudarme y tener un consejo útil. A Miguel Ángel Rojas Sierra por proveerme todos los materiales necesarios para realizar mi proyecto.

A mi familia, especialmente mi mamá, mi papá y mi hermano porque sin ellos no sería lo que soy hoy y, a pesar de estar lejos me dan la fuerza que necesito para seguir adelante con mis sueños y metas.

A Elio, la persona más importante que conocí en México, por hacer más fácil estar lejos de mi familia, por su apoyo y cariño infinito, por su paciencia y por mil cosas más.

A mis amigos de toda la vida, los que siempre están y a los nuevos.

A Erick Susano por convertirse en un gran apoyo en el laboratorio, por siempre poder contar con él para todo.

A mis compañeros de laboratorio por sus consejos.

# Índice

Lista de abreviatutas.....	1
Resumen.....	4
Abstract.....	5
<b>I. Introducción.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Epitelios .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Uniones estrechas.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. La estructura de la UE .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1.1. UE tricelular.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2. Función de cerca y compuerta de la UE .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3. Importancia del Ca<sup>2+</sup> para el ensamble de la UE y el desarrollo de la RET... ..</b>	<b>10</b>
<b>3. Proteínas integrales y periféricas de la UE .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1. Proteínas integrales de la UE de la familia de las inmunoglobulinas ....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Las claudinas.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Las TAMPs: ocludina, tricelulina y marvel D3 .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.1. La ocludina .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.2. La tricelulina .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3.3. Marvel D3.....</b>	<b>18</b>
<b>4. Proteínas periféricas de la UE sin repetidos PDZ: cingulina y paracingulina .....</b>	<b>18</b>
<b>5. Las proteínas periféricas de la UE con repetidos PDZ: MAGUK, MAGUK invertidas y las proteínas con múltiples dominios PDZ .....</b>	<b>19</b>
<b>5.1. Proteínas MAGUK .....</b>	<b>20</b>
<b>5.2. Proteínas MAGI.....</b>	<b>21</b>

5.3. Proteínas con múltiples dominios PDZ: MUPP1 y PATJ .....	21
5.4. Otras proteínas de la UE con dominio PDZ: afadina, Par-3 y Par-6.....	22
5.4.1. Afadina.....	22
5.4.2. Par-3.....	24
5.4.3. Par-6.....	24
6. El complejo Par-3/Par-6/aPKC y su relación con JAM-A.....	24
7. Las proteínas ZO .....	25
8. ZO-2 .....	26
8.1. Organización molecular de ZO-2 .....	26
8.2. Función de ZO-2 en la membrana.....	27
8.3. Función de ZO-2 en el núcleo .....	28
8.4. Distribución y tráfico intracelular de ZO-2 .....	29
8.5. Las SLN y SEN de ZO-2 y su modificación postraducciona l .....	30
9. Transición líquido-líquido en las proteínas ZO y su implicación en la formación de las uniones estrechas .....	32
10. Planteamiento del problema .....	34
11. Hipótesis .....	36
12. Objetivo general .....	36
II. Metodología .....	36
1. Cultivo celular.....	36
2. Inmunofluorescencia .....	36
3. Cuantificación de la fluorescencia en el borde celular .....	37
4. Drogas.....	38
III. Resultados .....	38
1. La activación del CaSR y la AMPK no es suficiente para que en la condición de bajo calcio, ZO-2 se distribuya en forma continua en el borde celular.....	38

2. El arribo de la afadina al borde celular no depende de la actividad del CaSR, pero sí de la AMPK y de las PKC clásicas y nuevas.....	39
3. En ausencia de ZO-2, aumenta la cantidad de afadina en el borde celular .	40
4. El movimiento de JAM-A al borde celular no depende de la activación del CaSR, o las PKC clásicas y nuevas .....	40
5. En ausencia de ZO-2 disminuye el reclutamiento de JAM-A al borde celular .....	40
IV. Discusión .....	44
V. Conclusión.....	47
VI. Perspectivas .....	48
VII. Bibliografía .....	49

## Lista de abreviatutas

ABR: región de unión a actina

AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboamida ribonucleósido

AMPK: proteína cinasa activada por AMP

aPKC: proteína cinasa C atípica

BC: bajo calcio

BSA: albúmina sérica bovina

BTH: barrera hematotesticular

CASR: receptor sensor de calcio

CC: cambio a calcio

CD1: ciclina D1

Cdc42: homólogo de la proteína 42 de control de la división celular

DAG: diacilglicerol

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol 10

DiC8: dioctanoil-sn-glicerol

DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

FHA: dominio asociado a *forkhead*

GEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina

GK: guanilato cinasa

IF: inmunofluorescencia

IP3: inositol trifosfato

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

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

MDCK: células de riñón de perro de Madin-Darby

MUPP1: proteína con múltiples dominios PDZ 1

Pals: proteína asociada con LIN 7

PATJ: proteína de la unión estrecha asociada a Pals1

PBD: dominio de unión a PKC

PDZ: dominio presente en las proteínas PSD-95/Discs-large y ZO-1

PFA: paraformaldehído

PKA: proteína cinasa A

PKC: Proteínas cinasa C

PKCε: proteína cinasa C epsilon

PLC: fosfolipasa C

PR: dominio rico en prolina

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

SEN: señal de exportación nuclear

SH3: homólogo a Src 3

SLN: señal de localización nuclear

TA: temperatura ambiente

TAMP: proteínas Marvel asociadas a la unión estrecha

TJP2: gen que codifica a la proteína ZO-2

U: regiones únicas

UA: unión adherente

UE: unión estrecha

UEb: unión estrecha bicelular

UEt: unión estrecha tricelular

VMZ: zona marginal de los vertebrados

WNK4: cinasa sin lisina 4

YAP: proteína asociada a yes

ZO: *zonula occludens*

ZONAB: proteína asociada a zónula occludens 1 de unión a ácidos nucleicos

## Resumen

El calcio extracelular activa al CaSR e induce el movimiento de ZO-2 al borde celular. En bajo calcio, la activación de AMPK, CaSR, o PKC $\epsilon$ , induce la distribución discontinua de ZO-2. Esto sugiere que para una distribución continua de ZO-2 se requiere otra proteína que depende del Ca<sup>2+</sup> extracelular pero no de la activación del CaSR o de la AMPK. Por otro lado, en ausencia de ZO-2 no se desarrolla el pico inicial de RET. Esto puede deberse a que, alguna(s) proteína(s) no llega(n) a la membrana en la cantidad adecuada. Nosotros exploramos si podrían ser JAM-A o afadina. Los resultados demuestran que la afadina llega al borde celular cuando se activa la AMPK o las PKC clásicas y nuevas, en la condición de bajo calcio. Por lo tanto, la afadina no puede ser la proteína que falta para lograr la distribución continua de ZO-2 en la periferia en la condición de bajo calcio tras la estimulación del CaSR o la AMPK. Así mismo, observamos que la afadina se acumula en el borde celular en ausencia de ZO-2. Este exceso de afadina podría contribuir a disminuir el valor del pico inicial de resistencia eléctrica transepitelial, en un cambio a calcio. Por otro lado, al evaluar a JAM-A observamos que su movimiento a la membrana no depende de la activación de la AMPK, el CaSR o las PKC clásicas/nuevas, esto indica que JAM-A puede ser la proteína que falta para que ZO-2 se localice en el borde celular de forma continua en la condición de bajo calcio. Además, en las células ZO-2 KD, llega a la membrana una menor cantidad de JAM-A en comparación con las células parentales. Esto sugiere que la ausencia de JAM-A puede también ser una de las causas de la disminución del pico inicial de la resistencia eléctrica transepitelial durante un cambio a calcio.

## Abstract

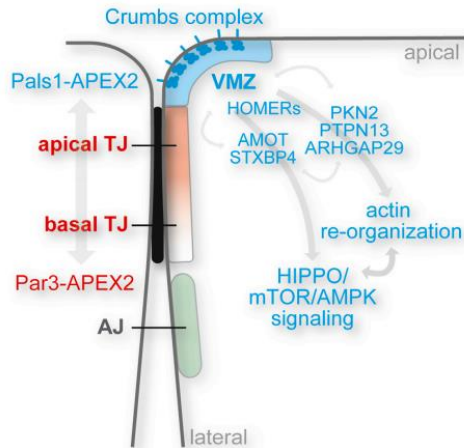
Extracellular calcium activates the CaSR and induces the movement of ZO-2 to the cell border. In the low calcium condition, the activation of AMPK, CaSR, or PKC $\epsilon$  induces the discontinuous distribution of ZO-2 at the cell borders. This suggests that for a continuous distribution of ZO-2, another protein dependent on extracellular Ca<sup>2+</sup> but not on the activation of CaSR or AMPK is required. On the other hand, in the absence of ZO-2, the initial peak of RET does not develop. This may be due to some protein(s) not reaching the membrane in the adequate amount. We explored whether these proteins could be JAM-A and/or afadin. Our results show that afadin reaches the cell border when AMPK or the classic/novel PKCs are activated under the low calcium condition. Therefore, afadin cannot be the missing protein needed to achieve the continuous distribution of ZO-2 at the periphery under the low calcium condition, following CaSR or AMPK stimulation. On the other hand, we observed that afadin accumulates at the cell border in the absence of ZO-2. This excess afadin could be the cause of the decrease in the initial peak of transepithelial electrical resistance, during a calcium switch. When JAM-A was evaluated, we observed that its movement to the membrane does not depend on the activation of AMPK, CaSR, or the classic/novel PKCs, indicating that JAM-A could be the protein needed for ZO-2 to localize continuously at the cell border under the low calcium condition. Moreover, in ZO-2 KD cells, a lesser amount of JAM-A reached the membrane compared to parental cells. This suggests that the absence of JAM-A may be the cause of the decrease in value of the initial peak of transepithelial electrical resistance, during a calcium switch.

# I. Introducción

## 1. Epitelios

Los epitelios cubren la superficie del cuerpo (*e.g.* piel), las cavidades (*e.g.* estómago, útero, vejiga) y los ductos (*e.g.* túbulos renales, intestino) de los organismos multicelulares. Los epitelios regulan el intercambio de sustancias del medio externo o la luz de las cavidades y los ductos, hacia el interior del organismo [para revisión ver Gonzalez-Mariscal *et al.* 2012]. De acuerdo a su organización los epitelios se clasifican en: 1) simples: forman una capa única de células o monocapa; 2) estratificados: tienen dos o más capas de células y se localiza en regiones expuestas a alto estrés mecánico y químico; 3) pseudoestratificados: aparentan tener varias capas celulares por la posición dispuesta de los núcleos en estos tejidos debido a que algunas células no llegan hasta la región apical. En relación con la forma de las células, los epitelios se dividen en: 1) escamosos: las células tienen poca altura y asemejan escamas, 2) cúbicos: las células tienen forma cúbica o hexagonal, 3) columnar: las células son más altas que anchas, 4) de transición: las células cambian de forma escamosa a cúbica según la condición del órgano [Para revisiones ver (Gonzalez- Mariscal *et al.*, 2012) (Tortora, 2011)].

Las células epiteliales están polarizadas, lo que significa que tienen una membrana apical y otra basolateral morfológica, bioquímica y funcionalmente distintas. Además, poseen un complejo de unión apical que en los vertebrados tiene tres componentes: la unión adherente (UA), la unión estrecha (UE) y la zona marginal (VMZ) (Fig. 1) (Tan *et al.*, 2020). Esta última recién se reconoce y está constituida por el complejo Crumbs, integrado por las proteínas Crumbs-3, Pals 1, PATJ y Lin7c que se localizan en una región inmediatamente superior a la UE, en lo que se considera el comienzo de la membrana apical (Fig. 1). Este complejo es crítico para la formación de las UAs y UEs, el desarrollo de la polaridad epitelial, la señalización de la vía Hippo y la remodelación de la actina (Straight *et al.*, 1990).



**Figura 1. Modelo de la organización del borde apical-lateral en las células epiteliales de los vertebrados y la composición y función de la VMZ.** El borde apical-lateral está compuesto por UA, UE y una VMZ. La VMZ está definida por el complejo Crumbs, que recluta proteínas implicadas en la señalización HIPPO y en la remodelación de la actina. (Imagen tomada de Tan *et al.*, 2020).

## 2. Uniones estrechas

### 2.1. La estructura de la UE

El tránsito de iones y moléculas en los epitelios ocurre a través de las rutas transcelular y paracelular. En la vía transcelular las sustancias pasan a través de las células cruzando la membrana plasmática por medio de canales, bombas y acarreadores, mientras que por la vía paracelular el tránsito ocurre entre las células adyacentes y se regula por la UE (Diamond, 1977).

Las UEs son estructuras de adhesión célula-célula presentes en las células epiteliales. Se localizan por debajo de la VMZ y arriba de las UAs (Fig. 2a). Las UEs se observan en cortes finos mediante microscopía electrónica de transmisión, como una región donde las caras exoplásmicas de la membrana plasmática de las células adyacentes parecen fundirse. Estos puntos denominados “besos” obliteran el espacio intercelular (Fig. 2bA) (Farquhar y Palade, 1963).

Mediante la técnica de crio-fractura la UE aparece en la cara protoplásmica (P) de la membrana como una red de filamentos continuos entrelazados que se localizan por debajo de las microvellosidades apicales. En la cara exoplásmica (E), la UE se observa como una red de zurcos complementarios (Fig. 2bB) (Staehelin *et al.*, 1969). Por otro lado, la distribución de las proteínas de la UE se observa mediante

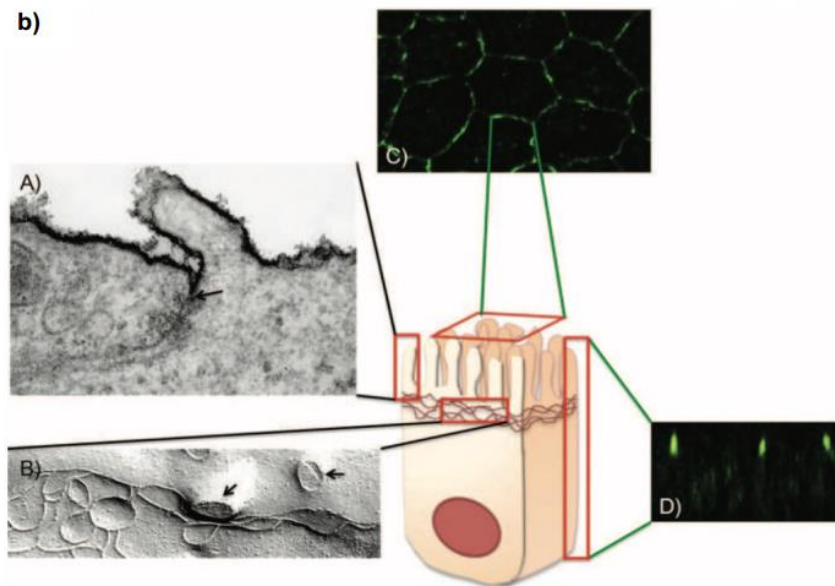
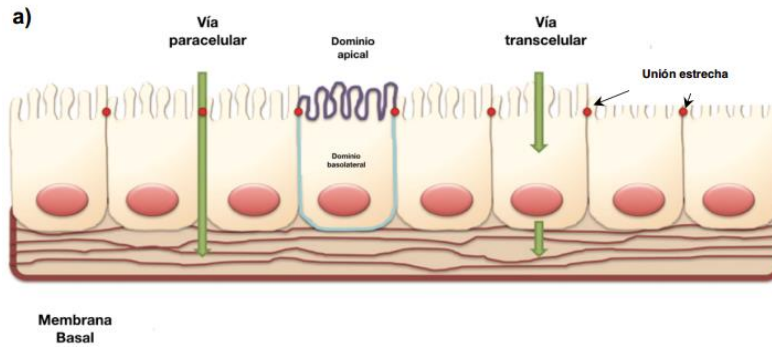
inmunofluorescencia (IF) en una imagen en fase, en el borde celular formando un patrón que asemeja a una malla de gallinero (Fig. 2bC). En cambio, en una vista lateral, la UE por IF se detecta como puntos en la parte superior de la membrana lateral (Fig. 2bD) [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2012) (Larre *et al.*, 2014) (Cerejido *et al.*, 2001)].

### **2.1.1. UE tricelular**

La unión estrecha tricelular (UEt) se encuentra en los contactos tricelulares o multicelulares, donde tres o más células epiteliales se adhieren entre sí. Junto con la unión estrecha bicelular (UEb), las UEt sellan el espacio entre las células adyacentes y regulan la permeabilidad paracelular de solutos y fluidos, contribuyendo así al mantenimiento de la barrera epitelial. Las UEt se forman por elementos centrales y laterales (Staehelin, 1973). Los elementos centrales de sellado son tres filamentos de UE que se conectan entre sí de manera continua desde la región más apical hasta la porción basal. Los filamentos laterales son hebras cortas de UE asociadas de forma perpendicular al elemento central. Estos filamentos laterales se dirigen a la región apical donde se conectan a la red de hebras de las UEb (Sugawara *et al.*, 2021).

Las proteínas transmembranales específicas de la UEt son la tricelulina (Ikenouchi *et al.*, 2005) y las angulinas (Higashi *et al.*, 2013). Estas últimas forman al elemento central de las UEt y reclutan a ZO-1 para la polimerización de las claudinas en el eje vertical de las UEt (Oda *et al.*, 2020). Por otro lado, la tricelulina se requiere para la formación de los filamentos laterales y su contacto tanto con los filamentos de la UEb como con los filamentos centrales de la UEt (Saito *et al.*, 2021).

Las UEt también funcionan como barreras paracelulares, aunque su contribución es limitada. Esto se sabe porque la eliminación de la angulina-1 disminuye la barrera a iones y macromoléculas, pero no de manera tan radical como ocurre cuando se pierden las claudinas, ZO-1 o ZO-2 (Umeda *et al.*, 2006; Otani *et al.*, 2019). Así mismo, la supresión de la tricelulina tiene un impacto variable, pues algunas células se vuelven más permeables a los iones y las macromoléculas, mientras que otras como las MDCK II no exhiben un efecto aparente (Umeda *et al.*, 2006; Ayala *et al.*, 2019).



**Figura 2. Localización de la UE.** a) Representación esquemática de una monocapa epitelial. Con puntos rojos se indica la localización de la UE y con flechas verdes las vías paracelular y transcelular. b) A) La UE vista por microscopía electrónica de transmisión en un corte fino. La flecha indica los puntos de oclusión o besos entre las membranas de las células adyacentes. B) Imagen de la UE vista en una réplica de criofractura. Las flechas indican a las microvellosidades apicales, bajo las cuales se ubica la red de filamentos entrecruzados que forma a la UE. C) Una proteína de la UE vista en fase por epifluorescencia, muestra el patrón típico de malla de gallinero. D) Vista lateral por epifluorescencia de una proteína de la UE. La UE aparece como un conjunto de puntos en la región superior de la membrana lateral (Imagen modificada de Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2012).

## 2.2. Función de cerca y compuerta de la UE

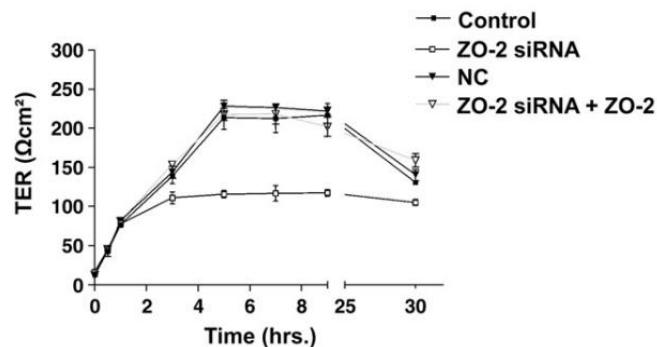
Las UEs tienen dos funciones canónicas que se asemejan a una compuerta y una cerca. Esta última se relaciona con la capacidad de las UEs para bloquear la libre difusión de lípidos y proteínas entre los dominios apical y basolateral en el plano de la

membrana plasmática, manteniendo así la polaridad (Diamond, 1977). Una forma de comprobar esta función es analizar si los lípidos fluorescentes como la esfingomielina fluoresceinada, pasan al dominio basolateral después de insertarse en la cara apical [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2012)].

La función de compuerta en cambio, se refiere a la capacidad de las UEs para regular por tamaño y carga, el paso de iones, moléculas y agua a través de la vía paracelular. Esta función se puede detectar al evaluar el paso de marcadores paracelulares como los dextransos y al medir la resistencia eléctrica transepitelial (RET) que refleja la resistencia que ofrece la UE al paso de la corriente eléctrica [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2012)].

### 2.3. Importancia del $\text{Ca}^{2+}$ para el ensamble de la UE y el desarrollo de la RET

En las células epiteliales, el  $\text{Ca}^{2+}$  es esencial para el ensamble de la UE, ya que al quelarlo con EGTA disminuye rápidamente la RET (Martinez-Palomo *et al.*, 1980). Por el contrario, al transferir las monocapas de un medio con bajo  $\text{Ca}^{2+}$  (1-5  $\mu\text{M}$ ) a uno con  $\text{Ca}^{2+}$  normal (1.8 mM), un proceso conocido como cambio a  $\text{Ca}^{2+}$ , la UE se ensambla y se desarrolla la RET (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1985). Las células que no expresan a la proteína periférica de las UEs, ZO-2, no desarrollan el pico máximo de RET después del cambio a calcio como lo hacen las células parentales (Fig. 3) (Hernández *et al.*, 2007). Esto tal vez indica que la falta de ZO-2 evita que se incorporen a la UE otros componentes críticos para una RET máxima. En esta tesis se busca identificar cuáles podrían ser estas proteínas y por ello en la introducción hacemos una amplia explicación de las proteínas de la UE y de los complejos de polaridad apical Par-3/Par-6/aPKC y Crb/PATJ/Pals1.





**Figura 3. Las células ZO-2 KD muestran un pico más bajo de RET que las células parentales.** Durante el cambio a calcio, las células ZO-2 KD muestran un pico más bajo de RET en comparación con las células parentales, lo cual puede ser restaurado mediante la transfección de ZO-2. (Imagen tomada de Hernández *et al.*, 2007).

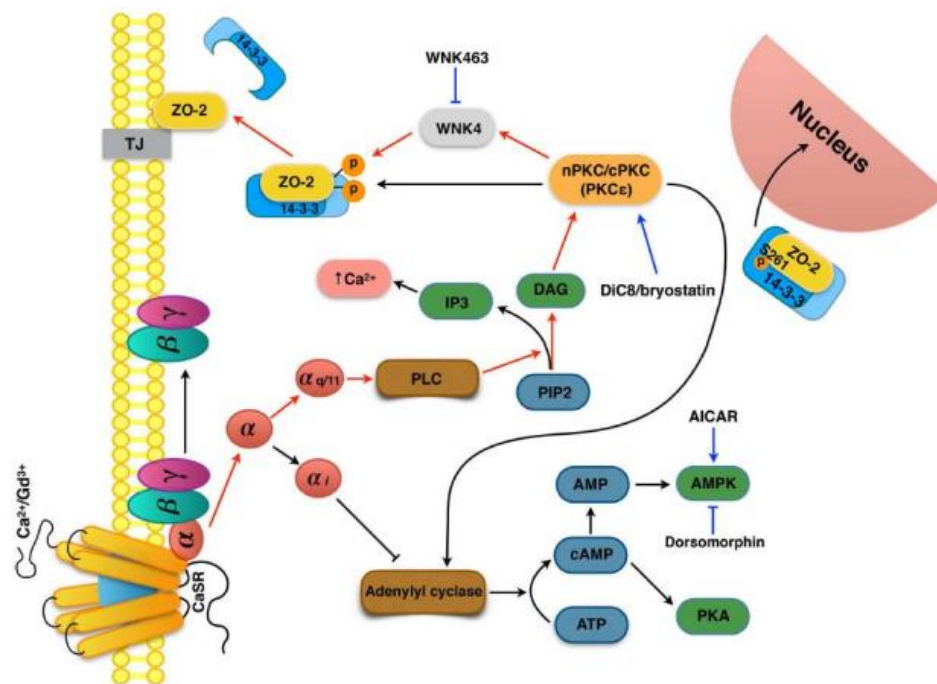
Para que las UEs se abrochen se necesita específicamente de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que al emplear a los cationes divalentes  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en el cambio a calcio, la UE no se forma. Con el cambio a calcio también aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Sin embargo, este incremento no es responsable del ensamble de la UE, ya que al hacer el cambio a calcio en presencia de  $\text{La}^{3+}$ , que bloquea el influjo  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula, la UE se desarrolla sin problema alguno (Contreras *et al.*, 1992). En las monocapas tratadas con cicloheximida, un inhibidor de la traducción, no se altera el desarrollo de la RET durante el cambio a calcio, por lo que en la condición de bajo calcio, los componentes de la UE ya están sintetizados, pero no están ensamblados (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1990). Para el ensamble de la UE también se requiere la participación del citoesqueleto de actina, pues cuando las monocapas se tratan con citocalasina B, un agente despolimerizador de la actina, la RET no se desarrolla (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1985). En el cambio a calcio también aumenta la superficie celular, lo que sugiere que se induce un proceso de exocitosis (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1990).

En los epitelios la UA se compone de E-cadherina y las  $\alpha$  y  $\beta$  cateninas. La E-cadherina es una proteína transmembranal con cinco dominios extracelulares entre los cuales se une el  $\text{Ca}^{2+}$ . La unión al  $\text{Ca}^{2+}$  hace que la cadherina se vuelva rígida y que su dominio extracelular pueda interactuar con otra cadherina en la célula vecina. La formación de la UA precede a la de la UE y es necesaria para su establecimiento, puesto que al utilizar anticuerpos contra el dominio extracelular de la E-cadherina, la UE no se forma (Gumbiner *et al.*, 1988). Además, en las células que carecen de la  $\alpha$ -catenina, las claudinas se endocitan y no se ensambla la UE (Shigetomi *et al.*, 2018).

Por otro lado, en las células MDCK, la activación del receptor sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  (CaSR) acoplado a proteína G desencadena la incorporación de la proteína de la UE ZO-2 al borde celular a través de una vía de señalización donde la subunidad  $\alpha_{q/11}$  de la proteína G, induce la activación de la PLC que a través del diacilglicerol activa a

la nueva proteína cinasa C-ε (nPKCε), que fosforila a ZO-2 y activa a la cinasa sin lisina-4 (WNK4). Esta cinasa se une y fosforila a ZO-2, provocando su desplazamiento al borde celular y disociación de 14-3-3 (Amaya *et al.*, 2019). En la membrana, ZO-2 se integra y polimeriza en las UEs recién formadas. Al mismo tiempo, las moléculas de ZO-2 que no pueden integrarse a la UE se endocitan y degradan en el lisosoma (Fig. 4) (Amaya *et al.*, 2019).

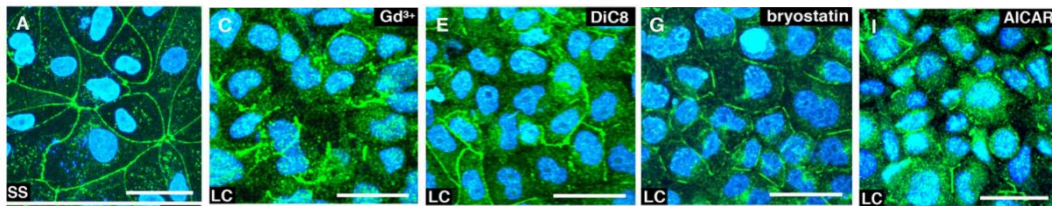
La AMPK también participa en el ensamblaje de las UEs desencadenado por el  $Ca^{2+}$  extracelular. Esta cinasa, que detecta el estado energético en las células eucariotas, se activa al elevarse la proporción AMP/ATP (Zhang *et al.*, 2006). Durante el cambio a calcio, la AMPK se activa, pero si en las células cultivadas en bajo calcio, la AMPK se activa con AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida ribosida), un nucleósido que se convierte en un nucleótido que imita al AMP (Corton *et al.*, 1995), ZO-1 (Zhang *et al.*, 2006) y ZO-2 aparecen en el borde celular (Amaya *et al.*, 2019).



**Figura 4. Esquema de la cascada de señalización que inicia con la activación del CaSR y que induce el arribo de ZO-2 a la UE.** La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular activa al CaSR presente en la membrana plasmática. Este receptor está acoplado a una proteína G cuya subunidad  $\text{G}\alpha_{\text{q11}}$  inicia la cascada de señalización que lleva a la activación de la  $\text{nPKC}\epsilon$ . Esta cinasa fosforila a la cinasa WNK4, que a su vez fosforila a ZO-2 provocando su separación de la proteína 14-3-3 e integración a la UE. El residuo 261 de ZO-2, localizado en una NLS, se une a 14-3-3 $\sigma$  y  $\zeta$  que facilitan la importación de ZO-2 al núcleo. Líneas rojas, vía de señalización que conduce al reclutamiento de ZO-2 al borde celular (Imagen tomada de Amaya *et al.*, 2019).

### 3. Proteínas integrales y periféricas de la UE

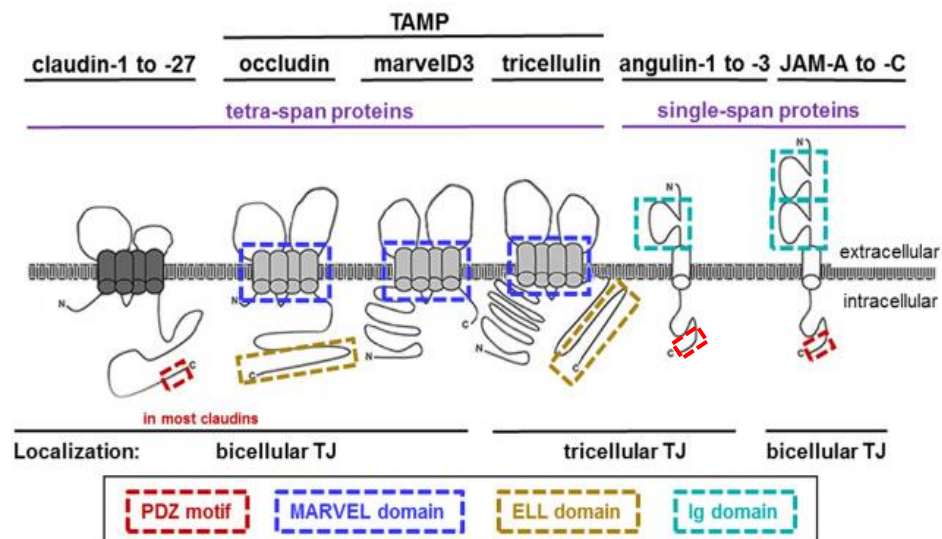
Sin embargo, cabe destacar que cuando las células se cultivan en bajo calcio, la incorporación de ZO-2 al borde celular inducida por la activación del CaSR con  $\text{Gd}^{3+}$  o río abajo de la  $\text{PKC}\epsilon$  con Dic8 o briostatina, o de la AMPK con AICAR, no genera una distribución continua y uniforme de ZO-2 en el borde celular (Fig. 5) (Amaya *et al.*, 2019). Por ello en esta tesis nos preguntamos ¿qué proteína falta que llegue también a la membrana para que ZO-2 se pueda distribuir de forma homogénea en la periferia celular?



**Figura 5. ZO-2 llega al borde celular de forma discontinua cuando se activa el CaSR con  $\text{Gd}^{3+}$  o río abajo de la  $\text{PKC}\epsilon$  con Dic8 o briostatina, o a la AMPK con AICAR.** Las monocapas se sembraron a una densidad confluyente y se incubaron en medio con calcio normal durante 24 horas (SS) o durante 1 hora y luego se transfirieron a un medio con bajo calcio por 20 horas. Estas monocapas enseguida se trataron con  $100\ \mu\text{M}$  de  $\text{Gd}^{3+}$ , un agonista del CaSR;  $0.5\ \text{mM}$  de Dic8, un activador de PKCs clásicas y nuevas;  $200\ \text{nM}$  de bryostatin, un estimulador de  $\text{nPKC}\ \delta$  y  $\epsilon$ , ó  $4\ \text{mM}$  de AICAR, un estimulador de AMPK. Se muestran las imágenes de ZO-2 detectado por inmunofluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barras,  $20\ \mu\text{m}$ . (Imagen tomada de Amaya *et al.*, 2019).

La UE se compone de proteínas integrales que establecen el contacto de la célula con sus vecinas, así como de proteínas periféricas, que conectan a estas proteínas integrales con el citoesqueleto de actinmiosina [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2012)]. Las proteínas periféricas tienen múltiples dominios de unión proteína-proteína, por lo que actúan como plataformas que concentran en la UE a proteínas que participan en diversas vías de señalización [Para revisión ver (González Mariscal *et al.*, 2012)].

Las proteínas integrales de la UE son de dos tipos, las que atraviesan la membrana cuatro veces y las que solo la cruzan una vez. En el primer grupo se encuentran ocludina, tricelulina y MarvelD3 que pertenecen a la familia TAMP. Los miembros de esta familia se caracterizan por tener un dominio MARVEL constituido por las cuatro regiones transmembrana y por estar presentes en regiones de membrana ricas en colesterol [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2012)]. Otra familia de proteínas de la UE que también cruza cuatro veces la membrana es la de las claudinas, responsables de la selectividad iónica del tejido. Las proteínas de la UE que atraviesan una sola vez la membrana son las angulinas y las JAMs que pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas (Fig. 6) [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2012)].



**Figura 6. Proteínas integrales de la UEb y UEt.** Las proteínas que atraviesan cuatro veces la membrana son las claudinas y las proteínas de la familia TAMP: ocludina, marvel D3 y trichelulina. Estas últimas contienen un dominio MARVEL (rectángulo discontinuo azul oscuro). La ocludina y la trichelulina tienen alta homología en su región C-terminal (rectángulo discontinuo marrón). Las JAMs y las angulinas atraviesan una sola vez la membrana y pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (dominios Ig en rectángulos azul claro). Las claudinas, las angulinas y las JAMs presentan un motivo de unión a dominios PDZ en su extremo carboxilo terminal (rectángulo rojo). (Imagen tomada de Piontek *et al.*, 2020).

### 3.1. Proteínas integrales de la UE de la familia de las inmunoglobulinas

Las angulinas y las JAMs tienen respectivamente uno o dos dominios de Ig que funcionan como módulos de interacción proteína-proteína. Además, ambas familias de proteínas poseen en su extremo carboxilo terminal un motivo de unión a dominios PDZ. Las JAMs y las LSR no forman los filamentos de la UE, pero son las primeras en aparecer en los sitios donde se establecerán las UEs bicelulares y tricelulares, respectivamente (Eckert y Fleming, 2008).

La angulina-1 es una proteína de 585 aa que recluta a la trichelulina a las UEt (Higashi *et al.*, 2013) y está presente en las células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas, incluidos monocitos, linfocitos y glóbulos rojos. Como ya se mencionó las angulinas constituyen el elemento central de la UEt (Sugawara *et al.*, 2021).

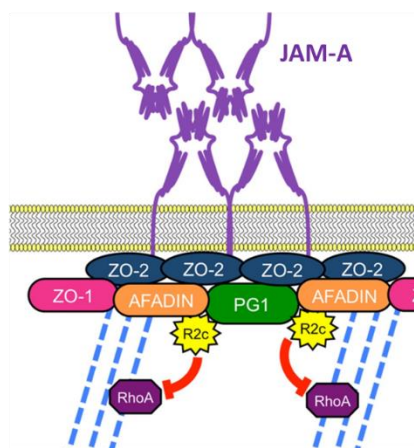
La familia de proteínas JAM está constituida por las proteínas JAM-A, B y C. De ellas la proteína más estudiada en los epitelios es JAM-A. Esta es una proteína de 36 kDa que en el espacio intercelular interacciona con la célula vecina a través de otra molécula de JAM-A o de manera heterofílica con otras JAMs o con integrinas (Monteiro *et al.*, 2013). JAM-A es la primera proteína que aparece en las UEs. El complejo Par3/Par6/aPKC la fosforila en la Ser285 y esto promueve la maduración de la UE (Ebnet, 2013).

JAM-A se asocia mediante su porción citoplasmática con las proteínas ZO, afadina, ASIP/Par-3 (Monteiro *et al.*, 2013) y cingulina (Bazzoni *et al.*, 2000). JAM-A al ser transfectada en fibroblastos promueve la localización de ZO-1, afadina, CASK y

occludina en los puntos de contacto célula-célula. En las células epiteliales la asociación de JAM con Par3 une al complejo Par3/Par6/aPKC a las UEs. La correcta ubicación de este complejo es crucial para el establecimiento de la polaridad apical-basal de las células epiteliales (Hirabayashi y Hata, 2006).

Cuando JAM-A se inhibe con anticuerpos se bloquea la recuperación de la RET en un ensayo de cambio a calcio, lo que indica que JAM es importante para el sellado de las UEs (Liu *et al.*, 2000). En cambio, el silenciamiento de JAM-A no afecta la RET, ni la permeabilidad paracelular a las moléculas. Pero, si JAM-A se noquea en las células donde también se apagó la expresión de las claudinas y por ende hay un libre flujo paracelular de iones, entonces si aumenta la permeabilidad paracelular de moléculas, y los bordes entre las células vecinas no se ven alineados. Esto indica que JAM-A no regula el tránsito de iones como sí lo hacen las claudinas, sino más bien el de moléculas y además que JAM-A es esencial para que se alineen las membranas de las células vecinas (Otani *et al.*, 2019).

JAM-A se asocia directamente con ZO-2 e indirectamente con la afadina, y a este complejo se une PDZ-GEF1, que recluta y activa a la GTPasa Rap2c. Esta última inhibe a RhoA. RhoA activa a ROCK que fosforila a la cadena ligera de la miosina no muscular 2 e inhibe a la fosfatasa de ROCK (Fig. 7). Por ello, las células deficientes de JAM-A exhiben un incremento en la actividad de RhoA y una mayor contracción de actomiosina (Monteiro *et al.*, 2013).



**Figura 7. Modelo de la función de barrera mediada por JAM-A.** JAM-A forma parte de un complejo compuesto por ZO-2, afadina y PDZ-GEF1 (PG1), que recluta y activa Rap2c (R2c) y controla la contracción actomiosínica mediante la activación de RhoA para regular la función de barrera epitelial. (Imagen tomada de Monteiro *et al.*, 2013).

### **3.2. Las claudinas**

Las claudinas forman barreras y poros en el espacio intercelular que determinan la permeabilidad paracelular de las células epiteliales. Las claudinas cuyo peso oscila desde 20 a 34 kDa, poseen dos asas extracelulares de diferentes tamaños (Gunzel y Yu, 2013). La primera asa contiene aminoácidos cargados que determinan la selectividad iónica, y la segunda asa interactúa con otras claudinas en trans y cis, generando la oligomerización de las claudinas en filamentos de UE (Umeda *et al.*, 2006). Además, las claudinas tienen en su extremo carboxilo terminal, un motivo de unión a dominios PDZ que permite su asociación con proteínas periféricas de la UE como las ZO y MUPP1 (Hamazaki *et al.*, 2002). Las claudinas interactúan entre sí de forma homofílica y heterofílica y se dimerizan de manera homomérica y heteromérica. Aunque las claudinas están presentes en todas las células epiteliales, cada tipo celular expresa una combinación única de ellas [Para revisión ver (González-Mariscal *et al.*, 2012)].

### **3.3. Las TAMPs: ocludina, tricelulina y marvel D3**

#### **3.3.1. La ocludina**

La ocludina es una proteína de 62-82 kDa de peso, cuya expresión incrementa la RET (Balda *et al.*, 1996), y promueve la correcta localización del complejo de polaridad apical aPKC/Par3/PATJ (Du *et al.*, 2010). La fosforilación del dominio carboxilo de ocludina regula su interacción con las proteínas ZO, mientras que la cola citoplásmica amino terminal de la ocludina se asocia a la E3 ubiquitina ligasa Itch (Sakakibara *et al.*, 1997).

En los ratones, la delección de ocludina no evita su desarrollo embrionario, ni su crecimiento ulterior y en estos animales las UEs tienen una morfología normal (Saitou *et al.*, 2000). Sin embargo, los ratones KO presentan otras anomalías como hiperplasia gástrica, depósitos de calcio en el cerebelo e infertilidad masculina ocasionada por la

apertura de la barrera hematotesticular (Saitou *et al.*, 2000). Esto indica que la ocludina es una proteína esencial en las UE de las células de Sertoli de los túbulos seminíferos (Saitou *et al.*, 2000).

En los cultivos celulares, la falta de ocludina se compensa parcialmente con las proteínas MARVEL D3 y trichelulina que se mueven de las tUEs a las UEb (Raleigh *et al.*, 2010).

### **3.3.2. La trichelulina**

La trichelulina es una proteína de 65 kDa cuya delección compromete la función de barrera de las células epiteliales y en concordancia, su sobreexpresión refuerza la barrera a iones y solutos más grandes. En las UEb la delección de la trichelulina disminuye el entrecruzamiento de la red de filamentos de la UE (Ikenouchi *et al.*, 2005).

La trichelulina se recluta a las UEt por la angulina-1, mientras que la ocludina la excluye de las UEb (Ikenouchi *et al.*, 2005). La trichelulina interactúa a través de su segmento citoplasmático N-terminal con ZO-1 (Furuse *et al.*, 1994) (Riazuddin *et al.*, 2006) y con la GEF Tuba que activa a Cdc42 (Oda *et al.*, 2017).

### **3.3.3. Marvel D3**

Marvel D3 es una proteína de 45 kDa, no esencial para la formación de las UEs, que participa en la regulación de la señalización de dicha unión. MarvelD3 inhibe a la vía MEKK1-c-Jun al reclutar a la cinasa MEKK1 a las UEs. Esto inhibe la transcripción de genes regulados por JNK, como CD1, lo que disminuye la proliferación y migración celular (Steed *et al.*, 2009).

## **4. Proteínas periféricas de la UE sin repetidos PDZ: cingulina y paracingulina**

La cingulina es una proteína de 140 kDa con una estructura similar a la miosina II (Citi *et al.*, 1988). La cingulina forma homodímeros paralelos, donde cada subunidad consta de una cabeza globular N-terminal grande, una pequeña cola globular C-terminal y un dominio medio de varilla en espiral (Cordenonsi *et al.*, 1999). La cingulina interactúa con actina, miosina, ZO-1, ZO-2, ZO-3, afadina, JAM-A, y



occludina (Fig. 8) (Samarin *et al.*, 2007). Además, la cingulina al activar a GEF-H1 inhibe a RhoA. De esta manera la formación de las UEs se relaciona con la inhibición de la señalización de RhoA (Saima *et al.*, 2005).

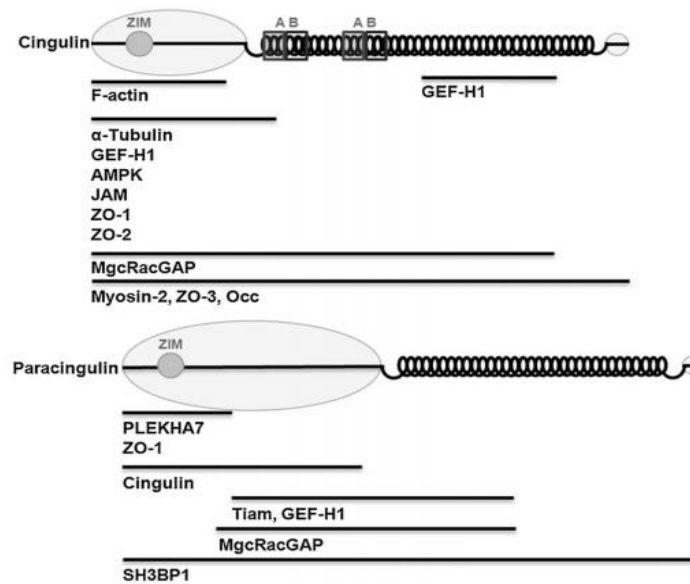
JACOP/paracingulina es una proteína de 160 kDa con una organización similar a la cingulina y un 40% de identidad en su secuencia. La paracingulina regula la actividad de Rac1 y RhoA. Durante la formación de las UAs, la paracingulina recluta a Tiam1, una GEF, que activa a Rac1 y permite el ensamble de la UE. La paracingulina también recluta a GEF-H1, que inhibe a RhoA. En las células epiteliales, la reducción de los niveles activos de RhoA y la activación de Rac1 es importante para la adquisición de la confluencia (Guillemot *et al.*, 2008).

La cingulina y la paracingulina se asocian a la actina y los microtúbulos (Ohnishi *et al.*, 2004) (Yano *et al.*, 2013). La cingulina se recluta a las UEs por ZO-1, mientras que la paracingulina se localiza en las UEs y las UAs donde interactúa con PLEKHA7 (Fig. 8) (Pulimeno *et al.*, 2011). Cuando baja la expresión de cingulina y paracingulina no se afecta la formación de las UEs, pero si la expresión de otras proteínas de la unión. Así, en los cuerpos embrionarios de ratón el silenciamiento de la cingulina aumenta la expresión de ZO-2, occludina y claudina-6 y disminuye la expresión de ZO-1, mientras que en las células MDCK, aumenta ZO-3 y las claudina-2, 6 y 7 (Guillemot *et al.*, 2004).

## **5. Las proteínas periféricas de la UE con repetidos PDZ: MAGUK, MAGUK invertidas y las proteínas con múltiples dominios PDZ**

Los dominios PDZ deben su nombre a las tres proteínas en donde se describieron por primera vez: PSD-95, Discs-large y ZO-1. Los dominios PDZ son módulos de 80 a 90 aa que interactúan con otros dominios PDZ o con motivos presentes en la región C-terminal de ciertas proteínas como S/TXV o  $\phi X \phi$ , donde  $\phi$  corresponde a un aminoácido hidrofóbico y X a cualquier aminoácido (Ernst *et al.*, 2014). Las proteínas que poseen dominios PDZ se clasifican en los siguientes grupos: 1) MAGUK, como ZO-1, -2 y -3 y Pals1; 2) MAGUK invertidas como MAGI-1, -2 y -3; 3) Con múltiples dominios PDZ como PATJ y MUPP1; y 4) Con dominios PDZ

pero que no pertenecen a las familias anteriores como afadina, PAR-3 y PAR-6 (González-Mariscal *et al.*, 2012).



**Figura 8. Representación esquemática de cingulina y paracingulina con las moléculas asociadas.** En la cingulina; ZIM, motivo de interacción con ZO-1. Óvalo grande: dominio de cabeza; espiral, varilla enrollada en hélice; círculo, cola pequeña globular y AB, segmentos con homología entre sí. Para la paracingulina; ZIM, motivo de interacción con ZO-1. Óvalo grande, dominio de cabeza; espiral, varilla enrollada en hélice; y círculo, cola pequeña globular. (Imagen tomada de Gonzalez Mariscal *et al.*, 2016).

La familia de proteínas asociadas a la membrana con homología a la guanilato cinasa (MAGUK) se localizan en las UEs, las UAs (González Mariscal *et al.*, 2000), las uniones septadas de los insectos (Woods y Bryant, 1991) y las densidades sinápticas de las neuronas (Cho *et al.*, 1992; Kistner *et al.*, 1993).

Las proteínas MAGUK tienen dominios PDZ, un módulo SH3 (Src Homology 3) y un dominio guanilato cinasa (GuK). Las proteínas MAGUK de la UE, ZO-1, ZO-2, ZO-3 tienen 3 dominios PDZ, mientras que Pals 1 solo tiene uno. El dominio SH3 tiene de 50 a 70 aa que se unen al módulo GuK o a secuencias ricas en prolina con el consenso PXXP (Faravelli y Dimasi, 2006). El dominio GuK tiene homología con el dominio de la cinasa que convierte al GMP en GDP. Sin embargo, este dominio en las proteínas MAGUK carece de actividad catalítica ya que no contiene los aa que se unen

al GMP (Kistner *et al.*, 1995). El segmento MAGUK de las proteínas ZO se une a proteínas de la UE y UA, mientras que su porción carboxilo se asocia al citoesqueleto de actina (Lye *et al.*, 2010).

## **5.2. Proteínas MAGI**

Las proteínas MAGUK invertidas o MAGIs se caracterizan porque en ellas la mayoría de los dominios PDZ se localizan en la porción C- terminal, al revés de lo que sucede en las MAGUK donde estos dominios se ubican hacia el extremo amino. Además, las MAGIs en lugar del dominio SH3, presentan un dominio WW que también se une a motivos ricos en prolina, pero con otro consenso [PPXY, PPLP, y motivos de poli-prolina flanqueados por arginina o lisina, así como fosfo-SP o fosfoTP, en donde X corresponde a cualquier aminoácido, P a prolina, L a leucina, fosfoS a serina fosforilada y fosfo-T a treonina fosforilada] (Dobrosotskaya *et al.*, 1997).

## **5.3. Proteínas con múltiples dominios PDZ: MUPP1 y PATJ**

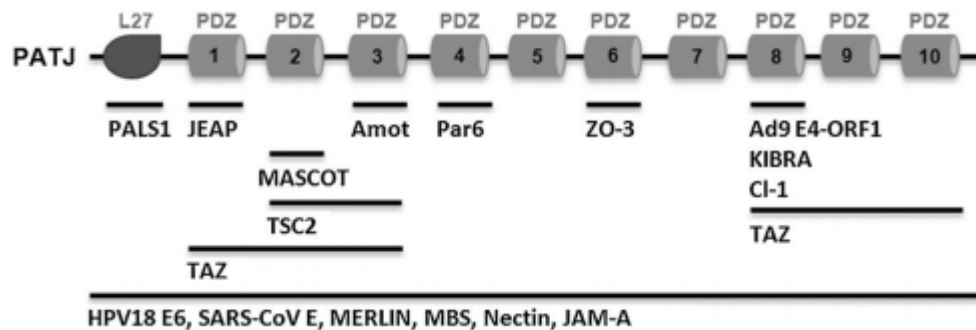
Las proteínas MUPP1 y PATJ (proteína de la unión estrecha asociada a Pals) tienen respectivamente 13 y 10 dominios PDZ además del módulo de interacción proteína-proteína, L27 (Fig. 9) (Roh *et al.*, 2002b). Estas proteínas funcionan como andamios multivalentes que reclutan a una gran variedad de proteínas a las UEs. Así, MUPP1 y PATJ interactúan en la UE con claudina-1 (Hamazaki *et al.*, 2002), JAM-A, ZO-3, Par6 y Pals1 (Adachi *et al.*, 2009). En la UA se asocian con las nectinas (Adachi *et al.*, 2009). Además, la sobreexpresión de PATJ bloquea la localización en las UEs de ZO-1 y ZO-3 (Lemmers *et al.*, 2002)

Como se mencionó anteriormente PATJ forma parte del complejo presente en la VMZ donde la proteína apical transmembranal Crumbs-3 se une a Pals1, la que a su vez recluta a PATJ a la UE (Fig. 16) (Roh *et al.*, 2002). El silenciamiento de PATJ disocia a Pals1 de la UE (Michel *et al.*, 2005), y a su vez la pérdida de Pals1 disminuye la expresión de PATJ (Straight *et al.*, 2004) Además, al inhibir la expresión de Pals1 y PATJ se retrasa la polarización epitelial y disminuye la RET (Straight *et al.*, 2004).

El complejo Crumbs-3/Pals1/PATJ interactúa con el complejo de polaridad apical Par3/ Par6/aPKC por la interacción entre Par6 y Pals1 (Hurd *et al.*, 2009). Esto inicia con la formación de un complejo transitorio entre Par3 y Pals1 y cuando la aPKC

fosforila a Par3, el complejo Par3/Pals1 se disocia, permitiendo la formación del complejo Crumbs/Pals que recluta a PATJ (Hurd *et al.*, 2009). PATJ regula la migración celular direccional al inducir la localización de Par3 y aPKC en el borde de migración de la célula (Shin *et al.*, 2007). Así, cuando aumenta el contenido de PATJ en el frente de migración de las células se favorece el reclutamiento de Par3 (Assemat *et al.*, 2013).

PATJ, pero no MUPPI, es indispensable para el establecimiento de la UE y la polaridad epitelial (Shin *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 2009). Esto se basa en que Pals1 muestra mayor afinidad por PATJ que por MUPPI. Los complejos Pals1/MUPPI y Pals1/PATJ coexisten en las células, y el nivel de la proteína MUPPI se correlaciona de manera inversa con el nivel de PATJ (Adachi *et al.*, 2009).



**Figura 9. Representación esquemática de PATJ con las moléculas asociadas.** Contiene el dominio L27, Lin2 y Lin7, y dominio PDZ. (Imagen tomada de Gonzalez Mariscal *et al.*, 2016).

#### 5.4. Otras proteínas de la UE con dominio PDZ: afadina, Par-3 y Par-6

En este grupo se encuentran las proteínas afadina, Par-3 y Par-6 que tienen de 1-3 dominios PDZ pero que no poseen dominios SH3, GuK o WW.

##### 5.4.1. Afadina

Existen dos isoformas de afadina generadas por procesamiento alternativo. La pequeña denominada AF-6 presente en el cerebro, y otra más grande que se expresa en todos los tejidos (Prasad *et al.*, 1993). La afadina se localiza en las UEs y UAs y participa en la polarización temprana del complejo de unión apical (Yamamoto *et al.*,

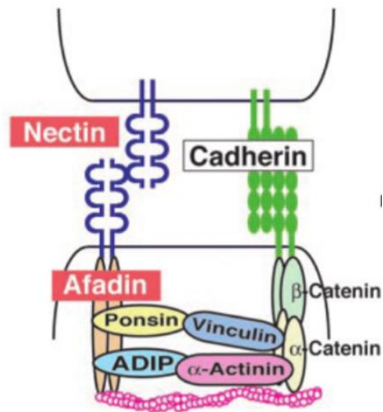
1997). Por ello se piensa que su importancia radica en la formación de las uniones más que en el mantenimiento de los complejos estables (Yamamoto *et al.*, 1997).

La afadina pesa 205 kDa y contiene dos dominios de unión a Ras en su extremo amino (Yamamoto *et al.*, 1997), un módulo PDZ y tres dominios ricos en prolina seguidos por una región de unión a F-actina en el extremo carboxilo (Fig. 11) (Mandai *et al.*, 1997). ZO-1 se une a las regiones ricas en prolina y a los dominios de unión a Ras de afadina (Takako *et al.*, 2010). La sobreexpresión de Ras activo perturba los contactos célula-célula y disminuye la acumulación de afadina y ZO-1 en el borde celular (Yamamoto *et al.*, 1997). En la UA el dominio PDZ de afadina se asocia con el extremo carboxilo de la nectina (Takahashi *et al.*, 1999). El complejo nectina/afadina se conecta con el complejo cadherina-catenina a través de la ponsina (Fig. 10) (Mandai *et al.*, 1999). La deficiencia de afadina deslocaliza a las nectinas 2 y 3 de la UA (Tanaka-Okamoto *et al.*, 2011).

La afadina también es importante para la función de barrera de la UE ya que su pérdida aumenta la permeabilidad paracelular intestinal (Tanaka-Okamoto *et al.*, 2011). La afadina interactúa con la cingulina (Cordenonsi *et al.*, 1999a) y forma un complejo con JAM-A, ZO-2 y el PDZ-GEF1, que recluta y activa a la GTPasa Rap2c que inhibe a RhoA y, por tanto, inhibe la contracción de la actomiosina (Fig. 7) (Monteiro *et al.*, 2013).

La afadina se asocia con profilina, una proteína que activa a las unidades de actina monoméricas para su posterior polimerización y ensambla a la actina cortical (Boettner *et al.*, 2000).

Por otro lado, la afadina recluta a Fam (Fig. 11), una enzima que desubiquitina a los componentes de la UE y la UA, lo que podría desempeñar un papel crucial en la estabilidad de los contactos célula-célula (Taya *et al.*, 1998).



**Figura 10. Modelo de la asociación de nectinas, afadina y E-cadherinas durante la formación de las UAs.** La región citoplásmica de las nectinas se une a afadina. Las adhesiones célula-célula basadas en nectinas reclutan luego a la E-cadherina a través de la unidad ponsin-vinculina. La región citoplásmica de la E-cadherina se une a la  $\beta$ -catenina, la cual a su vez se une a la  $\alpha$ -catenina. La  $\alpha$ -catenina se asocia con la actina. La unidad ADIP- $\alpha$ -actinina se ensambla en los sitios de adhesión célula-célula. (Imagen tomada de Ooshio *et al.*, 2004).

#### 5.4.2. Par-3

Par-3 es una proteína con tres dominios PDZ, que a través de su PDZ-1 se une al extremo carboxilo terminal de JAM (Fig. 11) (Itoh *et al.*, 2001). Par-3 forma un complejo con Par-6 y las PKC atípicas  $\lambda$  y  $\zeta$  (Izumi *et al.*, 1998).

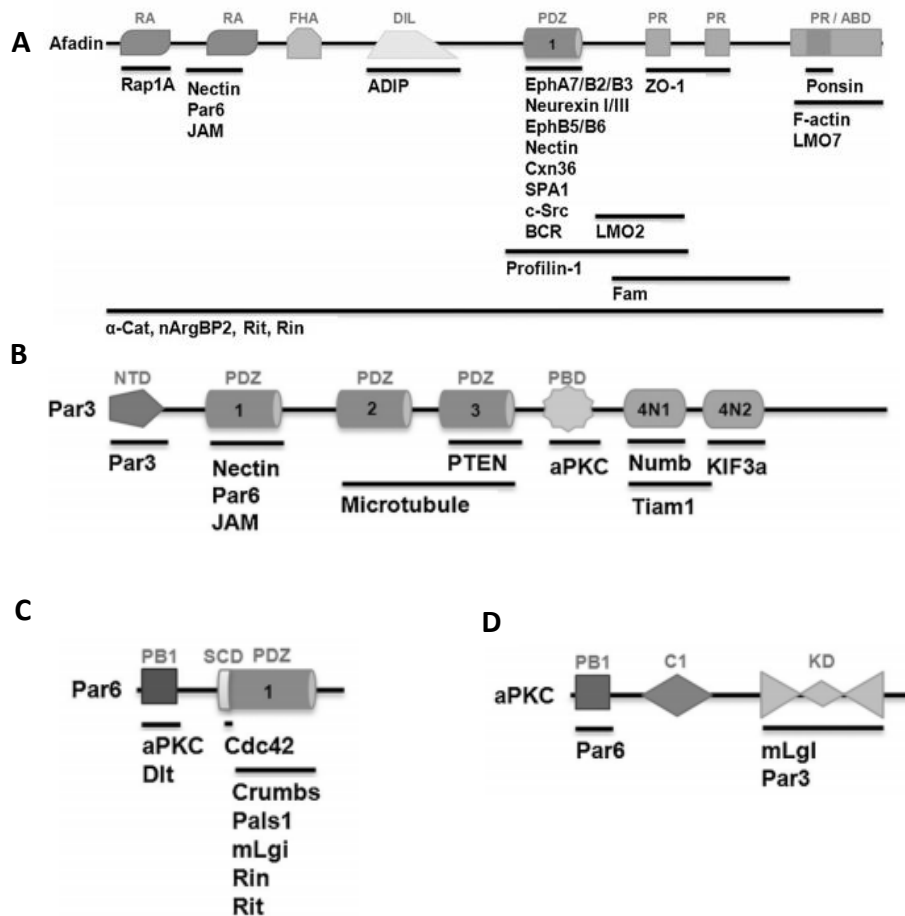
#### 5.4.3. Par-6

Par-6 posee un solo dominio PDZ e interactúa con Rac1 y Cdc42 (Fig. 11) (Johansson *et al.*, 2000). Esta última interacción aumenta la actividad de las PKC atípicas (Yamanaka *et al.*, 2001). Par-6 inhibe la formación de la UE durante el cambio a calcio (Gao *et al.*, 2002).

### 6. El complejo Par-3/Par-6/aPKC y su relación con JAM-A

Cuando se establecen los primeros contactos célula-célula, Cdc42-GTP interactúa con Par-6 presente en el complejo aPKC/Par6/Lgl. Esto activa a la aPKC que fosforila a Lgl y produce la separación de Lgl del complejo y su asociación a la membrana basolateral (Yamanaka *et al.*, 2001). Al salir Lgl del complejo, se forma otro grupo integrado por Par3/Par6/aPKC que a través de Par-3 se une a JAM-A que

se integra a la membrana y marca el sitio donde se formará la UE (Fig. 12) (Ebnet *et al.*, 2001).

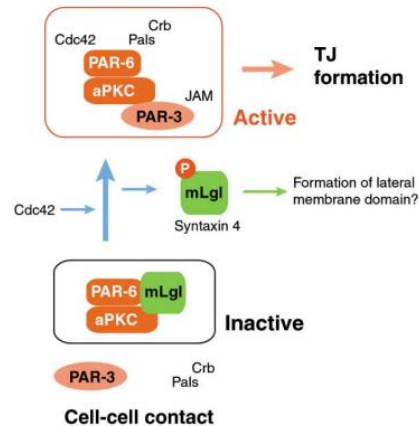


**Figura 11. Representación esquemática de la afadina y sus moléculas de interacción.** A) La afadina se compone de: los dominios asociados a Ras (RA), el dominio asociado a *forkhead* (FHA), el dominio DIL, el dominio PDZ, dominio rico en prolina (PR) y dominio de unión a actina (ABD). B) Par-3 contiene: el dominio N- terminal (NTD), un dominio PDZ, el dominio de unión a PKC (PBD) y 4N. C) Par-6 consta de: el dominio PB1, el dominio SCD semi-Crib, y el dominio PDZ. D) La aPKC se compone de: el dominio PB1, un dominio rico en cisteína C1 y el dominio cinasa KD. (Imagen tomada de Gonzalez Mariscal *et al.*, 2016).

## 7. Las proteínas ZO

Las proteínas ZO cuyas siglas derivan de *Zonula Occludens*, el nombre en latín de la UE, poseen tres dominios PDZ, un módulo SH3, un dominio GuK y una región rica en prolinas. Estos dominios se entrelazan entre sí mediante regiones únicas (U), que corresponden a secuencias de aminoácidos que no forman estructuras secundarias

o terciarias. La región N-terminal de las proteínas ZO interactúa con las claudinas, ocludina y JAM-A, mientras que la C-terminal de ZO-1 y ZO-2 contiene un sitio de unión a la actina (ABR) (Fanning *et al.*, 1998). Existen tres proteínas ZO: ZO-1, ZO-2 y ZO-3, cuyos nombres se asignaron secuencialmente con base al orden de su descubrimiento (Fanning *et al.*, 1998).



**Figura 12. Modelo esquemático del establecimiento de la polaridad epitelial por el complejo Par-6/aPKC.** El complejo Par-6/aPKC/mLgl inactivo se localiza inicialmente en los contactos célula-célula. Cdc42 activa a la aPKC y esta fosforila a la mLgl que se separa de Par-6/aPKC. Así se forma el complejo Par-6/aPKC/Par-3 activo que promueve la formación de la UE con JAM-A. El complejo Pars/Crb puede contribuir a este proceso a través de su interacción con Par-6. (Imagen tomada de Yamanaka *et al.*, 2003).

## 8. ZO-2

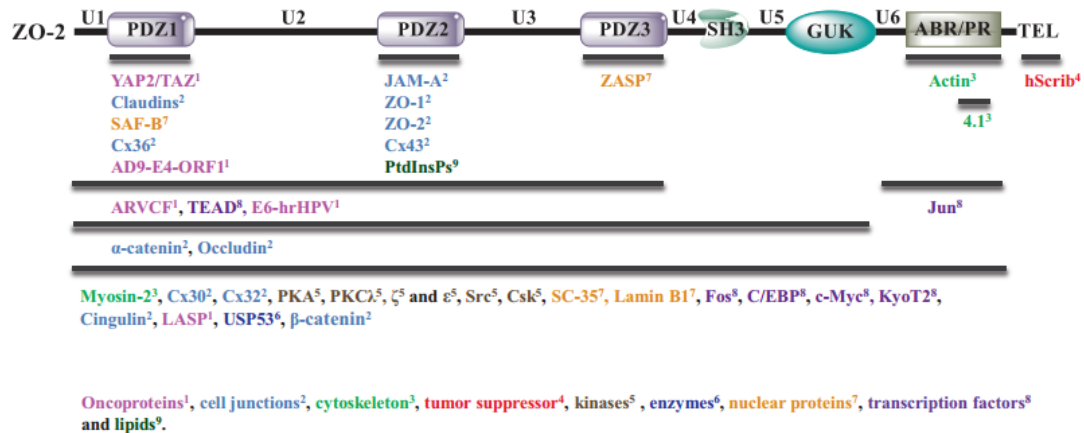
La proteína ZO-2 tiene 1,190 aa y su peso molecular teórico es de 134 kD, pero su peso electroforético en un gel SDS-PAGE es de 160 kD se explica por su alto contenido de prolina (7.1 %) (González-Mariscal, 2010). ZO-2 se identificó por su co-inmunoprecipitación con ZO-1 (Gumbiner *et al.*, 1991) y se localiza en la UE (Itoh *et al.*, 1999b).

### 8.1. Organización molecular de ZO-2

En el extremo amino de ZO-2 se localizan sus tres dominios PDZ. El primero se asocia a las claudinas, el segundo a ZO-1, a otras moléculas de ZO-2, a la conexina 43 y a las JAMs y el tercero se une a la proteína de los moteados nucleares ZASP. La sección media de ZO-2 alberga los dominios SH3 y GuK, que conforman un módulo plegable tipo bisagra (González-Mariscal *et al.*, 2017).



A esta región se unen la ocludina y la  $\alpha$ -catenina. En la región carboxilo, se sitúan un segmento ácido y otro rico en prolina, con una región de unión a actina. A este segmento se une también la cingulina. En el extremo C-terminal de ZO-2 está presente un motivo TEL de unión a dominios PDZ que se asocia con Scribble, miembro del complejo de polaridad lateral (Fig. 13) (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2017).



**Figura 13. Representación esquemática de ZO-2.** Se indica la localización de los tres dominios PDZ, SH3 y GuK, la región rica en prolina (PR), la zona ácida (Acid), las regiones U, la región de unión a actina (ABR) y su segmento carboxilo terminal con el motivo de unión PDZ, TEL. Las líneas indican las regiones de ZO-2 que se asocian con diferentes moléculas, incluyendo oncoproteínas, proteínas de unión celular, supresores de tumores, quinasas, factores nucleares y de transcripción, y lípidos. (Imagen tomada de González-Mariscal *et al.*, 2022).

## 8.2. Función de ZO-2 en la membrana

En las células epiteliales donde se suprime la expresión de ZO-1 y ZO-2 (ZO-1 KO/ZO-2 KD) no se forman los filamentos de la UE. Por ello se concluye que ZO-2 y ZO-1 tienen un papel fundamental en la polimerización de las claudinas en filamentos de la UE. La función de ZO-1 y ZO-2 es redundante puesto que, la reintroducción de cualquiera de las dos proteínas provoca la reaparición de los filamentos de la UE (Umeda *et al.*, 2006).

Durante el cambio a calcio, el silenciamiento de ZO-2 produce un retraso en el arribo al borde celular de las proteínas ZO-1, ocludina y E-cadherina y como ya mencionamos, una disminución en el pico de la RET máxima (Hernandez *et al.*, 2007).

En los embriones murinos, el KO de ZO-2 es letal pues detiene el desarrollo al inicio de la gastrulación por una disminución de la proliferación celular en E6.5 y un incremento de la apoptosis en E7.5 (Xu *et al.*, 2008). Cuando en una blástula de ratón silvestre se reemplazó la masa celular interna (MCI) de un embrión de ratón silvestre por otra KO para ZO-2 se generaron ratones viables. Esto indica que ZO-2 es fundamental para el desarrollo del trofoblasto y no para el embrión *per se*. Sin embargo, las quimeras macho adultas tenían abierta la barrera hematotesticular (BHT) por lo que estos animales eran infértiles (Xu *et al.*, 2009). Esto indica que ZO-2 tiene una función crucial en la formación de la BHT.

En las UEs de los hepatocitos, ZO-2 también tiene un papel fundamental ya que su ausencia produce hipercolanemia familiar, una condición donde las UEs del hígado son permeables, lo que ocasiona la fuga de los ácidos biliares a la sangre (Carlton *et al.*, 2003).

ZO-2 también es crucial para la audición. En la cóclea, las UEs mantienen el gradiente de  $K^+$  entre las superficies apical y basolateral de las células ciliadas. Cuando estas UEs se abren, desaparece este gradiente y las células ciliadas degeneran y mueren por apoptosis generando sordera (Kazmierczak *et al.*, 2015). Cuando se duplica el gen TJP2, se provoca en humanos sordera autosómica dominante. Esto ocurre porque se induce la expresión de genes proapoptóticos que matan a las células ciliadas del oído interno, que son las más sensibles del cuerpo a la apoptosis. Sin embargo, en las células MDCK la sobreexpresión de ZO-2 no induce apoptosis (Tapia *et al.*, 2009).

Con base en estos estudios se concluye que, aunque ZO-2 se expresa en todos los epitelios del cuerpo, su función es esencial y no redundante en el ratón para la formación del tejido extraembrionario y la BHT; y en los humanos, en la UE del hígado y el oído interno.

### **8.3. Función de ZO-2 en el núcleo**

ZO-2 viaja al núcleo en la fase G1 tardía y sale de él en la mitosis (Tapia *et al.*, 2009). En el núcleo ZO-2 se distribuye en un patrón moteado y se asocia a la lámina B1 de la matriz nuclear y a la proteína SUN-1 del complejo LINC que a través de las nesprinas se une en el citoplasma al citoesqueleto de actina, vinculina y microtúbulos (Islas *et al.*, 2002). ZO-2 se asocia al factor esencial para el procesamiento alternativo

del pre-ARNm, SC35 (Islas *et al.*, 2002), a la proteína ZASP (Lechuga *et al.*, 2010) y a SAF-B, (Traweger *et al.*, 2003). ZO-2 también interactúa con los factores de transcripción Jun, Fos, C/EBP (Betanzos *et al.*, 2004), c-Myc (Huerta *et al.*, 2007) y KyoT2 (Huang *et al.*, 2002). Además, algunas proteínas entran al núcleo por asociación con ZO-2, tal es el caso del coactivador transcripcional YAP-2 (Oka *et al.*, 2010) y del factor de transcripción TEAD (Gallego-Gutiérrez *et al.*, 2021).

ZO-2 inhibe la transcripción de genes controlados en su promotor por sitios AP-1 (Huerta *et al.*, 2007), y la transcripción de la ciclina D1 (CD1), una proteína indispensable para la progresión de la fase G1 del ciclo celular, al formar un complejo con c-Myc y HDAC1 que se asocia a una caja E del promotor (Huerta *et al.*, 2007).

ZO-2 también inhibe la transcripción de promotores regulados por sitios LEF como los de la ruta Wnt (Wetzel *et al.*, 2017, Tapia *et al.*, 2009) y por sitios TEAD modulado por el factor transcripcional YAP (Dominguez-Calderón *et al.*, 2016; Gallego-Gutiérrez *et al.*, 2021). ZO-2 recluta al borde celular a LATS1, una cinasa de la ruta Hippo que fosforila a YAP (González-González *et al.*, 2022). Por ello en las células ZO-2 KD se inhibe la fosforilación de YAP (Dominguez-Calderón *et al.*, 2016). Esto permite que YAP entre al núcleo y promueva la transcripción de genes regulados por sitios TEAD que promueven el crecimiento y la transformación celular. YAP induce la transcripción de la subunidad catalítica de la PI3 cinasa que al promover la síntesis de PIP3 activa a AKT y río abajo al complejo mTORC1. Esto promueve la fosforilación y activación de la cinasa S6K1 lo que aumenta la síntesis de proteínas e induce hipertrofia en las células ZO-2 KD (Dominguez-Calderon *et al.*, 2016).

#### **8.4. Distribución y tráfico intracelular de ZO-2**

La distribución de ZO-2 es sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y la densidad celular. En las células cultivadas en bajo calcio, donde las UEs no se ensamblan (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1985), ZO-2 se localiza en el citoplasma y el núcleo (Islas *et al.*, 2002) (Amaya *et al.*, 2019). En cambio, en los cultivos con calcio normal, las monocapas confluentes concentran a ZO-2 en el borde celular, mientras que en los cultivos subconfluentes ZO-2 muestra una fuerte presencia nuclear (Islas *et al.*, 2002).

En ausencia de las UEs por falta de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, ZO-2 se vuelve inestable, y su vida media se reduce a 7 horas en comparación con las 19.7 horas de vida media que tiene en las monocapas en calcio normal. En bajo calcio, ZO-2 se degrada constantemente en el proteosoma y solo una fracción de la proteína se conserva en el citoplasma, asociada a 14-3-3 (Amaya *et al.*, 2019).

La interacción de ZO-2 citosólica con 14.3.3 promueve su importación al núcleo (Amaya *et al.*, 2019) donde se mantiene una gran reserva de ZO-2 en las células que aún no forman sus UEs (Chamorro *et al.*, 2009). El segmento U2 de ZO-2, ubicado entre los dominios PDZ-1 y PDZ-2, contiene casi la mitad de los motivos de unión a 14-3-3 de ZO-2 y es por lo mismo crucial para el establecimiento del complejo ZO-2/14-3-3. La inhibición de 14-3-3 con BV02 en las células cultivadas en bajo calcio induce la aparición de ZO-2 en el borde celular, lo que sugiere que la disociación del complejo 14-3-3/ZO-2 facilita la incorporación de ZO-2 a la UE (Amaya *et al.*, 2019). La cantidad de ZO-2 presente en la fracción de membrana por *western blot* no aumenta después del tratamiento con BV02. Esta inesperada observación sugiere que la disociación del complejo 14-3-3/ZO-2 es necesaria para que ZO-2 se polimerice en el borde celular y pueda ser detectada por inmunofluorescencia (Amaya *et al.*, 2019).

En las células MDCK confluentes, ZO-2 está 22 veces más concentrado en las UEs que en el citoplasma. Sin embargo, la fracción de ZO-2 de la UE se intercambia constantemente con la poza citoplásmica. Esto se sabe por experimentos de recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo, que muestran un tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de ZO-2 de 126 s, que resulta más rápido incluso que los 161 s observados para ZO-1 (Beutel *et al.*, 2019). El análisis de espectroscopía de correlación de fluorescencia reveló que en el citoplasma, el 20% de la fracción total de ZO-2 corresponde a monómeros con una rápida difusión, mientras que el resto corresponde a una fracción de oligómeros con una difusión más lenta (Beutel *et al.*, 2019).

### **8.5. Las SLN y SEN de ZO-2 y su modificación postraduccional**

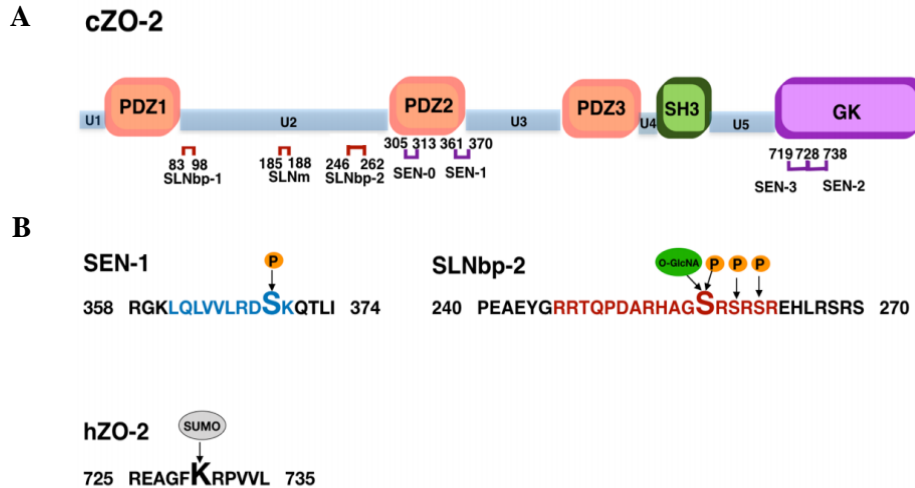
En los cultivos subconfluentes, ZO-2 recién sintetizada se mueve al núcleo, y a medida que el cultivo alcanza la confluencia, abandona el núcleo y se acumula en las UEs (Chamorro *et al.*, 2009). En cambio, en los cultivos confluentes, ZO-2 recién

sintetizada viaja directamente hacia la membrana celular (Quiros *et al.*, 2013). El tamaño de ZO-2 excede el límite para difundir pasivamente a través de los poros nucleares. Por ello, el tráfico intracelular de ZO-2 requiere de señales de localización (SLN) y exportación nuclear (SEN). ZO-2 canina (cZO-2) contiene en el segmento U2 que se encuentra entre los dominios PDZ-1 y PDZ-2, dos SLNs bipartitas (SLNbp-1 y SLNbp-2), una SLN monopartita (SLNmp) y 16 repetidos de serina y arginina (SR) que dirigen a las proteínas a los moteados nucleares (Fig. 14). Además, cZO-2 tiene cuatro SEN, dos en el dominio PDZ-2 (SEN-0 y SEN-1) y dos en el dominio GuK (SEN-2 y SEN-3) (González-Mariscal *et al.*, 2006). Se requiere la fosforilación de la S369 por nPKC $\epsilon$  para activar a la SEN-1 de ZO-2 y es necesaria la presencia de las cuatro SEN de ZO-2 para lograr una exportación nuclear efectiva (Fig. 14) (Chamorro *et al.*, 2009).

En la SLNbp-2 hay tres residuos de serina (S257, S259 y S261) que al fosforilarse neutralizan las cargas positivas de la señal y retardan la importación de ZO-2 al núcleo (Fig. 14) (Quiros *et al.*, 2013). El residuo S261 también es un sitio de unión a 14-3-3, necesario para la importación eficiente del complejo ZO-2/14-3-3 al núcleo (Amaya *et al.*, 2019). Por otro lado, la S257 puede ser fosforilada por la aPKC $\zeta$  o ser O-N-acetilglicosilada (Fig. 14). Si esto último sucede se inhabilita la SLNbp-2 y la proteína se exporta del núcleo (Quiros *et al.*, 2013).

ZO-2 contiene en su región U2 un motivo de unión a la cinasa SRPK1 que fosforila a los repetidos SR. ZO-2 se asocia a SRPK1 en el citoplasma, y la sobreexpresión de SRPK1 induce una hiperfosforilación de ZO-2 que conduce a la proteína a los moteados nucleares (Quiros *et al.*, 2013).

La SUMOilación del residuo K730 de ZO-2, ubicado muy cerca de la SEN-2 en el dominio GuK, induce la exportación nuclear de la proteína (Fig. 14). Así, la mutante K730R de ZO-2 se mantiene en el núcleo, mientras que ZO-2 SUMOilada de manera constitutiva permanece en el citoplasma. Esto sugiere que la SUMOilación de ZO-2 ocurre en el núcleo y promueve la exportación de la proteína (Wetzel *et al.*, 2017).

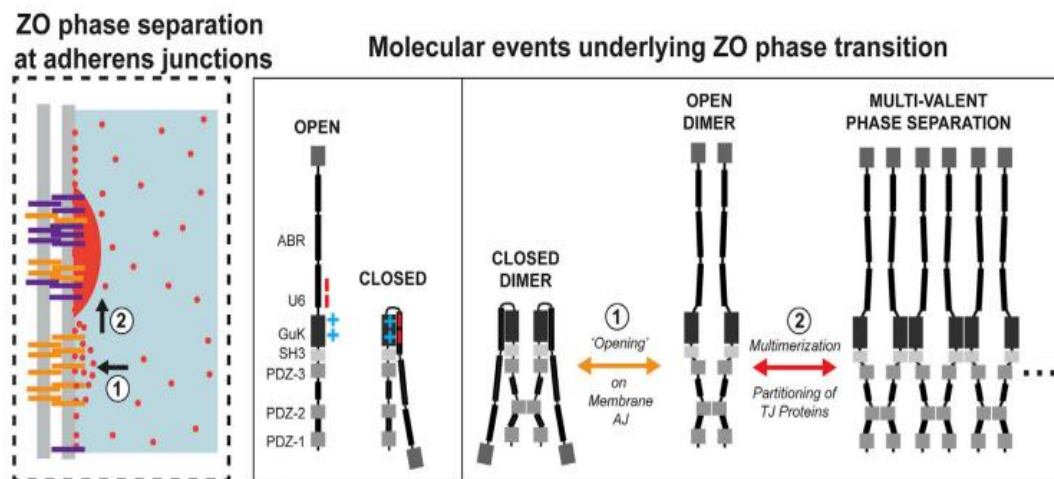


**Figura 14. SLN, SEN y modificaciones postraduccionales en ZO-2 que regulan el movimiento intracelular de la proteína.** A) La secuencia de ZO-2 canina tiene tres SLN, (rojo) y cuatro SEN (morado). Con números se indica la ubicación en aminoácidos de dichas señales. B) Modificaciones postraduccionales que regulan el movimiento intracelular de ZO-2. Panel superior izquierdo, se muestra a la SEN-1 en azul. Se resalta a la S369 en mayor tamaño, y se indica con un círculo amarillo, su fosforilación por PKC $\epsilon$  necesaria para que funcione la señal; panel superior derecho, se muestra la SLNbp-2 en rojo y se resalta a la S257 en mayor tamaño. Con un círculo verde se indica la O-GlcNA necesaria para que ZO-2 salga del núcleo y con círculos amarillos se indica la fosforilación en las serinas, que inhibe el funcionamiento de la señal; panel inferior izquierdo, con un círculo gris se indica la sumoilación del sitio K730 necesaria para la exportación de ZO-2. (Tomado de la Tesis doctoral de Amaya, 2019).

## 9. Transición líquido-líquido en las proteínas ZO y su implicación en la formación de las uniones estrechas

Las proteínas ZO experimentan separación de fases líquido-líquido y por ello forman condensados en las células epiteliales (Fig. 15) (Beutel *et al.*, 2019). Los condensados actúan como compartimentos celulares aunque carezcan de membrana (Hyman *et al.*, 2014). Los condensados pueden reclutar a diversas proteínas y en el caso de las proteínas ZO-1 y ZO-2 sus condensados en el borde celular atraen a otras proteínas de la UE como ocludina, JAM-A y claudinas, así como a las proteínas adaptadoras afadina y cingulina, lo que se piensa que facilita la polimerización de las claudinas y la formación de los filamentos de la UE (Beutel *et al.*, 2019).

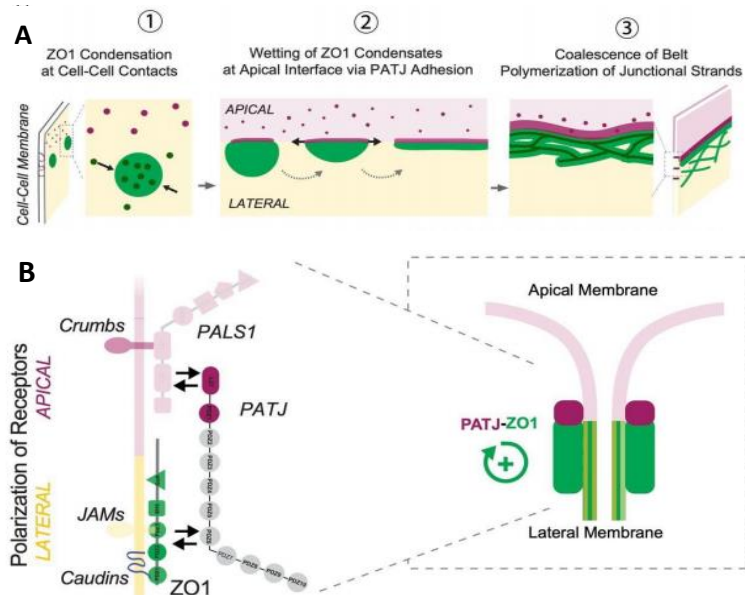
Las proteínas ZO presentan dos conformaciones, una abierta y otra cerrada. Esta última se alcanza cuando la región de bisagra U6, localizada inmediatamente después del dominio GuK, se pliega permitiendo su interacción con el dominio GuK (Fig. 15) (Beutel *et al.*, 2019). En cambio, en el estado abierto de ZO-1, el dominio GuK interactúa con la ocludina y el módulo SH3 se asocia al factor de transcripción ZONAB (Oka *et al.*, 2010). El estado abierto de ZO-1 además, permite la dimerización y posterior multimerización de ZO-1, lo que conduce a la transición de fase (Beutel *et al.*, 2019).



**Figura 15. Modelo de formación de las UEs mediante la separación de fases de ZO-1 y ZO-2.** Panel izquierdo, ZO se recluta a los sitios tempranos de adhesión por las proteínas integrales de la UA. El reclutamiento a la membrana de las proteínas ZO permite superar el umbral de concentración para su separación de fases. Panel derecho, ZO-1 se pliega cuando el dominio U6 se asocia a la región GuK. El estiramiento de ZO-2 promueve la separación de fases ya que permite la multimerización del dominio PSG. (Imagen tomada de Beutel *et al.*, 2019).

La elongación de los condensados de ZO-1 en el borde celular permite formar un cinturón continuo de UE. Este fenómeno se facilita por un proceso físico llamado *wetting*, que traducimos como humedecimiento (Pombo-García, manuscrito en preparación). El humedecimiento significa la propagación sobre una superficie de una gota líquida en una película delgada (Brinkmann *et al.*, 2002). El humedecimiento en el borde celular comienza con la propagación lineal en la membrana de los condensados de ZO-1 y esta propagación requiere que PATJ previamente “humedezca” la superficie y que ZO-1 se adhiera a PATJ (Fig. 16) (Pombo-García, manuscrito en preparación).

Esto explica por qué el silenciamiento de PATJ retrasa la formación de la UE (Rho *et al.*, 2002).



**Figura 16. Modelo de formación del cinturón de UE mediante el *wetting* de los condensados a lo largo de la membrana apical.** A) Eventos durante la formación del cinturón de UE. (1) La condensación de ZO1 lleva a la compartimentalización de las proteínas de la unión. (2) La adhesión de los condensados a la interfaz apical a través de PATJ induce una transición de fase que impulsa la propagación de los condensados a lo largo de la interfaz apical. (3) La polimerización de hebras de las UEs en el cinturón establece la barrera trans-epitelial. (C) Interacciones moleculares subyacentes al *wetting* de los condensados de ZO1 a lo largo de la interfaz apical. Los condensados de ZO1 se forman en la membrana lateral alrededor de receptores de adhesión (JAM-A, claudinas, nectinas). PATJ se une a la membrana apical a través del complejo Crumbs (PALS1). Las interacciones de ZO1 y PATJ unidos a la membrana impulsan la adhesión de los condensados de ZO1 a la interfaz apical (Imagen tomada de Pombo-García, manuscrito en preparación).

## 10. Planteamiento del problema

La formación de las UEs requiere de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, que activa al CaSR y provoca una cascada de señalización que lleva a ZO-2 a las UEs. Si en la condición de bajo calcio, se activa a la AMPK con AICAR, o al CaSR con  $\text{Gd}^{3+}$ , o río abajo se activa a la PKC $\epsilon$  con DIC-8 o briostatina, ZO-2 aparece en el borde celular pero de manera discontinua. Esto sugiere que para una distribución continua de ZO-2 en el borde celular se requiere la presencia de otra proteína que depende del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular pero

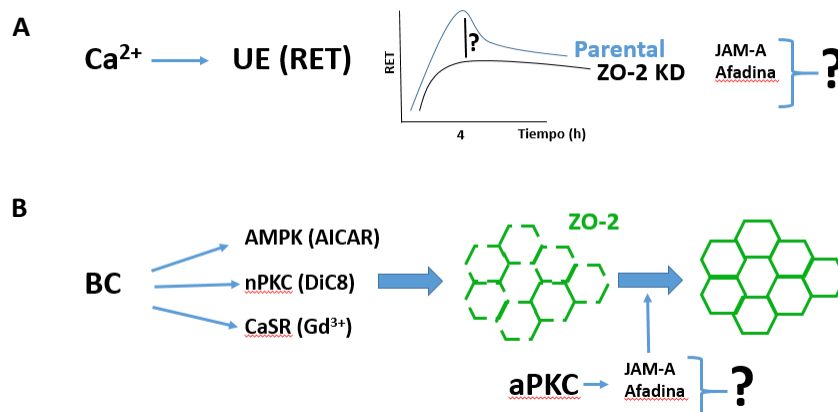


no de la cascada de señalización del CaSR/Gαq<sub>11</sub>/PLC/nPKCε o de la AMPK. Con respecto a cuál proteína podría ser se plantean los siguientes candidatos:

- 1) **JAM-A** por ser la primera proteína de la UE que llega a la membrana y porque lo hace cuando se activa la aPKC.
- 2) **Afadina** ya que es de las primeras proteínas en llegar a la UE y porque forma un complejo con ZO-2 y con JAM-A.

Por otro lado, también se ha visto que en ausencia de ZO-2 no se desarrolla el pico inicial de RET. Esto tal vez se deba a que, en ausencia de ZO-2 alguna de las proteínas arriba mencionadas no llega a la membrana en la cantidad adecuada. Es de nuestro interés averiguar si esto sucede.

En esta tesis comenzamos a explorar el movimiento de JAM-A y afadina al borde celular durante un cambio a calcio, en células que carecen de ZO-2 (Fig. 17).



**Figura 17. Modelo esquemático del planteamiento del problema.** A) En presencia de calcio se forman las UEs y se alcanza el pico inicial de RET en las células parentales pero no en las células ZO-2 KD. Por ello nos preguntamos si esto se debe a que falta que lleguen a la membrana las proteínas JAM-A y afadina. B) En la condición de bajo calcio, ZO-2 llega al borde celular de forma fragmentada cuando se activa al CaSR con Gd<sup>3+</sup>, la nPKC con DiC8 o la AMPK con AICAR. Nos preguntamos si esto ocurre porque no llegan a la membrana otras proteínas que se activan por calcio a través de una vía diferente como por la aPKC.

## 11. Hipótesis

La distribución continua de ZO-2 en el borde celular requiere de la presencia de otra proteína que depende del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular pero que no de la activación del CaSR. Esta proteína también puede ser la que falta para que las células MDCK-ZO-2KD desarrollen el pico inicial de RET.

## 12. Objetivo general

Analizar si el arribo de JAM-A y afadina a la membrana en la condición de bajo calcio se puede inducir por la activación del CaSR, las PKCs clásicas y nuevas o la AMPK, y estudiar si la ausencia de ZO-2 altera el movimiento a la membrana de estas proteínas durante el cambio a calcio.

# II. Metodología

## 1. Cultivo celular

Las células epiteliales de riñón de perro MDCK (*Madin Darby canine kidney*) parentales y ZO-2 KD se obtuvieron gracias a la generosa donación del Dr. Alan Fanning (Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, NC). Las células ZO-2 KD expresan de forma estable tres shRNAs contra ZO-2 insertados en el vector pSuper, mientras que las células MDCK parentales que expresan al vector vacío. Las células se cultivaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), como se describió previamente (González-Mariscal., 1985).

Para el experimento de cambio a calcio las células se sembraron en medio con calcio normal (1.8 mM). Una hora después se lavaron 5 veces con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  y se incubaron durante 20 h en medio con bajo calcio (1 -5  $\mu\text{M}$ ). Luego, las células se transfirieron a un medio con calcio normal o bajo calcio, por diferentes períodos de tiempo.

## 2. Inmunofluorescencia

Las imágenes de inmunofluorescencia se obtuvieron utilizando los protocolos de fijación, permeabilización y bloqueo descritos en la tabla 1 para las diferentes proteínas evaluadas. Como anticuerpo secundario se empleó uno hecho en burro contra

IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 488 (Cat. A-21206, dilución 1:1000, Life Technologies, Eugene, OR, USA). Los núcleos se tiñeron con DAPI presente en el reactivo de preservación de fluorescencia Vectashield/DAPI (Cat. No. H-1200, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA).

### 3. Cuantificación de la fluorescencia en el borde celular

Con el programa imageJ (versión 1.54 f) se midió la intensidad de la fluorescencia (densidad integrada) en la periferia celular. Se utilizó la herramienta de selección de línea a mano alzada. En cada condición experimental, se seleccionaron aleatoriamente 3 campos ópticos. La continuidad de la fluorescencia en el borde celular también se determinó con el programa imageJ (versión 1.54 f) utilizando la herramienta de selección de línea a mano alzada. Se analizaron segmentos de 70  $\mu\text{m}$  de longitud en el borde celular, para cada condición experimental.

**Tabla 1.** Protocolos de inmunofluorescencia para detectar a JAM-A, afadina y ZO-2

Anticuerpo	Fijación	Permeabilización	Bloqueo	Solución de incubación del anticuerpo primario	Solución de incubación del anticuerpo secundario
<b>conejo <math>\alpha</math> JAM-A</b> (Cat. 361700, dilución 1:100, Life Technologies, Carlsbad, CA).	metanol 100% (v/v), - 20°C, 18 min	-	BSA 1% (p/v), 20 min 4 °C	BSA 2% (p/v), 4 °C, toda la noche	BSA 2% (p/v), 2 h, TA
<b>conejo <math>\alpha</math> afadina</b> (Cat. A0224, dilución 1:400 Sigma Aldrich, St. Louis, MO).	PFA 4% (v/v), 10 min, TA	Tritón X-100 0.25 % (v/v), 10 min, TA	Solución de bloqueo ASE	BSA 2% (p/v), 4 °C, toda la noche	BSA 2% (p/v), 2 h, TA
<b>conejo <math>\alpha</math> ZO-2</b> (Cat. 71 -1400, dilución 1:200, Invitrogen, Waltham, MA).	PFA 4% (v/v), 10 min, TA	Tritón X-100 0.25 % (v/v), 10 min, TA	BSA 0.5 % (p/v), 20 min, TA	BSA 2% (p/v), 4 °C, toda la noche	BSA 2% (p/v), 2 h, TA

TA, temperatura ambiente; 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), suero de caballo 2% (v/v)]; BSA, albúmina sérica bovina libre de Ig (Cat. No. 1331A, Research Organics, Cleveland, OH).

## 4. Drogas

Las diferentes drogas empleadas se prepararon como se indica en la tabla 2. En todos los casos en los que se utilizó DMSO como vehículo, el porcentaje máximo al que estuvo en contacto con las células fue de 0.5 %.

**Tabla 2.** Preparación de drogas

Droga	Concentración de la solución madre	Disolvente	Concentración de uso
Gd <sup>3+</sup> (Cat. 439770, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo)	100 mM	agua	100 μM
DiC8 (Cat. D5156, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo)	50 mM	DMSO	0.5 mM
AICAR (Cat. A9978, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo)	0.12 M	agua	4 mM
Dorsomorfin (Cat. 866405, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo)	50 mM	DMSO	50 μM

DiC8, 1,2 dioctanoil-sn-glicerol; AICAR, 5-aminoimidazol-4-carboamida ribonucleósido; DMSO, dimetilsulfóxido

## III. Resultados

### 1. La activación del CaSR y la AMPK no es suficiente para que en la condición de bajo calcio, ZO-2 se distribuya en forma continua en el borde celular

ZO-2 es una proteína de las UEs y su localización en el borde celular depende de la presencia de calcio en el medio externo. Al transferir a las monocapas de células MDCK de un medio con bajo calcio a otro con calcio normal por 2 h, ZO-2 se desplaza al borde celular (Fig. 18Aa). En las monocapas cultivadas en medio con bajo calcio y tratadas con el vehículo DMSO, ZO-2 se distribuye en forma de partículas en el citoplasma (Fig. 18Ab), pero si se tratan con Gd<sup>3+</sup> o AICAR solos o en conjunto (Fig. 18B) se induce el movimiento de ZO-2 al borde celular (Fig. 18Ac, d y e). Sin embargo, ZO-2 presenta una distribución discontinua. Para evaluar esta discontinuidad se cuantificó la intensidad de la fluorescencia a lo largo del borde celular. En la figura 1C se muestran resultados representativos, de segmentos en el borde celular, de 70 μm de longitud, en las células MDCK sometidas a los distintos tratamientos (Fig. 18C). Estas

observaciones sugieren que para que ZO-2 se distribuya a lo largo del borde celular de forma continua, como sucede cuando se hace un cambio a calcio, es necesario además de activar al CaSR, a las PKC clásicas/nuevas y a la AMPK, la activación de otra cinasa que sea capaz de inducir el movimiento a la membrana de otras proteínas de las UEs, necesarias para la distribución continua de ZO-2.

## **2. El arribo de la afadina al borde celular no depende de la actividad del CaSR, pero sí de la AMPK y de las PKC clásicas y nuevas**

La afadina se distribuye en forma de partículas en el citoplasma de las células MDCK cultivadas en un medio con bajo calcio y con DMSO como vehículo de las diferentes drogas utilizadas (Fig. 19A). Cuando estas monocapas se transfieren a un medio con calcio normal por 2 h la afadina se desplaza al borde celular donde forma una línea continua (Fig. 19B). Si se activa al CaSR con  $Gd^{3+}$  no se induce el movimiento de la afadina al borde celular (Fig. 19C). Sin embargo, si las células cultivadas en bajo calcio se tratan con un análogo permeable del DAG, el 1, 2-dioctanoil-sn-glicerol (DiC8) que activa a las PKC clásicas y nuevas, la afadina se mueve a la periferia celular, pero no rodea al perímetro celular de forma continua (Fig. 19D).

Por otra parte, la administración del activador de la AMPK, 5-aminoimidazol-4-carboamida ribonulceósido (AICAR), a las células incubadas en bajo calcio, también indujo el movimiento de la afadina al borde celular (Fig. 19E). Como la PKC fosforila y activa a la adenil ciclasa que convierte al ATP en AMP y este último activa a la AMPK, nos preguntamos si el arribo a la membrana de la afadina inducido por la activación de la PKC, en la condición de bajo calcio, se debía a la activación subsecuente de la AMPK. Para analizar este punto inhibimos a la AMPK con 50  $\mu M$  de dorsomorfina y después activamos a la PKC con DiC8. Observamos que aun en esta condición, la afadina arribó al borde celular (Fig. 19F). Esto indica que la activación de las PKC clásicas o nuevas es suficiente para inducir el movimiento de la afadina al borde celular, pero que también la activación de la AMPK provoca este movimiento, pero de manera independiente.

Nosotros analizamos mediante qué mecanismo llega la afadina al borde celular, porque pensábamos que esta proteína podría ser la que hacía falta que llegara para que ZO-2 se distribuyera de manera continua en la periferia de la célula al estimular al CaSR en la condición de bajo calcio. Sin embargo, con los resultados obtenidos vemos que la proteína faltante no puede ser la afadina porque aunque su movimiento al borde celular no se activa con  $Gd^{3+}$ , si lo hace con DiC8 y AMPK.

### **3. En ausencia de ZO-2, aumenta la cantidad de afadina en el borde celular**

Al hacer un cambio a calcio de 4 h, la afadina se desplaza del citoplasma al borde celular. Sin embargo, en ausencia de ZO-2 la abundancia de afadina en el borde celular es mayor que en las células parentales (Fig. 20). Este resultado abre la posibilidad de que el exceso de afadina que aparece en el borde de las células ZO-2 KD de alguna manera contribuya a que en estas monocapas no se desarrolle el pico inicial de RET.

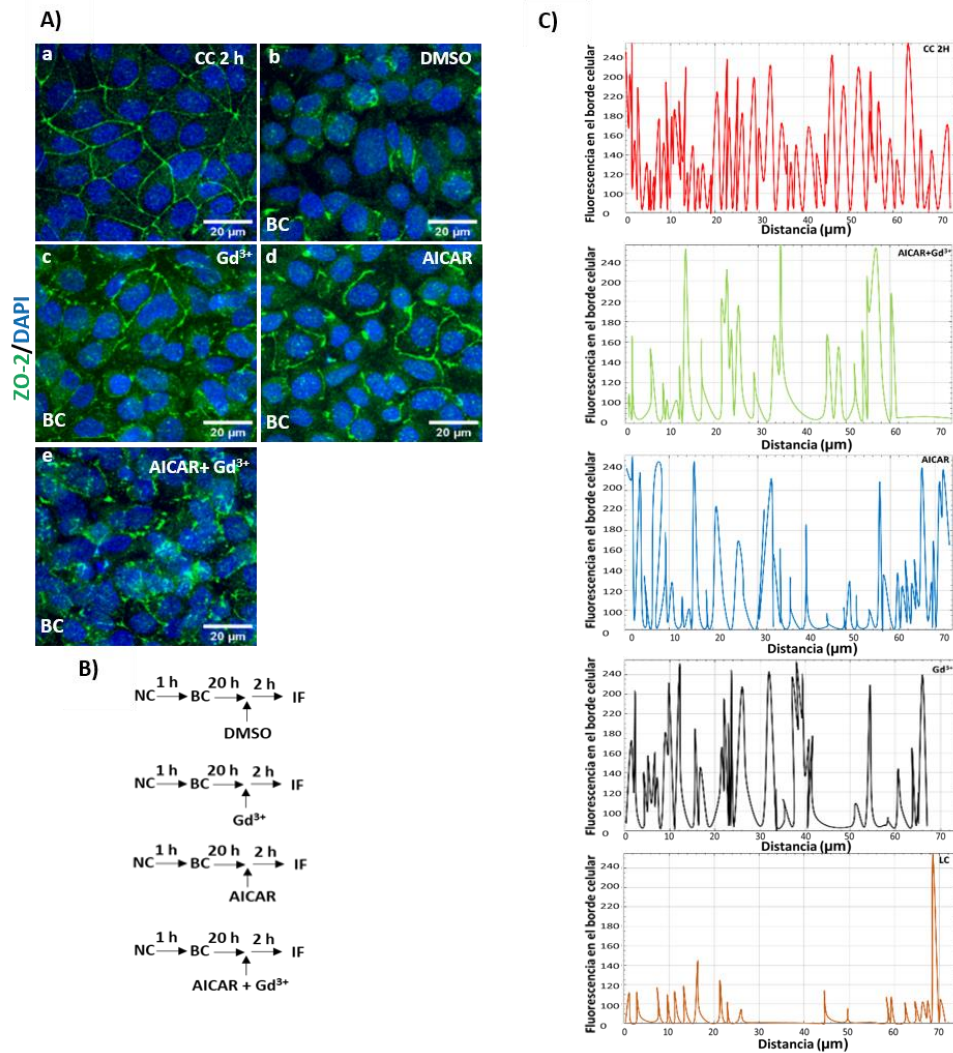
### **4. El movimiento de JAM-A al borde celular no depende de la activación del CaSR, o las PKC clásicas y nuevas**

En la condición de bajo calcio, JAM-A se localiza en el citoplasma y se mueve al borde celular cuando las monocapas se transfieren a medio con una concentración normal de calcio (Fig. 21 A y B). Si en la condición de bajo calcio, se activa al CaSR con  $Gd^{3+}$  o a las PKC clásicas y nuevas con DiC8, JAM-A no llega al borde celular (Fig. 21 C y D). Esto sugiere que el movimiento de JAM-A a la membrana inducido por calcio no se debe a la activación del CaSR o las PKC clásicas o nuevas, y abre la posibilidad de la participación de otra cinasa, que regule el movimiento de JAM-A inducido por el calcio extracelular.

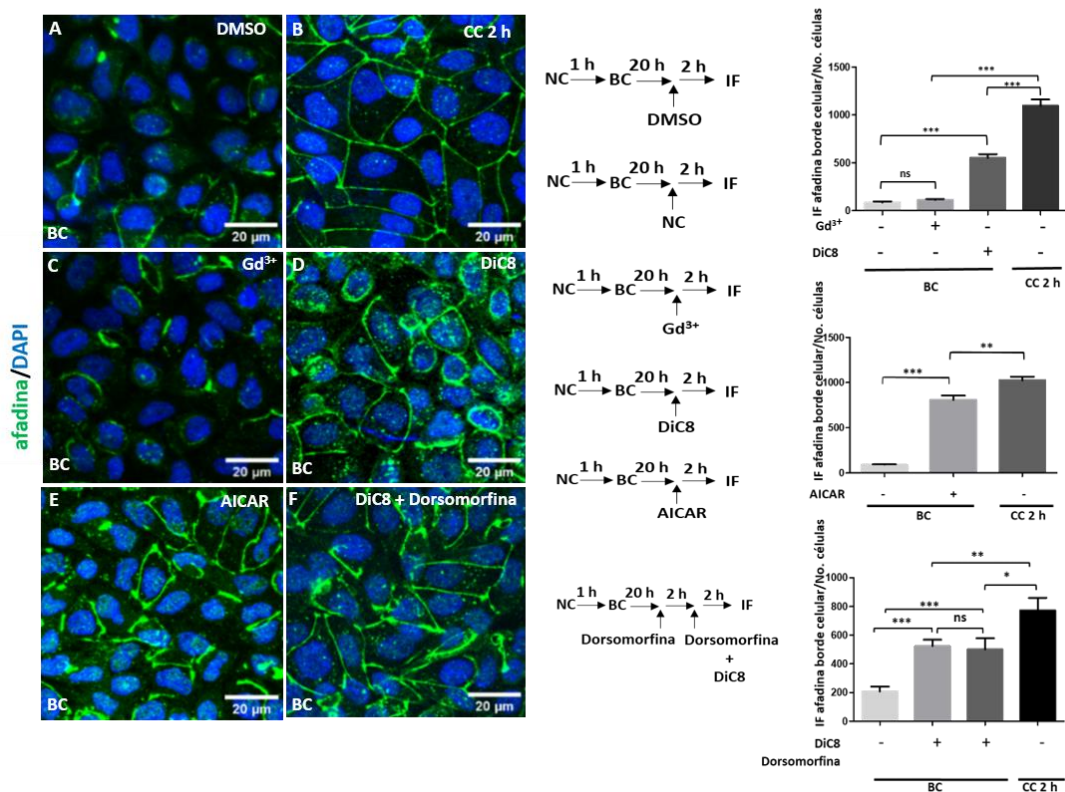
### **5. En ausencia de ZO-2 disminuye el reclutamiento de JAM-A al borde celular**

Enseguida, estudiamos si la ausencia de ZO-2 afecta el arribo de JAM-A al borde celular. Para ello hicimos un cambio a calcio y analizamos por inmunofluorescencia el movimiento de JAM-A a la membrana en las células parentales y ZO-2 KD. Observamos que el reclutamiento de JAM-A al borde celular en un cambio

a calcio es más lento en las células ZO-2 KD que en las parentales (Fig. 22). Esta probablemente pueda ser la causa del desarrollo de un pico de RET más bajo en las células ZO-2 KD, en comparación con las parentales.

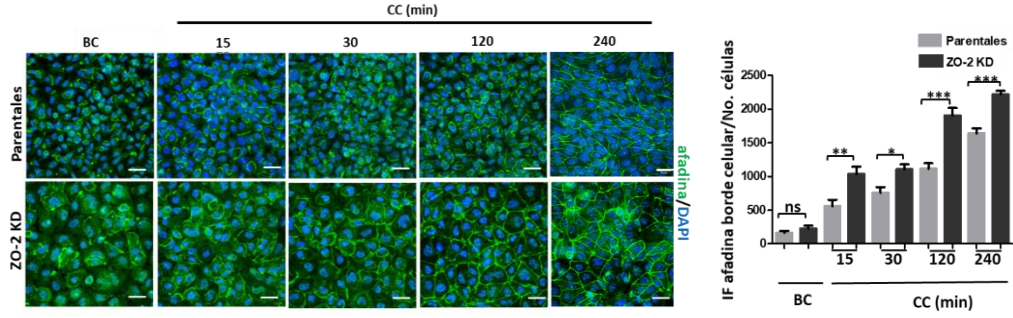


**Figura 18.** En la condición de bajo calcio, ZO-2 se localiza en el citoplasma y cuando se activa al CaSR, a la AMPK o a ambos, ZO-2 se mueve al borde celular, pero forma un cinturón discontinuo. Las células MDCK se sembraron a confluencia en medio con calcio normal y luego de 1 h se transfirieron a un medio con bajo calcio durante 20 h. Posteriormente, las monocapas se trataron con diferentes drogas. **A)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de ZO-2 en monocapas tratadas de la siguiente manera: **a)** medio con calcio normal; **b)** Tratadas con el vehículo DMSO en medio con bajo calcio; **c)** 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Gd}^{3+}$ , en bajo calcio; **d)** 4 nM de AICAR, en bajo calcio; **e)** 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Gd}^{3+}$  más 4 nM de AICAR en bajo calcio. Los núcleos se marcaron con DAPI. Barra, 20  $\mu\text{M}$ . **B)** Esquema experimental. **C)** Medición de la expresión continua de ZO-2 a lo largo del borde celular a través de la intensidad de fluorescencia en un tramo de 70  $\mu\text{m}$  de longitud.

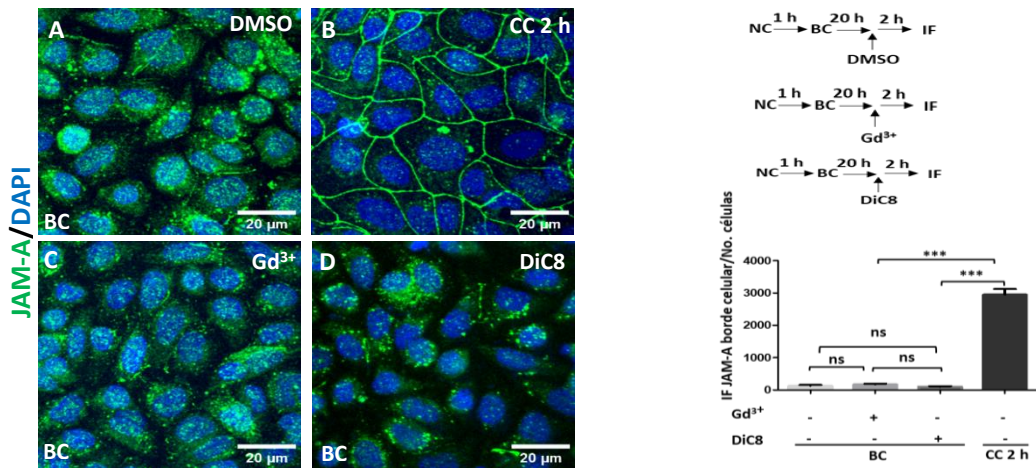


**Figura 19.** La afadina se desplaza del citoplasma a la membrana por la activación de las PKC clásicas y nuevas y de la AMPK. Las células MDCK se sembraron a confluencia en medio con calcio normal y una hora después se transfirieron a un medio con bajo calcio. Después de 20 h, las monocapas se trataron con distintas drogas, se fijaron y se procesaron para la inmunofluorescencia con anticuerpos anti-afadina. Las imágenes del panel izquierdo son representativas de la inmunofluorescencia de afadina observada en monocapas en las siguientes condiciones: **A)** DMSO como vehículo en medio con bajo calcio; **B)** 2 h de cambio a calcio; **C)** 100  $\mu$ M de Gd<sup>3+</sup>, en bajo calcio; **D)** 0.5 mM de DiC8, en bajo calcio; **E)** 4 nM de AICAR, en bajo calcio y **F)** 0.5 mM de DiC8 y 50  $\mu$ M de dorsomorfina, en bajo calcio. Los núcleos se marcaron con DAPI. Barra, 20  $\mu$ M. Panel central, esquema experimental. Panel derecho, cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de afadina en el borde celular. El análisis estadístico se hizo con t-Student, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , ns, no significativo. En esta y en las subsecuentes figuras, los resultados se muestran con el valor de la media  $\pm$  el error estándar.

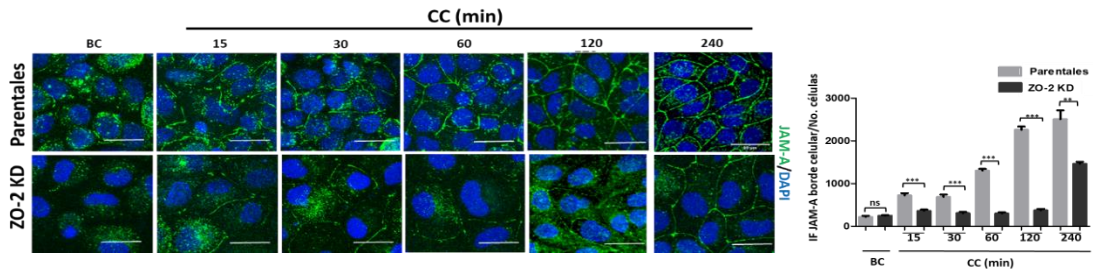




**Figura 20. En las células ZO-2 KD aumenta la expresión de afadina en el borde celular.** Las células MDCK parentales y ZO-2KD se sembraron a confluencia en medio con calcio normal y luego de 1 h se transfirieron a un medio con bajo calcio. Después de 20 h las monocapas se incubaron en un medio con calcio normal por 4 h. Panel izquierdo, imágenes representativas de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-afadina. Los núcleos se marcaron con DAPI. Barra, 20  $\mu$ m. Panel derecho, cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de la afadina en el borde celular durante el cambio a calcio. El análisis estadístico se hizo con t-Student, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , ns, no significativo.



**Figura 21. El arribo de JAM-A al borde celular, no depende de la vía activada por el CaSR.** Las células MDCK sembradas a confluencia se incubaron 1 h en medio con calcio normal y luego se transfirieron a un medio con bajo calcio durante 20 h. Posteriormente, las monocapas se incubaron por 2 h con: **A)** DMSO como vehículo, en bajo calcio; **B)** medio con calcio normal; **C)** 100  $\mu$ M de Gd<sup>3+</sup>, un agonista del CaSR, en bajo calcio; **D)** 0.5 mM de DiC8, un activador de la cPKC y la nPKC, en bajo calcio. Panel izquierdo, imágenes de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-JAM-A. Los núcleos se marcaron con DAPI. Barra, 20  $\mu$ m. Panel derecho superior, esquema experimental. Panel derecho inferior, cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de JAM-A en el borde celular. El análisis estadístico se hizo con t-Student, \*\*\* $p < 0.001$ , ns, no significativo.



**Figura 22. El arribo de JAM-A al borde celular es más lento y menor en ausencia de ZO-2.** Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron a confluencia en medio con calcio normal y luego de 1 h se transfirieron a un medio con bajo calcio. Después de 20 h las monocapas se incubaron con calcio normal y se fijaron y procesaron para inmunofluorescencia con anticuerpos anti-JAM-A, a distintos tiempos. Panel izquierdo, imágenes representativas de la inmunofluorescencia de JAM-A. Los núcleos se marcaron con DAPI. Barra, 20  $\mu$ M. Panel derecho, cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de JAM-A en el borde celular durante el cambio a calcio. El análisis estadístico se hizo con t-Student, \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , ns, no significativo.

## IV. Discusión

El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es crucial en las células epiteliales para formar la UE. La quelación del  $\text{Ca}^{2+}$  con EGTA disminuye la RET (Martínez-Palomo *et al.*, 1980), mientras que el cambio de un medio con bajo  $\text{Ca}^{2+}$  a uno con calcio normal permite el ensamblaje de la UE y el aumento de la RET (González-Mariscal *et al.*, 1985). En ausencia de ZO-2 no se alcanza el pico máximo de RET luego de un cambio a calcio, sugiriendo que ZO-2 es esencial para incorporar otros componentes críticos. Por ello, en esta tesis investigamos si estas proteínas pueden ser JAM-A o afadina.

Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es fundamental para la formación de la UA, porque facilita la interacción en *trans* de la E-cadherina (Gumbiner *et al.*, 1988). La formación de la UA precede la de las UEs y es necesaria para su formación (Gumbiner *et al.*, 1988). El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular también activa al CaSR, que induce la incorporación al borde celular de las proteínas de la UE ZO-1, ZO-2 y ocludina (Amaya *et al.*, 2019). La AMPK también participa en el ensamble de la UE desencadenado por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, pero si en la condición de bajo calcio la AMPK se activa con AICAR aparecen en el borde celular ZO-1 (Zhang *et al.*, 2006) y ZO-2 (Amaya *et al.*, 2019). Sin embargo, en la condición de bajo  $\text{Ca}^{2+}$ , la activación de CaSR o AMPK no logra una distribución uniforme de ZO-2 en el borde celular. En esta tesis investigamos si

JAM-A y la afadina son las proteínas adicionales requeridas para obtener una distribución continua de ZO-2 en la periferia celular.

Comenzamos a investigar a JAM-A porque es la primera proteína que aparece en las UEs, depende de la aPKC para llegar al borde celular (Ebnet, 2013), se asocia mediante su motivo de unión a dominios PDZ con ZO-2 (Monteiro *et al.*, 2013) y si se inhibe con anticuerpos, se bloquea el desarrollo de la RET en un ensayo de cambio a calcio. Esto indica que JAM-A es importante para la formación y el sellado de las UEs (Liu *et al.*, 2000). Estudiamos también a la afadina, ya que se une a la nectina que se conecta con el complejo cadherina-catenina en la UA (Takahashi *et al.*, 1999), y porque la pérdida de afadina aumenta la permeabilidad paracelular, lo que indica que también es importante para la función de barrera de la UE (Tanaka-Okamoto *et al.*, 2011).

En este trabajo se demostró que en las células MDCK cultivadas en bajo calcio y tratadas con  $Gd^{3+}$  más AICAR, aparece ZO-2 en el borde celular, pero de forma discontinua. Este patrón también se observó cuando las células se trataron solo con  $Gd^{3+}$  o con AICAR en bajo calcio (Amaya *et al.*, 2019). Esto indica que el CaSR y la AMPK están involucrados en la distribución de ZO-2 en el borde celular, sin embargo, la activación de ambos no es suficiente para que ZO-2 alcance un patrón continuo en el borde celular como sucede en presencia de calcio extracelular. Por tanto, en este proceso está involucrada otra proteína independiente de la AMPK y del CaSR.

Primero exploramos si la proteína necesaria es la afadina y observamos que su arribo al borde celular no depende de la activación del CaSR con el agonista  $Gd^{3+}$ , sin embargo, cuando se activa la vía de este receptor río abajo con DiC8 aparece la afadina en el borde celular. El DiC8 activa a las PKCs clásicas y nuevas (Ananthanarayanan *et al.*, 2003), lo que indica que el arribo de la afadina al borde celular depende de estas cinasas. Se sabe que la activación de la PKC $\epsilon$  fosforila directamente a la adenil ciclasa e incrementa su actividad catalítica lo que provoca que aumenten los niveles de AMP (Kawabe *et al.*, 1994). El CaSR al activarse puede señalizar a través de las subunidades  $G\alpha_{q11}$  y  $G\alpha_i$  en las células MDCK. La subunidad  $G\alpha_i$  inhibe a la adenil ciclasa (Ward *et al.*, 2004). Esto podría explicar los resultados aparentemente contradictorios obtenidos al activar al CaSR con  $Gd^{3+}$  vs. la activación de las PKCs clásicas/nuevas

con DiC8, ya que si al activar al CaSR la señalización ocurre a través de la subunidad  $G\alpha_i$  estaríamos inhibiendo de manera indirecta a la AMPK. Al respecto, observamos que la afadina llega al borde celular, cuando se activa directamente a la AMPK con AICAR, en la condición de bajo calcio. La AMPK fosforila a la afadina y permite su interacción con ZO-1 (Wu *et al.*, 2020). Esto es importante, pues facilita el anclaje de la afadina al borde celular. Sin embargo, si se activan directamente las PKC clásicas y nuevas con DiC8 y se inhibe a la AMPK, la afadina también se localiza en el borde celular. Esto sugiere que la activación directa, y no mediada por el CaSR de las PKC clásicas y nuevas, es suficiente para desplazar a la afadina a la membrana. Como la afadina llega al borde celular cuando se activan las PKC clásicas y nuevas con DiC8 o a la AMPK con AICAR, concluimos que la afadina no es la proteína faltante para que ZO-2 llegue de forma continua al borde celular en estas condiciones.

Como el silenciamiento de afadina disminuye la TER (Monteiro *et al.*, 2013), evaluamos si la afadina es una proteína necesaria para que se alcance el pico inicial de la TER en las células ZO-2 KD. Nuestros resultados demostraron que hay más afadina en el borde celular en ausencia de ZO-2, que en las células parentales a las 4 h luego de un cambio a calcio. La interacción de la afadina con ZO-1 durante de la formación de la UE es a través de dos regiones ricas en prolina de la afadina y el dominio SH3 de ZO-1 (Ooshio *et al.*, 2010). Recientemente se vio que ZO-1 se une a ZO-2 no solo mediante el módulo PDZ-2 de ambas proteínas, sino a través del dominio GuK de ZO-1 (Beutel *et al.*, 2019). El dominio GuK de ZO-1 está al lado del módulo SH3 por lo que tal vez, al no haber ZO-2 que se pueda unir al dominio GuK de ZO-1, se despeje un impedimento estérico que facilite la unión de la afadina al dominio SH3 de ZO-1. Esto hipotéticamente podría explicar el incremento de la afadina en el borde celular en ausencia de ZO-2. Necesitamos ahora realizar experimentos para probar si el incremento de la afadina en el borde celular, inhibe el desarrollo del pico inicial de TER, en un cambio a calcio.

En esta tesis, también nos interesó evaluar el movimiento de JAM-A a la membrana. Observamos que en la condición de bajo calcio, cuando se activa al CaSR o a las PKC clásicas y nuevas, JAM-A no llega al borde celular. Esto nos indica que

JAM-A depende de la activación de otra vía o cinasa para arribar a la membrana. Sabemos que JAM-A interactúa con la proteína PAR-3, un miembro del complejo de polaridad apical PAR-3/PAR-6/ aPKC y que se localiza en las UAs primordiales, en forma no fosforilada. Después de la formación del complejo PAR-3/PAR-6/ aPKC esta cinasa fosforila a JAM-A en la Ser285 para promover la maduración de las UEs (Ebnet *et al.*, 2001). Además, si se transfecta una aPKC inactiva, se bloquea la formación de las UEs y el desarrollo de la polaridad apical (Ebnet *et al.*, 2013). Esto indica que la activación de la aPKC además de las PKC clásicas/nuevas es fundamental para el desarrollo de la UE.

Por otro lado, investigamos si en las células ZO-KD la proteína que falta que llegue al borde celular para alcanzar el pico inicial de RET de las células parentales, es JAM-A. Nuestros resultados demostraron que en un cambio a calcio, en las células ZO-2 KD hay menos JAM-A en el borde celular, en comparación con las células parentales y que su aparición en el borde celular es más lenta en las células que carecen de ZO-2. Como el dominio PDZ-2 de ZO-2 y la cola carboxilo terminal de JAM-A tienen una fuerte interacción entre sí (Pinto-Dueñas *et al.*, 2024), pensamos que ZO-2 facilita el anclaje de JAM-A a la membrana. Esto además coincide con varios informes que asocian a JAM-A con la función de barrera epitelial como por ejemplo el reporte donde se vio que en los ratones donde JAM-A se silencia, disminuye en el intestino la RET y aumenta el flujo paracelular de marcadores de bajo peso molecular (Laukoetter *et al.*, 2007).

## V. Conclusión

El movimiento de ZO-2 al borde celular se induce con el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular que activa al CaSR. Sin embargo, si en la condición de BC, se estimula al CaSR o a la AMPK, ZO-2 se desplaza al borde celular pero no rodea de forma continua el perímetro celular. Sabemos que ZO-2 ancla a la proteína transmembranal de las UEs, JAM-A, al borde celular. Ahora con los resultados de esta tesis sabemos que la activación del CaSR, de las PKC clásicas/nuevas o de la AMPK no inducen el movimiento de JAM-A al borde celular en la condición de BC. Por ello pensamos que JAM-A podría ser la proteína que se necesita para que ZO-2 se pueda distribuir de forma continua en

el borde celular en la condición de BC al estimular al CaSR o a la AMPK. Además, en las células ZO-2 KD, llega a la membrana una menor cantidad de JAM-A en comparación con las células parentales. Esto sugiere que la ausencia de JAM-A puede también ser una de las causas de la disminución del pico inicial de la resistencia eléctrica transepitelial durante un cambio a calcio.

En cuanto a la afadina, encontramos que sí llega al borde celular tras la estimulación de las PKC nuevas/clásicas, o de la AMPK. Por lo tanto, la afadina no sería necesaria para la distribución continua de ZO-2 en el borde celular, en la condición de BC. Sin embargo, el hecho de que en ausencia de ZO-2 llegue más afadina al borde celular sugiere que este exceso de afadina podría probablemente ser la causa por la que en las células ZO-2 KD vemos que no se desarrolla el pico inicial de RET durante el cambio a calcio.

## **VI. Perspectivas**

En experimentos futuros vamos a investigar si con una aPKC constitutivamente activa o al activar a la aPKC con esfingosina-1-fosfato enjaulada, JAM-A llega al borde celular en la condición de bajo calcio, e induce la distribución continua de ZO-2 en el perímetro celular. También vamos a comprobar si al silenciar parcialmente a la afadina con un siRNA se recupera el pico inicial de RET o, si al bloquear a JAM-A con un anticuerpo contra su porción extracelular, disminuye el pico inicial de RET, como ocurre en las células ZO-2 KD. Además, investigaremos si el arribo de otras proteínas de la unión celular como PATJ, Crumbs y cingulina dependen de la activación del CaSR, las PKC clásicas/nuevas, la AMPK o la aPKC.

## VII. Bibliografía

- Adachi M, Hamazaki Y, Kobayashi Y, Itoh M, Tsukita S, Furuse M et al. (2009). Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins. *Mol Cell Biol* 29(9):2372–2389. doi:10.1128/MCB.01505-08.
- Amaya, E. (2019). La activación de la vía CaSR/PKC $\epsilon$ /WNK4 separa a ZO-2 de 14-3-3 e induce su incorporación a la unión estrecha. [Tesis doctoral, CINVESTAV]. Repositorio CINVESTAV.
- Amaya, E., Alarcon, L., Martin-Tapia, D., Cuellar-Perez, F., Cano-Cortina, M., Ortega-Olvera, J. M., et al. (2019). Activation of the Ca (2+) sensing receptor and the PKC/WNK4 downstream signaling cascade induces incorporation of ZO-2 to tight junctions and its separation from 14-3-3. *Molecular Biology of the Cell*, 30(18), 2377-2398.
- Ananthanarayanan, B., Stahelin, R., Digman, Cho, W. (2003). Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 Domains. *The Journal of Biological Chemistry* 278(47): 46886-46894.
- Assemat E, Crost E, Ponserre M, Wijnholds J, Le Bivic A, Massey-Harroche D. (2013). The multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) expression regulates cellular levels of the PALS-1/ PATJ polarity complex. *Exp Cell Res* 319(17):2514–2525.
- Avila-Flores, A., Rendon-Huerta, E., Moreno, J., Islas, S., Betanzos, A., Robles-Flores, M., González-Mariscal, L. (2001). Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C. *Biochem. J.* 360, 295–304.
- Ayala-Torres, C., Krug, S. M., Schulzke, J. D., Rosenthal, R., & Fromm, M. (2019). Tricellulin Effect on Paracellular Water Transport. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, E5700.

- Balda, M. S., Whitney, J. A., Flores, C., González, S., Cereijido, M., Matter, K. (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. *Journal of Cell Biology*, 134(4), 1031–1049.
- Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O.M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S., Dejana, E., (2000). Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J. Biol. Chem.* 275, 20520–20526.
- Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J., and González-Mariscal, L. (2004). The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res* 292, 51 -66.
- Beutel, O., Maraspini, R., Pombo-Garcia, K., Martin-Lemaitre, C., & Honigsmann, A. (2019). Phase Separation of Zonula Occludens Proteins Drives Formation of Tight Junctions. *Cell*, 179(4), 923-936 e11.
- Boettner, B., Govek, E.E., Cross, J., Van Aelst, L., (2000). The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the Rap1A GTPase and associates with the actin cytoskeletal regulator profilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9064–9069.
- Carlton, V.E., Harris, B.Z., Puffenberger, E.G., Batta, A.K., Knisely, A.S., Robinson, D.L., Strauss, K.A., Shneider, B.L., Lim, W.A., Salen, G., et al. (2003). Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nat Genet* 34, 91 -96.
- Cereijido, M., & Anderson, J. (2001). *Tight junctions* (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Chamorro, D., Alarcon, L., Ponce, A., Tapia, R., González-Aguilar, H., & Robles-Flores, M. et al. (2009). Phosphorylation of Zona Occludens-2 by Protein Kinase C Regulates Its Nuclear Exportation. *Molecular Biology Of The Cell*, 20(18), 4120-4129.



- Chen, C.L., Gajewski, K.M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., SansoresGarcia, L., Tao, C., and Halder, G. (2010). The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 15810–15815.
- Chen, H., Tong, S., Li, X., Wu, J., Zhu, Z., Niu, L., et al. (2009). Structure of the second PDZ domain from human zonula occludens 2. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 65(Pt 4), 327-330.
- Cho KO, Hunt CA, Kennedy MB (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9:929–942.
- Citi, S., H. Sabanay, R. Jakes, and B. Geiger. (1988). Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature (Lond.)*. 333:272-275.
- Contreras, R.G., Miller, J.H., Zamora, M., González-Mariscal, L., and Cerejido, M. (1992). Interaction of calcium with plasma membrane of epithelial (MDCK) cells during junction formation. *Am J Physiol* 263, C313-318.
- Cordenonsi, M., D’Atri, F., Hammar, E., Parry, D.A., Kendrick-Jones, J., Shore, D., Citi, S., (1999a). Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J. Cell Biol.* 147, 1569–1582.
- Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A., & Hardie, D. G. (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside: A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *European Journal of Biochemistry*, 229(2), 558-565.
- Diamond, J.M. (1977). Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist* 20, 10-18.
- Dobrosotskaya, I., Guy, R.K., James, G.L., (1997). MAGI-1, a membrane-associated guanylate kinase with a unique arrangement of protein–protein interaction domains. *J. Biol. Chem.* 272, 31589–31597.
- Dominguez-Calderon, A., Avila-Flores, A., Ponce, A., Lopez-Bayghen, E., Calderon-Salinas, J.V., Luis Reyes, J., Chavez-Munguia, B., Segovia, J., 90

Angulo, C., Ramirez, L., et al. (2016). ZO-2 silencing induces renal hypertrophy through a cell cycle mechanism and the activation of YAP and the mTOR pathway. *Mol Biol Cell* 27, 1581 -1595.

- Du D, Xu F, Yu L, Zhang C, Lu X, Yuan H et al (2010). The tight junction protein, occludin, regulates the directional migration of epithelial cells. *Dev Cell* 18(1):52–63. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.008
- Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, Hirose T, Meyer Zu Brickwedde MK, Ohno S et al (2001). The cell polarity protein ASIP/ PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO J* 20(14):3738–3748. doi:10.1093/emboj/20.14. 3738.
- Ebnet K. (2013). JAM-A and aPKC: A close pair during cell-cell contact maturation and tight junction formation in epithelial cells. *Tissue barriers*, 1(1), e22993. <https://doi.org/10.4161/tisb.22993>.
- Ebnet K. JAM-A and aPKC: A close pair during cell-cell contact maturation and tight junction formation in epithelial cells. *Tissue Barriers*. 2013 Jan 1;1(1): e22993. doi: 10.4161/tisb.22993. PMID: 24665372; PMCID: PMC3879182.
- Eckert, J. J., & Fleming, T. P. (2008). Tight junction biogenesis during early development. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(3), 717–728.
- Ernst, A., Appleton, B.A., Ivarsson, Y., Zhang, Y., Gfeller, D., Wiesmann, C., and Sidhu, S.S. (2014). A structural portrait of the PDZ domain family. *J Mol Biol* 426, 3509-3519.
- Fanning, A. S. et al. (1998) ‘The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton.’, *The Journal of biological chemistry*, 273(45), pp. 29745–53.
- Faravelli, A., and Dimasi, N. (2006). Expression, refolding and crystallizations of the Grb2-like (GADS) C-terminal SH3 domain complexed with a SLP-76 motif peptide. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62, 52-55.
- Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17, 375-412.

- Furuse, M. & Takai, Y. Recent advances in understanding tight junctions. *Fac Rev* **10**, (2021).
- Furuse, M., et al. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 127, 1617–1626.
- Furuse, M., et al. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 127, 1617–1626.
- Gallego-Gutierrez, H., González-González, L., Ramirez-Martinez, L., Lopez-Bayghen, E., & González-Mariscal, L. (2021). Tight junction protein ZO-2 modulates the nuclear accumulation of transcription factor TEAD. *Molecular Biology of the Cell*. Advance online publication.
- Gao, L., Joberty, G., Macara, I.G., (2002). Assembly of epithelial tight junctions is negatively regulated by Par6. *Curr. Biol.* 12, 221–225.
- González-González, L., Gallego-Gutiérrez, H., Martin-Tapia, D., Avelino-Cruz, J. E., Hernández-Guzmán, C., Rangel-Guerrero, S. I., Alvarez-Salas, L. M., Garay, E., Chávez-Munguía, B., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Hernández-Melchor, D., López-Bayghen, E., & González-Mariscal, L. (2022). ZO-2 favors Hippo signaling, and its re-expression in the steatotic liver by AMPK restores junctional sealing. *Tissue barriers*, 10(2), 1994351. <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1994351>
- González-Mariscal *et al.*, 2022. “Intracellular Traffic and Non-canonical Roles of ZO-2 Protein”, in *Tight Junctions*, ed. González-Mariscal L, Springer Nature.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., & Avila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: Structure and role in the tight junction. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 11(4), 315-324.
- González-Mariscal, L., Chavez de Ramirez, B., & Cerejido, M. (1985). Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *Journal of Membrane Biology*, 86(2), 113-125.

- González-Mariscal, L., Contreras, R.G., Bolivar, J.J., Ponce, A., Chavez De Ramirez, B., and Cerejido, M. (1990). Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells. *Am J Physiol* 259, C978-986.
- González-Mariscal, L., Miranda, J., Ortega-Olvera, J., Gallego-Gutierrez, H., RayaSandino, A., & Vargas-Sierra, O. (2016). Zonula Occludens Proteins in Cancer. *Current Pathobiology Reports*, 4(3), 107-116. doi: 10.1007/s40139-016-0109-3.
- González-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.
- González-Mariscal, L., Quirós, M., Díaz-Coránguez, M., and Bautista, P. (2012). Tight Junctions. In: *Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology*, ed. P. S. Najman, InTech, 4–30.
- González-Mariscal, L.G., E ; Quiros, M ; Tapia, R (2010). TJP2 (tight junction protein 2 (zona occludens 2)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 14, 423-428.
- Guillemot, L., Hammar, E., Kaister, C., Ritz, J., Caille, D., Jond, L., et al. (2004). Disruption of the cingulin gene does not prevent tight junction formation but alters gene expression. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 22), 5245–5256.
- Guillemot, L., Paschoud, S., Jond, L., Foglia, A., & Citi, S. (2008). Paracingulin regulates the activity of Rac1 and RhoA GTPases by recruiting Tiam1 and GEF-H1 to epithelial junctions. *Molecular Biology of the Cell*, 19(10), 4442–4453.
- Guillemot, L., Schneider, Y., Brun, P., Castagliuolo, I., Pizzuti, D., Martines, D., et al. (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. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 21), 5005–5014.

- Gumbiner, B., Stevenson, B., and Grimaldi, A. (1988). The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol* 107, 1575-1587.
- Günzel, D., & Yu, A. (2013). Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiological Reviews*, 93(2), 525-569.
- Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (2002) Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 277(1):455–461. doi:10.1074/jbc.M109005200.
- Henin, N., Vincent, M. F., Gruber, H. E., & Van den Berghe, G. (1995). Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *FASEB Journal*, 9(7), 541-546.
- Hernandez, S., Chavez Munguia, B., and González-Mariscal, L. (2007). ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. *Exp Cell Res* 313, 1533-1547.
- Hernandez, S., Chavez Munguia, B., and González-Mariscal, L. (2007). ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. *Exp Cell Res* 313, 1533-1547.
- Higashi, T., et al. (2013). Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2—tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. *Journal of Cell Science*, 126, 966–977.
- Hirabayashi S, Hata Y. (2006). JAM family proteins: Tight junction proteins that belong to the immunoglobulin superfamily. In: González-Mariscal L, editor. Tight junctions. Georgetown, New York: Landes Bioscience and Springer Science. pp. 43–53.
- Huang, R., Guilford, P., & Thiery, J. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal Of Cell Science*, 125(19), 4417- 4422. doi: 10.1242/jcs.099697.

- Huerta, M., Munoz, R., Tapia, R., Soto-Reyes, E., Ramirez, L., Recillas-Targa, F., González-Mariscal, L., and Lopez-Bayghen, E. (2007). Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Mol Biol Cell* 18, 4826-4836.
- Hurd, T. W., Gao, L., Roh, M. H., et al. (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nature Cell Biology*, 5(2), 137-142.
- Hyman, A. A., Weber, C. A., & Jülicher, F. (2014). Liquid-liquid phase separation in biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 39–58.
- Ikeda W, Nakanishi H, Miyoshi J, Mandai K, Ishizaki H, Tanaka M et al. (1999) Afadin: a key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J cell Biol* 146(5):1117–1132.
- Ikenouchi, J., et al. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 171, 939–945.
- Islas, S., Vega, J., Ponce, L., & González-Mariscal, L. (2002). Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 274(1), 138-148.
- Itoh, M., Morita, K., & Tsukita, S. (1999). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha-catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5981-5986.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., & Tsukita, S. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 154(3), 491–497.
- Izumi Y, Hirose T, Tamai Y, Hirai S, Nagashima Y, Fujimoto T, Tabuse Y, Kempfues KJ, Ohno S (1998) An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J Cell Biol* 143:95–106.

- Johansson, A., Driessens, M., Aspenstrom, P., (2000). The mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-6 is a binding partner for the Rho GTPases Cdc42 and Rac1. *J. Cell Sci.* 113 (Pt. 18), 3267–3275.
- Kawabe, J., Iwami, G., Ebina, T., Ohno, S., Katada, T., Ueda, Y., Homcy, C. J., & Ishikawa, Y. (1994). Differential activation of adenylyl cyclase by protein kinase C isoenzymes. *The Journal of biological chemistry*, 269(24), 16554–16558.
- Kazmierczak, M., Harris, S.L., Kazmierczak, P., Shah, P., Starovoytov, V., Ohlemiller, K.K., and Schwander, M. (2015). Progressive Hearing Loss in Mice Carrying a Mutation in *Usp53*. *J Neurosci* 35, 15582-15598.
- Kistner, U., Garner, C.C., and Linial, M. (1995). Nucleotide binding by the synapse associated protein SAP90. *FEBS Lett* 359, 159-163.
- Kitsner U, Wenzel BM, Veh RW, Cases-Langhoff C, Garner AM, Appeltauer O, Voss B, Gundelfinger ED, Garner CC (1993) SAP 90, a rat presynaptic protein related to the product of the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg-A*. *J Biol Chem* 268:4580–4583.
- Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbitt, B. A., Williams, I. R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J. A., Dermody, T. S., Cooper, J. A., & Nusrat, A. (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 204(13), 3067-3076.
- Lechuga, S., Alarcon, L., Solano, J., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., and González-Mariscal, L. (2010). Identification of ZASP, a novel protein associated to Zona occludens-2. *Exp Cell Res* 316, 3124-3139.
- Lemmers, C., Medina, E., Delgrossi, M.H., Michel, D., Arsanto, J.P., Le Bivic, A., (2002). hINAD1/PATJ, a homolog of Discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 25408–25415.

- Lye, M.F., A.S. Fanning, Y. Su, *et al.* (2010). Insights into regulated ligand binding sites from the structure of ZO-1 Src homology 3-guanylate kinase module. *J. Biol. Chem.* **285**: 13907–13917.
- M., & Lipowsky, R. (2002). Wetting morphologies on substrates with striped surface domains. *Journal of Applied Physics*, *92*, 4296–4306.
- Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Obaishi, H., Wada, M., Nishioka, H., Itoh, M., Mizoguchi, A., Aoki, T., Fujimoto, T., Matsuda, Y., Tsukita, S., Takai, Y., (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*, 517–528.
- Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Takahashi, K., Satoh, K., Nishioka, H., Mizoguchi, A., Takai, Y., (1999). Ponsin/ SH3P12: an l-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell–cell and cell–matrix adherens junctions. *J. Cell Biol.* *144*, 1001–1017.
- Martinez-Palomo, A., Meza, I., Beaty, G., and Cerejido, M. (1980). Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol* *87*, 736-745.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* *142*:117–127.
- Masuda, S., *et al.* (2011). LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *Journal of Cell Science*, *124*, 548–555.
- Michel D, Arsanto JP, Massey-Harroche D, Beclin C, Wijnholds J, Le Bivic A (2005) PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J Cell Sci* *118*(Pt 17):4049–4057. doi:10.1242/jcs.02528
- Monteiro AC, Sumagin R, Rankin CR, Leoni G, Mina MJ, Reiter DM *et al* (2013) JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c



and regulate epithelial barrier function. *Mol Biol Cell* 24(18):2849–2860. doi:10.1091/mbc.E13-06-0298.

- Naik MU, Mousa SA, Parkos CA, Naik UP. (2003). Signaling through JAM-1 and  $\alpha$ v $\beta$ 3 is required for the angiogenic action of bFGF: Dissociation of the JAM-1 and  $\alpha$ v $\beta$ 3 complex. *Blood* 102:2108–2114.
- Oda, Y., et al. (2020). The extracellular domain of angulin-1 and palmitoylation of its cytoplasmic region are required for angulin-1 assembly at tricellular contacts. *Journal of Biological Chemistry*, 295, 4289–4302.
- Oda, Y., Otani, T., Ikenouchi, J., & Furuse, M. (2014). Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts through Cdc42. *Journal of Cell Science*, 127, 4201–4212.
- Ohnishi, H., Nakahara, T., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., & Furuse, M. (2004). JACOP, a novel plaque protein localizing at the apical junctional complex with sequence similarity to cingulin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 46014–46022.
- 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-independent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem. J.* 432, 461–472.
- Ooshio T, Kobayashi R, Ikeda W, Miyata M, Fukumoto Y, Matsuzawa N et al (2010) Involvement of the interaction of afadin with ZO-1 in the formation of tight junctions in MadinDarby canine kidney cells. *J Biol Chem* 285(7):5003–5012.
- Ooshio, T., Irie, K., Morimoto, K., Fukuhara, A., Imai, T., & Takai, Y. (2004). Involvement of LMO7 in the Association of Two Cell-Cell Adhesion Molecules, Nectin and E-cadherin, through Afadin and  $\alpha$ -Actinin in Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31365-31373.
- Ooshio, T., Irie, K., Morimoto, K., Fukuhara, A., Imai, T., & Takai, Y. (2004). Involvement of LMO7 in the association of two cell-cell adhesion

molecules, nectin and E-cadherin, through afadin and  $\alpha$ -actinin in epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31365-31373.

- Ooshio, T., Kobayashi, R., Ikeda, W., Miyata, M., Fukumoto, Y., Matsuzawa, N., Ogita, H., & Takai, Y. (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(7), 5003-5012.
- Otani, T., et al. (2019). Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity. *Journal of Cell Biology*, 218, 3372–3396.
- Pombo-García, K., Lemaitre, C. M., Honigsmann, A. (en preparación). Wetting of junctional condensates along the apical interface promotes tight junction belt formation. bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.12.16.520750>; this version posted December 19, 2022. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.
- Prasad R, Gu Y, Alder H, Nakamura T, Canaani O, Saito H et al (1993) Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Cancer Res* 53(23):5624–5628
- Pulimeno, P., Paschoud, S., & Citi, S. (2011). A role for ZO-1 and PLEKHA7 in recruiting paracingulin to tight and adherens junctions of epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 16743–16750.
- Quiros, M., Alarcon, L., Ponce, A., Giannakouros, T., & González-Mariscal, L. (2013). The intracellular fate of zonula occludens 2 is regulated by the phosphorylation of SR repeats and the phosphorylation/O-GlcNAcylation of S257. *Molecular Biology of the Cell*, 24(16), 2528-2543.
- Raleigh, D.R., Marchiando, A.M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M., and Turner, J.R. (2010). Tight junction-associated MARVEL proteins *marveld3*, *tricellulin*, and *occludin* have distinct but overlapping functions. *Mol. Biol. Cell* 21, 1200-1213.

- Riazuddin, S., et al. (2006). Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *American Journal of Human Genetics*, 79, 1040–1051.
- Roh MH, Makarova O, Liu CJ, Shin K, Lee S, Laurinec S et al (2002) The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of crumbs and discs lost. *J Cell Biol* 157(1):161–172. doi:10.1083/jcb.200109010.
- Roh, M. H., Liu, C. J., Laurinec, S., & Margolis, B. (2002). The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 27501–27509.
- Saito K, Shiino T, Kurihara H, Harita Y, Hattori S, Ohta Y (2015) Afadin regulates RhoA/Rho-associated protein kinase signaling to control formation of actin stress fibers in kidney podocytes. *Cytoskeleton*. 72(3):146–156. doi:10.1002/cm.21211
- Saito, A. C., et al. (2021). Occludin and tricellulin facilitate formation of anastomosing tight-junction strand network to improve barrier function. *Molecular Biology of the Cell*, 32, 722–738.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., et al. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4131–4142.
- Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., and Tsukita, S. (1997). Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J. Cell Biol.* 137, 1393-1401.
- Samarin, S. N., Ivanov, A. I., Flatau, G., Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2007). Rho/Rho-associated kinase-II signaling mediates disassembly of epithelial apical junctions. *Molecular Biology of the Cell*, 18(9), 3429–3439.
- Sanchez-Pulido, L., Martin-Belmonte, F., Valencia, A., & Alonso, M. A. (2002). MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(12), 599–601.

- Schwayer, C. *et al.* (2019) ‘Mechanosensation of Tight Junctions Depends on ZO-1 Phase Separation and Flow.’, *Cell*, 179(4), pp. 937-952.e18.
- Shigetomi, K., Ono, Y., Inai, T., and Ikenouchi, J. (2018). Adherens junctions influence tight junction formation via changes in membrane lipid composition. *J Cell Biol* 217, 2373-2381.
- Shin K, Straight S, Margolis B (2005) PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol* 168(5):705–711.
- Shin K, Wang Q, Margolis B (2007) PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. *EMBO Rep* 8(2):158–164.
- Shyu, J.-F., Zhang, Z., Hernandez-Lagunas, L., Camerino, C., Chen, Y., Inoue, D., Baron, R., & Horne, W. C. (1999). Protein kinase C antagonizes pertussis-toxin–sensitive coupling of the calcitonin receptor to adenylyl cyclase. *European Journal of Biochemistry*, 262 (1), 95–101.
- Sobocka MB, Sobocki T, Banerjee P, Weiss C, Rushbrook JI, Norin AJ, Hartwig J, Salifu MO, Markell MS, Babinska A, Ehrlich YH, Kornecki E. (2000). Cloning of the human platelet F11 receptor: A cell adhesion molecule member of the immunoglobulin superfamily involved in platelet aggregation. *Blood* 95:2600–2609.
- Staehelin, L. A. (1973). Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *Journal of Cell Science*, 13, 763–786.
- Steed, E., Rodrigues, N. T. L., Balda, M. S., & Matter, K. (2009). Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biology*, 10, 95.
- Straight SW, Shin K, Fogg VC, Fan S, Liu CJ, Roh M et al (2004) Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol Biol Cell* 15(4):1981–1990.
- Sugawara, T., Furuse, K., Otani, T., Wakayama, T., & Furuse, M. (2021). Angulin-1 seals tricellular contacts independently of tricellulin and claudins. *Journal of Cell Biology*, 220, e202005062.

- Sugihara-Mizuno Y, Adachi M, Kobayashi Y, Hamazaki Y, Nishimura M, Imai T et al (2007) Molecular characterization of angiomin/JEAP family proteins: interaction with MUPP1/Patj and their endogenous properties. *Genes Cells* 12(4):473–486.
- Suzuki A, Ishiyama C, Hashiba K, Shimizu M, Ebnet K, Ohno S (2002) aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *J Cell Sci* 115(Pt 18):3565–3573.
- Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, K., Izumi, Y., Ohnishi, T., Ohno, S., (2001). Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J. Cell Biol.* 152, 1183–1196.
- Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, M., Mandai, K., Satoh, K., Satoh, A., Nishioka, H., Aoki, J., Nomoto, A., Mizoguchi, A., Takai, Y., (1999). Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherinbased adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J. Cell Biol.* 145, 539–549.
- Tan, B., Yatim, S. M. J. M., Peng, S., Gunaratne, J., Hunziker, W., & Ludwig, A. (2020). The Mammalian Crumbs Complex Defines a Distinct Polarity Domain Apical of Epithelial Tight Junctions. *Current biology: CB*, 30(14), 2791–2804.e6.
- Tanaka-Okamoto M, Hori K, Ishizaki H, Itoh Y, Onishi S, Yonemura S et al (2011) Involvement of afadin in barrier function and homeostasis of mouse intestinal epithelia. *J Cell Sci* 124(Pt 13):2231–2240. doi:10.1242/jcs.081000
- Tapia, R., Huerta, M., Islas, S., Avila-Flores, A., Lopez-Bayghen, E., Weiske, J., Huber, O., and González-Mariscal, L. (2009). Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. *Mol Biol Cell* 20, 1102-1117.
- Taya, S., Yamamoto, T., Kano, K., Kawano, Y., Iwamatsu, A., Tsuchiya, T., Tanaka, K., Kanai-Azuma, M., Wood, S.A., Mattick, J.S., Kaibuchi, K., (1998).

The Ras target AF-6 is a substrate of the fam deubiquitinating enzyme. *J. Cell Biol.* 142, 1053–1062.

- Tortora, G., & Derrickson, B. (2011). *Principios de anatomía y fisiología* (11th ed., pp. 109-123). Buenos Aires: Méica Panamericana.
- Traweger, A., Fuchs, R., Krizbai, I.A., Weiger, T.M., Bauer, H.C., and Bauer, H. (2003). The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factorB. *J Biol Chem* 278, 2692-2700.
- Umeda, K., et al. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*, 126, 741–754.
- Ward, D. T. (2004). Calcium receptor-mediated intracellular signalling. *Cell Calcium*, 35 (3), 217-228. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2003.10.011>
- Wetzel, F., Mittag, S., Cano-Cortina, M., Wagner, T., Kramer, O. H., Niedenthal, R., et al. (2017). SUMOylation regulates the intracellular fate of ZO-2. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(2), 373-392.
- Woods DF, Bryant PJ (1991) The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* 66:451–464.
- Wu, J., Pipathsouk, A., Keizer-Gunnink, A., Fusetti, F., Alkema, W., Liu, S., Altschuler, S., Wu, L., Kortholt, A., and Weiner, O.D. (2015). Homer3 regulates the establishment of neutrophil polarity. *Mol. Biol. Cell* 26, 1629– 1639.
- Wu, J., Rowart, P., Jouret, F., Gassaway, B. M., Rajendran, V., Rinehart, J., & Caplan, M. J. (2020). Mechanisms involved in AMPK-mediated deposition of tight junction components to the plasma membrane. *American journal of physiology. Cell physiology*, 318(3), C486–C501.
- Xu, J., Anuar, F., Ali, S.M., Ng, M.Y., Phua, D.C., and Hunziker, W. (2009). Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility. *Mol Biol Cell* 20, 4268-4277.
- Xu, J., Kausalya, P.J., Phua, D.C., Ali, S.M., Hossain, Z., and Hunziker, W. (2008). Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals

critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Mol Cell Biol* 28, 1669-1678.

- Yamamoto, T., Harada, N., Kano, K., Taya, S., Canaani, E., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., Ide, C., Kaibuchi, K., (1997). The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 139, 785–795.
- Yamanaka T, Horikoshi Y, Sugiyama Y, Ishiyama C, Suzuki A, Hirose T et al (2003) Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol* 13(9):734–743.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamura, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H., Ohno, S., (2001). PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell–cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells* 6, 721–731.
- Yano, T., Matsui, T., Tamura, A., Uji, M., & Tsukita, S. (2013). The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *Journal of Cell Biology*, 203(4), 605–614.
- Zhang, L., Li, J., Young, L. H., & Caplan, M. J. (2006). AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17272-17277.