



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

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

“Efecto epigenético de ZO-2”

TESIS

que presenta:

Biól. Elio Armando Fontes Otero

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE
FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Directora de tesis:

Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel

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

A mi padre, ese hombre incansable que jamás claudicó...

Agradecimientos

A la **Dra. Lorenza González Mariscal y Muriel** por permitirme formar parte de su laboratorio y por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto. Su vasto conocimiento y experiencia han sido una fuente invaluable de inspiración y aprendizaje a lo largo de este proceso. Su certeras correcciones y sugerencias mejoraron significativamente la calidad de este trabajo.

A la **QFB. María de Lourdes Alarcón Mortera** por su apoyo con la amplificación de todos los plásmidos usados en los experimentos de la tesis. Su conocimiento y disponibilidad fueron esenciales para desarrollar gran parte del trabajo.

A la **M. en C. Dolores Martín Tapia** por su inestimable apoyo y guía en el trabajo con las inmunofluorescencias y el mantenimiento de los cultivos celulares. Su experiencia y dedicación fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

Al **Biól. Miguel Ángel Rojas Sierra** por su disposición para brindarme siempre a tiempo el material de trabajo en el laboratorio.

Al **Dr. Christian Hernández Guzmán** por el tiempo que dedicó a guiarme durante las primeras semanas de mi estancia en el laboratorio y por asesorarme con el uso de las diferentes técnicas usadas en los experimentos. También por su disponibilidad vía mensaje de texto para aclarar cualquier duda sobre el desarrollo del proyecto.

Al **M. en C. Erick Susano López** por las horas que sacrificó de su trabajo para apoyarme en los experimentos de transfecciones, Duolink y orientarme en el uso del microscopio confocal. También por su cercanía y complicidad que hicieron más placentera la estancia durante este año en el laboratorio.

Al **QBP Hober Núñez Martínez** y al **M. en C. Gustavo Martín Tapia** del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por su apoyo con las técnicas de Biología Molecular: ChIPmentation y ATAC-seq y por su disponibilidad de tiempo para supervisar mis experimentos, incluso hasta altas horas de la noche.

A la **Dra. Esther López-Bayghen Patiño** y a la **Dra. Leticia Ramírez Martínez**, Auxiliar de Investigación del Departamento de Toxicología, CINVESTAV, por su apoyo con las qPCR y sus consejos acertados sobre el desarrollo de mis experimentos.

A la **Dra. Esther López-Bayghen Patiño** y al **Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño** por aceptar ser mis sinodales y por brindarme consejos y sugerencias para mejorar el documento escrito y la presentación.

A la **Biól. Georgina Guerrero Avendaño**, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por su disposición apoyo con la obtención de los plásmidos del DamID.

A **los compañeros del laboratorio** por su colaboración y apoyo a lo largo de este proceso.

A **los compañeros de la UNAM** por su cálida acogida en el laboratorio y por las horas de risas que pasamos que hicieron que hasta me gustara dar los viajes diarios hasta allá.

A **mis amigos cubanos del CINVESTAV**: Raúl, Daniel y Mayrelis por su apoyo siempre y sus empujones certeros cuando se torcían las cosas. Por la compañía y el apoyo total cuando todo parece que está saliendo mal. Por hacer que México fuera lo más parecido a nuestro terruño.

A **mis amigos de la carrera en Cuba**: Mary, Rachel, Daniela Luis, Xavier, Ryan y Tejada por creer en mí y en mi capacidad para llegar a este punto, por su apoyo incondicional en los momentos más duros de mi vida y por las largas reuniones llenas de risas que me daban fuerzas para seguir hacia adelante.

A **mi familia**, mis hermanos Luisa, Mayra y Ernestico; mis sobrinas Sara, Amanda y Haydecita. A Cira, que luchó como campeona con mi abuelo para que yo pudiera estar aquí hoy escribiendo esto. A mis abuelos, que dondequiera que estén me dan su confianza e impulso. A **mis padres**, a quienes debo todo lo que soy y que hasta el final de sus días sacrificaron mucho para que yo pudiera hacer lo que realmente me gusta.

A **todos**, gracias por la confianza y por estar dispuestos siempre a ayudarme por muy pedregoso que fuese el camino.

Índice

Resumen	1
Abstract	1
I Introducción	2
1.1 ZO-2 estructura molecular	2
1.2 Localización de ZO-2 en las células epiteliales.....	3
1.3 Señales de localización y exportación de ZO-2 y su regulación por modificaciones post-traduccionales	4
1.3 Función de ZO-2 en la membrana celular.....	6
1.4 Función de ZO-2 en el núcleo	7
1.4.1 Interacción de ZO-2 con el nucleoesqueleto de lámina B1 y el complejo LINC, y efecto sobre la forma del núcleo	7
1.4.2 Interacción de ZO-2 con los factores de transcripción y su efecto sobre la transcripción.....	10
1.4.3 ZO-2 como acarreador de factores de transcripción hacia y desde el núcleo 11	
1.5 Cromatina y regulación epigenética.....	12
1.6 Dam-ID.....	17
II Planteamiento del problema	18
III Hipótesis.....	18
IV Objetivo del proyecto.....	18
4.1 Objetivo general	18
4.2 Objetivos específicos.....	18
V Materiales y métodos	19
5.1 Cultivo celular	19
5.2 Transfección celular	19
5.3 Análisis de secuencia de ZO-2	19
5.4 Inmunofluorescencia	20
5.5 Inmunodetección por Western Blot.....	20

5.6. Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa cuantitativa (qPCR)	20
VI Resultados	21
6.1 El dominio PDZ-3 de ZO-2 contiene un motivo conservado de unión a HP1.	21
6.4 En ausencia de ZO-2, el patrón de heterocromatina cambia de perinuclear a moteado.	25
VII Discusión	27
VIII Referencias bibliográficas	30

Resumen

Zonula occludens 2 (ZO-2) es una proteína presente en las uniones estrechas y en el núcleo. En las células MDCK ZO-2 KD disminuye el contenido de heterocromatina con las marcas H3K9me2/3. En este trabajo demostramos que ZO-2 interactúa en el núcleo con la proteína de la heterocromatina HP1, crucial para la formación de heterocromatina con las marcas H3K9me2/3. Además, en ausencia de ZO-2 disminuye la transcripción y cantidad de proteína HP1. La falta de ZO-2 modifica el patrón de distribución de la heterocromatina de perinuclear a moteado, lo que sugiere que ZO-2 mantiene a la heterocromatina asociada a la envoltura nuclear y reprime la transcripción de genes por un mecanismo epigenético. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que ZO-2 actúa como un represor transcripcional por un mecanismo epigenético.

Abstract

Zonula occludens 2 (ZO-2) is a protein present in tight junctions and the nucleus. In MDCK cells, ZO-2 KD decreases the heterochromatin content with H3K9me2/3 marks. In this work, we demonstrate that ZO-2 interacts in the nucleus with the heterochromatin protein HP1, which is crucial in forming heterochromatin H3K9me2/3 marks. Moreover, the lack of ZO-2 reduces the transcription and amount of HP1 protein. The absence of ZO-2 changes the distribution pattern of heterochromatin from perinuclear to speckled, suggesting that ZO-2 keeps heterochromatin associated with the nuclear envelope and represses gene transcription through an epigenetic mechanism. Our results support the hypothesis that ZO-2 acts as a transcriptional repressor through an epigenetic mechanism.

I Introducción

1.1 ZO-2 estructura molecular

Zonula occludens 2 (ZO-2) es una proteína periférica de membrana presente en las uniones estrechas (UE) que pertenece a la familia de proteínas MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase Homologue). ZO-2 fue descubierta por Gumbiner en las células MDCK y se identificó por su interacción mediante coimmunoprecipitación con ZO-1 (Gumbiner *et al.*, 1991). ZO-2 pesa 160 kDa y está compuesta por tres dominios PDZ orientados hacia el extremo amino, seguidos por un módulo SH3 y un dominio GUK. Asimismo, en su porción carboxilo, ZO-2 posee una región rica en prolina y de unión a actina que finaliza con un motivo TEL de unión a dominios PDZ (Fig 1). Los dominios y motivos de ZO-2 permiten que actúe como una plataforma molecular para el ensamblaje de múltiples complejos de proteínas tanto en las UE como en el núcleo y que así influya en diversos procesos fisiológicos.

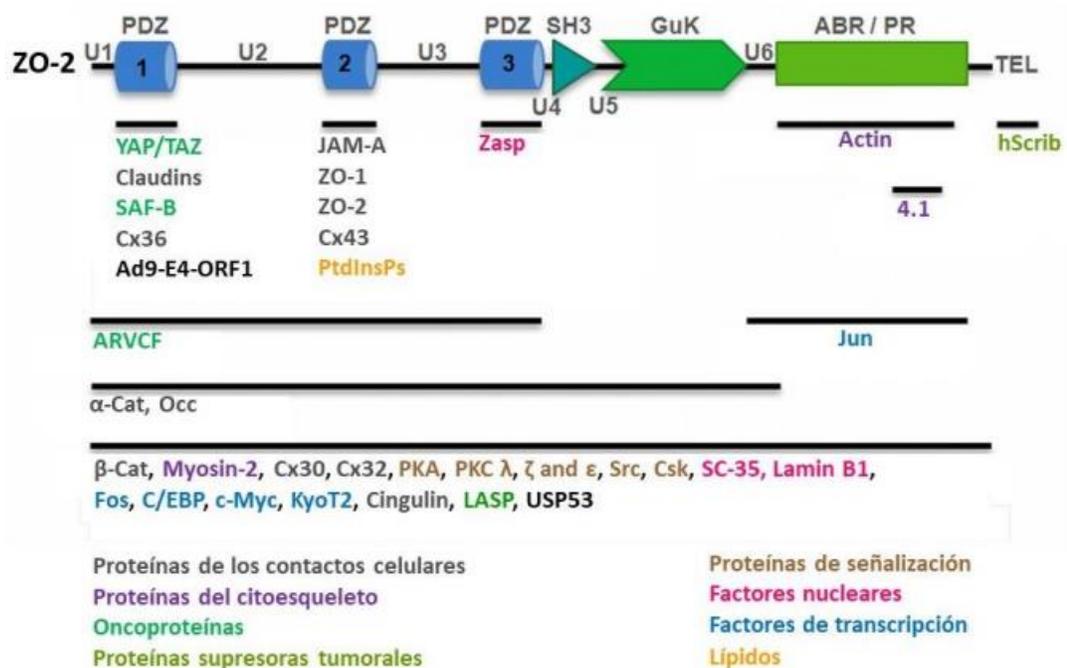


Figura 1. Representación esquemática de ZO-2 y de las proteínas a las que se asocia. En la parte superior del esquema se indica el nombre de cada dominio de ZO-2. Las proteínas con las que ZO-2 se asocia se localizan debajo de las líneas que delimitan el segmento de ZO-2 con el que interactúan. En la parte inferior se indica, siguiendo el código de color, el tipo de proteína involucrado. Imagen modificada de (González-Mariscal *et al.*, 2016).

1.2 Localización de ZO-2 en las células epiteliales

En las células epiteliales, la distribución de ZO-2 varía según el grado de confluencia del cultivo y la concentración extracelular de calcio. En los cultivos confluentes, ZO-2 se encuentra en el borde celular asociado a las UE, mientras que en los cultivos subconfluentes también se localiza en el núcleo (Islas *et al.*, 2002). La translocación de ZO-2 del citoplasma al núcleo se produce al final de la fase G1 y en cambio, ZO-2 sale del núcleo durante la fase M cuando desaparece la envoltura nuclear. Esto explica por qué en los cultivos confluentes, ZO-2 no se encuentra en el núcleo, mientras que allí se concentra en los cultivos subconfluentes en proliferación (Tapia *et al.*, 2009).

En la condición de bajo calcio (1-5 μM), ZO-2 permanece secuestrada en el citoplasma por la proteína 14-3-3. La interacción de ZO-2 con 14-3-3 protege a ZO-2 de la degradación proteosomal (Amaya *et al.*, 2019). Cuando se restablece el calcio extracelular (1.8 mM) se activa el receptor sensor de calcio (CaSR) acoplado a proteínas G. Así se desencadena una cascada de señalización a través de la subunidad $\alpha_q/11$ y la PLC, que activa a la nPKC ϵ , que, a su vez, fosforila en el citoplasma a ZO-2 y a la cinasa WNK4. Esta última también fosforila a ZO-2, permitiendo que se separe de 14-3-3 y se relocalice en la UE (Amaya *et al.*, 2019). Una vez que ZO-2 se ensambla en la membrana plasmática, ocurre la fosforilación de su residuo S257 por la aPKC ζ , lo que sugiere que la fosforilación de este residuo es importante para la interacción de ZO-2 con otras proteínas de la UE (Quiros *et al.*, 2013).

1.3 Señales de localización y exportación de ZO-2 y su regulación por modificaciones post-traduccionales

Por su tamaño, ZO-2 no puede difundir pasivamente a través de los poros nucleares. Por ello, el tráfico intracelular de ZO-2 se guía por señales de localización (NLS) y exportación nuclear (NES) específicas. La variante canina de ZO-2 exhibe cuatro NES funcionales, dos localizadas en el PDZ-2 y el resto en el dominio GK (González-Mariscal *et al.*, 2006). Además, ZO-2 tiene dos NLS bipartitas (bNLS) y una monopartita en la región U2, entre los dominios PDZ-1 y PDZ-2. Las NLS se definen como secuencias que contienen residuos R o K con carga positiva. En la bNLS-2 hay tres residuos de serina: S257, S259 y S261 que cuando se fosforilan neutralizan las cargas positivas de la señal, lo que retarda la translocación de ZO-2 al núcleo (Quiros *et al.*, 2013).

La región U2 de ZO-2 tiene además, dieciséis repetidos de serina y arginina (SR) (Jaramillo *et al.*, 2004), que son blancos específicos de la cinasa SRPK, cuya actividad se estimula por AKT en respuesta al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Quiros *et al.*, 2013). La fosforilación de ZO-2 por la SRPK induce la entrada de ZO-2 al núcleo y su acumulación en moteados (Quiros *et al.*, 2013). En cambio, la exportación de ZO-2 desde el núcleo se produce por la fosforilación de la S369 presente en la NES-1 por la PKC ϵ (Chamorro *et al.*, 2009). De manera complementaria, la señal de importación al núcleo se inhibe por la O-GlcNAcilación de la S257 presente en la bNLS-2 (Quiros *et al.*, 2013). Otra modificación que ocurre en el núcleo y que promueve la exportación nuclear de la proteína es la SUMOilación de ZO-2 en el residuo K730, localizado unos residuos río arriba de la NES-2 en el dominio GuK (Wetzel *et al.*, 2017).

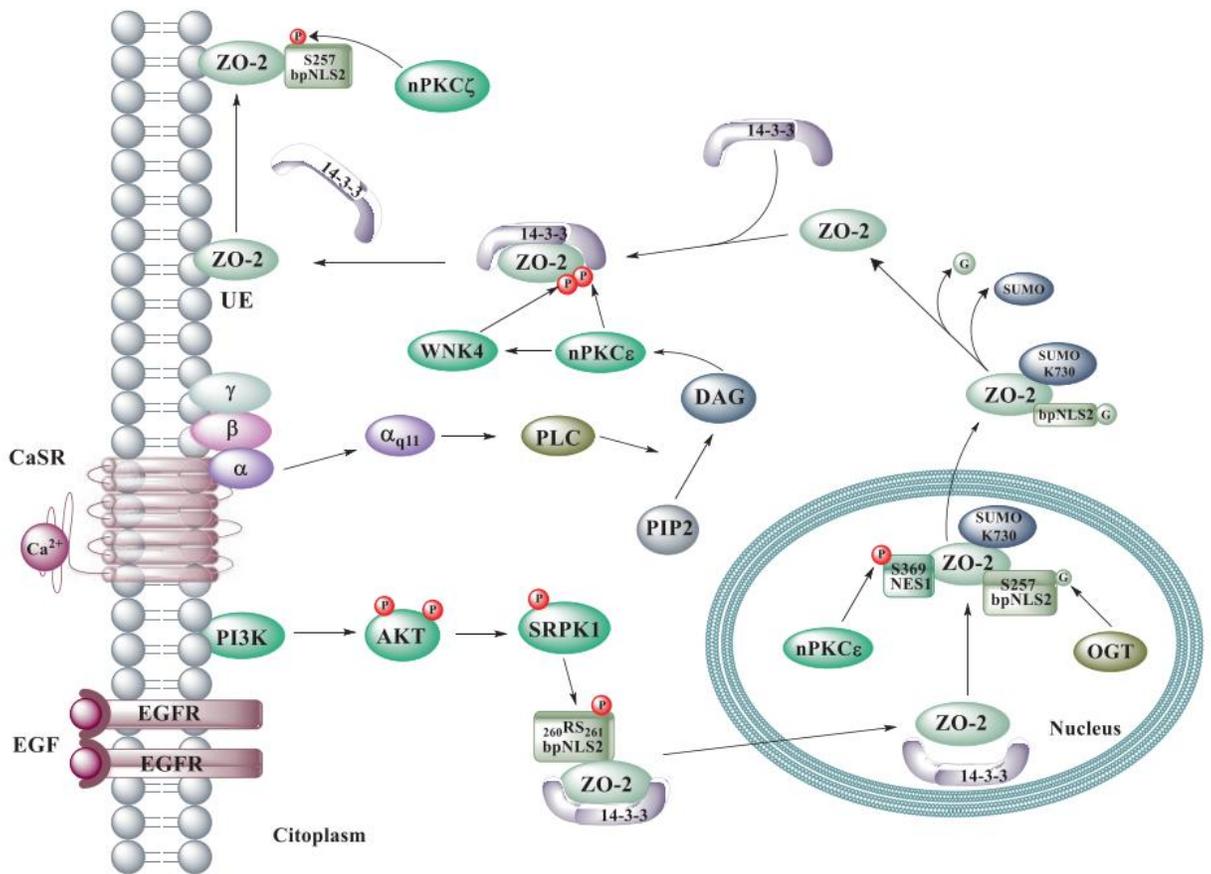


Figura 2: Regulación del tráfico intracelular de ZO-2 por NLS, NES, repetidos SR y modificaciones postraduccionales. En las células en proliferación, la activación del EGFR desencadena una cascada de señalización que lleva a la fosforilación de los repetidos SR en ZO-2 por la cinasa SRPK1. La S261 ubicada en la bpNLS2 se requiere para la interacción entre ZO-2 y 14-3-3 que facilita la importación nuclear de ZO-2. Para que ZO-2 se exporte del núcleo de manera efectiva requiere su cuatro NES. Además, son necesarias modificaciones postraduccionales específicas como la fosforilación de la S369 presente en la NES1 por la nPKCε; la O-GlcNAcilación de la S257 ubicada en la bpNLS2 y la SUMOilación de la K730. La presencia del Ca²⁺ extracelular activa al receptor CaSR. Esta activación desencadena una serie de señales que a través de la subunidad αq/11 y la enzima PLC, conducen a la activación de nPKCε. Esta enzima, además de actuar sobre la cinasa WNK4 en el citoplasma, también fosforila a ZO-2. Esta modificación permite que ZO-2 se desvincule de

la proteína 14-3-3, facilitando su anclaje en las UE. Durante este proceso de anclaje, la aPKC ζ juega un papel esencial al fosforilar la S257 de ZO-2 conforme las UE experimentan su proceso de maduración. Imagen tomada de González-Mariscal *et al.*, 2022.

1.3 Función de ZO-2 en la membrana celular

ZO-2 tiene múltiples dominios y motivos que permiten su unión a diversas proteínas (Fig. 1) (González-Mariscal *et al.*, 2022). En la membrana celular, por medio del dominio PDZ-1, ZO-2 se une al motivo YV, presente en el extremo carboxilo terminal de las claudinas (Itoh *et al.*, 1999). El dominio PDZ-2 le permite unirse a ZO-1 e incluso formar dímeros con otras moléculas de ZO-2. Además, el dominio PDZ-2 de ZO-2 media la interacción con Jam-A (Pinto-Dueñas *et al.*, 2024; Monteiro *et al.*, 2013). Por otro lado, ZO-2 mediante el dominio PDZ-3 se une a la proteína armadillo ARVCF (armadillo repeat gene deleted in velo-cardio-facial syndrome) de las uniones adherentes (Kausalya *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2013). Adicionalmente, mediante el segmento SH3-GK, ZO-2 se asocia a la ocludina y la proteína α -catenina, una proteína de la unión adherente (UA). ZO-2 también interactúa con varias proteínas de la unión comunicante como las conexinas (CX) Cx30, Cx32, Cx36 y Cx43 (Singh y Lampe, 2003; Talhouk *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009) y con otras proteínas de la UA como la β -catenina (Wetzel *et al.*, 2017)

Cuando se silencian simultáneamente ZO-1 y ZO-2, las células epiteliales en cultivo no forman los filamentos de la UE que aparecen en las réplicas de criofractura. En cambio, la reexpresión de cualquiera de estas proteínas es suficiente para que se vuelvan a formar los filamentos de UE, lo que demuestra que la función de ZO-1 y ZO-2, como plataforma para la polimerización de las claudinas, es redundante. Con esto se concluye que ZO-1 y ZO-2 son esenciales para la polimerización de las claudinas en filamentos de UE (Umeda *et al.*, 2006; Otani *et al.*, 2019).

La expresión de ZO-2 es crucial para el desarrollo embrionario de los ratones, ya que los embriones *Knockout* de ZO-2 mueren en la etapa embrionaria 7.5 debido a una disminución de la proliferación celular y a un incremento de la apoptosis (Xu *et al.*, 2008). Si se sustituyen las células de la masa celular interna en blástulas de ratones wt por células de ratones ZO-2 KO los embriones son viables y llegan a la vida adulta. Por lo que se concluye que en los ratones, ZO-2 es esencial para el desarrollo del tejido extraembrionario que da origen a la placenta, pero no para la formación del embrión *per se*. Sin embargo, los machos quiméricos muestran una fertilidad reducida debido a la apertura de la barrera hematotesticular (BHT) en las células de Sertoli (Xu *et al.*, 2009). Por ello se concluye que, en los ratones, ZO-2 es fundamental para el desarrollo de la placenta y el establecimiento de la BHT y no para la formación del embrión.

En humanos, las mutaciones del gen TJP2 que codifica a ZO-2, que inhiben la expresión de la proteína, generan colestasis intrahepática por apertura de las UEs de los ductos biliares intrahepáticos, que lleva a cirrosis y hepatocarcinoma en la infancia temprana (Zhang *et al.*, 2020). En cambio, la duplicación del gen TJP2 provoca sordera no sindrómica (Rajabi *et al.*, 2019). Por ello, se concluye que ZO-2 es esencial para el sellado de las UEs en el hígado y el oído interno.

1.4 Función de ZO-2 en el núcleo

1.4.1 Interacción de ZO-2 con el nucleoesqueleto de lámina B1 y el complejo LINC, y efecto sobre la forma del núcleo

La forma del núcleo se mantiene por un equilibrio entre el estado del nucleoesqueleto y la organización de la cromatina (Stephens *et al.*, 2019). ZO-2 es una proteína fundamental para mantener la forma y la rigidez del núcleo, ya que se asocia a proteínas que estabilizan la envoltura nuclear y le brindan al núcleo resistencia al estrés mecánico. En el núcleo, ZO-2 se asocia a la lámina B1 mediante su extremo carboxilo (Jaramillo *et al.*, 2004), y a SUN-1 a través

de segmento medio (3PSG) que contiene a los dominios PDZ-3, SH3 y GK (Hernández-Guzmán *et al.*, 2021). SUN-1 es una proteína del complejo LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton). Este complejo está constituido por las nesprinas, que atraviesan la envoltura nuclear externa y contactan en el citoplasma a proteínas del citoesqueleto y en el interior de la envoltura nuclear se asocian a SUN-1 que atraviesa la envoltura nuclear interna y del lado del nucleoplasma se une a las láminas. En el citoplasma, las nesprinas -1 y -2 se unen a la F-actina; la nesprina-3 por intermediación de la plectina se asocia a la vimentina, y la nesprina-4 interactúa con los microtúbulos a través de la kinesina (Fig. 3). Esto permite al complejo LINC conectar al nucleoesqueleto con el citoesqueleto (Zwerger *et al.*, 2011).

En ausencia de ZO-2 se pierde el vínculo entre la lámina B1 y SUN-1. Esto desestabiliza a los microtúbulos y hace que desaparezca la red de vimentina que rodea al núcleo. Además, disminuye la heterocromatina, lo que reduce la rigidez del núcleo. En conjunto, estas alteraciones modifican la forma del núcleo, dándole un aspecto lobulado con múltiples indentaciones (Hernández-Guzmán *et al.*, 2021).

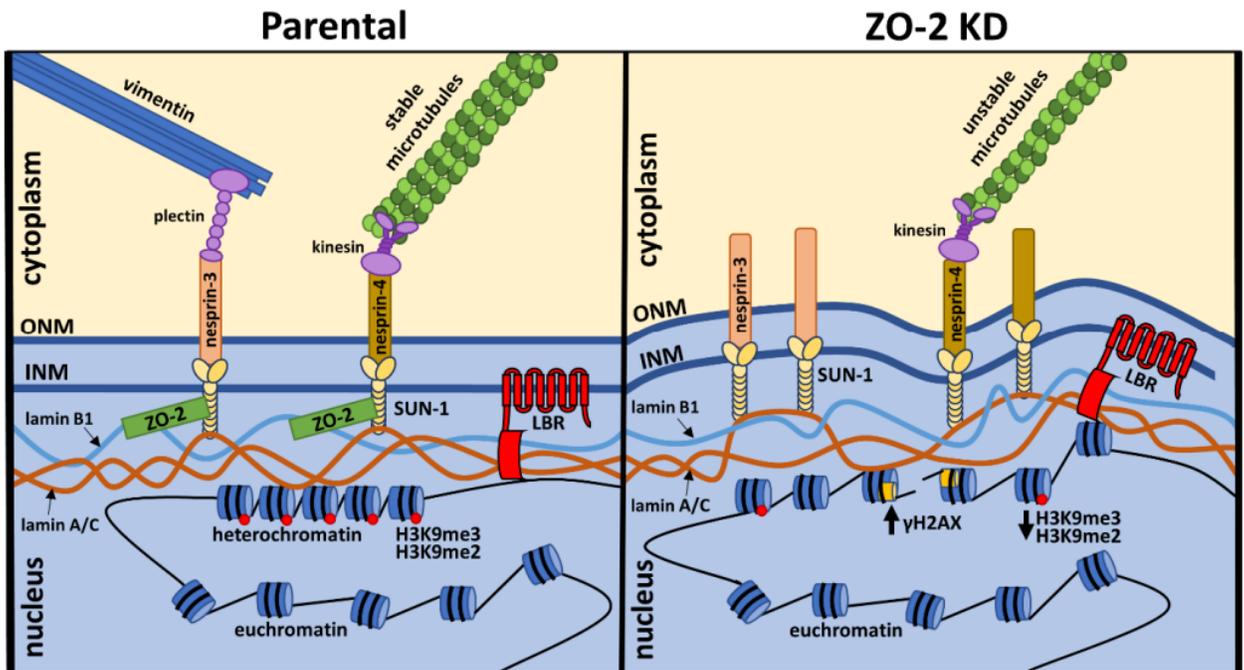


Figura. 3: Asociación de ZO-2 con proteínas de la membrana nuclear interna y su papel en la forma del núcleo. ZO-2 en el núcleo interactúa con las proteínas lámina B1 y SUN-1. Esta última es una proteína de la membrana nuclear interna que forma parte del complejo LINC que conecta el nucleoesqueleto con el citoesqueleto. SUN-1 se asocia con las nesprinas-3 y -4, las cuales, a través de plectina y kinesina, se unen a la vimentina y a los microtúbulos, respectivamente. En ausencia de ZO-2, los núcleos adoptan una forma lobulada con múltiples indentaciones; disminuyen los marcadores constitutivos y facultativos de la heterocromatina (H3K9me3 y H3K9me2, respectivamente); y aumentan las rupturas de la doble cadena de DNA, identificadas con Y-H2AX, en comparación con las células parentales. Estos cambios se acompañan de una sobreexpresión de SUN-1 y las nesprinas-3 y -4; una disminución en la expresión de vimentina; y la inestabilidad de los microtúbulos. Estas observaciones sugieren que el contacto de ZO-2 con proteínas en la membrana nuclear interna es crucial para mantener la forma del

núcleo. ONM, membrana nuclear externa; INM, membrana nuclear interna; LBR, receptor de lámina B (Tomado de Hernández-Guzmán *et al.*, 2021).

1.4.2 Interacción de ZO-2 con los factores de transcripción y su efecto sobre la transcripción.

ZO-2 interactúa con diversos factores de transcripción e inhibe la transcripción de una amplia variedad de genes. Por ejemplo, se asocia con los factores de transcripción Jun, Fos y C/EBP en el núcleo y en el borde celular de las células epiteliales, e inhibe la transcripción de genes regulados por sitios AP-1, adonde se unen los factores Jun y Fos (Betanzos *et al.*, 2004). ZO-2 forma un complejo con c-Myc que recluta a la desacetilasa de histonas 1 (HDAC1) y que se une a la caja E del promotor de la ciclina D1 (CD1), lo que inhibe su transcripción (Huerta *et al.*, 2007). Además, se ha identificado una proteína de los moteados nucleares llamada ZASP que se asocia a ZO-2 y bloquea su efecto inhibitorio sobre el promotor de la CD1 (Lechuga *et al.*, 2009).

En las células ZO-2 KD, YAP, el efector de la ruta Hippo, se concentra en el núcleo y actúa como coactivador transcripcional de genes regulados por sitios TEAD (Transcriptional Enhanced Associate Domain) (Domínguez-Calderón *et al.* 2016; Gallego-Gutiérrez *et al.*, 2021), que promueven transformación celular y resistencia a los fármacos (Oka *et al.*, 2010; Huh *et al.*, 2019).

ZO-2 asimismo reprime la transcripción de genes regulados por la vía de señalización Wnt (Tapia *et al.*, 2009; Bautista-García *et al.*, 2013). Por una parte, ZO-2 interactúa y activa a la glucógeno sintetasa cinasa 3 β (GSK-3 β) (Tapia *et al.*, 2009), una enzima que forma parte del complejo de degradación de la β -catenina citosólica (Wetzel *et al.*, 2017). Esto inhibe la acumulación de la β -catenina en el citoplasma y su ingreso al núcleo para la transcripción de genes. Por otro lado, ZO-2 reprime la transcripción de los genes blancos de la ruta Wnt regulados por sitios TCF/LEF (Bautista-García *et al.*, 2013; Domínguez-Calderón *et al.*, 2016). Al respecto, en las células de carcinomas de colon, la

expresión de ZO-2 inducida por la vitamina D3 inhibe la expresión de genes regulados por β -catenina-TCF4 (Palmer *et al.*, 2001).

La represión transcripcional de ZO-2 depende de su presencia nuclear. Así, se ha visto que cuando se refuerza la permanencia de ZO-2 en el núcleo por la adición de NLS virales, se inhibe de manera más intensa la transcripción de genes de la ruta Wnt (Wetzel *et al.*, 2017). En contraste, ZO-2 constitutivamente SUMOilada, que no puede ingresar al núcleo, no inhibe la transcripción de genes de la ruta Wnt (Wetzel *et al.*, 2017).

ZO-2 también se asocia con KyoT2, un factor de transcripción que inhibe la expresión de genes regulados por Notch (Huang *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2004) y reprime la transcripción de stat1 en células de músculo liso vascular humano (Kusch *et al.*, 2009). ZO-2 interactúa también con los factores de transcripción slug (Kao *et al.*, 2014) y smug de la familia snail que promueven la TEM (Huttlin *et al.*, 2015).

1.4.3 ZO-2 como acarreador de factores de transcripción hacia y desde el núcleo

ZO-2 es una proteína plataforma, lo que la capacita para funcionar como un acarreador de proteínas (Fig. 4). Así, para que la proteína ARVCF entre al núcleo requiere asociarse a ZO-2. Esta interacción se da entre el motivo de unión a dominios PDZ de ARVCF y el segmento amino de ZO-2 (Kausalya *et al.*, 2004).

La interacción del PDZ-1 de ZO-2 con el motivo de unión a PDZ de YAP2 favorece la translocación de YAP2 al núcleo y esto depende de la presencia del segmento U2 de ZO-2 donde se ubican sus NLS (Oka *et al.*, 2010).

ZO-2 también transloca a TEAD al núcleo. La interacción ZO-2/TEAD en el citoplasma se induce por la inhibición de la nPKC δ , lo que permite la importación al núcleo del complejo. En cambio, la exportación nuclear de TEAD/ZO-2 ocurre cuando se activa la NES-1 de ZO-2 por la nPKC ϵ (Gallego-Gutiérrez *et al.*, 2021).

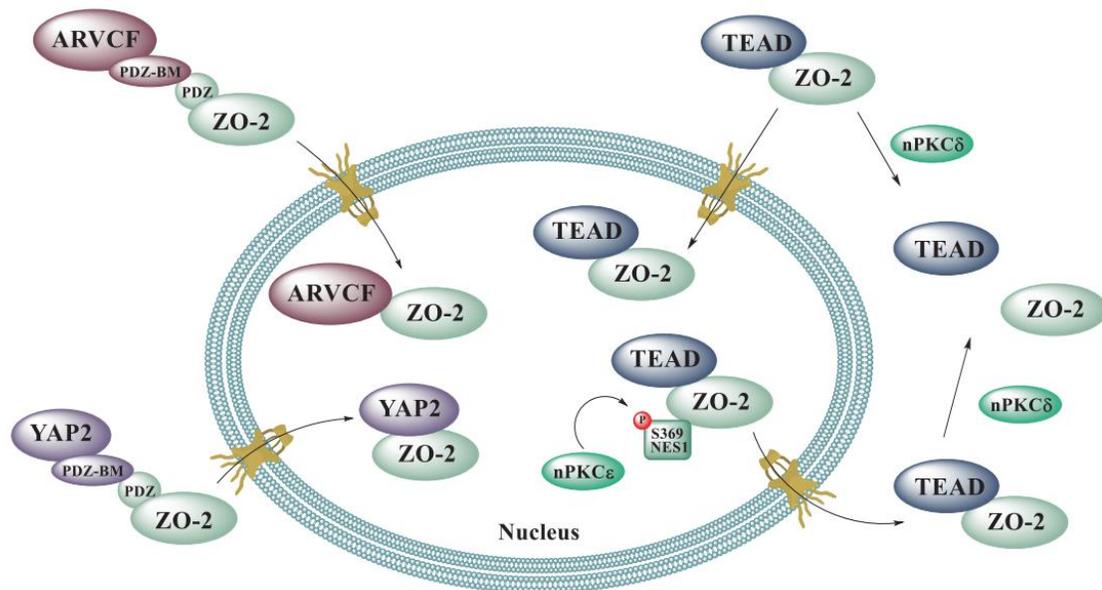


Figura 4: ZO-2 actúa como un acarreador que mete y saca proteínas del núcleo. La importación nuclear de las proteínas ARVCF y YAP2 requiere de la interacción entre sus respectivos motivos de unión a PDZ (PDZ-BM) y los dominios PDZ de ZO-2. La interacción entre ZO-2 y TEAD en el citoplasma se regula de forma negativa por la cinasa nPKC δ , por lo que su inhibición permite la importación nuclear del complejo TEAD/ZO-2. En cambio, la exportación nuclear de este complejo requiere de la fosforilación de ZO-2 en la S369 de la NES-1 por la nPKC ϵ . Imagen tomada de González-Mariscal *et al.*, 2022.

1.5 Cromatina y regulación epigenética

La cromatina es el complejo formado por el DNA y las histonas, y en las células se presenta como: heterocromatina, eucromatina y cromatina centromérica (Morrison y Thakur, 2021). Esta última, como su nombre lo indica,

se localiza en los centrómeros y se encuentra hipoacetilada (Sullivan y Arpen, 2004). La eucromatina es la forma abierta y desplegada de la cromatina, que facilita la transcripción de genes. Es abundante en las regiones promotoras y de *enhancers* (Carollo y Barra, 2023), y en el núcleo en interfase no se encuentra asociada a la lámina que circunda la envoltura nuclear (Morrison y Thakur, 2021). La heterocromatina o cromatina condensada constituye la porción mayor de la cromatina y se caracteriza por inhibir la actividad transcripcional (Sanulli *et al.*, 2019). La heterocromatina se localiza en la periferia del núcleo, alrededor del nucleolo, y en los telómeros (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009; Sanulli *et al.*, 2019) y se divide en constitutiva y facultativa. La primera se caracteriza por la trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3). La heterocromatina facultativa, como su nombre lo indica, alterna su condición entre activa o inactiva transcripcionalmente y puede encontrarse en un cromosoma completo, como el cromosoma X inactivo, o en regiones discretas en todo el genoma (Morrison y Thakur, 2021). La heterocromatina facultativa se caracteriza por tener las marcas de dimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me2) y de metilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27me), entre otras (Feil y Berger, 2007).

En las células epiteliales, la ausencia de ZO-2 disminuye la marca de H3K9me2 y H3K9me3, lo que indica que disminuyen la heterocromatina constitutiva y facultativa (Hernández-Guzmán *et al.*, 2021). Esto confirma que ZO-2 tiene un efecto inhibitor transcripcional y nos motiva a estudiar su actividad epigenética.

La regulación epigenética es aquella que por medio de modificaciones covalentes de los ácidos nucleicos y de las histonas altera la estructura de la cromatina y por ende la expresión génica (Nacev *et al.*, 2020). Las modificaciones epigenéticas incluyen: la metilación del DNA, la modulación por RNA no codificante (ncRNA), la remodelación de la cromatina y la acetilación, fosforilación, ubiquitinación y metilación de las histonas (Fig. 5; Tabla 1) (Park *et al.*, 2022).

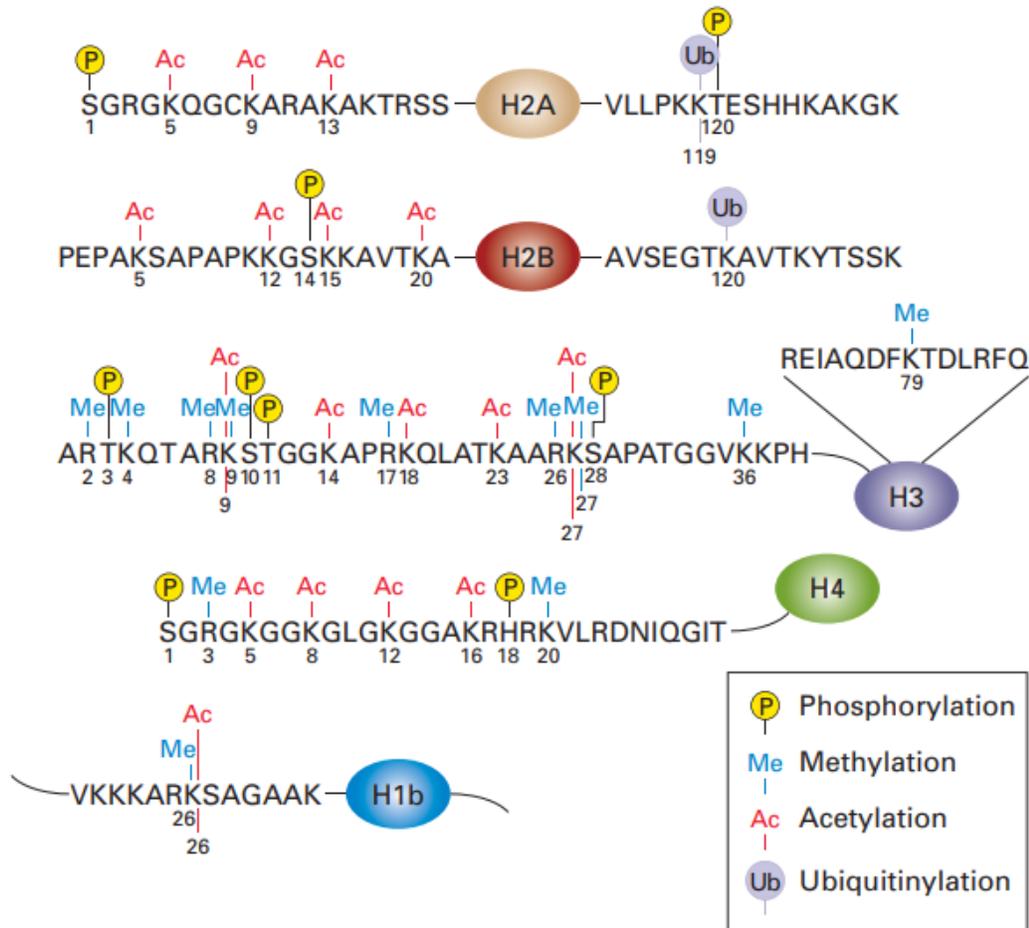


Figura 5: Modificaciones postraduccionales presentes en las histonas humanas. Las secuencias de las colas de las histonas se indican con el código de una letra para los aminoácidos, mientras que la parte central de cada histona se representa como un óvalo. Estas modificaciones no se producen todas al mismo tiempo en una sola molécula de histona. En su lugar, se observan combinaciones específicas de algunas de estas modificaciones en cada histona individual. Imagen tomada de Lodish, H. F. (2016).

Tabla 1: Modificaciones postraduccionales de las histonas asociados con la activación y represión de genes. Tomada de Lodish, H. F. (2016).

Modification	Sites of Modification	Effect on Transcription
Acetylated lysine	H3 (K9, K14, K18, K27, K56) H4 (K5, K8, K13, K16) H2A (K5, K9, K13) H2B (K5, K12, K15, K20)	Activation Activation Activation Activation
Hypoacetylated lysine		Repression
Phosphorylated serine/threonine	H3 (T3, S10, S28) H2A (S1, T120) H2B (S14)	Activation Activation Activation
Methylated arginine	H3 (R17, R23) H4 (R3)	Activation Activation
Methylated lysine	H3 (K4) Me3 in promoter region H3 (K4) Me1 in enhancers H3 (K36, K79) in transcribed region H3 (K9, K27) H4 (K20)	Activation Elongation Repression Repression
Ubiquitinated lysine	H2B (K120 in mammals, K123 in <i>S. cerevisiae</i>) H2A (K119 in mammals)	Activation Repression

La incorporación de grupos metilo en el DNA por las metiltransferasas (DNMTs) ocurre principalmente en las islas CpG (citosina, fosfato, guanina) y es característica de centrómeros, telómeros, secuencias repetidas y el cromosoma X inactivo. Cuando la metilación se da en la región promotora de un gen, por lo general resulta en la inhibición de la transcripción (Dhar *et al.*, 2021).

En el caso de ZO-2, se ha visto que el gen TJP2 que la codifica se silencia por metilación de su promotor en el adenocarcinoma de próstata (Wang *et al.*, 2005).

Las moléculas de ncRNA representan al 98 % del genoma humano y participan en diversos procesos (Iyer *et al.*, 2015). Según su longitud los ncRNAs se clasifican en pequeños (snRNA, 18-200 nucleótidos), grandes (lncRNA, 200-nucleótidos) y circulares (cirRNA). Los snRNA se subdividen en micro-RNA

(miRNA) y RNA de interacción con piwi (piRNA) (Ling *et al.*, 2013). Los miRNA al unirse a la región 3'UTR de sus mRNA blancos inhiben su traducción y promueven su degradación (Bartel *et al.*, 2009).

El 3'UTR de ZO-2 tiene sitios blancos para el miR-123a y b, y el miR-124 conservados en rata, ratón, perro y humanos, mientras que el sitio blanco para el miR-137 no está presente en ZO-2 de perro (González-González *et al.*, 2022). Los miRs-23a y 23b que solo difieren en un nucleótido, respectivamente inhiben e incrementan la permeabilidad endotelial (Li *et al.*, 2016), mientras que el miR-137 bloquea la expresión de ZO-2 y sube la permeabilidad paracelular de las células microvasculares cerebrales (Yu *et al.*, 2017). En el riñón de la rata después de una uninefrectomía, el riñón remanente aumenta de tamaño y silencia la expresión de ZO-2. En estos animales, sin embargo, no se observó una diferencia en la expresión de los miR-23a y -23b con los animales control, y en ellos tampoco se detectó al miR-137 (González-González *et al.*, 2022). Por ello, se concluyó que el silenciamiento de ZO-2 en el riñón ocasionado por una uninefrectomía no se regula por miRNAs. Sería pertinente en el futuro analizar si en los tejidos cancerosos el silenciamiento de ZO-2 se regula mediante miRNAs.

La remodelación de la cromatina incluye deslizamientos y reestructuración de los nucleosomas por acción de los complejos remodeladores de la cromatina, lo que produce la disociación del DNA genómico en el borde de los nucleosomas y genera su reposicionamiento (Wu *et al.*, 2023). Este proceso puede promover o reprimir la transcripción génica al facilitar o no el acceso de los factores de transcripción y la maquinaria de transcripción a los genes (Clark y Rager, 2020).

La acetilación de las histonas abre a la cromatina y la vuelve más accesible a los factores de transcripción, lo que promueve la expresión génica (Shvedunova y Akhtar, 2022). Por ello, el reclutamiento por ZO-2 de las desacetilasas de histonas al promotor de la CD1 inhibe su transcripción (Huerta *et al.*, 2007).

Los miembros de la familia HP1 (Heterochromatin Protein 1) son proteínas diferentes a las histonas, que se unen a la cromatina. Se les llama proteínas “lectoras”, porque reconocen modificaciones postraduccionales de las histonas, específicamente a las marcas H3K9me2/3 (Maeda y Tachibana, 2022). Las proteínas HP1 se han conservado a lo largo de la evolución y participan en la regulación de la transcripción (Schoelz y Riddle, 2022). HP1 interactúa con la metiltransferasa SUV39H1 y esto permite el reclutamiento de esta molécula hacia los sitios de metilación en la lisina 9 de la histona 3 (Yamamoto y Sonoda, 2003). De esta manera, se establece un ciclo de retroalimentación positiva, necesario para la formación de la heterocromatina pericentromérica (Muramatsu et al., 2016). La interacción entre HP1 y algunas metiltransferasas y demetilinas de H3K9 como SUV39H1 y Jmjd1a, respectivamente, les brinda estabilidad, impidiendo su degradación proteosomal (Maeda y Tachibana, 2022).

La disminución en la metilación de la histona 3, manifiesta por las marcas H3K9me2 y H3K9me3 en las células ZO-2-KD, indica que, en estas células, disminuyó el contenido de heterocromatina y sugiere, por tanto, que ZO-2 remodela a la cromatina, favoreciendo su estado cerrado como heterocromatina y su localización en la periferia del núcleo.

Por lo tanto, en esta tesis analizamos si ZO-2 cambia la distribución de la heterocromatina en el núcleo.

1.6 Dam-ID

El Dam-ID es un método que sirve para detectar la interacción entre el DNA y una proteína de interés. En nuestro caso, nos interesa saber si la ausencia de ZO-2 cambia la fracción de DNA que se asocia a la lámina B que rodea a la envoltura nuclear y que corresponde a la heterocromatina.

El Dam-ID se basa en la construcción de una proteína de fusión entre la DNA metiltransferasa (Dam) de *Escherichia coli* y una proteína de interés que se una a la cromatina (Greil et al., 2006), que en nuestro caso sería la lámina

B1. La Dam metila la posición 6 de las adeninas presentes en el consenso GATC (Barras y Marinus, 1987). Para detectar al DNA metilado por la Dam, se añade un trazador acoplado a un fluoróforo que se une a las adeninas metiladas por Dam. De esta manera, se puede observar por fluorescencia, si cambia la distribución de la cromatina asociada a la lámina B en las células que carecen de ZO-2, en comparación con las parentales.

II Planteamiento del problema

ZO-2 inhibe la transcripción génica y mantiene la forma del núcleo. Esto último ocurre por dos mecanismos: 1) Vincula a la lámina B1 con SUN-1, lo que estabiliza a los microtúbulos y sostiene la red de vimentina que rodea al núcleo, y 2) aumenta el contenido de heterocromatina que se asocia a la periferia nuclear e incrementa la rigidez del núcleo. La disminución de la heterocromatina en las células ZO-2 KD sugiere que ZO-2 podría modular la expresión de genes por un mecanismo epigenético.

III Hipótesis

ZO-2 tiene un efecto epigenético, y por tanto regula la distribución de la heterocromatina en el núcleo y la expresión de genes.

IV Objetivo del proyecto

4.1 Objetivo general

Determinar si ZO-2 tiene un efecto epigenético que se manifieste como un cambio en la localización perinuclear de la heterocromatina y en la expresión diferencial de genes.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Determinar si la ausencia ZO-2 cambia la distribución de la heterocromatina en el núcleo.

4.2.2 Investigar si ZO-2 tiene motivos de unión a HP1 y si la interacción ZO-2/HP1 es necesaria para mantener a la heterocromatina en la periferia nuclear.

4.2.3 Comenzar el proceso para identificar las regiones del genoma a las que se asocia ZO-2.

V Materiales y métodos

5.1 Cultivo celular

Las células epiteliales renales de perro Madin-Darby (MDCK) parentales y ZO-2 KD fueron amablemente donadas por el Dr. Alan Fanning (Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, NC). Estas células expresan tres shRNA diferentes dirigidos contra ZO-2 en el vector pSuper. Las células se cultivaron siguiendo el protocolo previamente descrito (González-Mariscal *et al.*, 1985).

5.2 Transfección celular

Para las transfecciones se utilizó Lipofectamina 2000® (Cat. 11668-019, Life Technologies, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células MDCK parentales y ZO-2 KD se sembraron a un 30 % de confluencia y 24 h después se transfectaron con los plásmidos con las construcciones del DamID: 2_SdV3_pCCL_hPGK_HA_AID_DAM_LaminB1 y 3_SL1-pCCL-EGFP-DPN7(tracer). Para el experimento de recuperación de la expresión de ZO-2, se transfectaron células MDCK ZO-2 KD con una construcción de ZO-2 que lleva asociada una señal fuerte de localización nuclear derivada del virus SV40 (ZO-2-NLS) donada generosamente por el Dr. Otmar Huber (Universidad de Jena, Alemania).

5.3 Análisis de secuencia de ZO-2

La secuencia de la proteína ZO-2 humana fue sometida a un alineamiento múltiple de secuencia utilizando el software libre en línea CLUSTALW, Science Foundation Ireland.

5.4 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia (IF) se realizó como previamente se describió (Quiros *et al.*, 2013). Se utilizó un anticuerpo policlonal producido en conejo anti-ZO-2 (Invitrogen, Cat. 711400, dilución 1:100, Carlsbad, CA) y un anticuerpo monoclonal producido en ratón anti-HP1 (Santa Cruz Biotechnology, HP1(E6): sc-515341; dilución 1:100). Como anticuerpos secundarios se emplearon los siguientes: anticuerpo de burro anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 488 (Cat. A-21206, dilución 1:1000, Life Technologies, Eugene, OR, EUA); anticuerpo de burro contra IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 594 (Cat. A-21203, dilución 1:1000, Life Technologies, Eugene, OR, EUA). Las imágenes se tomaron en un microscopio confocal Leica TCS-SPE DMI4000 1st Gen a una resolución de 2048 x 2048 megapíxeles y se procesaron en el software ImageJ versión 1.54e (National Institutes of Health, USA).

5.5 Inmunodetección por Western Blot

Los Western Blots (WB) se realizaron de acuerdo con el protocolo o estándar descrito previamente (Quiros *et al.*, 2013). Se empleó el anticuerpo policlonal producido en ratón anti-HP-1 (Insertar datos del Ac). Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa que se utilizaron fueron: de cabra anti-IgG de conejo (Sigma Aldrich, Cat A9169, dilución 1:10,000, San Louis, MO), y anti-IgG de ratón (Cat. 62-6420, Invitrogen, Carlsbad, CA, dilución 1:3000). La detección de las bandas que reaccionaron con los anticuerpos se hizo con el sistema Immobilon (Cat. WBKLS0500, Millipore, Billerica, MA).

5.6. Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa cuantitativa (qPCR).

El ARN total se extrajo de las células MDCK parentales y ZO-2 KD con ayuda del reactivo TRI-reagent (Sigma-Aldrich, Cat. T9424, St. Louis, MO). La RT-qPCR se realizó en un solo paso empleando el estuche KAPA SYBR® FAST qPCR kit (KAPA Biosystems, Cat. KK4600, Wilmington, MA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó el equipo de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems Cat. 4376600, Carlsbad, CA). Las condiciones de la PCR fueron: un

ciclo inicial de 5 min a 42 °C, un ciclo de 5 min a 92 °C, 40 ciclos de amplificación (30 s a 92 °C y 30 s a 62 °C) y una curva desnaturante (15 s a 95 °C; 1 min a 60 °C; 15 s a 95 °C). Los oligos que se usaron para la amplificación del mRNA de HP1 fueron: sentido: CTGACTTGAGCCCTCAGCA y antisentido: TTGAGCACCGGAGACCTAGA.

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

5.7. Ensayo de ligación por proximidad *in situ* DuoLink

El ensayo de ligación por proximidad *in situ* Duolink (PLA) (PLA Duolink, Cat. DUO92008, Sigma Aldrich, Uppsala, Suecia) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, empleando un anticuerpo policlonal producido en conejo contra ZO-2 (Invitrogen, Cat. 711400, dilución 1:100, Carlsbad, CA), un anticuerpo monoclonal producido en ratón anti-HP1 (Santa Cruz Biotechnology, HP1(E6): sc-515341; dilución 1:100) y DAPI para marcar los núcleos. Para la detección de fondo, las células MDCK *wild type* se incubaron solo con el anticuerpo contra ZO-2.

El análisis cuantitativo de los ensayos de PLA se realizó en el software Blobfinder. Se utilizó un tamaño de muestra $n=8$ y se empleó una prueba t de Student para comparar las dos condiciones.

VI Resultados

6.1 El dominio PDZ-3 de ZO-2 contiene un motivo conservado de unión a HP1.

Previamente se vio que la ausencia de ZO-2 altera la forma del núcleo que pasa de ovalado a lobulado con múltiples indentaciones (Hernández-Guzmán *et al.*, 2021). En la literatura encontramos que la ausencia de la proteína PRR14 altera la forma del núcleo de manera similar a como lo hace la ausencia de ZO-2 (Poleshko *et al.*, 2013). Esto llamó nuestra atención porque PRR14 es una proteína que recluta a la heterocromatina periférica asociada a la proteína de la heterocromatina HP1. PRR14 tiene en su porción amino

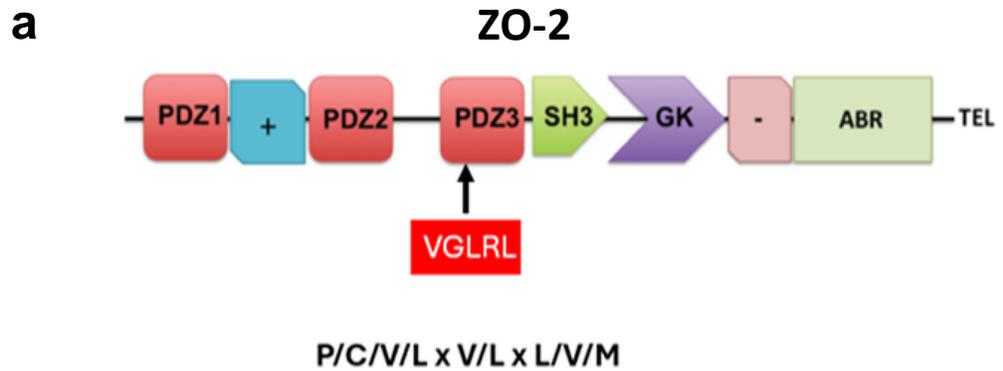
terminal al motivo LAVVL de unión a HP1 α y cuando este motivo se muta se pierde la interacción entre ambas proteínas (Nozawa *et al.*, 2010).

Por ello, nos propusimos investigar si ZO-2 tiene motivos de unión a HP1 similares al que tiene PRR14 y si la localización de la heterocromatina en la periferia nuclear depende de esta interacción.

El motivo VGLRL localizado en los aminoácidos 521–525 presentes en el dominio PDZ-3 de ZO-2 humano cumple con el consenso del motivo LxVxL de unión a HP1 (Fig. 6a). Este motivo se conserva en ZO-2 de varias especies de mamíferos, lo que sugiere que es importante para la función de la proteína (Fig. 6b).

6.2 ZO-2 interactúa con la proteína HP1.

Para analizar si ZO-2 y HP1 interactúan, se realizó un ensayo de ligación por proximidad con anticuerpos de conejo contra ZO-2 y de ratón contra HP1. El experimento se hizo en cultivos subconfluentes para inducir la concentración de ZO-2 en el núcleo (Islas *et al.*, 2002). La figura 7 muestra la presencia de puntos rojos fluorescentes en el núcleo, los cuales solo aparecen si las proteínas están juntas a una distancia no mayor a 30 nm. Estos resultados, por lo tanto, indican que ZO-2 y HP1 se asocian entre sí en el núcleo de las células MDCK.



b

Homo sapiens 511- KMVRFKKGDS**VGLRL**AGGNDVGIFV -535
Canis familiaris 514- KMVRFKKGDS**VGLRL**AGGNDVGIFV -538
Mus musculus 495- KMVRFKKGDS**VGLRL**AGGNDVGIFV -519
Rattus norvegicus 491- KMVKFKKGDS**VGLRL**AGGNDVGIFV -515

Figura 6: La secuencia de ZO-2 tiene un motivo de unión a HP1. (a) Ilustración esquemática de los dominios de ZO-2 y el motivo de unión a HP1 presente en el dominio PDZ-3. (b) Alineamiento del motivo VGLRL presente en la secuencia de ZO-2 de diferentes especies de mamíferos.

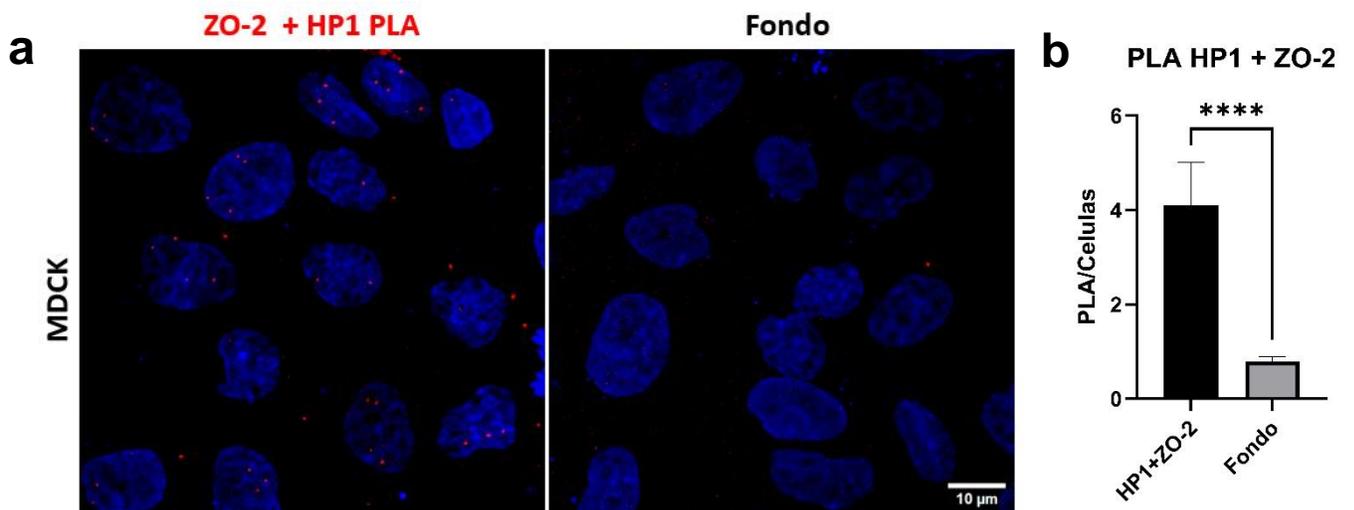


Figura 7: ZO-2 interactúa con HP1 en el núcleo. (a) Imagen representativa del PLA que muestra la interacción entre ZO-2 y HP1 como puntos rojos fluorescentes. (b) Análisis cuantitativo realizado con el software Blobfinder utilizando la prueba t

de Student. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. **** $p < 0.0001$.

6.3. En ausencia de ZO-2, disminuye la transcripción de HP1 y su expresión en el núcleo

En seguida, analizamos si la ausencia de ZO-2 podría afectar la expresión de HP1. Para ello, se analizó por inmunofluorescencia la expresión de HP1, y se observó que en las células ZO-2 KD disminuye drásticamente su expresión (Fig. 7a). Esta observación se corroboró con un ensayo de Western Blot (Fig. 7b).

Por otra parte, también se analizó si la ausencia de ZO-2 altera la cantidad de mRNA de HP1, encontrándose que en las células ZO-2 KD disminuye el mRNA de HP1 (Fig. 7c).

En conjunto, estos resultados muestran que la reducción en el contenido de la proteína HP1 en las células ZO-2 KD obedece a una menor transcripción de HP1. Esto podría explicar la baja expresión de H3K9me2/3 en las células ZO-2 KD.

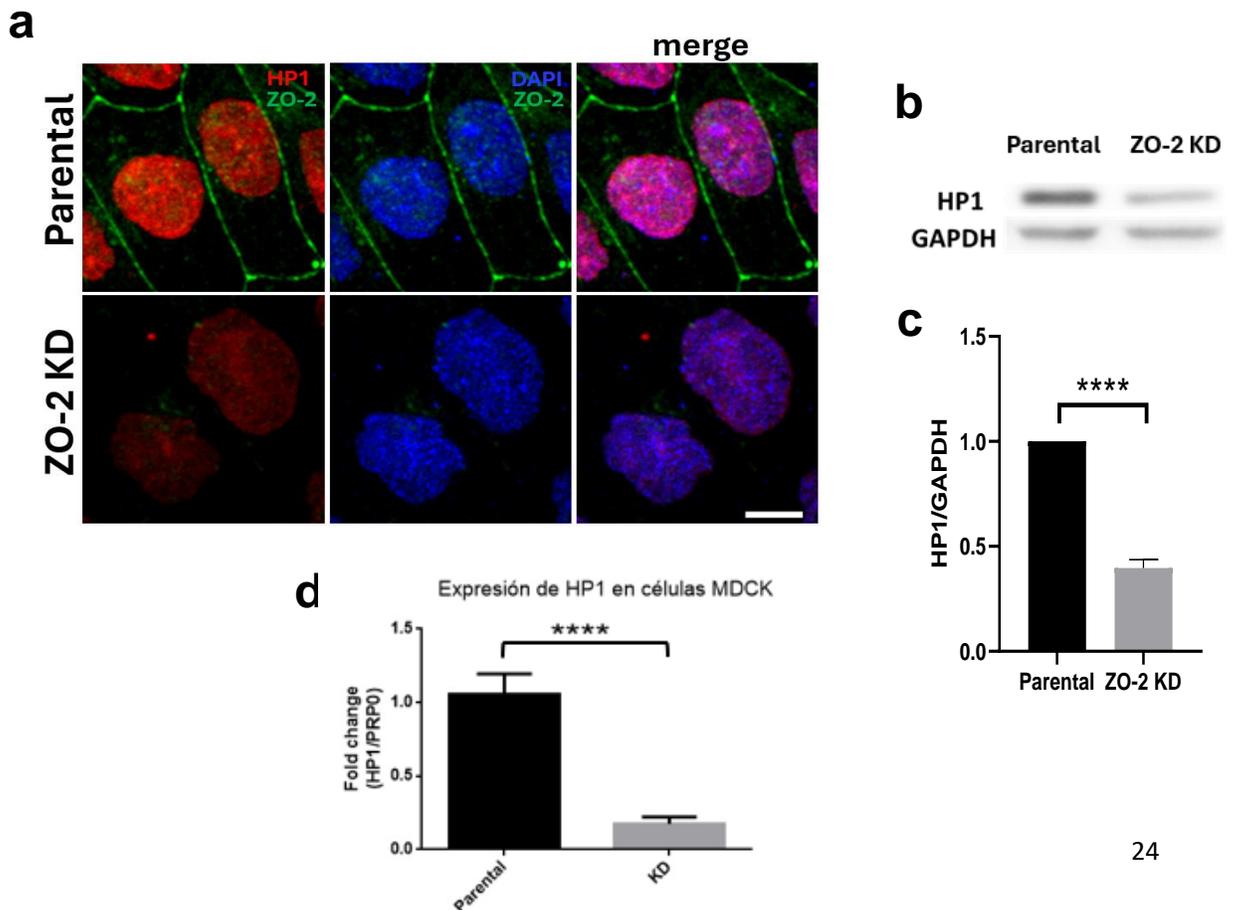


Figura 8: En ausencia de ZO-2 disminuye la expresión de HP1. (a) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de HP1 en el núcleo de células MDCK parentales y ZO-2 KD. (b) Western Blot de HP1 en células MDCK parentales y ZO-2 KD. (c) Análisis cuantitativo de los ensayos de Western Blot realizado con la prueba t de Student. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. **** $p < 0.0001$. (d) Cuantificación mediante PCR en tiempo real del mRNA de HP1 en las células MDCK parentales y ZO-2 KD. Se realizó una prueba t de Student. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. **** $p < 0.0001$.

6.4 En ausencia de ZO-2, el patrón de heterocromatina cambia de perinuclear a moteado.

Dada la importancia de la proteína HP1 en la organización de la heterocromatina y considerando que ZO-2 regula su expresión a nivel transcripcional, nos preguntamos si en ausencia de ZO-2 cambia el patrón de distribución de la heterocromatina en el núcleo. Para analizarlo empleamos la técnica de DamID.

En las células parentales la heterocromatina mostró un patrón de distribución perinuclear. En cambio, en las células ZO-2 KD la heterocromatina se concentró en moteados nucleares (Fig. 8b). Para saber si la presencia de ZO-2 en el núcleo era suficiente para que la heterocromatina se localizara en la periferia, transfectamos a las células ZO-2 KD con una construcción de ZO-2 que lleva asociada a una señal fuerte de localización nuclear derivada del virus SV40 (ZO-2-NLS). Observamos que el 30% de las células ZO-2 KD transfectadas con la construcción ZO-2-NLS recupera el patrón de la heterocromatina perinuclear, pero que en el resto (70 %) permanece el fenotipo de acúmulos nucleares de heterocromatina.

Falta ahora analizar si al transfectar a las monocapas de células ZO-2 KD con ZO-2, se recupera el patrón de distribución de la heterocromatina en un porcentaje mayor de células. Esto lo planteamos porque previamente vimos que la forma del núcleo solo se recupera cuando ZO-2 está presente tanto en el núcleo como en las UEs (Hernández-Guzmán *et al.*, 2021)

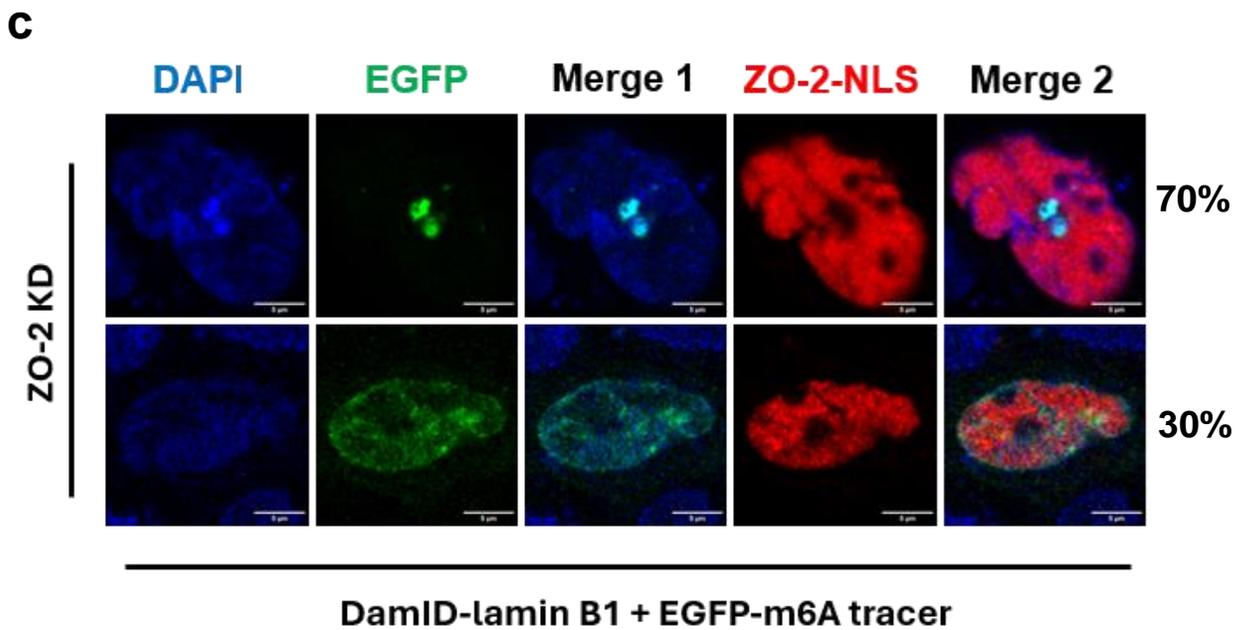
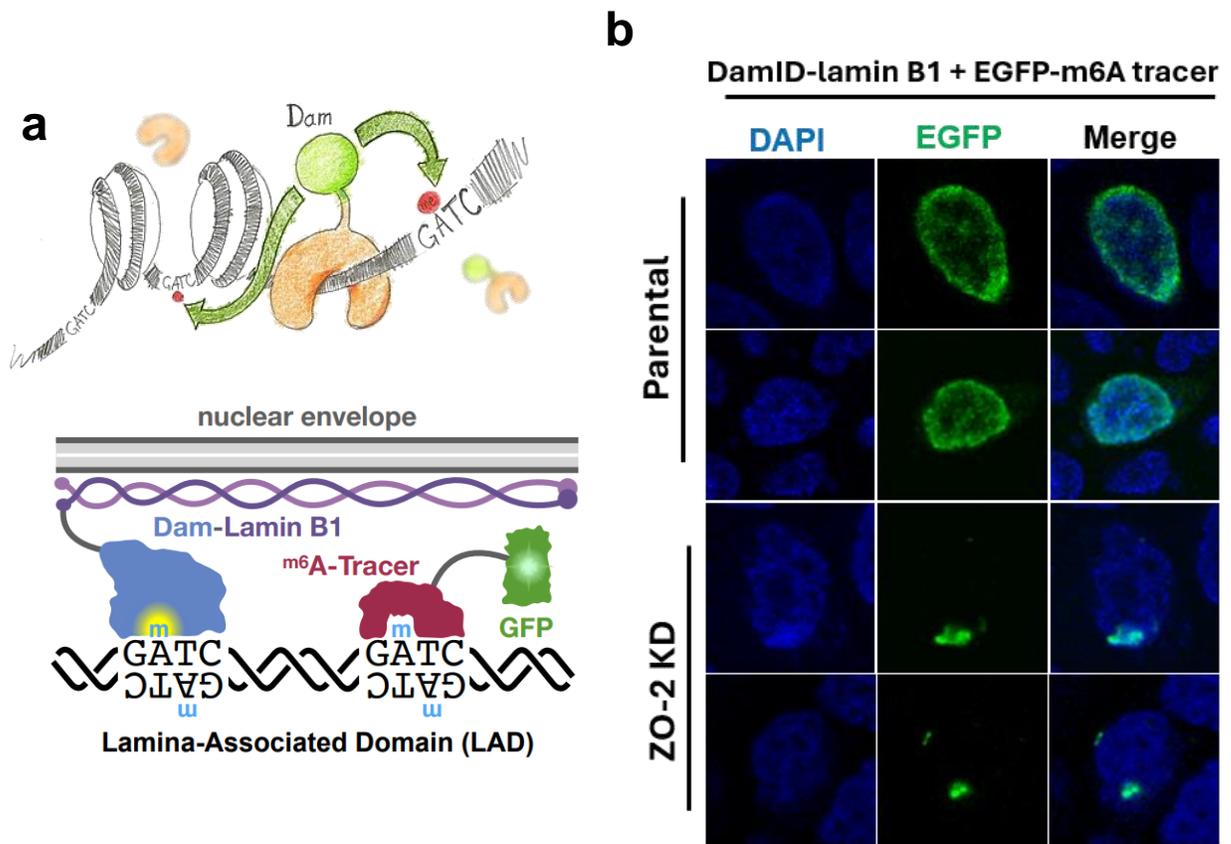


Figura 9: ZO-2 promueve la localización perinuclear de la heterocromatina. (a) Ilustración esquemática de la técnica de DamID. (b) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de las células MDCK parentales y ZO-2 KD transfectadas con los plásmidos del DamID. (c) Imágenes representativas de la recuperación de la expresión de ZO-2 en el núcleo de células MDCK ZO-2 KD.

VII Discusión

En nuestro laboratorio se demostró que ZO-2 actúa como represor transcripcional de genes involucrados en la proliferación y transformación celular, mediante su interacción con diversos factores de transcripción. Además, se vio que ZO-2 es importante para mantener el contenido de heterocromatina con la marca H3K9me2/3 (Hernández-Guzmán *et al.*, 2021). En este trabajo aportamos nuevas evidencias que apoyan la hipótesis de ZO-2 como proteína que regula la expresión de genes por un mecanismo epigenético.

En este trabajo identificamos un motivo VGLRL de unión a HP1 presente en el dominio PDZ-3 de ZO-2. Este motivo cumple con el consenso PxVxL que poseen todas las proteínas que se asocian a HP1 (Lechner *et al.*, 2005). ZO-2 no es la única proteína de las uniones celulares que interactúa con HP1. Se ha observado que un fragmento de 55 KDa producto del clivaje proteolítico de la proteína de las adhesiones neuronales L1 interactúa en el núcleo con las isoformas HP1 α , HP1 β y HP1 γ . Esta interacción es necesaria para el crecimiento de las neuritas y la migración neuronal (Kleene *et al.*, 2021).

En ausencia de ZO-2 disminuye la transcripción y la cantidad de proteína HP1 en las células MDCK. Se sabe que el factor de transcripción E2F6 reprime la transcripción del mRNA de HP1 α en células HeLa y HEK293 (Oberley *et al.*, 2003), mientras que E2F5 lo silencia en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Thomsen *et al.*, 2011). Sería interesante por ello, en el futuro analizar si en las células ZO-2 KD se concentran los factores E2F5/6 en el núcleo. Asimismo, en el cáncer de mama la expresión de la proteína HP1 se reduce de forma más pronunciada en las líneas más invasivas como HS578T y MDA-MB-231, en

comparación con líneas menos invasivas como T47D y MCF-7 (Kirschmann *et al.*, 2000). Por ello, la disminución de la expresión transcripcional de HP1 en las células MDCK ZO-2 KD, sugiere que estas células tienen características de células desdiferenciadas.

Otro elemento que apoya la hipótesis de que las células MDCK ZO-2 KD son células en proceso de desdiferenciación, es el patrón de distribución de la heterocromatina en moteados nucleares que presentan. Por el contrario, en las células MDCK parentales, la heterocromatina se distribuye en la periferia del núcleo. Esto sugiere, que los dominios de heterocromatina asociados a la lámina (LADs, por sus siglas en inglés) que están normalmente silenciados en las células MDCK ahora se están expresando. Esto es congruente con un estudio previo, donde se vio que los genes que se separan de la lámina nuclear se activan (Peric-Hupkes *et al.*, 2010).

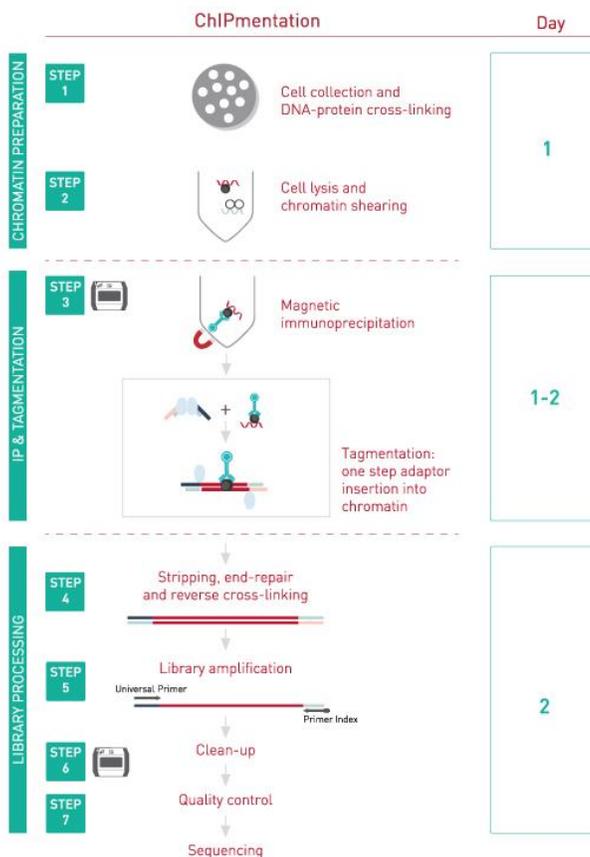
Al recuperar la expresión nuclear de ZO-2, transfectando a las células MDCK ZO-2 KD con la construcción ZO-2-NLS, no se reorganizó la heterocromatina en la periferia nuclear, más que en un 30% de las células. Resulta aquí pertinente mencionar que es necesario que las células expresen ZO-2 tanto en el núcleo como en las UEs, para que el núcleo recupere su forma ovalada (Hernández-Guzmán *et al.*, 2021). Por ello, en el futuro queremos probar si la heterocromatina se reorganiza en un mayor porcentaje de células al transfectar a las células ZO-2 KD con una construcción de ZO-2 humana resistente a los shRNAs anti-ZO-2 empleados en la generación de la línea celular estable.

El efecto de ZO-2 sobre la expresión de HP1, así como los cambios en la organización de la heterocromatina observados en las células MDCK ZO-2 KD, nos sugieren que ZO-2 inhibe la transcripción de ciertos genes con los que se asocia. Dichos genes hasta ahora nos son desconocidos. Por ello, comenzamos en este período de maestría, un ensayo de CHIPmentation en las células MDCK *wild type*. Este método combina la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) con la preparación de una librería de secuenciación por la transposasa Tn5 (tagmentación) (Fig. 9a). Al realizar la secuenciación masiva de los fragmentos de

DNA inmunoprecipitados por el anticuerpo anti-ZO-2, podremos identificar las regiones del genoma a las que ZO-2 se une y probablemente regula.

Se hizo también, un ensayo de cromatina accesible a transposasa mediante secuenciación (ATAC-seq). Este estudio se basa en la transposición *in vitro* de adaptadores de secuenciación en la cromatina nativa (Fig. 9b). Esto permite identificar mediante secuenciación, a las regiones del genoma donde la cromatina está abierta. Posteriormente, los ensayos se harán en las células MDCK ZO-2 KD, para comparar entre ambas líneas celulares la organización de la cromatina y la expresión diferencial de genes.

a



b

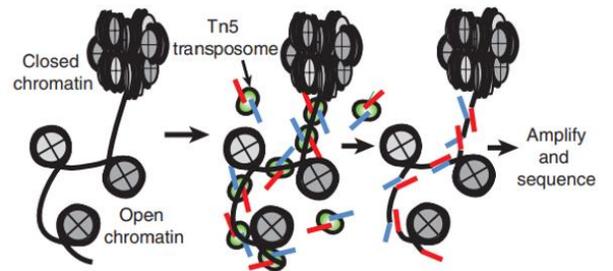


Figura 10: Métodos empleados para estudiar el genoma de las células MDCK *wild type*. (a) ChIPmentation: Método rápido y robusto empleado para mapear las regiones del genoma a las que se asocia ZO-2. Se emplea la transposasa hiperactiva Tn5 para colocar los adaptadores de secuenciación en los fragmentos del genoma inmunoprecipitados con ZO-2 (Tomado del sitio web de la compañía Hologic Diagenode: <https://www.diagenode.com/en/categories/chromatin-ip-chipmentation>). (b) ATAC-seq: Método rápido y sensible empleado para identificar las zonas abiertas de la cromatina nativa. Este también emplea la transposasa hiperactiva Tn5 para colocar adaptadores de secuenciación en estas regiones accesibles del genoma (Tomado de Buenrostro *et al.*, 2013).

VIII Referencias bibliográficas

- 1 Amaya, E., Alarcón, L., Martín-Tapia, D., Cuellar-Pérez, F., Cano-Cortina, M., Ortega-Olvera, J. M., ... & González-Mariscal, L. (2019). Activation of the Ca²⁺ 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.
- 2 Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., & Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410(6824), 120-124.
- 3 Barnhart, M.C.; Kuich, P.H.; Stellfox, M.E.; Ward, J.A.; Bassett, E.A.; Black, B.E.; Foltz, D.R. HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. *J. Cell Biol.* 2011, 194, 229–243.
- 4 Barras, F., & Marinus, M. G. (1989). The great GATC: DNA methylation in *E. coli*. *Trends in Genetics*, 5, 139-143.
- 5 Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233 (2009)
- 6 Bautista-García, P., Reyes, J. L., Martín, D., Namorado, M. C., Chavez-Munguía, B., Soria-Castro, E., ... & González-Mariscal, L. (2013). Zona occludens-2 protects against podocyte dysfunction induced by ADR in mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 304(1), F77-F87.

- 7 Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J., & González-Mariscal, L. (2004). The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Experimental cell research*, 292(1), 51-66.
- 8 Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2013). Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nature methods*, 10(12), 1213-1218.
- 9 Carollo, P. S., & Barra, V. (2023). Chromatin epigenetics and nuclear lamina keep the nucleus in shape: Examples from natural and accelerated aging. *Biology of the Cell*, 115(1), 2200023.
- 10 Citi, S., Fromm, M., Furuse, M., González-Mariscal, L., Nusrat, A., Tsukita, S., & Turner, J. R. (2024). A short guide to the tight junction. *Journal of Cell Science*, 137(9).
- 11 Clark, J., & Rager, J. E. (2020). Epigenetics: An overview of CpG methylation, chromatin remodeling, and regulatory/noncoding RNAs. *Environmental epigenetics in toxicology and public health*, 3-32.
- 12 Dhar, G. A., Saha, S., Mitra, P., & Nag Chaudhuri, R. (2021). DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of our health. *The Nucleus*, 64(3), 259-270.
- 13 Domínguez-Calderón, A., Ávila-Flores, A., Ponce, A., López-Bayghen, E., Calderón-Salinas, J. V., Luis Reyes, J., ... & González-Mariscal, L. (2016). ZO-2 silencing induces renal hypertrophy through a cell cycle mechanism and the activation of YAP and the mTOR pathway. *Molecular biology of the cell*, 27(10), 1581-1595.
- 14 Dominguez-Calderon, A.; Avila-Flores, A.; Ponce, A.; Lopez-Bayghen, E.; Calderon-Salinas, J.V.; Luis Reyes, J.; Chavez-Munguia, B.; Segovia, J.; Angulo, C.; Ramirez, L.; *et al.* ZO-2 silencing induces renal hypertrophy through a cell cycle mechanism and the activation of YAP and the mTOR pathway. *Mol. Biol. Cell* 2016, 27, 1581–1595.

- 15 Dominguez-Calderon, A.; Avila-Flores, A.; Ponce, A.; Lopez-Bayghen, E.; Calderon-Salinas, J.V.; Luis Reyes, J.; Chavez-Munguia, B.; Segovia, J.; Angulo, C.; Ramirez, L.; *et al.* ZO-2 silencing induces renal hypertrophy through a cell cycle mechanism and the activation of YAP and the mTOR pathway. *Mol. Biol. Cell* 2016, 27, 1581–1595.
- 16 Feil, R.; Berger, F. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends Genet.* 2007, 23, 192–199.
- 17 Gallego-Gutiérrez, H., González-González, L., Ramírez-Martínez, L., López-Bayghen, E., & González-Mariscal, L. (2021). Tight junction protein ZO-2 modulates the nuclear accumulation of transcription factor TEAD. *Molecular biology of the cell*, 32(15), 1347-1358.
- 18 González-González, L., Gallego-Gutiérrez, H., Martín-Tapia, D., Avelino-Cruz, J. E., Hernández-Guzmán, C., Rangel-Guerrero, S. I., ... & 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).
- 19 Gonzalez-Mariscal, L., Chavez de Ramirez, B., & Cereijido, M. (1985). Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *The Journal of membrane biology*, 86, 113-125.
- 20 González-Mariscal, L., Miranda, J., Ortega-Olvera, J.M., Gallego-Gutiérrez, H., Raya-Sandino, A., and Vargas-Sierra, O. (2016). Zonula Occludens Proteins in Cancer. *Current Pathobiology Reports* 4, 107-116.
- 21 González-Mariscal, L., Pinto-Dueñas, D. C., Hernández-Guzmán, C., Gallego-Gutiérrez, H., González-González, L., & Cano-Cortina, M. (2022). Intracellular traffic and non-canonical roles of ZO-2 protein. In *Tight junctions* (pp. 51-83). Cham: Springer International Publishing.
- 22 González-Mariscal, L., Ponce, A., Alarcón, L., & Jaramillo, B. E. (2006). The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Experimental Cell Research*, 312(17), 3323-3335.
- 23 Greil, F., Moorman, C., & van Steensel, B. (2006). [16] DamID: mapping of in vivo protein–genome interactions using tethered DNA adenine methyltransferase. *Methods in enzymology*, 410, 342-359.

- 24 Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(8):3460-4.
- 25 Hernández-Guzmán, C., Gallego-Gutiérrez, H., Chávez-Munguía, B., Martín-Tapia, D., & González-Mariscal, L. (2021). Zonula occludens 2 and Cell-Cell Contacts Are Required for Normal Nuclear Shape in Epithelia. *Cells*, 10(10), 2568.
- 26 Huang, H. Y., Li, R., Sun, Q., Wang, J., Zhou, P., Han, H., & Zhang, W. H. (2002). LIM protein KyoT2 interacts with human tight junction protein ZO-2-i3. *Yi Chuan xue bao= Acta Genetica Sinica*, 29(11), 953-958.
- 27 Huerta, M., Muñoz, R., Tapia, R., Soto-Reyes, E., Ramírez, L., Recillas-Targa, F., ... & López-Bayghen, E. (2007). Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Molecular biology of the cell*, 18(12), 4826-4836.
- 28 Huh HD, Kim DH, Jeong HS, Park HW. Regulation of TEAD Transcription Factors in Cancer Biology. *Cells*. 2019;8(6).
- 29 Huttlin, E.L.; Ting, L.; Bruckner, R.J.; Gebreab, F.; Gygi, M.P.; Szpyt, J.; Tam, S.; Zarraga, G.; Colby, G.; Baltier, K.; *et al.* The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell* 2015, 162, 425–440.
- 30 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.
- 31 Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., & Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of cell biology*, 147(6), 1351-1363.
- 32 Iyer, M. K., Niknafs, Y. S., Malik, R., Singhal, U., Sahu, A., Hosono, Y., ... & Chinnaiyan, A. M. (2015). The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature genetics*, 47(3), 199-208.
- 33 Jaramillo, B. E., Ponce, A., Moreno, J., Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., & González-Mariscal, L. (2004). Characterization of the tight

- junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Experimental cell research*, 297(1), 247-258.
- 34 Kao, S.H.; Wang, W.L.; Chen, C.Y.; Chang, Y.L.; Wu, Y.Y.; Wang, Y.T.; Wang, S.P.; Nesvizhskii, A.I.; Chen, Y.J.; Hong, T.M.; *et al.* GSK3beta controls epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis by CHIP-mediated degradation of Slug. *Oncogene* 2014, 33, 3172–3182.
- 35 Kausalya, P. J., Phua, D. C., & Hunziker, W. (2004). Association of ARVCF with zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF. *Molecular biology of the cell*, 15(12), 5503-5515.
- 36 Kirschmann, D. A., Lininger, R. A., Gardner, L. M., Seftor, E. A., Odero, V. A., Ainsztein, A. M., ... & Hendrix, M. J. (2000). Down-regulation of HP1Hsc expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Cancer research*, 60(13), 3359-3363.
- 37 Kleene, R., Loers, G., Castillo, G., & Schachner, M. (2022). Cell adhesion molecule L1 interacts with the chromo shadow domain of heterochromatin protein 1 isoforms α , β , and γ via its intracellular domain. *The FASEB Journal*, 36(1), e22074.
- 38 Kusch, A.; Tkachuk, S.; Tkachuk, N.; Patecki, M.; Park, J.K.; Dietz, R.; Haller, H.; Dumler, I. The tight junction protein ZO-2 mediates proliferation of vascular smooth muscle cells via regulation of Stat1. *Cardiovasc. Res.* 2009, 83, 115–122.
- 39 Lechner, M. S., Schultz, D. C., Negorev, D., Maul, G. G., & Rauscher III, F. J. (2005). The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(4), 929-937.
- 40 Lechuga, S., Alarcón, L., Solano, J., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., & González-Mariscal, L. (2010). Identification of ZASP, a novel protein associated to Zona occludens-2. *Experimental cell research*, 316(19), 3124-3139.

- 41 Li J, Zhao Y, Lu Y, Ritchie W, Grau G, Vadas MA, Gamble JR. The poly-cistronic miR-23-27-24 complexes target endothelial cell junctions: differential functional and molecular effects of miR-23a and miR-23b. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016;5(8):e354. doi:10.1038/mtna.2016.62.
- 42 Li. X, S. Lu, J.L. Nagy. (2009). Direct association of connexin36 with zonula occludens-2 and zonula occludens-3, *Neurochip. Int.* 54, 393–402
- 43 Lieberman-Aiden, E.; van Berkum, N.L.; Williams, L.; Imakaev, M.; Ragoczy, T.; Telling, A.; Amit, I.; Lajoie, B.R.; Sabo, P.J.; Dorschner, M.O.; *et al.* Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 2009, 326, 289–293.
- 44 Ling, H., Fabbri, M. & Calin, G. A. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat. Rev. Drug Disco.* 12, 847–865 (2013).
- 45 Lodish, H. F. (2016). *Molecular cell biology*. Macmillan.
- 46 Maeda, R., & Tachibana, M. (2022). HP1 maintains protein stability of H3K9 methyltransferases and demethylases. *EMBO reports*, 23(4), e53581.
- 47 Malik, H.S.; Henikoff, S. Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in *Drosophila*. *Genetics* 2001, 157, 1293–1298.
- 48 Monteiro, A. C., Sumagin, R., Rankin, C. R., Leoni, G., Mina, M. J., Reiter, D. M., ... & Parkos, C. A. (2013). JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function. *Molecular biology of the cell*, 24(18), 2849-2860.
- 49 Morrison, O., & Thakur, J. (2021). Molecular complexes at euchromatin, heterochromatin and centromeric chromatin. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6922.
- 50 Muramatsu, D., Kimura, H., Kotoshiba, K., Tachibana, M., & Shinkai, Y. (2016). Pericentric H3K9me3 formation by HP1 interaction-defective histone methyltransferase Suv39h1. *Cell structure and function*, 41(2), 145-152.
- 51 Nacev, B. A. *et al.* The epigenomics of sarcoma. *Nat. Rev. Cancer* 20, 608–623 (2020).

- 52 Nishiyama, A. & Nakanishi, M. Navigating the DNA methylation landscape of cancer. *Trends Genet* 37, 1012–1027 (2021)
- 53 Nozawa, RS., Nagao, K., Masuda, HT. *et al.* Human POGZ modulates dissociation of HP1 α from mitotic chromosome arms through Aurora B activation. *Nat Cell Biol* 12, 719–727 (2010).
- 54 Nusse, R.; Clevers, H. Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 2017, 169, 985–999.
- 55 Oberley, M. J., Inman, D. R., & Farnham, P. J. (2003). E2F6 negatively regulates BRCA1 in human cancer cells without methylation of histone H3 on lysine 9. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42466-42476.
- 56 Oka T, Remue E, Meerschaert K, Vanloo B, Boucherie C, Gfeller D, *et al.* Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem J.* 2010;432(3):461-72
- 57 Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* 2008; 68: 3645–3654.
- 58 Otani, T., Nguyen, T. P., Tokuda, S., Sugihara, K., Sugawara, T., Furuse, K., ... & Furuse, M. (2019). Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity. *Journal of Cell Biology*, 218(10), 3372-3396.
- 59 Palmer, H.G.; González-Sancho, J.M.; Espada, J.; Berciano, M.T.; Puig, I.; Baulida, J.; Quintanilla, M.; Cano, A.; de Herreros, A.G.; Lafarga, M.; *et al.* Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J. Cell Biol.* 2001, 154, 369–387.
- 60 Park, J., Lee, K., Kim, K. & Yi, S. J. The role of histone modifications: from neurodevelopment to neurodiseases. *Signal Transduct. Target Ther.* 7, 217 (2022)
- 61 Park, P. J. (2009). ChIP–seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature reviews genetics*, 10(10), 669-680.

- 62 Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S. W., Solovei, I., Brugman, W., ... & van Steensel, B. (2010). Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Molecular cell*, 38(4), 603-613.
- 63 Pinto-Dueñas, D. C., Hernández-Guzmán, C., Marsch, P. M., Wadurkar, A. S., Martín-Tapia, D., Alarcón, L., ... & González-Mariscal, L. (2024). The Role of ZO-2 in Modulating JAM-A and γ -Actin Junctional Recruitment, Apical Membrane and Tight Junction Tension, and Cell Response to Substrate Stiffness and Topography. *International journal of molecular sciences*, 25(5), 2453.
- 64 Poleshko, A., Mansfield, K. M., Burlingame, C. C., Andrade, M. D., Shah, N. R., & Katz, R. A. (2013). The human protein PRR14 tethers heterochromatin to the nuclear lamina during interphase and mitotic exit. *Cell reports*, 5(2), 292-301.
- 65 Qin, H., Wang, J., Liang, Y., Taniguchi, Y., Tanigaki, K., & Han, H. (2004). RING1 inhibits transactivation of RBP-J by Notch through interaction with LIM protein KyoT2. *Nucleic acids research*, 32(4), 1492-1501.
- 66 Quiros, M., Alarcón, 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.
- 67 Rajabi, S., Dastmalchi, R., Dehghan, M. H., Eftekharian, A., Aghazadeh, E., & Ghaderian, S. M. H. (2019). TJP2 Gene Mutation c. G1012A May Responsible for Congenital Hearing Loss with Incomplete Penetrance in An Iranian Pedigree. *Journal of Genetic Resources*, 5(2), 143-148.
- 68 Rea, S.; Eisenhaber, F.; O'Carroll, D.; Strahl, B.D.; Sun, Z.W.; Schmid, M.; Opravil, S.; Mechtler, K.; Ponting, C.P.; Allis, C.D.; *et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 2000, 406, 593–599.
- 69 Sanulli, S.; Trnka, M.J.; Dharmarajan, V.; Tibble, R.W.; Pascal, B.D.; Burlingame, A.L.; Griffin, P.R.; Gross, J.D.; Narlikar, G.J. HP1 reshapes nucleosome core to promote phase separation of heterochromatin. *Nature* 2019, 575, 390–394.

- 70 Schoelz, J. M., & Riddle, N. C. (2022). Functions of HP1 proteins in transcriptional regulation. *Epigenetics & Chromatin*, 15(1), 14.
- 71 Shvedunova, M., & Akhtar, A. (2022). Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 23(5), 329-349.
- 72 Singh, D., and Lampe, P.D. (2003). Identification of connexin-43 interacting proteins, *Cell Commun. Adhes.* 10, 215–220
- 73 Stephens, A. D., Banigan, E. J., & Marko, J. F. (2019). Chromatin's physical properties shape the nucleus and its functions. *Current opinion in cell biology*, 58, 76-84.
- 74 Sullivan, B.A.; Karpen, G.H. Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004, 11, 1076–1083.
- 75 Talhouk, R. S., Mroue, R., Mokalled, M., Abi-Mosleh, L., Nehme, R., Ismail, A., ... & El-Sabban, M. E. (2008). Heterocellular interaction enhances recruitment of α and β -catenins and ZO-2 into functional gap-junction complexes and induces gap junction-dependant differentiation of mammary epithelial cells. *Experimental cell research*, 314(18), 3275-3291.
- 76 Tapia, R., Huerta, M., Islas, S., Avila-Flores, A., Lopez-Bayghen, E., Weiske, J., ... & González-Mariscal, L. (2009). Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. *Molecular biology of the cell*, 20(3), 1102-1117.
- 77 Thomsen, R., Christensen, D. B., Rosborg, S., Linnet, T. E., Blechingberg, J., & Nielsen, A. L. (2011). Analysis of HP1 α regulation in human breast cancer cells. *Molecular carcinogenesis*, 50(8), 601-613.
- 78 Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., ... & Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*, 126(4), 741-754.
- 79 Venkatesh, S.; Workman, J.L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015, 16, 178–189.

- 80 Wang, Y., Yu, Q., Cho, A. H., Rondeau, G., Welsh, J., Adamson, E., ... & McClelland, M. (2005). Survey of differentially methylated promoters in prostate cancer cell lines. *Neoplasia*, 7(8), 748-IN7.
- 81 Wetzel, F.; Mittag, S.; Cano-Cortina, M.; Wagner, T.; Kramer, O.H.; Niedenthal, R.; González-Mariscal, L.; Huber, O. SUMOylation regulates the intracellular fate of ZO-2. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 2017, 74, 373–392.
- 82 Wu, Y. L., Lin, Z. J., Li, C. C., Lin, X., Shan, S. K., Guo, B., ... & Li, Z. H. (2023). Epigenetic regulation in metabolic diseases: mechanisms and advances in clinical study. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 98.
- 83 Xu, J., Anuar, F., Mohamed Ali, S., Ng, M. Y., Phua, D. C., & Hunziker, W. (2009). Zona occludens-2 is critical for blood–testis barrier integrity and male fertility. *Molecular Biology of the Cell*, 20(20), 4268-4277.
- 84 Xu, J., Kausalya, P. J., Phua, D. C., Ali, S. M., Hossain, Z., & Hunziker, W. (2008). Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Molecular and cellular biology*, 28(5), 1669-1678.
- 85 Yamamoto, K., & Sonoda, M. (2003). Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1. *Biochemical and biophysical research communications*, 301(2), 287-292.
- 86 Yu H, Xue Y, Wang P, Liu X, Ma J, Zheng J, Li Z, Li Z, Cai H, Liu Y, *et al.* Knockdown of long non-coding RNA XIST increases blood-tumor barrier permeability and inhibits glioma angiogenesis by targeting miR-137. *Oncogenesis*. 2017;6(3):e303. doi:10.1038/oncsis.2017.7
- 87 Zhang, J., Liu, L. L., Gong, J. Y., Hao, C. Z., Qiu, Y. L., Lu, Y., ... & Wang, J. S. (2020). TJP2 hepatobiliary disorders: Novel variants and clinical diversity. *Human Mutation*, 41(2), 502-511.
- 88 Zwerger, M., Ho, C. Y., & Lammerding, J. (2011). Nuclear mechanics in disease. *Annual review of biomedical engineering*, 13, 397-428.