Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas Área Biología - Subárea Biología Celular y Molecular PEDECIBA – Universidad de la República

Remodelación del citoesqueleto en respuesta a los cambios del potencial de membrana plasmática en endotelio de córnea de bovino en cultivo: búsqueda de las vías de señalización involucradas

MSc. Frances Evans Isola Orientador: Dra. Silvia Chifflet Co-orientador: Dr. Julio Hernández

Tribunal: Dra. Verónica Abudara Dr. Gustavo Brum Dra. Mercedes Rodriguez

Laboratorio de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, Universidad de la República Montevideo, Uruguay

Agosto 2018

Agradecimientos

- A Silvia, por su dedicación, asesoramiento y apoyo, y por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio donde puede crecer y desarrollarme científicamente.

- A Julio, por su dedicación, asesoramiento y apoyo durante esta tesis de doctorado.

- A los miembros del tribunal, por haber aceptado corregir la presente tesis y por sus críticas, sugerencias y consejos.

- A Lucia Fajardo, por su cariño y amistad.

-Al resto de mis compañeros de laboratorio, Cristian y Federico, por su apoyo en las tareas diarias.

- A la Dra. Adriana Parodi, por haberme abierto las puertas de su laboratorio para hacer los geles bidimensionales.

- A Mariana Didomenico, por su ayuda con el microscopio confocal.

- Al Departamento de Histología y Embriología, por su apoyo.

- Al LOBMM, por su ayuda en diversas circunstancias durante el desarrollo de esta tesis.

- Al Dr. Alejandro Chabalgoity, por amablemente cedernos las células B16F1.

- A los frigoríficos Las Piedras y Lorsinal, que amablemente nos proporcionaron los ojos de bovino para realizar este trabajo.

- A mis padres y hermanos por apoyo y estímulo permanente.

- Este proyecto fue financiado por ANII (Proyecto FCE 2009-1-2474 y Beca de Doctorado), CSIC (Proyecto Grupos I+D, 2014 y beca de finalización de Doctorado), y Pedeciba (beca para realizar pasantía en el laboratorio de la Dra. Adriana Parodi y alícuotas de estudiante).

Abre	eviaturas	7
Intro	oducción	. 10
1	El citoesqueleto en los epitelios	. 11
El ci	toesqueleto de actina en epitelios	. 11
Mio	sina II no muscular y la cadena liviana de la miosina	. 14
El ci	toesqueleto de tubulina en epitelios	. 18
Inte	racciones entre los microtúbulos y los filamentos de actina	. 21
2	El potencial de membrana plasmática y la señalización celular en células no excitables.	. 22
3	Algunas vías celulares implicadas en la reorganización del citoesqueleto de actina cort	ical
y de	los microtúbulos	. 24
La v	ía de Rho A	. 24
La fo	ormina mDia y la RhoA quinasa	. 24
Vía	de cAMP/PKA	. 26
Con	npartimentalización del cAMP	. 26
La v	ía de ERK1/2	. 30
Inte	racciones entre las vías de RhoA, cAMP y ERK	. 33
Obje	etivos	. 35
Obje	etivo general	. 35
Obje	etivos específicos	. 35
Mat	eriales y métodos	. 36
1	Soluciones y reactivos	. 36
2	Cultivos celulares	. 37
3	Procedimientos despolarizantes e hiperpolarizantes del potencial de membra	ana
plas	mática	. 38
4	Tinciones fluorescentes	. 39
Cua	ntificación de la ppMLC en imágenes de inmunofluorescencia	. 41

Cuantificación del área de los microtúbulos periféricos41			
Microscopía			
Cua	ntificación de núcleos ERK positivos42		
5	Estudios de la desestabilización de las uniones adherentes42		
Cuantificación de la separación intercelular 42			
6	Western blot		
7	Geles bidimensionales		
Tinción fosfoproteínas			
Tinción con plata de los geles bidimensionales45			
8	Evaluación de RhoA activo		
9	Cuantificación de cAMP 47		
10	Tratamiento estadístico de los resultados 47		
Res	ultados		
Part	te A: Estudio de las vías de señalización molecular que median las respuestas del		
cito	esqueleto de actina a la despolarización del potencial de membrana en endotelio de		
	40		
1	Determinación de los cambios en la fosforilación de la cadena liviana de la miosina en		
resp	puesta a la despolarización del potencial de membrana plasmatica		
2 mer	Evaluación de los cambios del cAMP en respuesta a la despolarización del potencial de		
Гfo	te de la inhibitión de la cAC cobre la nAUC y cobre la remodeleción del site convelete de		
acti	na en respuesta a la DPMP		
3	Evaluación de la participación de la PKA en la respuesta a la despolarización del potencial		
de r	nembrana plasmática		
4	Estudio de los sustratos fosforilados de la PKA en respuesta a la despolarización del		
potencial de membrana plasmática70			
5	Determinación de la activación de RhoA en respuesta a la despolarización del potencial de		
membrana plasmática			
6	Estudio de la activación de ERK en respuesta a la despolarización del potencial de		
membrana plasmática74			

Parte B: Estudio de las vías de señalización molecular que median las respuestas del				
citoesqueleto de actina a la hiperpolarización del potencial de membrana en endotelio de				
córnea				
1. Determinación de los cambios en la fosforilación de la cadena liviana de la miosina en				
respuesta a la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática				
2. Evaluación de los cambios de cAMP en respuesta a la hiperpolarización del potencial de				
membrana plasmática				
3. Estudio de la posible participación de la PKA en las respuestas celulares a la				
hiperpolarización del potencial de membrana plasmática				
4. Determinación de la activación de RhoA en respuesta a la hiperpolarización del potencial				
de membrana plasmática				
5. Estudio de la activación de ERK en respuesta a la hiperpolarización del potencial de				
membrana plasmática				
Efecto de la inhibición de ERK sobre la disminución en la ppMLC y la remodelación del				
citoesqueleto de actina en respuesta a la hiperpolarización del potencial de membrana				
plasmática				
Parte C: Estudio de la participación de la vía del cAMP/PKA en la reorganización de los				
microtúbulos en respuesta a la despolarización del potencial de membrana plasmática y en el				
acoplamiento de la remodelación de los microfilamentos y microtúbulos91				
1. Estudio del efecto de la despolarización del potencial de membrana plasmática sobre los				
microtúbulos				
2. Efecto de la inhibición de la sAC y la PKA en la respuesta de los microtúbulos a la DPMP 94				
3. Estudio de la interacción entre las respuestas de los microtúbulos y de los				
microfilamentos a la DPMP97				
Parte D: Estudios de los efectos de la gramicidina sobre intermediarios de vías de señalización				
102				
1. Efectos de la gramicidina sobre la fosforilación y localización de ERK 102				
2. Efecto de la gramicidina sobre la fosforilación de la ppMLC 105				
3. Efecto de la gramicidina sobre la fosforilación de tirosinas108				
Discusión				

1	Participación de la vía del cAMP/PKA en la remodelación del citoesqueleto de actina y			
tubulina en respuesta a la despolarización del potencial de membrana plasmática 109				
2	Vías de señalización involucradas en la remodelación del citoesqueleto de actina en			
resp	puesta a la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática			
3	Formas fosforiladas de la MLC 118			
4	Efectos no clásicos de la gramicidina sobre intermediarios de vías de señalización 120			
Con	clusiones			
Perspectivas				
Bibliografía				

Abreviaturas

- AC- Adenililciclasa
- AJ Uniones adherentes (Adherens Junctions)
- BAEC Endotelio de aorta de bovino (Bovine Aortic Endothelial Cells)
- BCE Endotelio de cornea bovino (Bovine Corneal Endothelium)
- **DI** Densidad integrada
- DPMP Despolarización de potencial de membrana plasmática
- HPMP Hiperpolarización del potencial de membrana plasmática
- **MDCK** Epitelio de riñón de perro (*Madin-Darby Canine Kidney*)
- MF Microfilamentos
- MLC Cadena liviana de la miosina (Myosin Light Chain)
- pMLC Cadena liviana de la miosina fosforilada en la serina 19
- ppMLC Cadena liviana de la miosina fosforilada en la serina 19 y treonina 18
- MLCK Quinasa de la MLC (Myosin Light Chain Kinase)
- **MLCP** Fosfatasa de la MLC (*Myosin Light Chain Phosphatase*)
- MT Microtúbulos
- **NM II** Miosina II no muscular (Non-muscle Myosin II)
- PMP- Potencial de Membrana Plasmática (Plasma Membrane Potential)
- **ROCK** RhoA quinasa (*Rho-Associated Coiled coil-containing Kinase*)
- sAC Adenililciclasa soluble
- SC Solución control
- TJ Uniones ocluyentes (Tight Junctions)
- TmAC Adenililciclasa transmembranal

Resumen

En nuestro laboratorio se encontró que el potencial de membrana plasmática (PMP) es capaz de provocar la reorganización del citoesqueleto de actina y tubulina en distintos epitelios. Asimismo, en las células tubulares renales otros autores reportaron que la despolarización del PMP (DPMP) determina un aumento en la fosforilación de la cadena liviana de la miosina (MLC) difosforilada por la activación de la vía ERK/Rho A. En línea con los hallazgos de nuestro laboratorio, este trabajo de tesis se orientó en el estudio de la(s) vía(s) molecular(es) que media(n) la remodelación del citoesqueleto de actina y tubulina en respuesta a la despolarización y a la hiperpolarización del PMP en células de endotelio de córnea (BCE) en cultivo. El abordaje experimental incluyó distintos procedimientos para modificar el PMP, estudios de inmunofluorescencia, ELISA, ensayos de "pull down", geles bidimensionales y Western blot.

En este trabajo encontramos que en las células BCE, la DPMP provoca una disminución de la MLC monofosforilada (pMLC) y no afecta a la MLC difosforilada (ppMLC). En la búsqueda de las vías implicadas en la reducción de la pMLC y la remodelación del citoesquieto de actina cortical, nuestros resultados sugieren que la vía cAMP/PKA esta implicada. Así, la DPMP induce un aumento de cAMP dependiente de la adinililciclasa soluble (sAC). Empleando un anticuerpo contra los sustratos fosforilados de la PKA, se halló por Western blot que el perfil de bandas obtenido con tratamientos despolarizantes es distinto al del control, observándose el aumento de dos bandas de alrededor de 70 y 50 KDa con la DPMP. La inhibición tanto de la sAC como de la PKA interfiere con la reorganización de la actina cortical y disminuye la desfosforilación de la pMLC. Con respecto al citoesqueleto de tubulina, la inhibición de la sAC y la PKA atenúa la remodelación de los microtúbulos corticales en respuesta a la DPMP. Al investigar la existencia de interacciones entre los microfilamentos y los microtúbulos empleando distintos agentes que conducen a la polimerización y despolimerización de estos filamentos, se observó que la remodelación de los microfilamentos es necesaria para que ocurra la de los filamentos de tubulina periféricos en respuesta a la DPMP. A su vez, en presencia de un agente desestabilizante de los microtúbulos el citoesqueleto de actina no se reorganiza. Por otro lado, evaluamos la activación de intermediarios clave de las vías de RhoA y de las MAPK. A través de un ensayo de "pull down" pudimos evidenciar que la DPMP activa a RhoA. La inhibición de la RhoA quinasa (ROCK), uno de los principales efectores de RhoA, no atenuó los efectos de la DPMP sobre la remodelación de los microfilamentos periféricos. A diferencia de lo que ocurre en el epitelio renal, no observamos un incremento de pERK con la DPMP.

8

En la investigación de las vías de señalización implicadas en la hiperpolarización del PMP (HPMP), comenzamos evaluando aquellas que participan en la DPMP en las células de BCE, ya que podrían estar implicadas las mismas moléculas. Mientras que la ppMLC disminuye con la HPMP, la pMLC no varía. A diferencia de la DPMP, durante la HPMP en las células BCE no encontramos activación de cAMP/PKA, ni tampoco un incremento de RhoA activo y si hallamos un incremento de pERK.La inhibición de esta MAPK reduce la compactación de la actina, el efecto protector de la HPMP sobre las uniones al extraer el calcio extracelular y también atenúa significativamente la disminución de la ppMLC determinada por la HPMP.

En suma, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que en respuesta a los cambios del PMP se activan vías de señalización celular que se encuentran involucradas en la remodelación del citoesqueleto de actina y tubulina en células de BCE. En efecto, encontramos que las variaciones del PMP determinan la activación de intermediarios de vías de señalización, cAMP/PKA para la DPMP y pERK para la HPMP, que parecen estar involucrados en la reorganización de los microfilamentos y microtúbulos.

Introducción

Los epitelios de transporte cubren las superficies luminales de los órganos internos formando una barrera de permeabilidad selectiva entre la luz del órgano y el medio intersticial y regulan, a su vez, el pasaje vectorial de iones, agua y moléculas a través de estos compartimentos biológicos (Yeaman *et al.*, 1999). La habilidad de conducir este transporte es dependiente de la organización estructural y funcional de las células, lo cual se ve reflejado en la presencia de: 1) una polaridad de la membrana plasmática con un dominio apical y otro basolateral que difieren estructural, bioquímica y fisiológicamente, y 2) complejos de unión que integran las células en una monocapa (Simons and Fuller, 1985; Yano *et al.*, 2017). El establecimiento y mantenimiento de esta organización celular especializada es un proceso complejo que involucra la formación de contactos célula-célula y célula-sustrato y la distribución polarizada de componentes de membrana y citosólicos. La interferencia de estos procesos puede comprometer la barrera epitelial desencadenando distintas patologías que pueden comprometer la integridad del individuo (Edelhauser, 2006; Izdebska *et al.*, 2018; Schneeberger *et al.*, 2018).

En los epitelios, el citoesqueleto presenta una organización característica que es de especial importancia para el establecimiento y el mantenimiento de la estructura y función de las células de este tejido (Bogatcheva and Verin, 2008; Rodgers and Fanning, 2011; Rodriguez-Boulan and Macara, 2014; Yano et al., 2017). La regulación del citoesqueleto de los epitelios es muy compleja e involucra diversos efectores (Etienne-Manneville, 2010; Lee and Dominguez, 2010; Senju et al., 2017). En este sentido, en nuestro laboratorio se ha encontrado que el potencial de membrana plasmática (PMP) es capaz de modular la organización del citoesqueleto (Chifflet et al., 2003; Nin et al., 2009). En línea con estos hallazgos, este trabajo de doctorado intenta contribuir a dilucidar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la reorganización del citoesqueleto en los epitelios de transporte en respuesta a los cambios de PMP. Se ha reportado que diversos intermediarios de vías de señalización son sensibles a las modificaciones del PMP (Ishii et al., 2001; Roos et al., 2006), muchos de los cuales son reguladores conocidos del citoesqueleto (Szaszi et al., 2005; Waheed et al., 2010). En la activación de los intermediarios que llevan a la modificación del citoesqueleto se han visto implicadas proteínas de transmembrana que son sensibles a los cambios del PMP (Cohen-Armon and Sokolovsky, 1993; Martinez-Pinna et al., 2005; Ben-Chaim et al., 2006; Murata and Okamura, 2007a; Okamura and Dixon, 2011), algunas de las cuales presentan un dominio sensible al voltaje (Murata and Okamura, 2007a; Okamura and Dixon, 2011). A su vez, varias proteínas periféricas implicadas en la regulación del citoesqueleto se encuentran unidas a la membrana plasmática por interacciones electrostáticas y al cambiar la carga superficial de la membrana la interacción puede alterarse (Sigal *et al.*, 1994; Gomez and Daniotti, 2007; Magalhaes and Glogauer, 2010; Dietrich *et al.*, 2011). En función de estos antecedentes, nos enfocamos en investigar si el PMP activa intermediarios de vías de señalización y si éstos a su vez están involucrados en la remodelación del citoesqueleto.

1 El citoesqueleto en los epitelios

El citoesqueleto de actina en epitelios

En los epitelios el citoesqueleto de actina tiene una distribución particular que contribuye a establecer y mantener su organización estructural y funcional (Bogatcheva and Verin, 2008; Rodgers and Fanning, 2011; Rodriguez-Boulan and Macara, 2014; Yano *et al.*, 2017).

El citoesqueleto de actina se compone de filamentos (actina-F) que son polímeros helicoidales, enroscado de dos en dos, de monómeros de actina (actina-G) (Bruce Alberts *et al.*, 2014). Los microfilamentos (MF) en general forman parte de grandes ensamblajes proteicos ("superstructured protein assemblies"). Tal es el caso de los haces de actina, las redes de actina, los filamentos de actina corticales y el citoesqueleto de la membrana plasmática (Schnittler *et al.*, 2014). Una de las características de los filamentos de actina es su capacidad de reorganización en respuesta a cambios en la dinámica celular -cambio de forma, migración, proliferación- o frente a distintos estímulos para realizar distintas funciones celulares por ejemplo, durante la cicatrización, inflamación, etc. (Schnittler *et al.*, 2014; Letort *et al.*, 2015). La remodelación de los MF se encuentra a menudo mediada por un rápido ensamblaje y desensamblaje de filamentos de actina, un proceso que depende de múltiples proteínas de unión y reguladoras de la actina (Pollard *et al.*, 2000; Suarez and Kovar, 2016).

Una manera de describir la organización de los filamentos de actina en los endotelios es la propuesta por Prasain y Stevens (Prasain and Stevens, 2009). De acuerdo con estos autores, la actina-F se organiza en tres estructuras principales: el citoesqueleto de la membrana plasmática, el anillo de actina cortical, y las fibras de estrés. El anillo de actina cortical está compuesto por haces de actina-F largos, mientras que el citoesqueleto de membrana y las

fibras de estrés por filamentos de actina cortos. Cada una de estas estructuras cumple roles particulares en el control de los procesos celulares (ibid.). En otros epitelios la organización del citoesqueleto es similar, pero además en la superficie apical presentan extensiones digitiformes, las microvellosidades (Apodaca, 2018). Éstas se componen de un haz rígido de 20 a 30 filamentos paralelos de actina anclados a una región especializada de la corteza conocida como red terminal (Bruce Alberts *et al.*, 2014).

El citoesqueleto de membrana constituye una red proteica de especial importancia para la arquitectura de la membrana plasmática. Esta red se encuentra formada por espectrina y actina, junto a una serie de proteínas adaptadoras que contribuyen a su organización y regulación (Bennett and Gilligan, 1993; Prasain and Stevens, 2009; Machnicka *et al.*, 2012; Schnittler *et al.*, 2014). Las proteínas que la componen se asocian a los lípidos y a las proteínas integrales de membrana. A su vez, este citoesqueleto conecta la membrana plasmática con los filamentos de actina corticales (Bennett and Gilligan, 1993; Kapus and Janmey, 2013).

En los epitelios, el anillo cortical se encuentra formado por haces paralelos de actina-F estrechamente empaquetados que se localizan debajo de la membrana plasmática (Ivanov, 2008; Schnittler et al., 2014). En el ápex de la membrana plasmática lateral, este anillo es parte de las uniones adherentes ("Adherens Junctions", AJ) y de las uniones ocluyentes ("Tight Junctions", TJ) en el complejo de unión apical ("Apical Junctional Complex", AJC). Estas uniones son de especial importancia en el mantenimiento de la barrera epitelial (González-Mariscal et al., 2008; Hartsock and Nelson, 2008; Giepmans and van Ijzendoorn, 2009; Coradini et al., 2011). Un deterioro de la adhesión intercelular mediada por las AJ y TJ puede conducir a la pérdida del fenotipo celular polarizado y la cohesión intercelular característicos de los epitelios y, por consiguiente, de su función de barrera selectiva. Esto puede resultar en disfunciones y estados patológicos (Dejana et al., 2009; Coradini et al., 2011; Rodgers and Fanning, 2011). Los MF constituyen el componente principal del citoesqueleto de las AJ y TJ. En los epitelios de transporte, los haces paralelos de actina-F se disponen en forma circunferencial tapizando la cara interna de estas uniones (Ivanov, 2008; Mège and Ishiyama, 2017). Se ha postulado que la dinámica de los filamentos de actina es un determinante importante de la plasticidad de las uniones. Las reorganizaciones de los MF pueden afectar a las AJ y TJ directamente a través de las proteínas de unión de la actina o indirectamente al organizar el tráfico vesicular de las mismas (Ivanov, 2008; Rodgers and Fanning, 2011). La pérdida de la actina-F de las AJ y TJ conduce a una disminución de la estabilidad de las uniones con la correspondiente

12

disminución de la cohesión intercelular (Ivanov *et al.*, 2004; Cavey and Lecuit, 2009; Srinivas, 2010; Rodgers and Fanning, 2011). Asimismo, un incremento de la actina-F en las uniones aumenta la fuerza de las mismas (Angres *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 2004; Gout *et al.*, 2004; Mege *et al.*, 2006).

Mientras que el citoesqueleto de membrana y el anillo cortical se localizan cercanos a la membrana plasmática, las fibras de estrés se extienden a lo largo del citoplasma. Desde el punto de vista estructural las fibras de estrés se componen de actina-F y filamentos de miosina no muscular II (Drenckhahn and Wagner, 1986; Katoh *et al.*, 2008; Tojkander *et al.*, 2012). La actividad contráctil de las fibras de estrés es capaz de generar una tensión centrípeta y retraer los bordes celulares provocando la separación de las células. A esta retracción se oponen las fuerzas de anclaje ejercidas por las uniones intercelulares (Dudek and Garcia, 2001; Prasain and Stevens, 2009).

La mayor parte de las fibras de estrés forman parte de uniones especializadas, llamadas contactos focales, que anclan mecánicamente la actina-F a la matriz extracelular (Pellegrin and Mellor, 2007; Tojkander *et al.*, 2012; Livne and Geiger, 2016). En estos complejos multiproteicos las fibras de estrés se asocian, a través de una serie de proteínas intermediarias, con las proteínas transmembranales llamadas integrinas, las que contactan con la lámina basal (ibid). Asimismo, en los últimos años se ha reportado que éstas también son parte de un tipo de unión adherente llamada unión adherente célula-célula discontinua o focales o puntuales (Millán *et al.*, 2010; Taguchi *et al.*, 2011; Huveneers *et al.*, 2012; Ando *et al.*, 2013). Las AJ discontinuas se diferencian de las AJ clásicas, asociadas a los haces de actina corticales circunferenciales, en varios aspectos. Las primeras son estables, se disponen de manera continua y paralela al límite celular (Hartsock and Nelson, 2008; Wu *et al.*, 2015). Las segundas son inestables y se extienden de manera discontinua y ortogonal al borde celular. Aparecen conectadas a las fibras de estrés radiales en respuesta a estímulos que comprometen la integridad de la barrera epitelial (Millán *et al.*, 2010; Taguchi *et al.*, 2010; Taguchi *et al.*, 2010; Taguchi *et al.*, 2010; Taguchi *et al.*, 2010; Jaguchi *et al.*, 2010; Las

13

Miosina II no muscular y la cadena liviana de la miosina

La miosina II no muscular ("non-muscle myosin II", NM II), es una proteína que se asocia a la actina y forma un complejo con propiedades contráctiles (Conti *et al.*, 2008) (Figura 1). Como mencionamos en la sección anterior, la NM II es uno de los componentes principales de las fibras de estrés. Además, la NM II se encuentra ligada a los haces de actina-F que forman el anillo cortical que son parte de las TJ y las AJ (Ebrahim *et al.*, 2013). Por lo cual, las células de la monocapa epitelial unidas entre sí por estas uniones especializadas se encuentran tensionadas por los MF de actomiosina que, en su conjunto, conforman una red que se extiende por toda la monocapa (Liu and Cheney, 2012) (Figura 1B).



Figura 1- Estructura de la miosina no muscular II y su disposición en el anillo de actina cortical. La NM II se encuentra formada por dos cadenas pesadas, dos cadenas reguladoras livianas (RLCs) y dos cadenas livianas esenciales (ELCs). Cuando la RLC se fosforila, la NM II cambia de conformación, se desenrolla y se ensambla a través de los dominios "*coil-coiled*" formando filamentos bipolares. Los filamentos de NM II se unen a través del dominio globular de la cabeza a la actina. La actividad ATPasa del dominio de la cabeza provoca un cambio conformacional en el mismo y mueve los filamentos de actina de manera antiparalela. Adaptado de Vicente-Manzanares *et al.*, 2009 **(A)**. Disposición de los filamentos de NM II en relación al anillo de actina cortical en el AJC. Adaptado de Ebrahim *et al.*, 2013 **(B)**.

La actividad de la NM II se encuentra regulada por la fosforilación de su cadena liviana regulatoria ("*Myosin Light Chain*", MLC). La MLC se fosforila en la serina 19 e incrementa el ensamblaje de los filamentos de la NM II y su actividad Mg⁺²-ATPasa en presencia de actina. La fosforilación adicional de la treonina 18, aumenta la actividad Mg⁺²-ATPasa de la NMII (Adelstein and Anne Conti, 1975; Vicente-Manzanares *et al.*, 2009) (Figura 1A). La MLC es fosforilada por múltiples quinasas como la quinasa activada por RhoA ("*Rho-Associated Coiled coil-containing Kinase*", ROCK), la quinasa de la MLC ("*Myosin Light Chain Kinasae*", MLCK), la citron quinasa, entre otras, y es desfosforilada por la fosfatasa de la MLC ("*Myosin Light Chain Kinasae*", MLCK), la citron se cinasa, entre otras, y es desfosforilada por la fosfatasa de la MLC ("*Myosin Light Chain Kinasae*", MLCK), la citron se cinasa et *al.*, 2015) (Figura 2). En futuras secciones se verá como distintas vías de señalización regulan la actividad de estas quinasas y fosfatasas.



Figura 2- Regulación de la fosforilación de la MLC. La MLC es fosforilada por la quinasa de la MLC (MLCK) y la Rho quinasa (ROCK), entre otras, y es desfosforilada por la fosfatasa de la MLC (formada por las subunidades M20, MYPT1 y PP1). En el esquema se muestra como estas quinasas y la fosfatasa pueden ser reguladas por la despolimerización de los microtúbulos (1) y por la proteína quinasa A (PKA) (2). La despolimerización de los microtúbulos libera a GEF-H1 (1). GEF-H1 libera el GDP de RhoA y la GTPasa se une GTP. RhoA-GTP activa a ROCK quien promueve la fosforilación de la MLC. Además de fosforilar a la MLC (1A), RhoA fosforila e inactiva a la MYPT1 (1B) y fosforila y activa al inhibidor endógeno de la fosfatasa CPI-17 (1C). La PKA por otro lado, conduce a la desfosforilación de la MLC, por los siguientes mecanismos. La PKA fosforila e inhibe a la MLCK (2A), promueve la desfosforilación de CPI-17 y lo activa (2B), fosforila a RhoA (2C) y a el inhibidor de nucleótidos de guanidina (GDI) (2D), aumentado la afinidad de RhoA por GDI. Adaptado de Sayner, 2011.

En los últimos años han surgido una serie de trabajos en los cuales se muestra que la difosforilación de la MLC podría tener una función distinta a la de reforzar la activación de la NM II provocada por la monofosforilación. En células de endotelio de aorta confluentes, la MLC monofosforilada (pMLC)¹ se localiza en la región perinuclear, mientras que la difosforilada (ppMLC)² es casi indetectable (Hirano and Hirano, 2016). Ante la estimulación de las células con trombina, un conocido modulador de la barrera epitelial, se observa un incremento de la ppMLC en la región periférica de la célula que colocaliza con el anillo de actina cortical y la VE-Cadherina (ibid.). La señal de la pMLC incrementa su intensidad, sin cambiar su localización perinuclear (ibid.). En la migración celular, la pMLC y la ppMLC presentan diferencias en la localización subcelular y en el tipo de adhesiones célula-sustrato que estas dos formas promueven (Vicente-Manzanares and Horwitz, 2010). En las plaquetas, la pMLC participa en los cambios de la forma de éstas y la ppMLC juega un rol en la liberación de sus gránulos densos (Getz *et al.*, 2010).

Se encuentra extensamente documentado que un incremento en la actividad de la NM II se asocia a la reorganización del anillo de actina cortical con la consecuente desestabilización de las uniones celulares en distintos epitelios (Dudek and Garcia, 2001; Shen *et al.*, 2006; Ivanov, 2008; Ivanov *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010; Shivanna *et al.*, 2010). La activación de la NM II es producto de un aumento de la fosforilación de la MLC (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009).

El citoesqueleto de tubulina en epitelios

Los microtúbulos están compuestos por 13 protofilamentos lineales, con una disposición paralela formando un cilindro. Cada uno de los protofilamentos, a su vez, está formado por heterodímeros de α - y β - tubulina.

Los microtúbulos (MT) adoptan arreglos espaciales específicos en las células diferenciadas para desempeñar diferentes funciones, y emanan de sitios celulares conocidos como centros organizadores de microtúbulos (*"Microtubule Organizing Centers"*, MTOC). Los MTOC nuclean, estabilizan y/o anclan a los MT (Sanchez and Feldman, 2016). En la mayoría de las células animales, el centrosoma es el MTOC más importante y los microtúbulos se disponen de

¹ A lo largo de este trabajo cuando se hace referencia a la pMLC esta corresponde a la MLC fosforilada en la serina 19.

 $^{^{2}}$ A lo largo de este trabajo cuando se hace referencia a la ppMLC esta corresponde a la MLC difosforilada en la serina 19 y treonina 18.

manera radial con su extremo menos anclado al centrosoma y el extremo más extendiéndose hacia la periferia (ibid.). La mayoría de los epitelios polarizados presentan microtúbulos no centrosomales que mayoritariamente se ubican en la periferia celular dónde se extienden longitudinalmente a lo largo del eje apico-basal con el extremo menos anclado en sitios no centrosomales y el extremo positivo dirigido hacia el polo basal (Bacallao *et al.*, 1989; Meads and Schroer, 1995a; Müsch, 2004; Bellett *et al.*, 2009; Toya and Takeichi, 2016). En algunos epitelios se han descrito además redes apicales (Bacallao *et al.*, 1989; Yano *et al.*, 2017) y basales (Reilein *et al.*, 2005) de microtúbulos no centrosomales cortos con polaridad mixta. Estas redes son independientes de los microtúbulos alineados a lo largo del eje apico-basal (Bacallao *et al.*, 1989; Reilein *et al.*, 2005) (Figura 3).



Figura 3 – Organización de los microtúbulos en células epiteliales polarizadas. Reconstrucción de imágenes tomadas cada 0.2 μm en el eje Z de células MDCK expresando tubulina-GFP **(A).** Imagen A rotada para poder visualizar la red basal de microtúbulos **(B).** Microscopía de deconvolución de células MDCK en donde se evidencia la tubulina en secciones apicales, medias y basales. En las imágenes se observa la red de los microtúbulos apicales y basales y los haces de microtúbulos que se disponen en la periferia celular paralelos a la membrana plasmática lateral **(C).** Barra 10 μm. Figura tomada de Reilein *et al.*, 2005.

No se conoce con exactitud la composición de los MTOC no centrosomales, sin embargo, Sanchez y Feldman (Sanchez and Feldman, 2016) plantean que estos se encuentran formados por proteínas que interactúan con los extremos negativos de los microtúbulos y por proteínas adaptadoras que conectan las primeras a sitios subcelulares específicos. Dentro de las proteínas que se unen y regulan la dinámica de los extremos negativos de los microtúbulos no centrosomales se encuentran la familia de proteínas Protonina o CAMSAP ("Calmodulinregulated Spectrin-Associated Protein") (Meng et al., 2008; Akhmanova and Hoogenraad, 2015), la nineína (Mogensen et al., 2000) y la y-tubulina (Meads and Schroer, 1995b). En células epiteliales colorrectales (Caco2), CAMSAP3/Nezha y CAMSAP2 cooperan para nuclear MT no centrosómicos y su silenciamiento reduce esta población de microtúbulos e induce el crecimiento de microtúbulos centrosomales (Tanaka et al., 2012). En células epiteliales cocleares, la nineína forma un anillo apical periférico que estabiliza y ancla microtúbulos no centrosomales (Mogensen et al., 2000; Moss et al., 2007). La microinyección de anticuerpos anti-nineína provoca la despolimerización de estos microtúbulos no centrosomales (Moss et al., 2007). De esta forma, estos trabajos apoyarían el concepto de que estas proteínas de unión a los extremos menos de los microtúbulos son un componente de gran importancia de los MTOC no centrosomales. Asimismo, los microtúbulos se anclan a varios sitios subcelulares, tales como los desmosomas (Lechler and Fuchs, 2007), las uniones adherentes (Moss et al., 2007; Meng et al., 2008; Bellett et al., 2009), las uniones ocluyentes (Yano et al., 2013) y la corteza celular (Mogensen et al., 2000).

Los microtúbulos, al igual que los filamentos de actina, son de especial importancia para el mantenimiento de los epitelios. Existen numerosos trabajos que demuestran que la disrupción de los microtúbulos a través de diferentes agentes compromete de manera importante la barrera epitelial (Jalimarada *et al.*, 2009; Alieva *et al.*, 2013). Así, por ejemplo, cuando las monocapas de endotelio pulmonar se tratan con nocodazol, un agente que induce la despolimerización de los microtúbulos, se observa una dramática remodelación de las AJ y la consecuente pérdida de la integridad de la monocapa endotelial (Birukova *et al.*, 2004c). A su vez, la estabilización de los microtúbulos fortalece la barrera epitelial y contrarresta los efectos nocivos de agentes desestabilizantes de la misma (Ivanov *et al.*, 2006; Jalimarada *et al.*, 2009; Shivanna and Srinivas, 2009; Sumigray *et al.*, 2012). A modo de ejemplo, en células de endotelio de córnea el efecto nocivo del TNF- α sobre la integridad de la barrera epitelial es bloqueado con drogas (como paclitaxel y epothilone B) que estabilizan los microtúbulos (Shivanna and Srinivas, 2009). El mecanismo a través del cual los microtúbulos ejercen su

efecto sobre la barrera epitelial no se conoce con exactitud. En queratinocitos se ha visto que la estabilización de los microtúbulos con taxol conduce a un aumento de la miosina no muscular cortical, que a su vez estabiliza a las TJ y a las AJ (Sumigray *et al.*, 2012). El taxol a su vez provoca un incremento en la asociación entre la E-cadherina y β -catenina, dos proteínas que forman parte de las AJ (ibid.).

Es interesante señalar que cuando se desestabiliza la barrera epitelial en monocapas de endotelio pulmonar con distintos agentes, los microtúbulos corticales se despolimerizan de manera temprana y el citoesqueleto de actina se reorganiza de manera más tardía (Alieva *et al.*, 2013). Esto sugiere que, en este tipo celular, los microtúbulos son aparentemente el primer blanco del citoesqueleto que lleva al compromiso de la barrera de endotelial pulmonar. Su despolimerización podría ser una condición necesaria y suficiente para iniciar su disfunción (ibid.).

Interacciones entre los microtúbulos y los filamentos de actina

Los microtúbulos y la actina-F son capaces de coordinar su funcionamiento para mediar numerosos procesos celulares. Para ello exhiben dos tipos de interacciones: estructurales y regulatorias (Rodriguez *et al.*, 2003). En las interacciones estructurales, los microtúbulos y la actina-F están ligados físicamente (ibid.). La proteína IQGAP1 establece una conexión estructural entre ambos filamentos (Watanabe *et al.*, 2004). Su extremo amino terminal se une directamente a actina-F (Bashour *et al.*, 1997) y se asocia a los microtúbulos a través de la proteína de unión a los microtúbulos, CLIP-170 (Fukata *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2004).

El ejemplo más conocido de interacciones regulatorias entre los MT y los MF lo ejerce la familia de las Rho GTPasas. La inducción de la polimerización de los microtúbulos hacia el borde líder en fibroblastos en migración induce la activación de la pequeña Rho GTPasa, Rac (Waterman-Storer *et al.*, 1999). Rac favorece la polimerización de la actina en los lamelipodios (ibid), ya que esta GTPasa activa a WASP/SCAR, la que a su vez activa el complejo nucleador de la actina, Arp2/3 (Smith and Li, 2004). Los MT también pueden provocar la remodelación de los filamentos de actina a través de RhoA (Krendel *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2008). Las Rho GTPasas son activadas por factores de intercambio de nucleótidos (*"Guanine-nucleotide Exchange Factors"*, GEFs) al estimular la liberación de GDP de las GTPasas permitiendo la unión de GTP. La proteína GEF-H1 es una GEF que se une a los MT (Ren *et al.*, 1998). Cuando la GEF-

H1 se encuentra unida a los MT, ésta no puede activar a RhoA. Al despolimerizar los MT, la GEF-H1 queda libre para activar a RhoA (Krendel *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2008) (Figura 2). En consecuencia, l el desensamblaje de los MT resulta en la activación de RhoA, lo que conduce a la contracción de la NM II y a la formación de las fibras de estrés (Liu *et al.*, 1998; Verin *et al.*, 2001). Por lo tanto, a través de sistema que involucra a RhoA y GEF-H1, los MT coordinan su dinámica con los MF.

2 El potencial de membrana plasmática y la señalización celular en células no excitables

Se ha constatado que, en células no excitables, el potencial de membrana plasmática (PMP) se modifica en distintos procesos fisiológicos o patológicos (Chifflet and Hernandez, 2012), tales como la cicatrización (Rao *et al.*, 2002; Chifflet *et al.*, 2005; Justet *et al.*, 2013; Girault and Brochiero, 2014), la diferenciación celular (Konig *et al.*, 2004; Konig *et al.*, 2006; Sundelacruz *et al.*, 2008), la proliferación (Arcangeli *et al.*, 1995; Song *et al.*, 2002; Pardo, 2004; Lang *et al.*, 2005; Blackiston *et al.*, 2009; Aprea and Calegari, 2012), la apoptosis (Wang *et al.*, 1999; Miki *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2005) y el cáncer (Wang *et al.*, 1998; Brackenbury, 2012; Yang and Brackenbury, 2013).

A su vez, se ha propuesto que cambios del PMP podrían actuar como un intermediario en diversas vías de señalización celular (Olivotto et al., 1996; Levin, 2009; Chifflet and Hernandez, 2012; Levin, 2014; Levin and Martyniuk, 2017). En este sentido, tal como fue originalmente descrito en nuestro laboratorio, se encontró que la despolarización inespecífica del PMP de células de endotelio de córnea de bovino ("Bovine Corneal Endothelium", BCE) en cultivo constituye, por sí misma, una señal para promover cambios en la organización del citoesqueleto de actina y de tubulina, así como de otros componentes celulares. En particular, dicha despolarización provoca la desorganización de la actina-F cortical asociada a las AJ y TJ, lo que finalmente conduce a la pérdida de los contactos célula-célula (Chifflet *et al.*, 2003). Los resultados posteriores de nuestro laboratorio pudieron establecer que dicha respuesta ocurre en otros epitelios bien diferenciados en confluencia en los que también se constituyen AJ y TJ (por ejemplo, epitelio de córnea y endotelio de aorta de bovino), aunque las mismas se afectarían más tardíamente que la respuesta del citoesqueleto de actina en BCE (Chifflet et al., 2004). Estos resultados fueron complementados por otros autores que hallaron que la despolarización del PMP determina un aumento en la fosforilación de la MLC en las células tubulares renales (Szaszi et al., 2005) y provoca la activación de RhoA en estas células (Waheed *et al.*, 2010) y en músculo liso (Liu *et al.*, 2005). Por otro lado, en nuestro laboratorio se demostró que la hiperpolarización inespecífica del PMP de monocapas confluentes de células BCE en cultivo provoca una compactación de la actina a nivel de las uniones celulares y un incremento de la estabilidad de dichas uniones (Nin *et al.*, 2009).

La membrana plasmática tiene un espesor de 80 Å y un potencial de membrana de aproximadamente -60 mV por lo cual se generan campos eléctricos de alrededor de 100 kV/cm (Cantiello et al., 1991). Los campos eléctricos generados por el PMP pueden extenderse un nanómetro desde la membrana plasmática hacia el citosol (Olivotto *et al.*, 1996). Se ha reportado que los filamentos de actina son poliméros cargados capaces de propagar corrientes eléctricas y reorganizarse por efecto de campos eléctricos (Luther *et al.*, 1983; Laub and Korenstein, 1984; Yang *et al.*, 1984; Onuma and Hui, 1988). Por consiguiente, existe la posibilidad de que la actina-F cortical detecte cambios en el PMP y se remodele en respuesta a éstos (Cantiello *et al.*, 1991). A pesar de que existe un consenso en que los MT son polímeros cargados, la información en relación a la capacidad conductora de estos filamentos es confusa. Mientras que los resultados de Priel y colaboradores (Priel *et al.*, 2006) parecen indicar que los microtúbulos aislados pueden comportarse como amplificadores eléctricos, otros estudios (Umnov *et al.*, 2007) sugieren que los microtúbulos son malos conductores.

Los filamentos de actina además se encuentran estrechamente asociados con una variedad de canales iónicos (Janmey, 1998; Mazzochi *et al.*, 2006; Noda and Sasaki, 2008; Sasaki *et al.*, 2014) que pueden verse en este contexto como generadores de corriente eléctrica, por lo que Goldman plantea que la interfase canal iónico-actina podría formar parte de un mecanismo de señalización electrodinámico (Goldmann, 2008). Las señales eléctricas generadas en la membrana plasmática, por ejemplo por la actividad de canales iónicos, puede ser traducida a la actina-F (Janmey, 1998; Tuszyński *et al.*, 2004) o a las redes de MT (Priel *et al.*, 2006), actuando como conductores. Además, se ha encontrado que los filamentos de actina (Goswami *et al.*, 2010) pueden controlar la actividad de los canales iónicos (Prat *et al.*, 1995; Noda and Sasaki, 2008; Goswami *et al.*, 2010; Ilatovskaya *et al.*, 2011). Por esa razón, la interfase funcional entre las moléculas de transporte iónico y el citoesqueleto subyacente podría ser indicativa de un mecanismo dinámico donde las señales generadas en la membrana plasmática podrían ser conducidas directamente a los compartimentos intracelulares por el citoesqueleto (Goldmann, 2008).

Las variaciones del PMP podrían también provocar una reorganización de los filamentos indirectamente a través de proteínas que se unen a ellos o a través de la activación de vías de señalización intracelular. En este sentido se ha demostrado que ciertos intermediarios, como RhoA (Waheed *et al.*, 2010) y el calcio (Nilius and Droogmans, 2001), o enzimas, como la fosfatidil inositol fosfatasa Ci-VSP (Murata and Okamura, 2007b), y las tirosinas fosfatasas (Hobiger and Friedrich, 2015), involucrados en la señalización intracelular, responden a los cambios del PMP.

3 Algunas vías celulares implicadas en la reorganización del citoesqueleto de actina cortical y de los microtúbulos

Las vías de señalización que modulan el citoesqueleto de actina y tubulina son muy diversas y complejas. En las siguientes secciones se señalarán las vías moduladoras de los MF y los MT que se estudiaron en este trabajo.

La vía de Rho A

Como se mencionó en secciones anteriores, la proteína RhoA es una pequeña GTPasa que pertenece a la superfamilia de las GTPasas Ras monoméricas. La RhoA actúa como un interruptor molecular para varias señales extracelulares y está implicada en una variedad de funciones celulares. Al igual que otras Rho GTPasas, RhoA presenta una actividad GTPasa y cicla entre un estado inactivo unida a GDP y un estado activo unida a GTP. El pasaje de un estado a otro se encuentra regulado por tres tipos de proteínas: las factores de intercambio de nucleótidos (GEFs), las proteínas activadoras de GTPasas y los inhibidores de disociación de nucleótidos de guanidina (Heasman and Ridley, 2008).

La proteína RhoA presenta dos efectores principales que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina y tubulina, la formina mDia (Palazzo *et al.*, 2001; Bartolini *et al.*, 2012) y la RhoA quinasa (ROCK) (Maekawa *et al.*, 1999; Kalaji *et al.*, 2012; Schofield *et al.*, 2012; Prunier *et al.*, 2017).

La formina mDia y la RhoA quinasa

La formina mDia1 promueve la polimerización de la actina y la estabilización de los microtúbulos (Palazzo *et al.*, 2001; Goode and Eck, 2007; Bartolini *et al.*, 2012). En distintas

líneas celulares epiteliales, mDia regula la polimerización de la actina-F cortical que forma parte de las AJ y conduce a la estabilización de las mismas (Sahai and Marshall, 2002). La formina mDia1 es capaz de formar un complejo con las proteínas de unión a los extremos positivos de MT, APC y EB1, estabilizando estos extremos en fibroblastos en proceso de migración (Wen *et al.*, 2004). La quinasa GSK3b se encuentra involucrada en la desestabilización de los microtúbulos. En fibroblastos, se ha reportado que mDia1 conduce a la fosforilación e inhibición de GSK3B, afectando indirectamente la estabilidad de los MT (Eng *et al.*, 2006).

El otro efector de Rho es ROCK, su activación provoca la reorganización de la actina cortical asociada a la NM II en fibras de estrés que se distribuyen a lo largo del cuerpo celular. Estas fibras de estrés incrementan la tensión centrípeta provocando la reorganización del complejo de adhesión, median la retracción de los límites de las células provocando espacio entre las células y desestabilizan la barrera epitelial (McKenzie and Ridley, 2007; Samarin et al., 2007; van Nieuw Amerongen et al., 2007). Uno de los principales blancos de ROCK, a través de los cuales esta quinasa orquesta la reorganización del citoesqueleto de actomiosina, es la MLC (Amano et al., 2010; Nunes et al., 2010). La ROCK activa a la MLC por varios mecanismos (Figura 2), 1) fosforilando directamente a la MLC, como ya mencionamos anteriormente (ver "Miosina II no muscular y la cadena liviana de la miosina) (Amano et al., 1996), 2) fosforilando a la subunidad de unión a la miosina ("Myosin-Binding Subunit", MBS) de la fosfatasa de la MLC (en Thr853 and Thr696) e inactivándola (Kimura et al., 1996; Kawano et al., 1999), y 3) fosforilando a un inhibidor endógeno de la MLCP (en Thr38), el CPI-17 (Kitazawa et al., 2000; Koyama et al., 2000). La ROCK también fosforila y activa a la LIM kinasa (en Thr 505) (Maekawa et al., 1999; Amano et al., 2001), la cual a su vez fosforila a la cofilina (en Ser3), inactivándola (Arber et al., 1998). La cofilina es un factor que regula la dinámica de la actina y conduce a su despolimerización (Mizuno, 2013). De este modo, la ROCK induce y mantiene las fibras de estrés aumentando la contracción por fosforilación de la MLC y estabilizando los filamentos de actina al inactivar indirectamente a la cofilina (Amano et al., 2010). La Rho quinasa regula la dinámica de los MT a través de la LIMK1. En un estudio realizado en células endoteliales se pudo determinar que LIMK1 colocaliza con los MT y forma un complejo con la tubulina (Gorovoy et al., 2005). En este mismo trabajo se constató que la sobreexpresión de ROCK2, que fosforila y activa a LIMK1, disminuye la interacción de LIMK1 con los MT y los desestabiliza (ibid). A su vez se observó que tanto el silenciamiento de la LIMK1 como la sobreexpresión de una LIMK1 sin actividad quinasa, bloquea la desestabilización de los MT inducida por trombina

(ibid). A pesar de que existe un consenso en la acción desestabilizadora de LIMK1 sobre los MT, los mecanismos involucrados aún se encuentran en discusión (Prunier *et al.*, 2017).

Vía de cAMP/PKA

El adenosín 3'5'- monofosfato cíclico ("3',5'-cyclic adenosine monophosphate", cAMP) es un segundo mensajero ubicuo capaz de traducir estímulos extracelulares a una variedad de respuestas celulares (Antoni, 2012). En las células eucariotas, los efectos del cAMP están mediados por tres efectores celulares: la proteína quinasa A ("Protein Kinase A", PKA), la proteína de intercambio activada por cAMP ("Exchange Protein directly Activated by cAMP", EPAC) y los canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos (ibid).

Existen numerosos trabajos donde se ha reportado la acción del cAMP sobre los filamentos de actina y los microtúbulos. La PKA es capaz de fosforilar directamente a proteínas de unión a la actina como por ejemplo la filamina (Wang *et al.*, 1996; Hastie *et al.*, 1997; Jay *et al.*, 2004) y la aducina (Matsuoka *et al.*, 2000). Además, conduce a la fosforilación de proteínas de unión o vinculadas a la actina como por ejemplo la cofilina -a través de LIMK1- (Nadella *et al.*, 2009) o la MLC (Moy *et al.*, 1993; Qiao *et al.*, 2003; Aslam *et al.*, 2010), y así induce la reorganización de los filamentos de actina. La PKA también fosforila a proteínas que se asocian a los MT, como tau (Zhu *et al.*, 2010) y estatmina (Di Paolo *et al.*, 1997), modificando de esta forma la dinámica de estos filamentos.

Compartimentalización del cAMP

La señalización del cAMP ocurre en compartimentos intracelulares o microdominios regulados independientemente. La compartimentalización del cAMP puede ser explicada en parte por la localización de las adenililciclasas (AC), que contribuyen a la generación del cAMP en determinados microdominios celulares (Edwards *et al.*, 2012; Caldieri and Sigismund, 2016), y por la distribución de fosfodiesterasas que restringen el cAMP a un microambiente celular (Surapisitchat and Beavo, 2011; Edwards *et al.*, 2012; Conti *et al.*, 2014). Las proteínas de anclaje de la PKA (*"A-Kinase Anchoring Proteins"*, AKAPs) pueden asociarse a las AC y a las fosfodiesterasas y así limitan su localización intracelular (Houslay, 2010; Edwards *et al.*, 2012; Dema *et al.*, 2015). Las AKAP se unen también a los dos efectores del cAMP, la PKA y el EPAC (Dodge-Kafka *et al.*, 2005; Dema *et al.*, 2015). Así, las AKAP son capaces de ensamblar complejos macromoleculares los cuales reúnen una AC y generan un "pool" de cAMP que

actúa efectivamente sobre sus efectores (Edwards *et al.*, 2012; Kritzer *et al.*, 2012; Dema *et al.*, 2015). La presencia de las fosfodiesterasas a la vez determina el nivel y la persistencia de una señal de cAMP en un sitio específico y puede impedir la activación inapropiada de estos efectores por fluctuaciones de los niveles de cAMP basales (Houslay, 2010; Kritzer *et al.*, 2012).

En los mamíferos se han identificado diez genes que codifican para las isoformas de la AC (Antoni, 2012; Steegborn, 2014). Nueve de ellos codifican para las isoformas transmembranales. Las adenililciclasas transmembranal presentan dos dominios hidrofóbicos con seis hélices que se expanden en la membrana. Su actividad es regulada principalmente por proteínas G heterotriméricas asociadas a receptores acoplados a proteínas G (Antoni, 2012). Las AC transmembranales difieren en su patrón de expresión y en sus propiedades reguladoras (Steegborn, 2014). Se localizan mayoritariamente en la membrana plasmática, pero también se han encontrado en la membrana del retículo sarcoplasmático en cardiocitos (Gao *et al.*, 1997; Zaccolo and Pozzan, 2002; Head *et al.*, 2005) o en endosomas (Calebiro *et al.*, 2009).

El segundo tipo de AC, la adenililciclasa soluble (sAC), es codificada por un solo gen que es regulado por múltiples promotores y cuyo mensajero también puede sufrir un extenso empalme ("splicing") alternativo (Tresguerres *et al.*, 2011; Schmid *et al.*, 2014). Las sAC carecen de dominios transmembranales y se localizan en el citoplasma, dentro de la mitocondria y el núcleo, junto a los MT y en centros organizadores de MT (Zippin *et al.*, 2002). A pesar de que la sAC no es una proteína transmembranal, se la ha encontrado en fracciones de membrana (Braun and Dods, 1975; Kolodecik *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013) y podría estar asociada a la membrana plasmática (Chen *et al.*, 2013). A diferencia de las AC transmembranales, las sAC son insensibles a la forscolina, son reguladas por bicarbonato, el que aumenta el número de recambio del sustrato, y por iones calcio, que incrementan su afinidad por el sustrato (Lee *et al.*, 2014; Steegborn, 2014).

Se ha observado que variaciones en la concentración de cAMP en distintos compartimentos intracelulares tienen efectos diferentes. Un incremento en la concentración de cAMP cercano a la membrana tiene un efecto protector sobre la barrera epitelial (Sayner, 2011). Existen numerosos trabajos en distintos epitelios donde también se reporta el efecto antagonista del cAMP próximo a la membrana frente a situaciones que activan la maquinaria contráctil celular por un aumento en la fosforilación de la MLC, por ejemplo por la acción de agentes inflamatorios (Moy *et al.*, 1993; Qiao *et al.*, 2003; Goeckeler and Wysolmerski, 2005; Aslam *et*

27

al., 2010) o por drogas que desestabilizan los microtúbulos (Birukova *et al.*, 2004a). El cAMP conduce a una disminución de la MLC a través de los siguientes mecanismos (Figura 2). Por un lado, la PKA fosforila RhoA (en Ser188) (Goeckeler and Wysolmerski, 2005; Ramachandran *et al.*, 2011). Dicha fosforilación incrementa la afinidad de RhoA al inhibidor de disociación de los nucleótidos de guanidina y promueve el pasaje de la GTPasa a un estado inactivo (Lang *et al.*, 1996; Ellerbroek *et al.*, 2003). En este estado, RhoA no puede activar a ROCK. La ROCK inactiva es incapaz de fosforilar a la MLC (Qiao *et al.*, 2003) y a la subunidad reguladora de la MLCP, MYPT1, y de inhibirla (Kimura *et al.*, 1996). Por otro lado, la vía del cAMP/PKA promueve la desfosforilación e inactivación del inhibidor endógeno de la MLCP, el CPI-17 (Aslam *et al.*, 2010) (Figura 2).

Existen numerosos trabajos que muestran que un incremento del cAMP producto de la sAC tiene un efecto desestabilizador sobre la barrera epitelial. La bacteria Pseudomonas aeruginosa produce una toxina, la Exo Y, que actúa como una sAC. Cuando la ExoY se introduce a las células endoteliales microvasculares, se produce un incremento de cAMP citosólico que afecta la barrera epitelial. Este incremento de cAMP genera espacios entre las células endoteliales a través de un mecanismo que involucra la hiperfosforilación de Tau en Ser-214 (y acumulación de Tau insoluble) y la desestabilización de los MT (Sayner et al., 2011; Balczon et al., 2013) y los MF (Cowell et al., 2005) (Figura 4). El grupo de Stevens ha publicado una serie de trabajos empleando una AC quimérica soluble, sAC I/II, que responde a la forscolina (Sayner and Stevens, 2006; Sayner et al., 2006; Prasain et al., 2009). El cAMP generado por esta enzima produce un efecto similar sobre la barrera epitelial a la toxina (ibid.). En células endoteliales microvasculares la activación de la sAC I/II provoca espacios intercelulares y determina una disminución de los MT periféricos (Prasain et al., 2009). Junto a esta remodelación no se observa la reorganización de la actina-F del anillo cortical en fibras de estrés, como habitualmente ocurre al verse comprometida la barrera epitelial y afectarse los MT periféricos (ibid.). El incremento del cAMP citosólico por acción de la sACI/II conduce a una disminución en la fosforilación de la MLC, los autores concluyen que esto previene la reorganización de la actina cortical (ibid.). Asimismo, proponen que la remodelación de los MT está acoplada a cambios en las proteínas de las AJ, las que a su vez son las responsables de desestabilizar la barrera epitelial (ibid.) (Figura 4). En células endoteliales, al estimular la AC transmembranal y a la vez inhibir la fosfodiesterasa PDE4D4, se logra que el "pool" de cAMP de la membrana plasmática acceda al citosol (Creighton et al., 2008; Zhu et al., 2010). El incremento de cAMP citosólico generado de esta manera tiene efectos similares a los observados en los trabajos

anteriores sobre la barrera epitelial y los microtúbulos (Zhu *et al.*, 2010) (Figura 4). En este artículo, se constata además una activación de la proteína quinasa A (PKA), la que colocaliza con los MT despolimerizados (ibid).



Figura 4 – Incremento del cAMP citosólico El cAMP citosólico puede aumentar por acción de la adenililciclasa soluble **(1A)** o por la inactivación de la fosfodiestersa PDE4D4 que permite que el cAMP sintetizado por la adenililciclasa transmembranal difunda hacia el citosol **(1B)**. Este cAMP activa a una PKA que colocaliza con los microtúbulos y fosforila Tau, la que se disocia de los microtúbulos. Esto favorece el desensablaje de los mismos y lleva a la formación de espacios intercelulares **(2)**. La PKA también conduce a la desfosforilación de la pMLC (ver Figura 2) **(3)**. Adaptado de Sayner, 2011.

Es interesante señalar que, frente a un aumento simultáneo de cAMP por la AC transmembranal y por la sACI/II quimérica, prima el efecto desestabilizador sobre la barrera epitelial (Sayner *et al.*, 2006). Esto ocurre a pesar de que la actividad de la AC transmembranal es 4.5 veces mayor que la generada por la sACI/II quimérica (ibid).

La vía de ERK1/2

La vía de ERK ("extracelular signal-regulated kinase") pertenece a un grupo de vías de señalización intracelular que se encuentra evolutivamente conservada en las células eucariotas y es activada en respuesta a una variedad de ligandos extracelulares, tales como factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores (Ramos, 2008; Yao and Seger, 2009; Cargnello and Roux, 2011; Roskoski, 2012). La señalización de esta MAPK ("mitogen-activated protein kinase") opera a través de la fosforilación y activación secuencial de tres MAP quinasas (Figura 5). Éstas son: 1) las MAPKK quinasas, A-Raf, B-Raf y Raf-1, 2) las MAPK quinasas, MEK1 y MEK2 y 3) las MAPK, ERK1 y ERK2. La primera quinasa Raf (MAPKK quinasa) es reclutada en la membrana plasmática u otras membranas donde es activada por fosforilación. En su estado activo, Raf fosforila y activa a MEK1/2 (MAPK quinasa) que a su vez fosforila y activa a ERK1/2 (MAPK) (ibid). Al ser fosforilada en los residuos de treonina183 y tirosina185, las ERK1/2 pueden fosforilar a más de 180 sustratos diferentes provocando diversas respuestas (Yoon and Seger, 2006).



Figura 5 –Vía de MAPK-ERK. La vía ERK se puede activar por receptores acoplados a las proteínas G, las integrinas, las tirosinas quinasas Src/Fyn y otros receptores de tirosina quinasas. Cuando el receptor de EGF se une a su ligando se autofosforila. Esto promueve el reclutamiento de Grb-2, que a su vez recluta al intercambiador de nucleótidos de guanidina, SOS. SOS activa a Ras. Ras-GTP recluta a las distintas Raf a la membrana, donde es activada por múltiples quinasas y fosfatasas. Raf fosforila a MEK y éste a su vez fosforila a ERK. ERK fosforila a múltiples sustratos a nivel citosólico y también es capaz de translocarse al núcleo donde fosforila muchos factores de transcripción. Adaptado de Ramos, 2008.

Al igual que la vía del cAMP/PKA, la respuesta específica desencadenada por ERK1/2 se debe en gran parte a su unión con distintos complejos de proteínas de andamiaje (Ebisuya *et al.*, 2005; Brown and Sacks, 2009; Casar and Crespo, 2016). Estos complejos son capaces de regular la duración y magnitud de la respuesta de ERK1/2, controlar su localización subcelular (Yao and Seger, 2009; Wortzel and Seger, 2011) y facilitar su interacción con componentes de otras vías de señalización (Brown and Sacks, 2009; Casar and Crespo, 2016).

Se ha constatado que existe un "pool" de moléculas de ERK que se asocian con los MT (Reszka et al., 1995; Harrison and Turley, 2001; MacCormick et al., 2005) y con los filamentos de actina (Leinweber et al., 1999; Hirata and Sokabe, 2015), y que está involucrado en su reorganización. Es muy frecuente que ERK sea reclutado junto a los filamentos a través de proteínas de andamiaje (Brown and Sacks, 2009). Una de estas proteínas es IQGAP, una proteína multidominio capaz de formar un complejo con B-Raf (Ren et al., 2007), MEK1/2 (Roy et al., 2005) y ERK1/2 (Roy et al., 2004). Como mencionamos anteriormente (ver "Interacciones ebtre los microtúbulos y los filamentos de actina"), IQGAP se une a la actina-F y a proteínas de unión a MT. Al formar un complejo con estos tres componentes de la cascada, IQGAP facilita la activación de ERK asociada al citoesqueleto. Asimismo, ERK puede fosforilar y regular a proteínas de unión a la actina y a la tubulina. Uno de los blancos de ERK es la cortactina (Kelley et al., 2010, 2011; Zhao et al., 2012; Stamatovic et al., 2015), una proteína que se une a la actina y contribuye a su polimerización (Martinez-Quiles et al., 2004). En los epitelios la cortactina se asocia a la actina del anillo cortical (Zhao et al., 2012), donde colocaliza con ZO-1, una proteínas que forma parte de las TJ (Stamatovic et al., 2015). Al ser fosforilada por ERK (en Ser 405), la cortactina se transloca de la membrana plasmática al citosol donde es degradada (Zhao et al., 2012). Esto provoca una reducción en la interacción de ZO-1 con el citoesqueleto de actina cortical y compromete la estabilidad de las TJ (Stamatovic et al., 2015). La estatmina es una proteína que se une a los heterodímeros de tubulina libres en el citoplasma, regulando por tanto la concentración de tubulina libre. Cuando la estatmina es fosforilada (en Ser 25 y 38) por ERK, los heterodímeros de tubulina quedan libres para polimerizarse y formar los MT (Lovrić et al., 1998).

Existen diversos trabajos en donde se ha reportado la activación de ERK1/2 por cambios en el PMP en células excitables (Carrasco *et al.*, 2003; Corvol *et al.*, 2005; Obara *et al.*, 2007; Nordström *et al.*, 2009). Asimismo, se ha observado que ocurre un incremento en la fosforilación de ERK1/2 en queratinocitos y neutrófilos expuestos a campos eléctricos (Zhao *et al.*, 2006). También se ha encontrado una activación de ERK en respuesta a la DPMP en células epiteliales de túbulo renal (Waheed *et al.*, 2010).

Interacciones entre las vías de RhoA, cAMP y ERK

Como se señaló en anteriormente (ver "Compartimentalización del cAMP") la PKA es capaz de fosforilar a RhoA y promover el pasaje de la GTPasa a un estado inactivo.

Se ha reportado que ERK también puede regular a RhoA. En algunos tipos celulares con activación de ERK sostenida, se ha observado una menor activación de RhoA con la consecuente inactivación de ROCK (Sahai *et al.*, 2001; Pawlak and Helfman, 2002; Vial *et al.*, 2003). Sin embargo, en otros tipos celulares la activación constitutiva de ERK provoca la activación de RhoA a través de la fosforilación de la GEF-H1 (Fujishiro *et al.*, 2008). En células epiteliales de túbulo renal, la despolarización del PMP activa a ERK y éste a su vez conduce a la activación de RhoA (Waheed *et al.*, 2010). La vía de RhoA/ROCK a su vez puede activar a ERK (Yanazume *et al.*, 2002).

El cAMP también puede modular la activación de ERK. Existen numerosos trabajos en donde se observa que la vía del cAMP/PKA inhibe la activación de ERK (Cook and McCormick, 1993; Wu *et al.*, 1993a; Häfner *et al.*, 1994). Esta inhibición es producto de la fosforilación de Raf-1 en distintos residuos (Ser 43, 259, 621) por parte de la PKA (Wu *et al.*, 1993a; Dhillon *et al.*, 2002). En el endotelio pulmonar, se produce una activación de ERK en respuesta a la inhibición de la PKA (Liu *et al.*, 2001). Sin embargo, también se encuentra reportado que el cAMP puede activar ERK a través de Rap1, que a su vez activa a B-Raf (Young *et al.*, 1994; Vossler *et al.*, 1997). El cAMP puede activar a Rap1 a través de sus dos efectores: PKA y EPAC. La PKA fosforila a la tirosina quinasa Src, que a su vez activa a Rap1 (Obara *et al.*, 2004). La EPAC es la GEF que activa a Rap1 (de Rooij *et al.*, 1998). La acción del cAMP sobre la MAP quinasa parece depender del tipo celular, del "pool" de cAMP involucrado y de los factores que activan la vía de ERK (Houslay and Kolch, 2000).

En este trabajo nos centramos en la búsqueda de intermediarios de vías de señalización celular, activadas directamente por el PMP, que estén implicadas en la reorganización del citoesqueleto de actina y de tubulina en el endotelio de córnea. Si bien el grupo de Szaszi encontró que en células de epitelio renal en cultivo la DPMP activa la vía Ras/Ref/MEK/ ERK/GEF-H1/Rho/ROCK con el consecuente incremento en la ppMLC, los efectos morfológicos de la DPMP sobre las células renales (Szaszi *et al.*, 2005; Waheed *et al.*, 2010) no son los mismos a los observados en las células BCE (Chifflet *et al.*, 2003). Asimismo, mientras que en células BCE el citoesqueleto de actina y tubulina se remodela en respuesta a la DPMP (Chifflet *et al.*, 2003), estudios preliminares de nuestro laboratorio en MDCK indican que el citoesqueleto no se reorganiza en dichas condiciones (resultados presentados en forma de poster en las XI Jornadas de la SUB (Correa *et al.*, 2005)). En consecuencia, podrían activarse vías de señalización diferentes en estos epitelios.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis de doctorado consiste en contribuir a comprender los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la remodelación del citoesqueleto de actina y tubulina, vinculado a las uniones intercelulares en epitelios de transporte, en respuesta a los cambios del potencial de membrana plasmática.

Objetivos específicos

-Identificar la(s) vía(s) molecular(es) que media(n) las respuestas del citoesqueleto de actina a la despolarización del potencial de membrana en endotelio de córnea.

-Identificar la(s) vía(s) molecular(es) que media(n) las respuestas del citoesqueleto de actina a la hiperpolarización del potencial de membrana en endotelio de córnea.

-Determinar si la(s) vía(s) molecular(es) que media(n) las respuestas del citoesqueleto de actina a la despolarización del potencial de membrana en este epitelio también son responsables de las modificaciones de los microtúbulos y si las remodelaciones de ambos filamentos están vinculadas.

Materiales y métodos

1 Soluciones y reactivos

Todos los reactivos y drogas se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), a menos que se especifique lo contrario.

Solución control (SC): NaCl 127 mM, KCl 5.4 mM, NaH₂PO₄ 1.02 mM, CaCl₂ 3.6 mM, MgSO₄ 0.8 mM, Hepes 10 mM pH 7.4. El CaCl₂ se adicionó en el momento de la utilización de la solución.

Soluciones despolarizantes: **KGIn**: Solución de gluconato de potasio. Igual que la solución control, sustituyendo el NaCl por KGIn en cantidades equimolares. **NaGIn**: Solución de gluconato de sodio. Igual que la solución control, sustituyendo el NaCl por KGIn en cantidades equimolares. **Na₂SO₄**: Solución de sulfato de sodio, igual que la solución control, sustituyendo el NaCl por Na₂SO₄ en cantidades equimolares. **Gram**: Solución de gramicidina. Solución SC suplementada con 1 µg/ml de gramicidina.

Soluciones hiperpolarizantes: ChoCl: Solución de cloruro de colina. Igual que la SC, sustituyendo el NaCl por ChoCl en cantidades equimolares. **NMDG:** Solución de N-metil-D-glucamina. Igual que la SC, sustituyendo el NaCl por una cantidad equimolar de cloruro de N-metil-D-glucamina. **Val:** Solución de valinomocina. Solución SC suplementada con 1 μ g/ml de valinomicina.

Buffer PBS de Dulbecco (DPBS): NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 5.8 mM, KH₂PO₂ 1.5 mM, MgCl₂ 0.5 mM, CaCl₂ 0.9 mM, pH 7.5. El MgCl₂ y el CaCl₂ se adicionaron en el momento de su utilización.

Drogas. El inhibidor de la PKA (iPKA) se reconstituyó en agua como una solución stock 750 μ M y se diluyó a una concentración de trabajo de 20 μ M. El resto de las drogas se prepararon como soluciones stock 1000 X en dimethilsufoxido (DMSO): KH7 (15 mM), SQ22536 (50 mM), Y-27632 (5 mM), A6355 (27 mM), citocalasina D (25 μ M), jasplakinolide (20 mM), nocodazol (0.1 mM), paclitaxel (10mM). Se realizaron alícuotas de las soluciones que se preservaron a
-20 °C. Las drogas se diluyeron a la concentración final en el medio o solución correspondiente inmediatamente antes de su uso.

2 Cultivos celulares

En este trabajo se utilizaron células de endotelio de córnea de bovino (BCE) y células de endotelio de aorta de bovino (*"Bovine Aortic Endothelial Cells"*, BAEC), las que se obtuvieron a partir de ojos y aortas torácicas frescas, respectivamente, amablemente brindadas por el frigorífico *"Las Piedras"* y el frigorífico *"Lorsinal"*.

Los cultivos de células de endotelio de córnea de bovino (BCE) se realizaron como fuera descrito en trabajos previos del laboratorio (Chifflet *et al.*, 2003). Brevemente, las córneas disecadas se trataron con tripsina (0.25%)-EDTA (0.02%) en PBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺ de 20 a 30 minutos a 37 °C. Las células endoteliales de cada córnea se removieron suavemente con una espátula roma, y se colocaron en cajas de cultivo de 35 mm conteniendo medio de cultivo MEM suplementado con 10% de suero, 50 µg/ml de gentamicina, 0.25 µg/ml de anfotericina B y 50 µg de proteína total/ml de extracto total de retina (Arruti and Courtois, 1978). Una vez alcanzada la confluencia, las células se subcultivaron y se mantuvieron en el mismo medio.

Los cultivos de células de endotelio de aorta de bovino (BAEC) se realizaron como fuera descrito en nuestro trabajo previo (Justet *et al.*, 2013). Brevemente, luego de extraer el tejido adiposo y conectivo, las aortas se lavaron con DPBS estéril y se cortaron en trocitos pequeños (0.5 x 1 cm), y el endotelio se trató con colagenasa (6.5 U/ml) en DPBS durante 30 minutos a 37 °C. Las células endoteliales se removieron con una espátula roma y se colocaron en cajas de cultivo de 35 mm conteniendo medio de cultivo MEM suplementado con 10% de suero, 50 µg/ml de gentamicinay 0.25 µg/ml de anfotericina B. Una vez alcanzada la confluencia, las células se subcultivaron y se mantuvieron en el mismo medio. Se utilizaron células del 1º al 5º pasaje con 15-20 días de cultivo (BCE) y del 4º al 16º pasaje con 10-15 días de cultivo (BAEC).

Las células B16F1 (ATCC CRL-6323, Rockville, MD, USA), fueron gentilmente cedidas por el Dr. Alejando Chabalgoity y cultivadas en el mismo medio que las anteriores.

3 Procedimientos despolarizantes e hiperpolarizantes del potencial de membrana plasmática

La diferencia del potencial de membrana plasmática (Δ PMP) es el resultado de la permeabilidad y distribución asimétrica de los iones Na⁺, K⁺, Cl⁻. El Δ PMP puede calcularse mediante la ecuación de Goldman-Hodkin-Katz (G-H-K):

$$\Delta PMP = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_e + P_{Na}[Na^+]_e + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_e}$$

Donde:

- ΔPMP es la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática
- R es la constante universal de los gases
- F es la constante de Faraday
- T es la temperatura absoluta
- P_{K}^{+} , P_{Na}^{+} , P_{Cl}^{-} son los coeficientes de permeabilidad de K⁺, Na⁺ y Cl⁻, respectivamente.
- [K⁺], [Na⁺] [Cl⁻] indican concentraciones de K⁺, Na⁺ y Cl⁻, respectivamente. Los subíndices *i* y *e* hacen referencia a los medios intra o extracelular, respectivamente.

La DPMP se consiguió incubando a las monocapas celulares de BCE en una solución salina en la que se sustituyó el NaCl de la SC por una sal conteniendo un anión no difusible (gluconato o sulfato). Las células BCE presentan una permeabilidad dominante de potasio. Al sustituir el NaCl por KGln, la corriente de K⁺ saliente disminuye. Si observamos la ecuación de G-H-K, este procedimiento implicó aumento de la [K⁺]_e y, por consiguiente, del numerador. Cuando se sustituye el NaCl por NaGln o Na₂SO₄, (los aniones gluconato y sulfato son no permeantes) aumenta la salida de Cl⁻. Esto implica una corriente saliente de cargas negativas, despolarizante. La gramicidina A es un ionóforo permeable a cationes monovalentes que en condiciones fisiológicas provoca la DPMP por la entrada de sodio extracelular. Es decir, la gramicidina aumenta la permeabilidad del Na⁺ y con ello el numerador de la ecuación de G-H-K es mayor. Todos los procedimientos despolarizantes han sido utilizados en trabajos previos de nuestro laboratorio para provocar la DPMP en monocapas de células BCE y en otros epitelios (Chifflet *et al.*, 2003; Chifflet *et al.*, 2004). En esta tesis no se utilizó la gramicidina A en los

estudios de búsqueda de las vías de señalización celular involucradas en la DPMP ya que, como se describe en los resultados, la gramicidina A tiene efectos propios, no dependientes de su efecto como ionóforo, sobre las vías de señalización (ver ParteD de Resultados).

Con el fin de hiperpolarizar el PMP, se emplearon dos procedimientos. En uno de ellos, las monocapas celulares de BCE se incubaron en una solución salina en la que se sustituyó el NaCl de la SC por una sal conteniendo un catión no difusible (Cho o NMDG). Esta maniobra disminuye la entrada de sodio, lo que provoca la HPMP. Si analizamos esto, en la ecuación de G-H-K, al disminuir el [Na⁺]_e el numerador se vuelve mayor. El otro procedimiento consistió en agregar a la SC valinomicina, un ionóforo de K⁺. La valinomicina provoca la salida del K⁺ intracelular a favor de su gradiente electroquímico. Es decir, aumenta el coeficiente de permeabilidad del potasio haciendo más importante su rol en la ecuación de G-H-K. Las dos estrategias empleadas en este trabajo para hiperpolarizar el PMP han sido utilizando en las monocapas celulares de BCE en nuestro laboratorio (Nin *et al.*, 2009).

4 Tinciones fluorescentes

Las tinciones fluorescentes se realizaron sobre las monocapas celulares sembradas sobre cubreobjetos de acuerdo a lo detallado en Tabla I y siguiendo los siguientes procedimientos generales. Las monocapas celulares se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con paraformaldheído (PAF) o PAF-Tritón X-100. Luego, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 (TX-100) a la dilución apropiada o con 0.1% Tween 20- 1% seroalbumina bovina y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente. A continuación, las células se lavaron tres veces con DPBS y se incubaron con el anticuerpo secundario. Finalmente, las monocapas se lavaron tres veces con DPBS y una vez con agua destilada, y se montaron en glicerol-Tris 1.5 M, pH 8.8 (5:1). A las soluciones de PAF se les adicionó CaCl₂ 0.9 mM y MgCl₂ 0.5 mM en el momento de su utilización. Las incubaciones con los anticuerpos se realizaron durante una hora a 37 °C en cámara húmeda. Las diluciones de los anticuerpos se hicieron en seroalbumina bovina (BSA) 1% en DPBS.

Tabla I

Antígeno	Fijación	Permeabilización	Anticuerpo	Anticuerpo
			Primario	Secundario

pMLC ppMLC	15 minutos PAF 4% 15 minutos PAF 2%	15 minutos 0.1% TX-100 15 minutos 0.25% TX-100	anti-pMLC (Abcam) 1/500 anti-ppMLC (Santa Cruz)	anti-conejo conjugado a Cy3 (Abcam) o conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes) 1/500 anti-cabra conjugado a
			1/200	Rhodamina o conjugado a FiTC (Santa Cruz) 1/200
N-Cadherina	15 minutos PAF 4%	15 minutos 0.1% TX-100	anti-N cadherina (Sigma) 1/100	anti-ratón conjugado a Cy3 (Abcam) o o conjugado a FitC 1/500
Pan-Cadherina	15 minutos PAF 4%	15 minutos 0.1% TX-100	anti-pan Cadherina (Sigma) 1/1000	anti-conejo conjugado a Cy3 (Abcam) o conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes) 1/500
сАМР	15 minutos PAF 4%	0.1% Tween 20- 1% BSA	anti-cAMP (Abcam) 1/500	anti-ratón conjugado a Cy3 (Abcam) o conjugado a FitC 1/500
pERK	15 minutos PAF 4%	5 minutos 0.1% TX-100	anti-pERK (Sigma) 1/500	anti-conejo conjugado a Cy3 (Abcam) o conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes) 1/500
α-tubulina	10 minutos PAF 2%-TX-100 0.25%		anti-α-tubulina (Sigma) 1/500	anti-ratón conjugado a Cy3 (Abcam) o o conjugado a

				FitC
				1/500
fosfotirosina	15 minutos	5 minutos	anti-	anti-ratón
	PAF 4%	0.1% TX-100	fosfotirosina	conjugado a
		1	(Sigma)	Cy3 (Abcam) o o
			1/50	conjugado a
				FitC
				1/500

Para la tinción de la actina-F se utilizó la faloidina conjugada a isotiocianato (FITC) 1/500. Los núcleos se visualizaron con Hoechst 1/1000. Las células se incubaron con faloidina FITC o con Hoechst junto con los anticuerpos secundarios en aquellos casos en los que se visualizó la actina o los núcleos, respectivamente, de manera simultánea con los antígenos anteriormente mencionados.

Cuantificación de la ppMLC en imágenes de inmunofluorescencia

En las imágenes de inmunofluorescencia de la ppMLC obtenidas por microscopía de epifluorescencia, ésta se observa de manera punteada en el límite celular (Figura 9A). A fin de determinar la existencia de variaciones en el patrón de la señal de la ppMLC en respuesta a los cambios de la ppMLC, se realizó el análisis de las imágenes que se describe a continuación. En primer lugar, se seleccionaron los "puntos" fluorescentes con la herramienta varita mágica y se cuantificó la densidad integrada (DI) de cada uno de éstos con el programa Adobe Photoshop CS5 Extended software (Adobe Systems, Mountain View, Calif., USA). Se cuantificó la DI de 10 imágenes por condición por experimento. A continuación, se normalizaron los valores de la DI de cada uno de los puntos en relación al valor del punto con mayor DI de las diferentes condiciones. Los valores de DI normalizados se ordenaron en intervalos de 0.1.

Cuantificación del área de los microtúbulos periféricos

El área de los MT periféricos se determinó de imágenes de inmunofluorescencia obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Las imágenes se procesaron con el ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA) siguiendo los pasos descritos a continuación: 1) Se trazó una línea sobre los microtúbulos periféricos con la herramienta de "línea de trazo libre" ("Freehand Line"). 2) La línea se transformó en un área con el comando "línea a área" ("Line to Area"). En aquellos casos en que el ancho del área obtenida con el procedimiento anterior era menor al

área de los MT periféricos, el ancho se aumentó con el comando "agrandar" ("Enlarge"). 3) Las áreas seleccionadas se grabaron como una región de interés (ROI) utilizando el "plugin" "Administrador de ROI" ("ROI manager"). 4) El área de los MT periféricos se midió con el comando "medir" ("Measure") del "plugin" "Administrador de ROI".

Microscopía

La mayor parte de las tinciones fluorescentes se observaron empleando un microscopio de epifluorecencia Nikon 50i (Nikon, Tokyo, Japan) y se fotografiaron con una cámera Moticam Pro 282B y el software Moticam Image Advanced 3.2 (Motic, Xiamen, China). Asimismo, se empleó el microscopio confocal Leica (modelo TCS SPII). En este último caso se adquirieron planos confocales cada 1 µm.

Cuantificación de núcleos ERK positivos

Para determinar la localización de pERK, se realizaron máscaras de los núcleos Hoechst positivos ("Varita mágica" del Adobe Photoshop) que se superpusieron sobre las imágenes teñidas para pERK. El número de los núcleos pERK positivos se determinó para cada condición.

5 Estudios de la desestabilización de las uniones adherentes

Las monocapas de BCE en cultivo se incubaron 30 min con y sin el inhibidor de ERK, A6355 27 μ M, en MEM sin suero y a continuación 30 min en SC o en ChoCl, con o sin la adición de A6355 27 μ M. Luego, la mitad de las monocapas se transfirieron a las soluciones correspondientes sin calcio. El efecto de las soluciones sin Ca²⁺ se siguió en un microscopio de contraste de fase hasta que se detectaron separaciones intercelulares en cualquiera de las monocapas (aproximadamente 10 minutos después). Las monocapas se fijaron y se realizó una tinción de la actina con faloidina FITC.

Cuantificación de la separación intercelular

El área entre las células en los estudios de desestabilización de las uniones adherentes se determinó de las imágenes de las células teñidas con faloidina FITC obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Las imágenes se procesaron con el programa Adobe Photoshop. Para ello,

se seleccionó el área entre las células con la herramienta "Varita mágica" y luego se determinó el área con el comando "Measurement log".

6 Western blot

Para determinar las variaciones de la pMLC, la ppMLC, pERK y en la fosforilación de los sustratos fosforilados de la PKA por Western blot (WB), se utilizaron monocapas cultivadas en placas de Petri de 35 mm (pMLC, sustratos fosforilados de la PKA y pERK) o 60 mm (ppMLC). Una vez culminados los distintos tratamientos, las placas se colocaron sobre hielo y las células se extrajeron con buffer de lisis (ver Tabla II). A las células que se resuspendieron con el buffer de lisis de pERK se les agregó 67 µl de buffer Laemmli 4x. Las muestras para el WB de la pMLC y la ppMLC debieron ser sonicadas con 3 pulsos de 10 segundos de duración y de 8500 rpm antes de ser hervidas, para lograr romper el ADN. En el resto de las muestras, el ADN se fragmentó forzando la muestra a pasar a través de una jeringa de punta fina varias veces. A continuación, todas las muestras se centrifugaron 10 minutos a 25.000 g y se conservó el sobrenadante. En el caso del WB de la PKA, se agregó 30 μl de buffer Laemmli 4x al sobrenadante. Se cargaron 100 µg de proteína para el WB de la pMLC, de los sustratos fosforilados de la PKA y de la pERK, y 200 µg de proteína para el WB de la ppMLC en un gel SDS-PAGE (en la Tabla II se indican los porcentajes de los geles de apilamiento y separación), que se corrió a voltaje constante. Luego de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF) (Amersham-GE, Healthcare). Para verificar la transferencia de las muestras, las membranas se tiñeron con Ponceu, se escanearon y se cuantificó la densidad integrada de cada carril con el ImageJ. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en DPBS y se incubaron con el anticuerpo correspondiente (ver Tabla II) toda la noche a 4°C. A continuación, la membrana se lavó tres veces con DPBS-Tween 0.05% y se incubó 1 hora en cámara húmeda con el anticuerpo secundario correspondiente. Los anticuerpos se diluyeron en una solución de leche descremada 1%- Tween-20 0.05% en DPBS. Para visualizar las bandas se utilizó el procedimiento de guimio-luminiscencia desarrollado por Haan y Behrmann (Haan and Behrmann, 2007). Se cuantificó la densidad integrada (DI) de cada banda empleando el ImageJ. Se realizó un control de transferencia cuantificando la densidad integrada del Ponceu con el mismo programa. A fin de normalizar las DI, en cada experimento la DI de cada condición se dividió entre la suma de las DI de todas las bandas de ese ensayo.

43

Tabla II

Antígeno	Buffer de Lisis	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario	Tipo de Gel
pMLC	200 μl Buffer Laemmli 1x	anti-pMLC (Abcam) 1/500	anti-conejo conjugado a la peroxidasa (Sigma) 1/10.000	4% de apilamiento- 12% de separación
ppMLC	300 μl Buffer Laemmli 2x	anti-ppMLC (Cell Signalling) 1/500	anti-conejo conjugado a la peroxidasa (Sigma) 1/10.000	4% de apilamiento- 12% de separación
Sustratos fosforilados de la PKA	90 μl Buffer de ¹ Lisis de la PKA	anti-sustratos fosforilados de la PKA (Cell Signalling) 1/500	anti-conejo conjugado a la peroxidasa (Sigma) 1/10.000	4% de apilamiento- 10% de separación
pERK	200 μl Buffer de ² Lisis de pERK.	anti-pERK (Sigma) 1/500	anti-ratón conjugado a la peroxidasa (Sigma) 1/2.000	4% de apilamiento- 10% de separación

¹Buffer de Lisis PKA: Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y NP-40 0.5%. Se adicionó en el momento de su utilización NaF 5mM, Na₃VO₄ 1mM y cocktail anti-proteasas.

²Buffer de Lisis pERK: NaCl 100 mM, HEPES 30 mM pH 7.5, NaF 20 mM, EGTA 1 mM y Triton X-100 1%. En el momento de su uso se suplementó con Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 1 mM y cocktail anti-proteasas.

7 Geles bidimensionales

Para estos geles se utilizaron monocapas confluentes cultivadas en placas de Petri de 60 mm. Una vez culminados los distintos tratamientos, las placas se colocaron sobre hielo y las células se extrajeron con 100 μ l de buffer de lisis (urea 8M, CHAPS 4%. En el momento de su uso se suplementó con DTT 40 mM y PMSF 1 mM). Las muestras se centrifugaron a 25000 g durante 10 min a 4 °C y se conservó el sobrenadante. Luego, las muestras se trataron con 1 μ l de mix nucleasa (GE Healthcare, Life Science)/ 100 μ l de muestra para digerir el ADN, se centrifugaron a 15000 g durante 10 minutos a 4 °C y se conservó el sobrenadante. La muestra se trató con el Kit de limpieza en 2-D ("2-D Clean-Up Kit", GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante y finalmente se resuspendió en 125 μl de buffer de rehidratación (Urea 8M, CHAPS 2%. En el momento de su uso se suplementó con DTT 40 mM y un buffer de gradiente de pH de inmovilizado (IPG, "immobilized pH gradient") de un rango de pH 4-7 no lineal (GE Healthcare) 0.5%. Para la primera dimensión (IEF) las muestras se cargaron en tiras IPG de rango de pH 4-7 no lineales y de 7 cm longitud (GE Healthcare). En la primera dimensión se siguió el siguiente programa: 1) 12 h de rehidratación, 2) 30 min a 150 volts, en gradiente, 3) 1:30 h a un voltaje constante de 300 volts, 4) 30 min a 1000 volts, en gradiente, 5)1 h a un voltaje constante de 1000 volts, 6) 1:30 h a 5000 volts, en gradiente, 7) 6 h a un voltaje constante de 5000 volts. Las tiras de IEF se incubaron durante 15 min con agitación constante en el buffer de equilibración (urea 6M, buffer Tris-HCl 75 mM pH 8.8, glicerol 29.3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%) al que se le agregó dithiothreitol (DTT) 10 mg/ml y luego otros 15 min también con agitación constante en el buffer de equilibración 2D al que se le agregó iodoacetamida 25 mg/ml. A continuación, se realizó la segunda dimensión en geles de SDS-PAGE 10% que se corrieron a voltaje constante. Los geles fueron posteriormente teñidos con una tinción para fosfoproteínas y luego con una de plata como se describe más abajo.

Tinción fosfoproteínas

La tinción de fosfoproteínas se realizó sobre los geles bidimensionales y los geles de SDS-PAGE. Para ello se siguió un protocolo desarrollado por Cong y colaboradores (Cong *et al.*, 2014). Brevemente, los geles se incubaron con la solución de tinción (purpurina 3 μ M, AlCl₃ 50 μ M, formamida 30%, etanol 30%, buffer acetato de sodio /ácido acético 250 mM pH 5.0) durante una 1:30 min a 50 °C con agitación constante. Luego se destiñeron 10 min con la solución de desteñido (etanol 37.5%, buffer acetato de sodio/ácido acético 500 mM pH 5.0).

Tinción con plata de los geles bidimensionales

La tinción con plata se realizó sobre los geles bidimensionales ya tenidos para visualizar fosfoproteínas. Para ello en primer lugar, los geles se incubaron con una solución de fijación (ácido acético 12%, etanol 50%, formaldehído 0.0185%) durante una hora con agitación constante. A continuación, se realizaron tres lavados de 5, 10 y 15 min con etanol 50%. Los geles se enjugaron rápidamente con una solución de Na₂S₂O₃.5H₂O 0.2 g/l, se lavaron tres veces con agua destilada e incubaron 20 min con solución de nitrato de plata (AgNO₃ 2g/l,

formaldehído 0.028%) con agitación constante. Luego de tres lavados con agua destilada, los "spots" se revelaron con la solución de revelado (Na₂CO₃ 30 g/l, Na₂S₂O₃.5H₂O 4 mg/l, formaldehído 0.0185%). La reacción, con la solución de revelado, se detuvo con la solución de fijación.

8 Evaluación de RhoA activo

La activación de RhoA GTPasa se evaluó a través de un ensayo de "pull-down". Se utilizaron monocapas confluentes cultivadas en cajas de Petri de 60 mm. Una vez finalizados los distintos tratamientos, se realizó un lavado rápido con TBS (Tris-HCl 25 mM pH 7.4, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM). Las placas se colocaron sobre hielo y las células se extrajeron con 400 μl de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, TX-100 1%, NaCl 500 mM, SDS 0.1%, NaF 20 mM, en el momento de su uso se suplementó con MgCl2 0.6 M, Na3VO4 1 mM, PMSF 1 mM, y cocktail antiproteasas). Las células se homogenizaron a 4 °C con homogeinizador Potter Elvehjem y se centrifugaron a 250000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml conteniendo 50 µg de microesferas unidas a Rhotekin (GST-Rhotekin-Beads; Cytoskeleton, Inc) y se incubó durante 1 h a 4 °C con agitación continua. La muestra se colocó en una punta de pipeta automática de 1000 µl con filtro. A la punta se le recortó el extremo inferior y a su vez se la colocó en un eppendorf de 2 ml. La muestra se centrifugó a 500 g durante 20 seg a 4° C. Las microesferas unidas a RhoA activo quedaron retenidas sobre el filtro de la punta y RhoA inactivo se eluyó. Luego de cuatro lavados con buffer de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, TX-100 1%, NaCl 150 mM, NaF 20mM, en el momento de su uso se suplementó con MgCl₂ 0.6 M), las microesferas se separaron de RhoA activo-Rhotekin con 100 μ l de buffer Laemmli 1x. Las muestras con RhoA activo se hirvieron 5 min y se cargaron (50 μ l de muestra) en un gel de SDS-PAGE 4% de apilamiento/ 12% de separación. El gel se corrió a voltaje constante. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham-GE, Healthcare). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en DPBS y se incubaron con el anticuerpo anti-RhoA (Santa Cruz Biotechnology) 1 h con agitación constante. A continuación, la membrana se lavó tres veces con DPBS-Tween 0.05% y se incubó 1 h con agitación constante con un anticuerpo anti-Ig G de ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (dilución final 1/10,000) (Sigma). Se realizaron tres lavados con DPBS-Tween 0.05%, previo al revelado. Los anticuerpos se diluyeron en una solución de leche descremada 1%-Tween-20 0.05% en DPBS. Para visualizar las bandas se utilizó el procedimiento de quimio-luminiscencia desarrollado por Haan y Behrmann (Haan and Behrmann, 2007). Los blots se escanearon y se analizaron con el ImageJ.

9 Cuantificación de cAMP

Para cuantificar el cAMP se siguió un protocolo de ELISA de competición desarrollado por Karimova y Ladant (Karimova and Ladant, 2007). Luego de obtener el conjugado BSA-cAMP, siguiendo el procedimiento descrito por los autores, se cuantificó el cAMP del conjugado midiendo su absorbancia. La concentración de cAMP en el conjugado obtenido fue de 2.4 mM y luego de testear distintas diluciones del conjugado se determinó que la dilución apropiada del conjugado que nos permitía cuantificar y discriminar diferencias de cAMP en nuestro sistema era de 1/20.000. Las placas de ELISA (Greiner) de 96 pocillos se sensibilizaron con 50 µl del conjugado BSA-cAMP 100 diluido en buffer carbonato 50 mM pH 9.6 durante toda la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con DPBS-Tween 0.05% (DPBS-T) y se bloquearon con BSA 20 mg/ml a temperatura ambiente. Una vez finalizados los distintos tratamientos, las placas de 35 mm con las monocapas celulares de BCE se colocaron sobre hielo y las células se extrajeron con 200 μ l de DPBS-T. Los lisados celulares se hirvieron 5 min y se centrifugaron 10 min a 13000 g. Los sobrenadantes se diluyeron 20 veces en DPBS-Tween 0.05% e incubaron durante 30 min con una dilución 1/10000 de anti-cAMP (Abcam). En paralelo, diluciones de cAMP (concentraciones de 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 nM) se incubaron durante el mismo tiempo con el anti-cAMP (Abcam) 1/10000. A continuación, cada pocillo se cargó con 80 µl de las diluciones de los sobrenadantes o de cAMP más el anti-cAMP y la placa de ELISA se incubó toda la noche a 4 °C. Cada condición se realizó por cuadruplicado. Luego de cuatro lavados con DPBS-T, los pocillos se incubaron con 80 µl de anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano durante 1 h a 37 °C. Los pocillos se lavaron cuatro veces con DPBS-T y se incubaron con la solución de revelado a temperatura ambiente. Cuando se visualizó un color en la solución de revelado (OPD 0.5 mg/ml, ácido cítrico 50 mM, Na₂HPO₄ 100 mM y H₂O₂ 0.012%) que podía ser medido de manera adecuada, la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 N. La absorbancia se midió en un lector de placas a 492 nm.

10 Tratamiento estadístico de los resultados

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces de forma independiente, a no ser que se indique le contrario. Se utilizó el test de diferencias de medias (test t de Student) para evaluar la significación estadística de los resultados. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa "Microsoft Excel" de Microsoft Office.

Resultados

Parte A: Estudio de las vías de señalización molecular que median las respuestas del citoesqueleto de actina a la despolarización del potencial de membrana en endotelio de córnea

1 Determinación de los cambios en la fosforilación de la cadena liviana de la miosina en respuesta a la despolarización del potencial de membrana plasmática

En la investigación de las vías de señalización involucradas en la remodelación del citoesqueleto de actina cortical en respuesta a la despolarización del PMP (DPMP), comenzamos evaluando si existían variaciones en la fosforilación de la MLC, ya que en las células de epitelio renal la DPMP provoca un incremento en la ppMLC (Szaszi *et al.*, 2005). Además, como se mencionara en la Introducción, la miosina II no muscular se encuentra asociada al citoesqueleto de actina. El encontrar cambios en la MLC nos permitiría acotar nuestro estudio de las vías de señalización involucradas en la remodelación del citoesqueleto a aquellas que modulen la fosforilación de la MLC.

Mediante la utilización de anticuerpos específicos para las formas mono- y difosforiladas de la MLC se pudo observar que, en monocapas confluentes de células BCE en cultivo (Figuras 8A-B y 9A-B), ambas especies moleculares presentan una distribución similar a la de las células en BCE in situ (Figura 6). Por otra parte, si bien las dos especies fosforiladas se localizan en la periferia celular, lo hacen con un patrón de distribución diferente. La ppMLC se localiza en el límite celular con un patrón regular punteado (Figuras 6 y 9A-B) y la pMLC se dispone de manera más difusa en la corteza celular (Figuras 6 y 8A-B).

En células de BCE aisladas, tal como en aquellas que han establecido contactos celulares en monocapas inmaduras, la pMLC se distribuye de manera difusa en la célula (Figura 7A-B). Como mencionamos en el párrafo anterior, una vez que las monocapas han alcanzado la madurez la pMLC se concentra en la periferia celular (Figura 8A). A diferencia de la pMLC, la ppMLC no se visualiza en células aisladas y la ppMLC se detecta únicamente en la corteza celular en aquellos sitios en donde dos células contactan (Figura 7C y 7D). Por esta razón, la ppMLC podría estar vinculada con la actina que forma parte de las uniones celulares.

En BAEC observamos una señal baja y difusa de las formas fosforiladas de la MLC (cf.Figura 10, en la misma se muestra solo la pMLC pero puede observarse el mismo tipo de imagen para la ppMLC), en consistencia con los reportado en la literatura para estas células (Hirano and Hirano, 2016).



Figura 6- Distribución de las dos formas fosforiladas de la MLC en el endotelio de córnea de bovino in situ. Inmunofluorescencia de la pMLC **(A)** y de la ppMLC **(B)**. Junto a cada una de éstas se muestra una tinción con faloidina-FITC realizada en simultáneo para observar la distribución de las MLC en relación a la actina-F. Barra: 15 μm. Proyecciones Z de stacks de 1 μm obtenidos por microscopía confocal.



Figura 7. Distribución de las dos formas fosforiladas de la MLC en células aisladas y en monocapas subconfluentes de células BCE en cultivo. Las monocapas se fijaron, para luego evaluar por inmunofluorescencia la localización de la pMLC en relación a la actina-F (A) y a la cadherina (B); de la ppMLC con respecto a la actina-F (C) y a la cadherina (D), y de ambas formas fosforiladas de la MLC (E). Barra: 30 μm.

Al incubar las monocapas de BCE en las distintas soluciones despolarizantes se observó por inmunofluorescencia una disminución de la pMLC. Tal como ocurre con el citoesqueleto de actina (Chifflet *et al.*, 2003), la intensidad del efecto de la DPMP sobre la pMLC varía entre distintas monocapas de BCE en cultivo (Figura 8A-B). En la Figura 8A se puede observar una disminución de la pMLC en monocapas que no han sufrido cambios importantes en la actina-F. En aquellas monocapas celulares de BCE en donde la DPMP provocó una mayor remodelación del citoesqueleto de actina y una separación de las células, la pMLC también disminuyó en la mayor parte de las células (Figura 8B). En respuesta a la DPMP también se constató por Western blot una menor fosforilación de la pMLC total en relación al control (Figura 8C).

Si bien la DPMP provocó una reducción de la pMLC en las monocapas de células de BCE, no se observaron cambios en la fosforilación de la ppMLC por inmunofluorescencia (Figura 9A). Cuándo la DPMP provocó la separación de células, tampoco se evidenciaron variaciones en la ppMLC, salvo en aquellos sitios de la periferia celular en los que las células perdieron los contactos celulares (Figura 9B). La figura 9C muestra una comparación cuantitativa de la fosforilación de la ppMLC entre las distintas soluciones despolarizantes. Los datos de la gráfica representan los valores de densidad integrada (DI) de cada uno de los puntos fluorescentes de las imágenes de inmunofluorescencia, obtenidos utilizando el software de Photoshop, tal como se describe en Materiales y métodos. Los valores de DI normalizados se ordenaron en intervalos de 0.1 y se graficó la frecuencia de estos intervalos en función de la DI normalizada (Figura 9C). Como se observa en la Figura 9C, la distribución de los valores de DI de los tratamientos con las distintas soluciones despolarizantes son similares a los de la solución control (SC). Asimismo, no se encuentran diferencias significativas entre las distintas soluciones despolarizantes y la solución control cuando se grafica la frecuencia en función del intervalo de DI con mayor número de eventos de todos los tratamientos (0,1-0,2), de acuerdo con los datos obtenidos en la Figura 9C (Figura 9D). Al evaluar las variaciones de la ppMLC por Western blot en respuesta a la DPMP, tampoco se encontraron diferencias significativas de la misma en relación a SC (Figura 9E).

En su conjunto, nuestros resultados muestran que la respuesta de la MLC a la DPMP en las monocapas de BCE es, por lo tanto, distinta a la de las células de túbulo renal, ya que en este tipo celular la DPMP provoca un aumento en la ppMLC y no altera a la pMLC (Szaszi *et al.*, 2005).

51

Figura 8- Efecto de la DPMP sobre la pMLC. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o con distintas soluciones despolarizantes **(A-C)**. Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para visualizar la pMLC y la actina-F. Las tinciones se realizaron en líneas celulares en donde la respuesta del citoesqueleto de actina a la DPMP fue moderada **(A)** o muy pronunciada **(B)**. Las puntas de flechas indican zonas en donde disminuye la pMLC y los asteriscos las zonas donde las células se separan (Barra A: 30 μ m, y B: 60 μ m). Western blot para la pMLC **(C)**. El gráfico muestra el porcentaje de la densidad integrada respecto al control a partir de un análisis densitométrico. Se representan promedios ± desvío estándar. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al control (p<0.03, n=3). El control de la transferencia y la cuantificación de las bandas fueron realizados como se describe en Materiales y métodos. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes **(C)**.



Figura 9- Efecto de la DPMP sobre la ppMLC. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o con distintas soluciones despolarizantes **(A-E).** Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para visualizar la ppMLC y la actina-F. Las inmunofluorescencias se realizaron en líneas celulares en las que la respuesta del citoesqueleto de actina a la DPMP fue moderada (A) o muy pronunciada **(B).** Las puntas de flechas indican algunas de las zonas de las monocapas en que las células se separan. Barra: 30 μm. Histogramas de las frecuencias de las DI normalizadas de las imágenes de inmunofluorescencias **(C).** Gráfico de la frecuencia promedio del intervalo con mayor número de eventos de DI normalizada de todos los tratamientos (0.1-0.2, ver Figura 4C) **(D).** Western blot para la ppMLC **(E).** El gráfico muestra el porcentaje de la densidad integrada respecto al control a partir de un análisis densitométrico. Se representan promedios ± desvío estándar (n=3). El control de la transferencia y la cuantificación de las bandas fueron realizados como se describe en Materiales y métodos. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes **(E).**



A los efectos de determinar si en respuesta a la DPMP también se producen cambios en las dos formas fosforiladas de la MLC en otros epitelios, realizamos estudios de inmunofluorescencia en monocapas de BAEC en cultivo (Figura 10). En las monocapas incubadas en SC, la señal observada de ambas formas fosforiladas de la MLC es baja y difusa. En respuesta a la DPMP no se observaron cambios en la pMLC (Figura 10) ni tampoco en la ppMLC (resultados no mostrados).



Figura 10- Efecto de DPMP sobre la pMLC en BAEC. Las monocapas de BAEC en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o con distintas soluciones despolarizantes. Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para visualizar la pMLC y la actina-F. Barra: 60µm.

2 Evaluación de los cambios del cAMP en respuesta a la despolarización del potencial de membrana plasmática

En función del resultado anterior en relación a la DPMP y la MLC, nos centramos en aquellas vías de señalización que al activarse pudieran inducir la disminución de la pMLC. Como se indica en la Introducción, existen trabajos que reportan que un incremento del cAMP puede conducir a la disminución de la fosforilación de la MLC (Aslam *et al.*, 2010; Sayner, 2011). La evaluación de los cambios en la concentración de cAMP intracelular se realizó por inmunofluorescencia y a través de un ELISA de competición.

A los efectos de confirmar que las células BCE responden a los cambios de cAMP se realizaron controles con forscolina, un agonista de las adenilil ciclasas transmembranales. Como se observa en la Figura 11, en presencia de forscolina se detecta un aumento de cAMP. Este incremento de la concentración de cAMP se inhibe en presencia de un inhibidor especifico de las AC transmembranales, el SQ22,536 (Figura 11).



Figura 11- Efecto de la estimulación (forscolina) e inhibición (SQ22536) de las AC transmembranales sobre los niveles del cAMP. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o con SC conteniendo forscolina 15 μ M, SQ22536 50 μ M o forscolina 15 μ M + SQ22536 50 μ M. Cuantificación de la concentración de cAMP mediante ELISA. Se grafica el porcentaje de cAMP en relación al control. Se representan promedios ± desvío estándar. Los asteriscos (*, **) indican diferencias significativas (*p<0.01, ** p<0.05 n=3).

Al incubar las monocapas de BCE en distintas soluciones despolarizantes se pudo observar, en una primera instancia, mediante inmunofluorescencia, un incremento en la concentración de cAMP (Figura 12A-B). El aumento en la concentración de cAMP se observó a los 15 minutos del tratamiento con las soluciones despolarizantes y se prolongó por 15 -20 minutos más. En los casos en los que la DPMP provocó la separación de células, el incremento de cAMP se evidenció mayoritariamente en aquellos sitios de la periferia celular en los que las células perdieron los contactos celulares (Figura 12B).

A fin de determinar los cambios en la concentración de cAMP en respuesta a la DPMP y contrastar con los resultados ya obtenidos por inmunofluorescencia en monocapas de BCE, se realizó un ELISA. Con esta metodología se encontró un incremento en la concentración de cAMP de aproximadamente 35% (Figura 12C).

Figura 12- Efecto de la DPMP sobre la concentración de cAMP. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min en SC o en distintas soluciones despolarizantes **(A–C).** Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para visualizar el cAMP y la actina-F. Las inmunofluorescencias se realizaron en líneas celulares en donde la respuesta del citoesqueleto de actina a la DPMP fue moderada **(A)** o muy pronunciada **(B)**. Las puntas de flechas indican algunas de las zonas de las monocapas en que las células se separan y se observa un incremento del cAMP. Barra: 30 µm. Cuantificación de la concentración de cAMP mediante ELISA **(C)**. Se grafica el porcentaje de la concentración de cAMP en relación al control. Se representan promedios \pm desvío estándar. El asterisco (*) indica una diferencia significativa (*p<0.02, n=3) **(C)**.







El incremento en la concentración de cAMP en respuesta a la DPMP puede ser producto de un incremento en la actividad de la adenilil ciclasa transmembranal y/o de la adenilil ciclasa soluble (sAC). Es importante señalar que en las BCE se expresa tanto la AC transmembranal como la sAC (Sun *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2011). Para evaluar el origen del cAMP empleamos los inhibidores específicos de las AC transmembranales y de la sAC, SQ 22,536 y KH7 respectivamente (Bitterman *et al.*, 2013; Schmid *et al.*, 2014).

Cuando las monocapas de BCE se incubaron en KGIn en presencia del inhibidor de la sAC (KH7), el aumento en la concentración de cAMP provocado por la DPMP no fue significativo (Figura 13A). El inhibidor de la AC transmembranal (SQ 22,536) no tuvo efecto sobre el incremento en la concentración de cAMP provocado por la solución de KGIn (Figura 13B). Estos datos sugieren que el aumento en la concentración de cAMP sería producto de la activación de la sAC.



Figura 13- Efecto de la inhibición de la sAC y de las AC transmembranales sobre los cambios en la concentración de cAMP en respuesta a la DPMP. Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de KH7 15 μ M. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de KGln y se agregó nuevamente el inhibidor a las células pretratadas con el mismo (A). Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de SQ22536 50 μ M. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de KGln y se agregó nuevamente el inhibidor a las células pretratadas con el mismo (B). La concentración de cAMP se cuantificó por ELISA. Los gráficos muestran el porcentaje de la concentración de cAMP respecto al control. Se representan promedios \pm desvío estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas (*p<0.005, n=3) (A-B).

Efecto de la inhibición de la sAC sobre la pMLC y sobre la remodelación del citoesqueleto de actina en respuesta a la DPMP

Teniendo en cuenta el hallazgo de que la DPMP indujo un incremento en la concentración de cAMP y que este aumento se atenuó con el inhibidor de la sAC, se realizaron experimentos para determinar si el cAMP participa de la remodelación del citoesqueleto de actina y la disminución de la fosforilación de la pMLC que ocurre en respuesta DPMP. Para ello, las monocapas de BCE se incubaron en KGIn en presencia del inhibidor de la sAC, KH7.

En la Figura 14 se puede observar, que el KH7 atenúa de manera significativa la disminución de la fosforilación de la pMLC por la solución de KGln. Asimismo, que el inhibidor bloquea la remodelación del citoesqueleto de actina y la separación de las células en respuesta a la solución de KGln (Figura 14A). Si bien estos resultados se realizaron empleando únicamente el KGln y habría que repetir los experimentos con otras soluciones despolarizantes, los resultados son consistentes con la idea de que el incremento en la concentración de cAMP dependiente de la sAC induce una desfosforilación de la pMLC y la reorganización de la actina-F cortical en respuesta a la DPMP.



Figura 14- Efecto de la inhibición de la sAC sobre la pMLC y la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a la DPMP. Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de KH7 15 μ M. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de KGln y se agregó nuevamente el inhibidor a las células pretratadas con el mismo (A-B). Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para visualizar la pMLC y la actina-F. Las puntas de flechas indican las zonas donde las células se separan. Barra A: 30 μ m (A). Western blot para la pMLC (B). El gráfico muestra el porcentaje de la densidad integrada respecto al control a partir de un análisis densitométrico. Se representan promedios ± desvío estándar. El asterisco (*) indica diferencia significativa (*p<0.01, n=3). El control de la transferencia y la cuantificación de las bandas fueron realizados como se describe en Materiales y métodos. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes (B).

3 Evaluación de la participación de la PKA en la respuesta a la despolarización del potencial de membrana plasmática

En virtud de que la concentración de cAMP aumenta en respuesta a la DPMP, se exploró si este segundo mensajero activaba a la PKA, uno de sus efectores. La PKA es una candidata atractiva a estudiar dentro de los efectores del cAMP, ya que su activación conduce a una disminución en la fosforilación de la MLC (Aslam et al., 2010).

Como una primera aproximación para estudiar si la PKA estaba involucrada en los cambios provocados por el DPMP, se realizó un Western blot con un anticuerpo que reconoce los dominios fosforilados de los sustratos de la PKA. En la puesta a punto de este ensayo se realizaron controles positivos con forscolina y con un análogo permeable del cAMP, el dibutiril cAMP. También se hizo un control negativo con un inhibidor específico de la PKA. Al incubar las monocapas de BCE con forscolina, se constató un aumento en la fosforilación de todos los sustratos de la PKA (Figura 15A). Como se observa en la Figura 15A, el dibutiril-cAMP provocó el incremento de algunos de los sustratos fosforilados de la PKA. Resulta muy probable que las diferencias del efecto sobre los sustratos fosforilados de la PKA entre la forscolina y el dibutiril cAMP se deban a que estos agonistas de la PKA activen a diferentes "pools" de PKA celulares. Como era esperable, en presencia del inhibidor de la PKA disminuyeron todas las bandas detectables con el anticuerpo que reconoce los sustratos fosforilados de la PKA disminuyeron todas las bandas





Cuando los Western blots se realizaron en monocapas de BCE tratadas con distintas soluciones despolarizantes se obtuvo un perfil de bandas distinto al del control, y se observó un aumento de dos bandas de aproximadamente 70 y 50 KDa (Figura 16A). En monocapas de BAEC, el tratamiento con KGIn también provocó un incremento de la banda de 50 KDa y además de dos bandas de aproximadamente 110 y 149 KDa (Figura 16B).



Figura 16- Efecto de la DPMP sobre los sustratos fosforilados de la PKA. Western blots utilizando un anticuerpo que reconoce los sustratos fosforilados de la PKA **(A-B)**. Previo al Western blot, las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o con distintas soluciones despolarizantes **(A)** y las de BAEC durante 30 min con SC o con KGIn **(B)**. Los gráficos muestran el porcentaje de la densidad integrada respecto al control a partir de un análisis densitométrico de las bandas de 50, 70, 110 y 149 KDa. La banda de 149 KDa no cambia en las células BCE con los tratamientos despolarizantes en relación al control. Se representan promedios ± desvío estándar. Los asteriscos (*, **) indican diferencias significativas (*p<0.03, ** p<0.003 n=3). El control de la transferencia y la cuantificación de las bandas fueron realizados como se describe en Materiales y métodos. En cada caso, se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes **(A-B)**.

Con el fin de continuar los estudios de la participación de la PKA en los cambios del citoesqueleto de actina en respuesta a la DPMP, evaluamos el efecto de la inhibición de esta quinasa sobre la pMLC y los MF al despolarizar el PMP.

A través de ensayos de inmunofluorescencia y Western blot se pudo establecer que la inhibición de la PKA con un péptido específico (iPKA) atenúa de manera significativa la disminución de la fosforilación de la pMLC (Figura 17). Asimismo, este inhibidor bloquea la remodelación del citoesqueleto de actina en respuesta al tratamiento con KGIn (Figura 17A). Si bien en los experimentos en los que se inhibió la sAC y PKA se utilizó únicamente el KGIn, y habría por lo tanto que repetirlos empleando otras soluciones despolarizantes, los resultados obtenidos hasta aquí son consistentes con el concepto de que la vía de la cAMP/PKA podría ser una de las implicadas en los cambios de la actina-F cortical en respuesta a la DPMP.



Figura 17- Efecto de la inhibición de la PKA sobre la pMLC y la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a la DPMP. Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de iPKA 20 μ M. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de KGIn y se agregó nuevamente el inhibidor a las células pretratadas con el mismo (A-B). Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para visualizar la pMLC y la actina-F (A). Western blot para la pMLC (B). El gráfico muestra el porcentaje de la densidad integrada respecto al control a partir de un análisis densitométrico. Se representan promedios ± desvío estándar. El asterisco (*) indica diferencia significativa (*p<0.01, n=3). El control de la transferencia y la cuantificación de las bandas fueron realizados tal como se describe en Materiales y métodos. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes (B).

4 Estudio de los sustratos fosforilados de la PKA en respuesta a la despolarización del potencial de membrana plasmática

En función de los resultados de la sección anterior resultó pertinente lograr identificar los sustratos fosforilados de la PKA. Con este fin, se planeó realizar electroforesis bidimensionales en geles de poliacrilamidas seguidas de espectrometría de masa de aquellas proteínas que se modificaran con la DPMP. Asimismo, con esta estrategia teníamos la intención de llegar a determinar cambios en la fosforilación de otros posibles intermediarios que pudiesen estar implicados en la reorganización del citoesqueleto de actina. Esta parte del proyecto se efectuó en el marco de una pasantía en la Unidad de Biología del Instituto Pasteur de Montevideo bajo la supervisión de la Dra. Adriana Parodi.

Durante esta pasantía se corrieron geles bidimensionales con extractos proteicos obtenidos de monocapas de células BCE incubadas en una solución despolarizante y en una solución control. Los geles obtenidos fueron teñidos en una primera instancia empleando una tinción desarrollada por Cong y colaboradores (Cong *et al.*, 2014), a fin de detectar únicamente las fosfoproteínas. Esta técnica presenta dos componentes esenciales, el aluminio que se une a los residuos fosfato y la purpurina que quela al aluminio y pone en evidencia las proteínas fosforiladas al visualizarlas con un transiluminador UV (ibid). Posteriormente, una vez efectuado este procedimiento, los geles se tiñeron con plata.

En la puesta a punto de la tinción de proteínas fosforiladas, una proteína pura que presenta residuos fosforilados, la seroalbúmina bovina (BSA), y una proteína que no presenta ningún residuo fosforilado, el colágeno, fueron sometidas a un SDS-PAGE y posteriormente coloreadas con esta tinción (Figura 18A). Como era de esperarse, se obtuvo una señal con la BSA y no con el colágeno. Cuando se empleó la tinción para visualizar proteínas fosforiladas en geles de SDS-PAGE en los que se corrieron lisados celulares de monocapas de BCE incubadas con la SC y con las soluciones despolarizantes, no se observaron diferencias entre las monocapas afectadas por la DPMP y el control (Figura 18B).

En los geles bidimensionales de las muestras obtenidas a partir de las monocapas de BCE incubadas en solución KGln (y procesadas como se describe en Materiales y métodos) y teñidos para visualizar fosfoproteínas, se detectaron una serie de "spots" de aproximadamente 54.5 KDa (señalados en la Figura 18 C con los números 1, 2) y 38.5 KDa (señalado en la Figura 18C con el número 3) que estaban incrementadas respecto al control, y que podrían por

consiguiente ser buenos candidatos para analizar por espectrometría de masas en el futuro. La aparente inconsistencia entre los resultados obtenidos en los geles bidimensionales y los del Western blot de la PKA será tratada en mayor profundidad en la Discusión.



Figura 18- Efecto de la DPMP sobre la fosforilación proteica. SDS-PAGE (10%) en el que se corre seroalbúmina bovina (BSA), colágeno y un extracto proteico (Ext.Prot) de BCE coloreados con Coomassie (a') y con la tinción de fosfoproteínas (a'') (A). Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o con distintas soluciones despolarizantes. SDS-PAGE (10%) teñido para visualizar fosfoproteínas (B). Geles bidimensionales de lisados celulares de monocapas incubadas en SC o en solución de KGIn y coloreados para visualizar proteínas fosforiladas (n=4) (C).

5 Determinación de la activación de RhoA en respuesta a la despolarización del potencial de membrana plasmática

La pequeña GTPasa RhoA es un regulador clave del citoesqueleto de actina. En este proyecto es pertinente estudiar su activación ya que la PKA conduce a su fosforilación e inactivación (Sayner, 2011) y esto podría explicar la disminución en la fosforilación de la pMLC.

Para evaluar la activación de RhoA realizamos un ensayo de "pull down", empleando microesferas ("beads") que están unidas a una proteína recombinante con el dominio de Rhotekin (una proteína efectora de RhoA) de unión a RhoA activo. Con este sistema es posible separar RhoA activo de RhoA inactivo y posteriormente comparar la cantidad de RhoA activo con los distintos tratamientos respecto al control mediante Western blot.

Cuando las monocapas de BCE se trataron con distintas soluciones despolarizantes encontramos un incremento significativo de RhoA activo (Figura 19A). Para evaluar si RhoA/ROCK participa en la remodelación de la actina-F cortical, las monocapas de BCE se incubaron en KGIn en presencia de un inhibidor de ROCK, el Y-27632. Como se observa en la Figura 19B, el Y-27632 no atenúa los efectos de la DPMP sobre los microfilamentos corticales ni evita que las células se separen.


Figura 19- Efecto de la DPMP sobre la actividad de RhoA. Las monocapas de células BCE en cultivo se trataron durante 30 min con SC o con distintas soluciones despolarizantes. Los lisados celulares se incubaron con una proteína recombinante que contenía el dominio de unión a RhoA activo de Rhotekin unida a microesferas. Luego de eluir las microesferas se recuperó el RhoA activo y se realizó un Western blot. El gráfico muestra el porcentaje de la densidad integrada respecto al control a partir de un análisis densitométrico (A). Se representan promedios ± desvío estándar. Los asteriscos (*, **) indican diferencias significativas (*p<0.08, **p<0.03, n=3). Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes (A). Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de Y-27632 5 μM. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de KGIn y se agregó nuevamente el inhibidor a las células pretratadas con el mismo. Las monocapas se fijaron y se realizó una tinción de la actina con faloidina FITC (B).

6 Estudio de la activación de ERK en respuesta a la despolarización del potencial de membrana plasmática

Como se menciona en la Introducción, en células de epitelio renal se encontró que la DPMP provoca la activación de ERK y que esta vía conduce a cambios en la fosforilación de la MLC (Waheed *et al.*, 2010). Por otra parte, se conoce que el cAMP puede regular a ERK (Cook and McCormick, 1993; Wu *et al.*, 1993a; Häfner *et al.*, 1994; Dhillon *et al.*, 2002). En base a estos antecedentes, es de interés estudiar si la vía de ERK se encuentra involucrada en los cambios del citoesqueleto de actina en las monocapas de BCE en respuesta a la DPMP. Con este objetivo, evaluamos por inmunofluorescencia y por Western blot, si la DPMP induce cambios en la forma activa de ERK, es decir, en ERK fosforilado (pERK).

Luego de incubar las monocapas de BCE durante 30 minutos en SC, se observó una señal homogénea y baja de pERK en el citoplasma. La señal de pERK permaneció inalterada al incubar las monocapas de BCE en soluciones despolarizantes (Figura 20A). Por Western blot tampoco se constataron cambios en la fosforilación de ERK, luego de investigar los mismos empleando tratamientos despolarizantes (Figura 20B).



Figura 20- Efecto de DPMP sobre pERK. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o con distintas soluciones despolarizantes **(A-B)**. Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para visualizar la pERK y los núcleos (con Hoechst). Barra: 30 μm **(A)**. Western blot de pERK **(B)**. El gráfico muestra el porcentaje de la densidad integrada respecto al control a partir de un análisis densitométrico. Se representan promedios ± desvío estándar. El control de la transferencia y la cuantificación de las bandas fueron realizados como se describe en Materiales y métodos. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes **(B)**.

Parte B: Estudio de las vías de señalización molecular que median las respuestas del citoesqueleto de actina a la hiperpolarización del potencial de membrana en endotelio de córnea

Los resultados anteriores parecen indicar que, al provocar una DPMP en las monocapas de BCE se activan vías de señalización intracelular que podrían estar involucradas en la consecuente remodelación del citoesqueleto de actina cortical. En la hiperpolarización del PMP (HPMP), estas vías podrían afectarse en formar inversa y/o podrían activarse nuevas. Por esta razón, con el objetivo de realizar los estudios correspondientes a esta parte de la tesis, comenzamos explorando la participación de las vías estudiadas para el caso de la DPMP cuando se hiperpolariza el PMP en BCE.

1. Determinación de los cambios en la fosforilación de la cadena liviana de la miosina en respuesta a la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática

Como la DPMP provoca una disminución de la pMLC, se investigó si ésta también se modifica al hiperpolarizar de manera inespecífica el PMP. Nuestros resultados muestran que, en respuesta a la HPMP, no ocurren variaciones en la pMLC cortical (Figura 21). Como se menciona más arriba, la ausencia de cambios en la pMLC podría estar indicando que durante la HPMP se activan vías distintas que en la DPMP. No es posible descartar, sin embargo, que en la condición control la pMLC haya llegado a su nivel máximo, y que la HPMP no estimule una mayor fosforilación.

En virtud de que la ppMLC no cambia con la DPMP y que la fosforilación de ambas formas de la MLC pueden regularse por vías distintas (Prahalad *et al.*, 2004; Kassianidou *et al.*, 2017), la forma difosforilada podría modificar su fosforilación en respuesta a la HPMP en BCE. Como se observa en las imágenes de la figura 22A, al incubar las monocapas de BCE en distintas soluciones hiperpolarizantes la ppMLC disminuye. Para comparar de forma cuantitativa la ppMLC de las imágenes de inmunofluorescencia entre las distintas condiciones hiperpolarizantes y el control, se realizó el mismo tipo de análisis que para la DPMP (cf. Figura 8C-D). Los valores de la densidad integrada normalizada (DI) de los tratamientos con las soluciones hiperpolarizantes son menores que con SC (Figura 22B). La frecuencia del intervalo

de DI con mayor número de eventos (0.1-0.2), de acuerdo con los datos obtenidos en la Figura 22B, es significativamente menor en respuesta a la HPMP (Figura 22C). Los resultados de Western blot parecen confirmar que la HPMP conduce a una disminución de la ppMLC (Figura 22D).



Figura 21- Efecto de la HPMP sobre la pMLC. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o con distintas soluciones hiperpolarizantes **(A-B).** Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para visualizar la pMLC y la actina-F. Barra: 30 μ m **(A).** Western blot para la pMLC **(B).** El gráfico muestra el porcentaje de la densidad integrada respecto al control a partir de un análisis densitométrico. Se representan promedios \pm desvío estándar. El control de la transferencia y la cuantificación de las bandas fueron realizados como se describe en Materiales y métodos. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes **(B).**

Figura 22- Efecto de la HPMP sobre la ppMLC. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o con distintas soluciones hiperpolarizantes **(A-C).** Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para visualizar la ppMLC y la actina-F. Barra: 30 μ m **(A)**. Histogramas de las frecuencias de las DI normalizadas de las imágenes de inmunofluorescencias **(B)**. Gráfico de la frecuencia promedio del intervalo con mayor número de eventos de DI normalizada de todos los tratamientos (0.1-0.2) **(C)**. Los asteriscos (*, **, ***) indican diferencias significativas (*p<0.09, **p<0.05, ***p<0.001, n=3) **(C)**. Western blot para la ppMLC **(D)**. El gráfico muestra el porcentaje de la densidad integrada respecto al control a partir de un análisis densitométrico. Se representan promedios ± desvío estándar. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al control (*p<0.03, n=3). El control de la transferencia y la cuantificación de las bandas fueron realizados como se describe en Materiales y métodos. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes **(D)**.



A los efectos de determinar si en respuesta a la HPMP también se producen cambios en las dos formas fosforiladas de la MLC en otros epitelios, realizamos estudios de inmunofluorescencia en monocapas de BAEC en cultivo. Como se menciona en una sección anterior, ninguna de las formas fosforiladas de la MLC se encuentra en la periferia. En respuesta a la HPMP no se observaron cambios en la pMLC (Figura 23) ni tampoco en la ppMLC (resultados no mostrados).



Figura 23- Efecto de la HPMP sobre la pMLC en BAEC. Las monocapas de BAEC en cultivo se incubaron durante 30 min con solución SC o con distintas soluciones hiperpolarizantes. Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para visualizar la pMLC y la actina-F. Barra: 30 μm.

2. Evaluación de los cambios de cAMP en respuesta a la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática

Teniendo en cuenta que la DPMP provoca un incremento en la concentración del cAMP en las monocapas de BCE, este segundo mensajero podría disminuir en respuesta a la HPMP. Por otro lado, se ha reportado que el cAMP conduce a una desfosforilación de la MLC (Aslam *et al.*, 2010; Sayner, 2011). Así, la disminución de la ppMLC inducida por la HPMP podría ser producto de un incremento del cAMP. Por ello, evaluamos mediante ELISA si existen cambios en su concentración al hiperpolarizar el PMP. Al incubar las monocapas de BCE en distintas soluciones hiperpolarizantes, no encontramos variaciones en el cAMP (Figura 24A).

Estudio de la posible participación de la PKA en las respuestas celulares a la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática

Si bien el principal activador de la PKA es el cAMP, se ha reportado que esta quinasa puede activarse por mecanismos independientes de este segundo mensajero (Ma *et al.*, 2005; Kohr *et al.*, 2010; Srinivasan *et al.*, 2013). Por lo tanto, a pesar de no haber encontrado cambios en la concentración de cAMP en respuesta a la HPMP, la PKA aún podría activarse y conducir a la desfosforilación de la ppMLC. Cuando las monocapas de BCE se trataron con distintas soluciones hiperpolarizantes no se obtuvo un perfil de bandas distinto al del control por Western blot empleando el anticuerpo que reconoce los sustratos fosforilados de la PKA (Figura 24B).

Los resultados obtenidos en estas dos últimas secciones sugiren que, en respuesta a la HPMP, no se activa la vía del cAMP/PKA, tal como ocurre durante la DPMP.



В



Figura 24- Efecto de la HPMP sobre la concentración de cAMP y la fosforilación de los sustratos fosforilados de la PKA. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o con distintas soluciones hiperpolarizantes **(A-B).** Cuantificación de la concentración de cAMP mediante ELISA **(A)**. Se grafica el porcentaje de la concentración de cAMP en relación al control. Se representan promedios ± desvío estándar (n=3). Western blot utilizando un anticuerpo que reconoce los sustratos fosforilados de la PKA **(B)**. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes.

4. Determinación de la activación de RhoA en respuesta a la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática

La pequeña GTPasa RhoA es un regulador de importancia del citoesqueleto de actina que podría participar en los cambios observados en respuesta a la HPMP. Para evaluar la activación de RhoA se efectuó el mismo tipo de ensayo que se realizó en los estudios correspondientes de la DPMP. Cuando las monocapas de BCE se trataron con distintas soluciones hiperpolarizantes no encontramos cambios en RhoA activo (Figura 25).



Figura 25- Efecto de la HPMP sobre la actividad de RhoA. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o con distintas soluciones hiperpolarizantes. Los lisados celulares se procesaron como en la Figura 19. El gráfico muestra el porcentaje de la densidad integrada respecto al control a partir de un análisis densitométrico. Se representan promedios ± desvío estándar. El control de la transferencia y la cuantificación de las bandas fueron realizados como se describe en Materiales y métodos. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes.

5. Estudio de la activación de ERK en respuesta a la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática

Se ha reportado que existe una población de ERK que se asocia directamente con el citoesqueleto de actina (Leinweber *et al.*, 1999; Vetterkind *et al.*, 2013). ERK puede modular la dinámica del citoesqueleto de actina (Mendoza *et al.*, 2015) y, a su vez, la tensión desarrollada por los haces de actomiosina pueden modular la activación de ERK (Hirata *et al.*, 2015). Asimismo, se ha constatado que ERK puede modular la fosforilación de la MLC (Carrillo-Sepúlveda and Barreto-Chaves, 2010; Haidari *et al.*, 2011), por lo que la vía de las MAP quinasas también podría estar involucrada en la disminución de la ppMLC observada luego de la HPMP. Es importante señalar que ERK es activada por los cambios del PMP en células epiteliales (Waheed *et al.*, 2010). En función de estos antecedentes, decidimos estudiar si ocurren cambios en la fosforilación de ERK en respuesta a la HPMP en las monocapas de células de BCE.

Luego de incubar las monocapas de células de BCE durante 30 minutos en soluciones hiperpolarizantes se observó un pequeño aumento de pERK en el citoplasma (Figura 26A). Asimismo, por Western blot se pudo constatar el incremento en la fosforilación de ERK en respuesta a la solución de ChoCl (Figura 26B). Los estudios preliminares realizados con la solución de NMDG sugieren que ésta tiene los mismos efectos sobre la MAPK (Figura 26B).





Figura 26- Efecto de la HPMP sobre pERK. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o con distintas soluciones hiperpolarizantes **(A-B)**. Las monocapas se fijaron y se realizó una tinción para visualizar la pERK, actina-F y los núcleos (con Hoechst). Barra: 50 μm **(A)**. Western blot para la pERK **(B)**. El gráfico muestra el porcentaje de la densidad integrada respecto al control a partir de un análisis densitométrico, únicamente con la solución de ChoCl. Se representan promedios ± desvío estándar. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al control (*p<0.0004, n=3). El control de la transferencia y la cuantificación de las bandas fueron realizados como se describe en Materiales y métodos. **(B)**.

Efecto de la inhibición de ERK sobre la disminución en la ppMLC y la remodelación del citoesqueleto de actina en respuesta a la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática

En virtud de que la HPMP indujo un incremento en la fosforilación de ERK, se realizaron experimentos para determinar si esta MAP quinasa participa en la compactación del anillo de actina cortical, la estabilidad de las uniones (Nin *et al.*, 2009) y en la disminución de la fosforilación de la ppMLC en respuesta a la HPMP. Para ello, las monocapas de BCE se incubaron en una solución de ChoCl en presencia del inhibidor de ERK, A6355. Como se observa en la Figura 27, las células incubadas en ChoCl presentan un anillo de actina periférico más intenso y delimitado que las monocapas control. Este resultado reproduce lo reportado en un trabajo previo de nuestro laboratorio (Nin *et al.*, 2009). En presencia del A6355 27 µM, no se visualizan estos cambios sobre el citoesqueleto de actina de las células BCE.



Figura 27- Efecto de la inhibición de pERK sobre la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a la HPMP. Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de A6355 27 μM. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de ChoCl y se agregó nuevamente el inhibidor a las células pretratadas con el mismo. Las monocapas se fijaron y se realizó una tinción de la actina con faloidina FITC. Barra: 30 μm.

Para evaluar si ERK se encuentra involucrado en los efectos de la HPMP sobre las uniones célula-célula, realizamos un ensayo de desestabilización de dichas uniones removiendo el calcio extracelular en presencia del inhibidor de ERK. Al incubar las monocapas de BCE en ChoCl sin calcio y con A6355 27 μM, la acción protectora de la HPMP sobre las uniones celulares disminuye de manera significativa (Figura 28A-B). Como se observa en la Figura 28A, al incubar las células BCE en soluciones salinas sin calcio los contactos celulares se pierden y aparecen espacios entre las células. Se cuantificó el área entre los espacios intercelulares, y no se encontraron diferencias significativas entre las monocapas de BCE tratadas con ChoCl más

A6355 y el control (SC más A6355) (Figura 28B). Se obtuvieron resultados preliminares similares con la solución de NMDG, en lugar de ChoCl (resultados no mostrados).



Figura 28- Efecto de la inhibición de ERK frente a la acción protectora de la HPMP sobre las uniones celulares. Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de A6355 27 μ M. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de ChoCl y se agregó nuevamente el inhibidor a las células pretratadas con el mismo. Finalmente, la mitad de las monocapas se transfirieron a las soluciones correspondientes sin calcio y la otra mitad permaneció en las soluciones en que se encontraban. A los 10 min las células se fijaron y se realizó una tinción de la actina-F con faloidina FITC. Barra: 120 μ m. (A). El gráfico muestra el porcentaje del área entre las células respecto al control. Se representan promedios ± desvío estándar. Los asteriscos (*, **, ***) indican diferencias significativas (*p<8x10⁻⁶,**p<3x10⁻¹⁵,***p<5x10⁻¹⁸, n=3) (B).

Para continuar evaluando la participación de ERK en la respuesta a la HPMP, estudiamos si el incremento en pERK encontrado puede conducir a una disminución de la ppMLC, como se ha reportado por otros autores en situaciones en las que tiene lugar un aumento en la actividad de ERK (Mavria *et al.*, 2006; Im and Kazlauskas, 2007; Deng *et al.*, 2011). Para ello evaluamos la ppMLC al hiperpolarizar el PMP con ChoCl en presencia del A6355. Por inmunofluorescencia se encontró que la inhibición de pERK atenúa la desfosforilación de la ppMLC provocada por la HPMP (Figura 29A-C). Al analizar estas imágenes, se encontró que la distribución de los valores de DI de las monocapas incubadas con ChoCl y A6355 es similar al control (SC más A6355) (Figura 29B). Como se observa en la Figura 29C no hay diferencias significativas en la frecuencia del intervalo de DI con mayor número de eventos de todos los tratamientos (0,1-0,2) entre el tratamiento con ChoCl más el A6355 y el control (SC más A6355). Estos datos parecen indicar que el A6355 atenúa el efecto de la HPMP sobre la ppMLC.

Si bien en los experimentos de esta sección se empleó únicamente el ChoCl y habría que repetir los ensayos con otras soluciones hiperpolarizantes, los resultados obtenidos son consistentes con la idea de que la vía de la ERK podría estar implicada en los cambios del citoesqueleto de actina cortical en respuesta a la HPMP.



Figura 29- Efecto de la inhibición de ERK sobre la disminución de la ppMLC en respuesta a la HPMP. Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de A6355 27 μ M. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de ChoCl y se agregó nuevamente el inhibidor a las células pretratadas con el mismo (A-C). Las monocapas se fijaron y se realizó una tinción de la ppMLC. Barra: 30 μ m (A). Histogramas de las frecuencias de las DI de las imágenes de inmunofluorescencia (B). Gráfico de la frecuencia promedio del intervalo con mayor número de eventos de DI de todos los tratamientos. (0.1-0.2). El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al control (*p<0.005, n=3) (C).

Parte C: Estudio de la participación de la vía del cAMP/PKA en la reorganización de los microtúbulos en respuesta a la despolarización del potencial de membrana plasmática y en el acoplamiento de la remodelación de los microfilamentos y microtúbulos

La vía del cAMP/PKA, además de estar involucrada en la remodelación del citoesqueleto de actina en respuesta a la DPMP, podría intervenir en la despolimerización de los MT corticales, tal como fuera mencionado en la Introducción. A su vez, el citoesqueleto de actina y tubulina pueden coordinar su funcionamiento para mediar numerosos procesos celulares (ver "Interacciones entre los microtúbulos y los filamentos de actina" en la Introducción). Por estos motivos decidimos estudiar si existe una interrelación entre las respuestas de los microfilamentos y los microtúbulos a la DPMP.

1. Estudio del efecto de la despolarización del potencial de membrana plasmática sobre los microtúbulos

A fin de profundizar en el estudio de los efectos del DPMP en los microtúbulos, ya observados en un trabajo previo de nuestro laboratorio (Chifflet *et al.*, 2003), se evaluaron los cambios del citoesqueleto de tubulina en respuesta a la DPMP mediante microscopía confocal.

Los estudios de microscopía confocal nos permitieron visualizar distintas poblaciones de microtúbulos en las monocapas de BCE: una población de microtúbulos corticales que se extiende longitudinalmente a lo largo del eje ápico-basal, otra que se nuclea en un centrosoma apical y una red de microtúbulos basales cortos sin una orientación definida (Figura 30A). Esta distribución es similar a la encontrada en otros epitelios (Reilein *et al.*, 2005; Toya and Takeichi, 2016) (cf. Figura 3). Los MT que se extienden longitudinalmente entre los dominios apicales y basales muy cercanos a la corteza parecen disminuir en respuesta a la DPMP (Figura 30) (se observan efectos similares con NaGln, Na₂SO₄, resultados no mostrados). La reducción de los microtúbulos corticales ocurre en la periferia celular, tanto en aquellos sitios en los que las células perdieron los contactos celulares (Figura 30A), como en aquellas zonas en las que las células permanecen unidas por cadherina (Figura 30C). La cuantificación del área de microtúbulos corticales (ver Materiales y métodos) muestra una disminución significativa de los mismos en respuesta al KGIn (Figura 30B).

Figura 30- Respuesta de las distintas poblaciones de MT a la DPMP. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC o KGln. Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para α -tubulina y actina-F **(A)** o cadherina **(C)**. Imágenes de microscopía confocal en donde se observan proyecciones Z de stacks de 1 μ M de los planos apicales, intermedios y basales (se obtienen resultados similares con NaGln, Na₂SO₄, resultados no mostrados) **(A)**. Las puntas de flechas en el control indican los MT corticales y en el KGln zonas en donde los MT se despolimerizaron. Barra: 30 μ m **(A y C)**. El gráfico muestra el porcentaje del área de los MT corticales respecto al control **(B)**. Se representan promedios ± desvío estándar. En cada experimento se midió el área de un promedio de 180 células por tratamiento. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al control (*p<1x10⁻¹², n=3) **(B)**.



cadherina

adherina

Control

KGIn

2. Efecto de la inhibición de la sAC y la PKA en la respuesta de los microtúbulos a la DPMP

En este trabajo consideramos de interés evaluar si la vía del cAMP/PKA se encuentra involucrada en la despolimerización de los MT corticales en respuesta a la DPMP, por dos razones principales. En primer lugar, dicha vía se activa con la DPMP y parece participar en la remodelación del citoesqueleto de actina en las monocapas de BCE (cf. Figuras 14 y 17). En segundo lugar, se ha encontrado que en células de endotelio vascular el incremento del "pool" de cAMP citosólico por la activación sAC induce la reducción de los MT periféricos (Prasain *et al.*, 2009). Con el fin de estudiar la posible participación de la vía del cAMP/PKA, se determinó el efecto de la inhibición de la sAC y de la PKA sobre los MT corticales al inducir la DPMP con KGln.

Cuando las monocapas se incubaron en KGln en presencia del KH7 15 μM, se pudo observar, una menor reducción de los microtúbulos corticales provocada por la DPMP (Figura 31). Al cuantificar el área de los MT corticales, no se encontró una diferencia significativa entre las monocapas tratadas con KGln más el KH7 y su control (SC más KH7) (Figura 31B). Asimismo, la inhibición de la PKA también parece atenuar la remodelación de los microtúbulos corticales con KGln (Figura 32).

A pesar de que en los experimentos de esta sección se empleó únicamente el KGIn, y habría que repetir los ensayos con otras soluciones despolarizantes, los resultados son consistentes con la idea de que la vía del cAMP/PKA podría estar involucrada en la reorganización de los MT corticales inducida por la DPMP.



Figura 31- Efecto de la inhibición de la sAC sobre la remodelación de los microtúbulos corticales en respuesta a la DPMP. Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de KH7 15 μ M. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de KGln y se agregó nuevamente el inhibidor a las células pretratadas con el mismo. Las monocapas se fijaron y se realizó una tinción doble para la α -tubulina y la actina-F. Las puntas de flechas en la condición con KGln indican zonas en donde los MT corticales se despolimerizaron y los asteriscos las zonas donde las células se separan Barra: 30 μ m (A). El gráfico muestra el porcentaje del área de los MT corticales respecto al control. Se representan promedios ± desvío estándar. En cada experimento se midió el área de un promedio de 180 células por tratamiento. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al control (*p<1x10⁻⁵, n=3) (B).



Figura 32- Efecto de la inhibición de la PKA sobre la despolimerización de los microtúbulos corticales en respuesta a KGIn. Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de iPKA 20 μ M. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de KGIn y se agregó nuevamente el inhibidor a las células pretratadas con el mismo. Las monocapas se fijaron y se realizó una tinción doble de la α -tubulina y de la actina-F. Las puntas de flechas en la condición con KGIn indican zonas en donde los MT corticales se despolimerizaron y los asteriscos las zonas donde las células se separan. Barra: 30 μ m (A). El gráfico muestra el porcentaje del área de los MT corticales respecto al control. Se representan promedios ± desvío estándar. En cada experimento se midió el área de un promedio de 180 células por tratamiento. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al control (*p<1x10⁻⁵, n=3) (B).

3. Estudio de la interacción entre las respuestas de los microtúbulos y de los microfilamentos a la DPMP

En virtud del hallazgo de que la vía del cAMP/PKA participa tanto en la reorganización del citoesqueleto de la actina como en la de los microtúbulos corticales en respuesta a la DPMP y de que existe una extensa literatura en donde se reporta que ambos filamentos interaccionan, se investigó si la respuesta de los microfilamentos y microtúbulos a la DPMP está acoplada. Para ello, se utilizaron agentes que estabilizan y desestabilizan ambos filamentos y se determinó su efecto durante la DPMP.

Para evaluar si la despolimerización de los MT en respuesta a la DPMP es dependiente de la reorganización del citoesqueleto de actina, las monocapas de BCE se incubaron en presencia de drogas que estabilizan y desestabilizan los filamentos de actina, jasplakinolide y citocalasina D respectivamente. En estos estudios, la dosis de las drogas que se utilizó es la mínima para provocar una respuesta sobre los MF sin alterar la morfología celular y los microtúbulos. En presencia de jasplakinolide 20 μ M, se pudo observar que las células presentaban un anillo de actina-F cortical periférico poco definido debido al desplazamiento de la actina hacia el centro celular (Figura 33A). A su vez, el jasplakinolide disminuyó de manera significativa la despolimerización de los MT corticales y la separación de las células provocada por el KGIn (Figura 33A). Al cuantificar el área de los MT corticales de los distintos tratamientos, no se encontró una diferencia significativa entre las monocapas tratadas con la solución de KGIn más jasplakinolide y su control (SC más jasplakinolide) y sí la hay con KGIn (Figura 33B). Como es de esperar, la citocalasina D conduce a la disminución de la actina-F cortical (Figura 34A). El área de los MT corticales de las monocapas tratadas con KGIn más la citocalasina D es significativamente menor a su control (SC más citocalasina D) y no hay diferencias entre las células incubadas con KGln y aquellas con KGln más citocalasina D (Figura 34B). Por consiguiente, a pesar de que en los experimentos de esta sección se empleó únicamente el KGIn y habría que repetir los ensayos con otras soluciones despolarizantes, los resultados sugieren que, mientras la estabilización de los microfilamentos interfiere con la respuesta de los microtúbulos a la DPMP, la desestabilización de la actina-F no la afecta.



Figura 33- Efecto de la estabilización de los microfilamentos sobre la remodelación de los microtúbulos corticales en respuesta al KGIn. Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de jasplakinolide 20 nM. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de KGIn y se agregó nuevamente el inhibidor a las células pretratadas con el mismo. Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para la α -tubulina y la actina-F. Las puntas de flechas en la condición con KGIn indican zonas en donde los MT corticales se despolimerizaron y los asteriscos las zonas donde las células se separaron. Barra: 30 µm (A). El gráfico muestra el porcentaje del área de los MT corticales respecto al control (B). Se representan promedios ± desvío estándar. En cada experimento se midió el área de un promedio de 180 células. El asterisco (*) indica diferencia significativa (*p<1x10⁻⁵, n=3) (B).



Figura 34 - Efecto de la destabilización de los microfilamentos sobre la remodelación de los microtúbulos corticales en respuesta al KGIn. Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de citocalasina D 25 nM. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de KGIn y se agregó nuevamente el inhibidor a las células pretratadas con el mismo. Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para la α -tubulina y la actina-F. Las puntas de flechas en la condición con KGIn indican zonas en donde los MT corticales se despolimerizaron y los asteriscos las zonas donde las células se separaron. Barra: 30 µm (A). El gráfico muestra el porcentaje del área de los MT corticales respecto al control. Se representan promedios ± desvío estándar. En cada experimento se midió el área de un promedio de 180 células. El asterisco (*) indica una diferencia significativa (*p<2x10⁻⁷, n=3) (B).

Asimismo, se investigó si la remodelación del citoesqueleto de actina durante la DPMP está supeditada a la despolimerización de los MT corticales. Para ello se empleó paclitaxel y nocodazol, drogas que estabilizan y desestabilizan los microtúbulos respectivamente. Las dosis de estas drogas tuvieron un efecto visible sobre los MT, pero no alteraron la morfología celular ni el anillo de actina-F cortical. Al incubar las monocapas en SC con paclitaxel 10 nM se observa un incremento general de los microtúbulos, y no se observan grandes cambios en la actina (Figura 35). Cuando se despolariza el PMP, el paclitaxel no bloquea el efecto de la DPMP sobre la actina-F y sobre las uniones celulares (Figura 35). Cuando las monocapas se incuban en SC con nocodazol 0.1 μM, se observa únicamente una población de microtúbulos centrosomales, la actina cortical no sufre grandes modificaciones y se forma una gran cantidad de fibras de estrés basales. Al despolarizar el PMP en presencia de nocodazol 0.1 μ M, la población de MT se ve disminuida, el efecto de la DPMP sobre los microfilamentos se encuentra atenuado y las células prácticamente no se separan como ocurre con KGln (Figura 35). Pese a que en los experimentos de esta sección se empleó únicamente el KGIn y habría que repetir los ensayos con otras soluciones despolarizantes, los resultados parecen indicar que, mientras la estabilización del citoesqueleto de tubulina no interfiere con la remodelación de los microfilamentos provocada por la DPMP, la desestabilización de los microtúbulos impide la reorganización de la actina cortical.



Figura 35- Efecto de la estabilización y desestabilización de los microtúbulos sobre la reorganización de los microfilamentos en respuesta a la DPMP. Las monocapas de células BCE se preincubaron 30 min en MEM sin suero en ausencia o en presencia de paclitaxel 10 nM o nocodazol 0.1 μ M. Luego, se transfirieron por 30 min a SC o a la solución de KGIn, con el agregado de los inhibidores a las células pretratadas con los mismos. Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para la α -tubulina y la actina-F. Las puntas de flechas en la condición con KGIn indican zonas en donde los MT corticales se despolimerizaron y los asteriscos las zonas donde las células se separaron. Barra: 30 μ m.

Parte D: Estudios de los efectos de la gramicidina sobre intermediarios de vías de señalización

La gramicidina es un ionóforo de cationes monovalentes, ampliamente utilizado para manipular experimentalmente el PMP en diversos sistemas celulares (Kelkar and Chattopadhyay, 2007). En condiciones normales de reposo, cuando el PMP se encuentra cercano al potencial de equilibrio del potasio, la gramicidina provoca la DPMP al mediar la entrada de sodio en soluciones fisiológicas (Pittet *et al.*, 1990; Brailoiu *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2017). Al reemplazar el sodio extracelular por ChoCl, la presencia de la gramicidina determina una HPMP (Carpenter and Parsons, 1978; Koch *et al.*, 1988). La gramicidina ha sido utilizada en nuestro laboratorio para provocar la DPMP en células BCE y se ha comportado como los otros agentes despolarizantes empleados (Chifflet *et al.*, 2003; Chifflet *et al.*, 2004). En el curso de este trabajo hallamos que la gramicidina provoca efectos independientes de su condición como ionóforo. Es por esta razón que la gramicidina no se utilizó como agente despolarizante en esta tesis.

1. Efectos de la gramicidina sobre la fosforilación y localización de ERK

Como se describiera en secciones anteriores, no encontramos cambios en los niveles de fosforilación de ERK ni en su localización celular en respuesta a la DPMP y sí observamos que la HPMP provoca un incremento de pERK a nivel citosólico. Sin embargo, cuando las monocapas de células BCE se incubaron con gramicidina en SC (condición despolarizante) o en soluciones hiperpolarizantes (condición hiperpolarizante), se observó un incremento de pERK a nivel nuclear (Figura 36A-B). En concordancia con estos resultados, el análisis de Western blot reveló en estas dos condiciones un incremento de pERK en relación al control (Figura 36C).

En células de melonoma de murino (B16F1), al igual que en las células de BCE, la gramicidina en SC o en la solución de ChoCl también provoca la translocación de pERK al núcleo (Figura 37A). Los resultados preliminares de Western blot parecen indicar que pERK también aumenta con las soluciones hiperpolarizantes (ChoCl y NMDG) y no varía con KGIn (Figura 37B). Sin embargo, a diferencia de lo que observamos en BCE, la cantidad de pERK no se ve afectada por la gramicidina en estas células (Figura 37B). En función de los resultados obtenidos en las células BCE y B16F1, podríamos concluir que la gramicidina tiene efectos propios sobre ERK que son independientes de su condición de ionóforo.



Figura 36- Efecto de la gramicidina sobre pERK en células BCE. Las monocapas en cultivo se incubaron durante 30 min con SC, KGIn o ChoCl, o con gramicidina en SC o en ChoCl **(A-C).** Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para visualizar pERK y los núcleos (Hoechst). Barra: 30 μ m **(A).** Gráfico del porcentaje de núcleos ERK positivos. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al control (*p<0.001, n=3) **(B)**. Western blot para pERK **(C).**





2. Efecto de la gramicidina sobre la fosforilación de la ppMLC

Como se describiera en secciones anteriores, la DPMP provoca un incremento y la HPMP una disminución de la ppMLC. Luego de incubar las monocapas de células BCE durante 30 minutos con gramicidina, como un agente despolarizante (en la SC) o hiperpolarizante (en la solución de ChoCl), se observó una disminución significativa de la ppMLC en relación al control (Figura 38A). Por Western blot también se pudo constatar la desfosforilación de la ppMLC en respuesta a la gramicidina (Figura 38B). Los resultados obtenidos parecen indicar que la gramicidina es capaz de provocar cambios en la fosforilación de la ppMLC, independientemente de su condición de ionóforo.

Figura 38- Efecto de la gramicidina sobre la ppMLC. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC, KGIn o ChoCl, o con gramicidina en SC o ChoCl **(A-D).** Las monocapas se fijaron y se realizó una doble tinción para visualizar la ppMLC y la actina-F. Barra: 30 μm **(A).** Histogramas de las frecuencias de las DI normalizadas de las imágenes de inmunofluorescencias **(B)**. Gráfico de la frecuencia promedio del intervalo con mayor número de eventos de DI normalizada de todos los tratamientos (0.1-0.2). El asterisco (*) indica diferencia significativa (*p<0.01, n=3) **(C)**. Resultado preliminar de un Western blot para la ppMLC **(D)**. El gráfico muestra el porcentaje de la densidad integrada respecto al control a partir de un análisis densitométrico de un experimento (n=1) **(D)**. El control de la transferencia y la cuantificación de las bandas fueron realizados como se describe en Materiales y métodos. Se hace notar que el orden de las muestras Western blot no se corresponde con el del gráfico del análisis densitométrico, el que se realizó siguiendo el orden del gráfico mostrado en **B** a los efectos de faciltar la comparación con el mismo.



3. Efecto de la gramicidina sobre la fosforilación de tirosinas

La fosforilación de tirosinas es una modificación postraduccional implicada en la activación de vías de señalización que regulan múltiples procesos celulares (Hubbard and Till, 2000; Lim and Pawson, 2010). Las tirosinas quinasas son activadas en respuesta a diversos estímulos extracelulares. Clásicamente, los receptores de membrana con actividad de tirosina quinasa se activan cuando se unen a su ligando, pero también se ha reportado que existen tirosinas quinasas citoplasmáticas activadas por estímulos diversos (ibid.). En particular, Src puede activarse por la aplicación de campos eléctricos externos (Zhao *et al.*, 2006). Esto nos impulsó a investigar si la fosforilación de las tirosinas se modificaba con los cambios de PMP.

Cuando las monocapas se incubaron con gramicidina en SC (condiciones despolarizantes) y los otros agentes depolarizantes (la Figura 39 muestra los resultados para el KGln, pero se obtienen resultados similares para el NaGln y el Na₂SO₄), se pudo observar que la señal de las tirosinas fosforiladas se desplaza de la periferia al citoplasma en algunas células y se pierde en otras. Cuando el sodio extracelular es reemplazado por colina, la gramicidina no tiene efectos en la distribución de las tirosinas fosforiladas, igual a como se observa con la colina sola u otros agentes hiperpolarizantes (por ejemplo, el NMDG) (Figura 39).

Los resultados descritos en las secciones anteriores revelan que la gramicidina es capaz de afectar, por sí misma, la activación y localización de algunos intermediarios y/o efectores de vías de señalización de manera independiente de sus efectos eléctricos como ionóforo. Sin embargo, el efecto de la gramicidina en la localización de la señal de las tirosinas fosforiladas sugiere que se debe a sus propiedades como agente despolarizante.



Figura 39- Efecto de la gramicidina sobre las tirosinas fosforiladas. Las monocapas de células BCE en cultivo se incubaron durante 30 min con SC, una solución despolarizante (KGIn) o una hiperpolarizante (ChoCl), o con gramicidina en SC o en solución de ChoCl. Las monocapas se fijaron y se realizó una tinción para visualizar las tirosinas fosforiladas. Barra: 30 μm.
Discusión

En trabajos previos de nuestro laboratorio se encontró que los cambios del potencial de membrana plasmática provocan la remodelación del citoesqueleto de actina y tubulina asociado a las uniones intercelulares en epitelios de transporte (Chifflet et al., 2003; Chifflet et al., 2004; Nin et al., 2009). El objeto de investigación que surge naturalmente de estos trabajos es la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que están involucrados en esta respuesta. Frente a este objetivo surgen diferentes posibilidades de estudio. En primer lugar, el hecho de que los filamentos de actina y tubulina sean polímeros cargados y que éstos estén en el radio de alcance del campo eléctrico generado por el PMP, posibilita que variaciones en el PMP afecten directamente la estructura y las propiedades funcionales de los filamentos corticales (Cantiello et al., 1991; Tuszyński et al., 2004; Priel et al., 2006; Goldmann, 2008). Otra alternativa es que los cambios del PMP sean detectados por proteínas de membrana, y que éstas activen vías de señalización que modifiquen la organización los microfilamentos y los microtúbulos (Gomez and Daniotti, 2007; Waheed et al., 2010; Levin, 2014; Levin and Martyniuk, 2017; Levin et al., 2017). La remodelación de estos filamentos también podría ser modulada a la vez por vías de señalización y directamente por el PMP. Asimismo, no se puede descartar que los cambios estructurales en el citoesqueleto provoquen la activación de vías de señalización, ya que éste se encuentra asociado a moléculas que inducen diversas señales intracelulares. En esta tesis nos centramos en estudiar la existencia de vías de señalización activadas por los cambios del PMP responsables de modular la reorganización del citoesqueleto de actina y tubulina en esta respuesta.

1 Participación de la vía del cAMP/PKA en la remodelación del citoesqueleto de actina y tubulina en respuesta a la despolarización del potencial de membrana plasmática

Nuestra investigación comenzó con el estudio de la fosforilación de la MLC, la cual regula la contracción de la miosina no muscular (Adelstein and Anne Conti, 1975; Vicente-Manzanares *et al.*, 2009). La MLC es un efector de varias vías de señalización que provocan la reorganización del anillo de actina cortical (Satpathy *et al.*, 2004; Birukova *et al.*, 2005; Srinivas *et al.*, 2006; Samarin *et al.*, 2007; Kakiashvili *et al.*, 2009; Bogatcheva *et al.*, 2011; Hirano and Hirano, 2016). Así, por ejemplo, en monocapas de células BCE la trombina activa RhoA/ROCK y la PKC, ésta provoca un aumento en la fosforilación de la MLC y una remodelación del anillo actina de cortical, y así desestabiliza las uniones intercelulares (Satpathy *et al.*, 2004). La

histamina también activa a la PKC en cultivos de BCE y tiene efectos similares a la trombina sobre los microfilamentos corticales, la MLC y la barrera epitelial (Srinivas et al., 2006). En el presente trabajo observamos que, en células de BCE en cultivo, al despolarizar el PMP se encuentra una disminución de la pMLC y no se detectan cambios en la ppMLC. En función del efecto de la DPMP sobre la pMLC, comenzamos estudiando aquellas vías de señalización celular que conducen a una disminución de la misma. Como se mencionó en la Introducción, se ha reportado que la activación de la vía del cAMP/PKA provoca una desfosforilación de la MLC (Moy et al., 1993; Prasain et al., 2009; Aslam et al., 2010). En consistencia con los resultados reportados por estos autores, en este trabajo encontramos un incremento del cAMP en células de BCE en cultivo en respuesta a la DPMP. El incremento en el cAMP puede ser producto de la activación de la adenililciclasa soluble o de la transmembrana. Como se encuentra descrito en la Introducción, un incremento del cAMP próximo a la membrana, dependiente de la adenililciclasa transmembrana, evita la formación de espacios intercelulares y protege a la barrera epitelial de agentes desestabilizantes de la misma (Moy et al., 1993; Qiao et al., 2003; Aslam et al., 2010). Por otro lado, la activación de la adenililciclasa soluble conduce a la retracción de los bordes celulares y al debilitamiento de la barrera epitelial en células endoteliales (Cowell et al., 2005; Sayner et al., 2006; Prasain et al., 2009; Sayner et al., 2011; Balczon et al., 2013). En las células BCE observamos que el aumento de cAMP, en respuesta a la DPMP, es dependiente de la adenililciclasa soluble y no de la transmembrana. A su vez, la inhibición de la adenililciclasa soluble reduce la remodelación de los microfilamentos y atenúa de manera significativa la disminución de la pMLC producto de la DPMP en las células BCE. Teniendo en cuenta que el campo eléctrico generado por el PMP se extingue a distancias mayores de un nanómetro (Olivotto et al., 1996), nos resultó de interés que la adenililciclasa transmembrana, que se encuentra insertada en la membrana plasmática, no varíe su actividad con la DPMP y que sí lo haga la adenililciclasa soluble que está mayoritariamente alejada de la membrana. Por esta razón, es posible que la DPMP modifique intermediarios próximos a la membrana y que éstos actúen sobre la adenililciclasa soluble. Ésta es activada por calcio y por bicarbonato (Lee et al., 2014; Steegborn, 2014). En estudios realizados en nuestro laboratorio se observó que existe un incremento fugaz de calcio citosólico en respuesta a la DPMP (Chifflet et al., 2012). Sin embargo, quelar el calcio intracelular con BAPTA-AM no impide la remodelación del citoesqueleto de actina provocado por la DPMP (resultados publicados en la Tesis de Maestría de Verónica Nin), por lo tanto, no parece que éste sea el mecanismo de activación de la sAC. Por otro lado, existe evidencia de que en células BCE la DPMP con NaGIn induce la alcalinización intracelular por la entrada de HCO₃- (Bonanno et al., 1998). La incubación de las mismas células con una solución despolarizante que contiene gluconato de NMDG y gluconato de potasio (en una relación 1:1) provoca una pequeña alcalinización transitoria (ibid.). En nuestro modelo, la DPMP también podría incrementar los niveles de HCO₃⁻ intracelular y éste a su vez activar a la adenililciclasa soluble. Otra posibilidad es que la adenilciclisa soluble, que se ha visto asociada a la membrana plasmática (Chen et al., 2013), se active directamente por la DPMP. La PKA, uno de los principales efectores del cAMP, también parece participar en la respuesta de la DPMP en células de BCE. Empleando un anticuerpo que reconoce los sustratos fosforilados de la PKA mediante Western blot encontramos un incremento de dos bandas de aproximadamente de 50 y 70 KDa. Asimismo, en presencia de un inhibidor de la PKA se atenúan los efectos de la DPMP sobre los microfilamentos y la pMLC. A fin de identificar los sustratos fosforiladas de la PKA y otras proteínas que pudiesen cambiar su fosforilación con la DPMP, se realizaron estudios en geles bidimensionales y se colorearon con una tinción para proteínas fosforiladas. En extractos celulares de las monocapas de BCE incubadas en la solución despolarizante se identificaron tres "spots" de proteínas fosforiladas que aumentan con respecto al control. Uno de estos "spots" tiene un peso molecular de aproximadamente 38.5 KDa y los otros dos de 54.5 KDa. Los últimos "spots" podrían corresponder a la banda de los sustratos fosforilados de la PKA en el entorno de los 50 KDa, aunque es necesario confirmar estos datos por espectrometría de masas. El hecho de no poder detectar en los geles 2D la banda de aproximadamente 70 KDa puede deberse a dos factores. En primer lugar, los buffers de extracción y métodos de purificación de las muestras utilizados en el Western blot y en los geles bidimensionales difieren en su composición. En segundo lugar, la sensibilidad del anticuerpo que permite identificar a los sustratos fosforilados de la PKA es mucho mayor que las tinciones utilizadas para visualizar los "spots" por Western blot. Asimismo, quedan pendientes los estudios de espectrometría de masas para identificar los "spots" de los geles bidimensionales.

La vía del cAMP/PKA podría conducir a la remodelación de la actina y a la disminución de la pMLC a través de diversos mecanismos. En los estudios realizados en células de endotelio vascular el aumento del cAMP citosólico por acción de la adenililciclasa soluble quimérica provoca la despolimerización de los microtúbulos, los que a su vez serían responsables de la formación de los espacios intercelulares y de la desfosforilación de la pMLC (Prasain *et al.*, 2009). Sin embargo, en nuestro sistema celular no hemos encontrado que la estabilización de los microtúbulos con paclitaxel inhiba los efectos del DPMP sobre el citoesqueleto de actina y la retracción de los bordes celulares. La PKA también podría conducir a la desfosforilación de la pMLC a través de dos mecanismos (ver Figura 2). Por un lado, fosforilando e inactivando al

inhibidor endógeno de la fosfatasa de la MLC, el CPI-17 (Aslam *et al.*, 2010). Por el otro, fosforilando e inactivando a la quinasa de la MLC (Verin *et al.*, 1998).

La GTPasa RhoA juega un rol central en la remodelación del citoesqueleto de actina. Como mencionamos en párrafos anteriores, se encuentra reportado que la activación de RhoA/ROCK conduce a la remodelación del anillo de actina cortical en células BCE (Satpathy *et al.*, 2004). Si bien en este trabajo de tesis encontramos que tiene lugar un aumento en la actividad de RhoA en células BCE, no encontramos que la inhibición de la ROCK atenúe los efectos de la DPMP sobre el citoesqueleto de actina. A pesar de que se ha descrito que el cAMP conduce a la disminución de RhoA activo (Lang *et al.*, 1996; Ellerbroek *et al.*, 2003) y nuestros resultados indican que en las células BCE el cAMP aumenta durante la DPMP, RhoA se activa en estas condiciones. Una posible explicación para esta aparente contradicción podría deberse a la acción del activador de RhoA, GEF-H1 (Ren *et al.*, 1998), el que es liberado a raíz de la despolimerización de los microtúbulos (Krendel *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2008). Así, la activación de RhoA durante la DPMP podría deberse a la despolimerización de los microtúbulos.

En este trabajo también estudiamos la participación de la ERK en la respuesta a la DPMP, ya que esta MAP quinasa se activa con la DPMP en las células de epitelio renal (Waheed *et al.*, 2010). Asimismo, en la literatura se encuentra reportado que el cAMP inhibe (Cook and McCormick, 1993; Wu *et al.*, 1993a; Häfner *et al.*, 1994) y también activa a ERK (Young *et al.*, 1994; Vossler *et al.*, 1997). La acción del cAMP sobre la MAP quinasa parece depender del tipo celular, del "pool" de cAMP involucrado y de los factores que activan la vía de ERK (Houslay and Kolch, 2000). Sin embargo, a pesar de estos antecedentes, en las células BCE no encontramos cambios en los niveles de fosforilación de ERK ni en su localización celular como consecuencia de los tratamientos despolarizantes del potencial de membrana. Estas diferencias entre nuestros resultados y los reportados en la literatura podrían deberse a que, durante la DPMP, en las células BCE se activan vías de señalización diferentes a las de las células utilizadas en esos estudios.

Luego de una búsqueda bibliográfica exhaustiva, sólo encontramos dos trabajos, realizados por el grupo de Szaszi, en donde se ha estudiado la activación de vías de señalización celular que modifican el citoesqueleto en respuesta al PMP. En ellos se encuentra que, en células de epitelio renal (MDCK y LLC-PK1), la DPMP activa la vía de Ras/Ref/MEK/ERK/GEF-H1/Rho/ROCK y aumenta la ppMLC (Szaszi et al., 2005; Waheed et al., 2010). En células BCE encontramos que ocurre activación de cAMP/PKA, incremento de RhoA activo y no hallamos cambios en la fosforilación de pERK en respuesta a la DPMP. Las discrepancias en las vías de señalización activadas en repuesta a la DPMP en las células de epitelio renal y BCE podrían explicase por diferencias intrínsecas entre ambos epitelios. En uno de los aspectos en que difieren estos epitelios es en el tipo de cadherinas que forman las uniones adherentes. Las células de endotelio córnea presentan la N-cadherina (Ying-Ting et al., 2008) mientras que las células de epitelio renal la E-cadherina (Wu et al., 1993b). Esta diferencia no es menor si se considera que las colas citoplasmáticas de las cadherinas interaccionan con proteínas que son capaces de desencadenar señales intracelulares (Wenjun et al., 2014). Asimismo, resultados no publicados de nuestro laboratorio parecen indicar que el citoesqueleto de actina cortical no se remodela en respuesta a la DPMP en células de epitelio renal (MDCK) (resultados presentados en forma de poster en las XI Jornadas de la SUB, (Correa et al., 2005)). Es importante destacar que en condiciones basales la expresión y la distribución celular de la ppMLC en las células epiteliales renales es diferente a la de las células BCE (Szaszi et al., 2005). En efecto, en las células epiteliales renales la expresión de la ppMLC es muy baja y presenta una distribución citosólica difusa (ibid). Considerando estos antecedentes, ante un determinado estímulo no es extraño que en ambos epitelios no se activen las mismas vías de señalización.

En células endoteliales microvasculares, la activación de la adenililciclasa soluble provoca la reorganización de los microtúbulos periféricos (Prasain *et al.*, 2009). Debido a que en nuestro laboratorio se encontró que ocurre una remodelación del citoesqueleto de tubulina al despolarizar el PMP, también estudiamos si la vía del cAMP/PKA estaba involucrada en dicha respuesta. En primer lugar, se estudiaron en mayor profundidad los cambios en los microtúbulos por microscopía confocal. Utilizando este procedimiento pudimos identificar las tres poblaciones de estos filamentos descritos en la bibliografía: una población de microtúbulos corticales que se extiende longitudinalmente a lo largo del eje ápico-basal, otra que se nuclea en un centrosoma apical y una red de microtúbulos basales cortos sin una orientación definida. La población que resulta más afectada por la DPMP es la que se extiende longitudinalmente entre los dominios apicales y basales muy cercana a la corteza. Estos microtúbulos corticales se despolimerizan en respuesta a la DPMP, aún en aquellos casos en que las uniones dependientes de cadherina no parecen haberse modificado. Al igual que con los microfilamentos, la inhibición de la adenililciclasa soluble atenúa la remodelación de los microtúbulos corticales en respuesta a la DPMP. Esta reorganización de los microtúbulos

113

podría involucrar a tau, una proteína asociada a los microtúbulos. Tal como se señaló en la Introducción, cuando tau es fosforilada por la PKA en la ser 214 pierde su unión a los microtúbulos, lo que conduce a la desestabilización de estos filamentos (Prasain *et al.*, 2009; Balczon *et al.*, 2013).

Finalmente, a pesar de que nuestros resultados parecen indicar que la vía del cAMP/PKA se encuentra implicada en la remodelación del citoesqueleto de actina y de tubulina en las células BCE en respuesta a la DPMP, no es posible descartar que otras vías de señalización también se encuentren involucradas.

Como nuestros resultados parecen indicar que el cAMP participa en la reorganización del citoesqueleto de actina y tubulina, y considerando que ambos filamentos interaccionan, se investigó si la respuesta de los microfilamentos y los microtúbulos durante la DPMP está acoplada. Es decir, si la remodelación del citoesqueleto de actina conduce a la despolimerización de los microtúbulos o viceversa. En células BCE la reducción de la polimerización y el incremento de la despolimerización de los microfilamentos con citocalasina D no interfieren con la acción de la DPMP sobre el citoesqueleto de actina y tubulina. Por otro lado, un incremento de la polimerización y una diminución de la despolimerización de los microfilamentos con jasplakinolide atenúa el efecto de la DPMP sobre la actina y los microtúbulos. En células que se encuentran migrando, la ubicación y dinámica de los microtúbulos en las lámelas es dependiente de los haces de actomiosina (Waterman-Storer and Salmon, 1997). Asimismo, a nivel del citoplasma los microtúbulos se polimerizan a lo largo de los haces de actina y los extremos de los microtúbulos son arrastrados por el citoplasma por su conexión con los haces de actina en movimiento (Gupton et al., 2002; Salmon et al., 2002). Sobre la base de los antecedentes, es posible que los resultados que observamos al incubar a las células BCE durante la DPMP con jasplakinolide puedan explicarse por la dependencia de los microtúbulos sobre los microfilamentos para remodelarse. Así, en respuesta a la DPMP tras la remodelación de los microfilamentos, los microtúbulos se reorganizan. Cuando las monocapas de células BCE se incuban con nocodazol, un agente que provoca la despolimerización de los microtúbulos, únicamente se observaron escasos microtúbulos centrosómicos. En estas condiciones, en respuesta a la DPMP los microfilamentos corticales prácticamente no se modifican y disminuye en forma importante la separación intercelular. Los datos bibliográficos parecen indicar que el efecto del nocodazol sobre los epitelios varía con el tipo celular. En el endotelio vascular esta droga provoca una importante remodelación

114

del citoesqueleto de actina cortical con la pérdida de los contactos celulares (Verin et al., 2001; Birukova et al., 2004b; Alieva et al., 2013). En células epiteliales bronquiales y alveolares (Lorenowicz et al., 2007) y en queratinocitos (Kee and Steinert, 2001), el nocodazol parece estabilizar las uniones celulares sin afectar el anillo cortical. Incluso en células de epitelio intestinal este agente previene la reorganización de anillo de actina asociado a las uniones en respuesta a la extracción del calcio extracelular (Ivanov et al., 2006). Es importante señalar, además, que los extremos positivos de los microtúbulos se asocian a proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina (Basu and Chang, 2007). En presencia del nocodazol se observa una remodelación radical del citoesqueleto de tubulina que podría involucrar poblaciones de microtúbulos distintas a las que se despolimerizan con la DPMP. Los filamentos de tubulina alterados podrían provocar cambios en proteínas o moléculas asociadas indirecta o directamente con ellos, necesarias para que ocurra la remodelación del citoesqueleto de actina. De esta manera, el nocodazol estaría previniendo la respuesta sobre los microfilamentos al afectar las proteínas asociadas a los microtúbulos y no por la acción sobre la población de microtúbulos que se modifican con la DPMP. De hecho, en las células de epitelio intestinal, la kinesina-1, una proteína motora asociada a los microtúbulos, se ha visto implicada en la remodelación del citoesqueleto de actina asociado a las uniones celulares cuando se extrae el calcio extracelular (Ivanov et al., 2006). La desestabilización de los microtúbulos con nocodazol evita la participación de la kinesina-1 en la reorganización de los microfilamentos (ibid.). El incremento de la polimerización y la disminución de la despolimerización de los microtúbulos con paclitaxel no impiden la reorganización de la actina cortical en respuesta a la DPMP. Esto sugiere que los cambios en los microfilamentos por acción del DPMP no parecen depender de la remodelación de los microtúbulos corticales.

En base a los resultados de esta tesis y a los datos de la literatura en el esquema de la Figura 40 se plantea un modelo posible de los distintos intermediarios que podrían participar en la remodelación del citoesqueleto de actina y tubulina en respuesta a la DPMP.



Figura 40- Posible modelo de los mecanismos involucrados en la remodelación del citoesqueleto de actina y tubulina en respuesta a la DPMP. La DPMP podría incrementar los niveles de HCO₃⁻ intracelular y éste a su vez activar a la sAC. La sAC aumenta el cAMP, el que activa a la PKA. La PKA podría conducir a la desfosforilación de la pMLC a través de los siguientes mecanismos: fosforilación e inhibición de la quinasa de la MLC (MLCK) (1) y del CPI-17 (inhibidor endógeno de la fosfatasa de la MLC, MLCP) (2). La PKA podría fosforilar a Tau. Al estar fosforilado, Tau pierde su unión a los microtúbulos (MT), desestabilizando los filamentos (3). Por mecanismos aún no determinados, la PKA induciría la remodelación de la actina-F cortical (4). Las modificaciones del citoesqueleto de actina cortical podrían depender de factores asociados a los microtúbulos corticales (6). Los microfilamentos, a su vez, determinan la reorganización de los microtúbulos. Como consecuencia de la remodelación de los microtúbulos se podría liberar GEF-H1 y activar a RhoA (5). El texto azul y las flechas punteadas indican los resultados obtenidos en esta Tesis. Los textos blancos y las flechas punteadas representan posibles mecanismos en base a lo reportado en la literatura.

2 Vías de señalización involucradas en la remodelación del citoesqueleto de actina en respuesta a la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática

En la investigación de las vías de señalización implicadas en la HPMP, comenzamos estudiando aquellas que participan en la DPMP en las células de BCE, ya que en la reorganización del citoesqueleto por ambas variaciones del PMP podrían estar implicadas las mismas moléculas señalizadoras, funcionando de forma opuesta. Es así que en este trabajo se determinó que, en contraposición a la DPMP, durante la HPMP la ppMLC disminuye. Sin embargo, no se observaron cambios en el cAMP ni en los sustratos fosforilados de la PKA en respuesta a la HPMP en las monocapas celulares de BCE en cultivo. Tampoco se hallaron variaciones en la pMLC. Así, a pesar de que los efectos de la DPMP y la HPMP sobre el citoesqueleto de actina y las uniones parecen ser contrapuestos, no parecen involucrar los mismos mecanismos moleculares. Por lo cual, los blancos moleculares sobre los cuales actúa la DPMP no parecen afectarse por la HPMP.

En concordancia con lo señalado en el párrafo anterior, a pesar de que durante la DPMP no constatamos cambios en la fosforilación de pERK, sí encontramos que esta MAP quinasa se activa con la HPMP en los monocapas celulares de BCE. El aumento de pERK ocurre a nivel citosólico. Asimismo, observamos que la inhibición de pERK disminuye la compactación de la actina, el efecto protector de la HPMP sobre las uniones al extraer el calcio extracelular y también atenúa significativamente la reducción de la ppMLC producto de la HPMP. Por consiguiente, este conjunto de resultados refuerza la participación de esta MAP quinasa en la respuesta a la HPMP de las células BCE en cultivo. Existen antecedentes en relación a la acción protectora de ERK sobre la barrera epitelial (Samak et al., 2011). En una línea de células de epitelio intestinal (Caco-2), la activación de ERK con EGF inhibe la acción del acetaldehído sobre la desorganización de la actina cortical y evita la disrupción de la barrera epitelial (Sheth et al., 2004; Samak et al., 2011). Sin embargo, los autores no encuentran ni plantean un mecanismo que explique la acción de ERK sobre los microfilamentos. Asimismo, existen antecedentes en células musculares lisas en relación a pERK y la MLC (Deng et al., 2011). En éstas células la sobreexpresión de la MAP quinasa que fosforila y activa a ERK (MEK), conlleva a una disminución en la pMLC por un mecanismo desconocido pero independiente de la quinasa de la MLC (ibid). La vía de Raf/ MEK/ERK es activada por dos pequeñas GTPasas de la familia de Ras: Rap1 y Ras (Ramos, 2008; Roskoski, 2012). Se ha reportado que Ras presenta un extremo carboxilo terminal polibásico a través del cual interacciona de manera electrostática con la membrana plasmática (Leventis and Silvius, 1998). En la fagocitosis, los macrófagos remodelan la composición de los lípidos de la cara interna de su membrana plasmática y con ello alteran la carga superficial de la misma (Yeung *et al.*, 2006). Esto provoca la liberación de K-Ras al perderse la interacción electrostática que la mantenía unida (ibid.). Al hiperpolarizar el PMP de células CHO con valinomicina, Ras se transloca a los endosomas (Gomez and Daniotti, 2007). En células de epitelio renal en cultivo la DPMP activa a Ras y ésta a su vez conduce a la fosforilación de ERK (Waheed *et al.*, 2010). Por consiguiente, existe la posibilidad de que la HPMP provoque cambios en la localización de Ras que podrían favorecer la activación de esta MAPK.

En el esquema de la Figura 41 se plantea un posible modelo de los distintos intermediarios que podrían participar en la remodelación del citoesqueleto de actina en respuesta a la HPMP.



Figura 41- Posible modelo de los mecanismos involucrados en la remodelación del citoesqueleto de actina en respuesta a la HPMP. La HPMP podría provocar cambios en la localización de Ras favoreciendo su activación. Ras iniciaría la activación de la vía de las MAP quinasas, con el consecuente incremento de pERK (1). pERK, a su vez, conduce a la disminución de la ppMLC (2), a la compactación de a la actina (3) y a la estabilización de las uniones (4). El texto azul y las flechas llenas indican los resultados obtenidos en esta Tesis. Los textos blancos y las flechas punteadas representan posibles mecanismos en base a lo reportado en la literatura.

3 Formas fosforiladas de la MLC

Como se mencionó en la Introducción, existen varios trabajos en donde se ha encontrado que las dos formas fosforiladas de la MLC participan en procesos celulares diferentes (Getz *et al.*,

2010; Vicente-Manzanares and Horwitz, 2010; Hirano and Hirano, 2016). Nuestros resultados, obtenidos en células BCE, parecen concordar con estos hallazgos, ya que encontramos que la pMLC y la ppMLC presentan una distribución diferente y respuestas distintas ante los cambios de PMP.

En este trabajo obtuvimos evidencia de que en las células BCE en subconfluencia o como células aisladas, la pMLC se dispone de manera difusa a nivel citosólico. La ppMLC tiene por el contrario una distribución muy distinta, no es detectable por inmunofluorescencia en células aisladas, pero sí se visualiza en aquellos sitios en que dos células han contactado. En las monocapas de células BCE en cultivo maduras o in situ, la ppMLC se dispone en el límite celular con un patrón regular punteado. La pMLC se distribuye de manera difusa en la corteza celular y su localización citosólica disminuye de manera considerable en las células de las monocapas de células BCE maduras en cultivo en relación a las células subconfluentes.

Por otro lado, resulta interesante mencionar que las dos formas fosforiladas se modifican de manera distinta con el PMP y que estos cambios son, a su vez, dependientes de vías de señalización diferentes. Así, en respuesta a la DPMP la pMLC disminuye como consecuencia de la activación del caMP/PKA y la ppMLC no varía. Por otro lado, la HPMP conduce a una disminución de la ppMLC dependiente de pERK y la pMLC no cambia. Una de las preguntas que surge de estos resultados es si las dos formas fosforiladas de la MLC tienen funciones diferentes en la remodelación del citoesquieto de actina en respuesta a las modificaciones del PMP. Como se ha señalado en la Introducción, en células epiteliales polarizadas el anillo de actina cortical forma parte del complejo de unión apical (Ivanov, 2008; Schnittler et al., 2014) y se asocia a la miosina II no muscular (Ebrahim et al., 2013). La fosforilación de la MLC, además de activar la actividad Mg⁺²-ATPasa de la NM II, estabiliza a los filamentos de miosina II no muscular (Vicente-Manzanares et al., 2009). En un estudio realizado en queratinocitos, Braga y colaboradores describen dos poblaciones de filamentos de actina corticales durante la polarización de estas células que resultan indistinguibles una vez finalizado dicho proceso (Zhang et al., 2005). Una de ellas es parte de las uniones y la otra se compone de filamentos periféricos no asociados a las uniones (ibid). En los queratinocitos con contactos celulares establecidos los autores observan una señal intensa de la pMLC en donde se detecta la actina periférica no asociada a las uniones. En ausencia de los contactos celulares la señal de la pMLC es mínima (ibid). Los autores sugieren que la pMLC es necesaria para la compactación y la estabilización de la actina-F periférica (ibid). En consistencia con estos hallazgos, la disminución de la pMLC que encontramos durante la DPMP podría contribuir a la desestabilización de la actina cortical. Asimismo, existen estudios en células BCE en cultivo en donde se reporta que, junto a la disminución del anillo de actina cortical producto de la acción de la trombina, histamina o PMA, hay un incremento de la ppMLC (Srinivas *et al.*, 2006; Shivanna *et al.*, 2010). Como se mencionase en párrafos anteriores, la HPMP provoca la compactación de los microfilamentos corticales y la estabilización de las uniones intercelulares. Es interesante entonces, que en este escenario la ppMLC disminuya.

En su conjunto, nuestros resultados surgieren que la desestabilización del anillo cortical de actina se encontraría vinculada al incremento de ppMLC y a la disminución de la pMLC.

4 Efectos no clásicos de la gramicidina sobre intermediarios de vías de señalización

En este trabajo encontramos que algunos de los efectos de la gramicidina no pueden ser interpretados en término de sus propiedades iónicas o eléctricas. La incorporación de esta droga a los cultivos de BCE o B16F1 modifica la fosforilación y/o la localización de algunos intermediarios clave relacionados, entre otras propiedades celulares con la organización del citoesqueleto, en forma independiente de los efectos sobre el PMP. Al respecto, la gramicidina aumenta la localización nuclear de pERK y disminuye la ppMLC, tanto en aquellas condiciones en que la droga produce la DPMP como la HPMP. Los procedimientos alternativos de despolarización o hiperpolarización empleados aquí no provocan respuestas similares a la gramicidina. A pesar de que no determinamos los mecanismos involucrados, se encuentra establecido que esta droga modifica las propiedades lipídicas de la membrana (Antoinette Killian, 1992; Hassan-Zadeh *et al.*, 2017), lo cual podría estar involucrado en estos efectos.

Debido a nuestros hallazgos de que la gramicidina es capaz de afectar, por sí misma, la activación y localización de algunos intermediarios y/o efectores de vías de señalización de manera independiente de su condición de ionóforo, no se utilizó esta droga como un agente para modificar el PMP en los estudios de esta tesis.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que, en células BCE:

- La DPMP provoca la disminución de la pMLC y la ppMLC no cambia.

- La DPMP activa a la vía la cAMP/PKA y ésta se encuentra implicada en la remodelación del citoesqueleto de actina y de tubulina, y en la reducción de la pMLC.

- Si se inhibe la despolimerización de los microfilamentos no ocurre la remodelación de los microtúbulos. Por otro lado, no es posible que el citoesqueleto de actina cortical se reorganice en presencia de un agente que desestabiliza los microtúbulos.

- En respuesta a la DPMP tiene lugar la activación de RhoA. Sin embargo, la inhibición de su efector ROCK no atenúa los efectos de la DPMP sobre la actina-F cortical.

- A diferencia de lo que ocurre en el epitelio renal tubular, la DPMP no induce cambios en pERK.

- En respuesta a la HPMP se observa una disminución de la ppMLC y no hay variaciones en la pMLC.

- La vía de cAMP/PKA no se ve afectada por la HPMP.

- La HPMP provoca un incremento en la fosforilación de ERK y esta se encuentra implicada en la compactación de la actina, en el efecto protector de la HPMP sobre las uniones y, en la reducción de la ppMLC.

- En respuesta a la HPMP no hay cambios en la activación de RhoA.

- La gramicidina tiene efectos independientes de su condición como ionóforo. Así, en este trabajo encontramos que aumenta la fosforilación de ERK y su localización nuclear y disminuye la ppMLC, tanto en aquellas condiciones en que la droga produce la DPMP como la HPMP.

Perspectivas

En virtud de los resultados obtenidos en este trabajo, han surgido nuevas interrogantes que permiten plantear diversos estudios complementarios, algunos de los cuales se destacan a continuación.

-Explorar los mecanismos a través de los cuales disminuye la pMLC con la DPMP. Se plantea investigar por un lado la fosforilación de la quinasa de la MLC y, de encontrar un incremento, si es dependiente de la PKA. Por el otro, realizar estudios de activación de la fosfatasa de la MLC y, de hallar un incremento, explorar la fosforilación de su inhibidor endógeno, el CPI-17. De evidenciar cambios, establecer la participación de la PKA en los mismos.

-Una vez determinados los mecanismos involucrados en la desfoforilación de la pMLC, explorar su rol sobre la reorganización del citoesqueleto de actina durante la DPMP.

-Identificar los "spots" obtenidos en los geles 2D por espectrometría de masas y comenzar a estudiar la posible participación de estas proteínas en la reorganización del citoesqueleto en respuesta a la DPMP.

-Evaluar cambios en la fosforilación de tau (Ser-214) con el objetivo de conocer los intermediarios involucrados en la despolimerización de los microtúbulos. De hallar un incremento, determinar si es dependiente de la PKA.

- Inhibir la despolimerización de los microtúbulos con paclitaxel y determinar si disminuye la actividad de RhoA en la respuesta a la DPMP. De hallar una disminución, estudiar la posible activación de GEF-H1.

- Con el fin de identificar los intermediarios de ERK que son activados "upstream" por la HPMP, evaluar la activación de Ras a través de un ensayo de "pull down".

-Explorar los mecanismos a través de los cuales ERK conduce a la disminución de la pMLC con la HPMP. Se plantea investigar la fosforilación de la quinasa de la MLC y realizar estudios de activación de la fosfatasa de la MLC.

Bibliografía

Adelstein, R.S., Anne Conti, M., 1975. Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. Nature 256, 597-598.

Akhmanova, A., Hoogenraad, Casper C., 2015. Microtubule Minus-End-Targeting Proteins. Current Biology 25, R162-R171.

Alieva, I.B., Zemskov, E.A., Smurova, K.M., Kaverina, I.N., Verin, A.D., 2013. The leading role of microtubules in endothelial barrier dysfunction: Disassembly of peripheral microtubules leaves behind the cytoskeletal reorganization. Journal of Cellular Biochemistry 114, 2258-2272.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., Kaibuchi, K., 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). J Biol Chem 271, 20246-20249.

Amano, M., Nakayama, M., Kaibuchi, K., 2010. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. Cytoskeleton (Hoboken) 67, 545-554.

Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S., Mizuno, K., 2001. LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. Biochemical Journal 354, 149-159.

Ando, K., Fukuhara, S., Moriya, T., Obara, Y., Nakahata, N., Mochizuki, N., 2013. Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization. The Journal of Cell Biology 202, 901-916.

Angres, B., Barth, A., Nelson, W.J., 1996. Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay. The Journal of Cell Biology 134, 549-557.

Antoinette Killian, J., 1992. Gramicidin and gramicidin-lipid interactions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes 1113, 391-425.

Antoni, F.A., 2012. New paradigms in cAMP signalling. Molecular and Cellular Endocrinology 353, 3-9.

Apodaca, G., 2018. Role of Polarity Proteins in the Generation and Organization of Apical Surface Protrusions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 10.

Aprea, J., Calegari, F., 2012. Bioelectric State and Cell Cycle Control of Mammalian Neural Stem Cells. Stem Cells International 2012, 10.

Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., Caroni, P., 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. Nature 393, 805-809.

Arcangeli, A., Bianchi, L., Becchetti, A., Faravelli, L., Coronnello, M., Mini, E., Olivotto, M., Wanke, E., 1995. A novel inward-rectifying K+ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. The Journal of Physiology 489, 455-471.

Arruti, C., Courtois, Y., 1978. Morphological changes and growth stimulation of Bovine Epithelial Lens cells by a retinal extract in vitro. Experimental Cell Research 117, 283-292.

Aslam, M., Härtel, F.V., Arshad, M., Gündüz, D., Abdallah, Y., Sauer, H., Piper, H.M., Noll, T., 2010. cAMP/PKA antagonizes thrombin-induced inactivation of endothelial myosin light chain phosphatase: role of CPI-17. Cardiovascular Research 87, 375-384.

Bacallao, R., Antony, C., Dotti, C., Karsenti, E., Stelzer, E.H., Simons, K., 1989. The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. The Journal of Cell Biology 109, 2817-2832.

Balczon, R., Prasain, N., Ochoa, C., Prater, J., Zhu, B., Alexeyev, M., Sayner, S., Frank, D.W., Stevens, T., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Y-Mediated Tau Hyperphosphorylation Impairs Microtubule Assembly in Pulmonary Microvascular Endothelial Cells. PLoS ONE 8, e74343.

Bartolini, F., Ramalingam, N., Gundersen, G.G., 2012. Actin-capping protein promotes microtubule stability by antagonizing the actin activity of mDia1. Molecular Biology of the Cell 23, 4032-4040.

Bashour, A.-M., Fullerton, A.T., Hart, M.J., Bloom, G.S., 1997. IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding Protein, Directly Binds and Cross-links Microfilaments. The Journal of Cell Biology 137, 1555-1566.

Basu, R., Chang, F., 2007. Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips. Current Opinion in Cell Biology 19, 88-94.

Bellett, G., Carter, J.M., Keynton, J., Goldspink, D., James, C., Moss, D.K., Mogensen, M.M., 2009. Microtubule plus-end and minus-end capture at adherens junctions is involved in the assembly of apicobasal arrays in polarised epithelial cells. Cell Motility and the Cytoskeleton 66, 893-908.

Ben-Chaim, Y., Chanda, B., Dascal, N., Bezanilla, F., Parnas, I., Parnas, H., 2006. Movement of 'gating charge' is coupled to ligand binding in a G-protein-coupled receptor. Nature 444, 106.

Bennett, V., Gilligan, D.M., 1993. The Spectrin-Based Membrane Skeleton and Micron-Scale Organization of the Plasma Membrane. Annual Review of Cell Biology 9, 27-66.

Birukova, A.A., Birukov, K.G., Gorshkov, B., Liu, F., Garcia, J.G.N., Verin, A.D., 2005. MAP kinases in lung endothelial permeability induced by microtubule disassembly. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 289, L75-L84.

Birukova, A.A., Liu, F., Garcia, J.G.N., Verin, A.D., 2004a. Protein kinase A attenuates endothelial cell barrier dysfunction induced by microtubule disassembly. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 287, L86-L93.

Birukova, A.A., Smurova, K., Birukov, K.G., Usatyuk, P., Liu, F., Kaibuchi, K., Ricks-Cord, A., Natarajan, V., Alieva, I., Garcia, J.G., Verin, A.D., 2004b. Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: role of Rho-dependent mechanisms. J Cell Physiol 201.

Birukova, A.A., Smurova, K., Birukov, K.G., Usatyuk, P., Liu, F., Kaibuchi, K., Ricks-Cord, A., Natarajan, V., Alieva, I., Garcia, J.G.N., Verin, A.D., 2004c. Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: Role of Rho-dependent mechanisms. Journal of Cellular Physiology 201, 55-70.

Bitterman, J.L., Ramos-Espiritu, L., Diaz, A., Levin, L.R., Buck, J., 2013. Pharmacological Distinction between Soluble and Transmembrane Adenylyl Cyclases. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 347, 589-598.

Blackiston, D.J., McLaughlin, K.A., Levin, M., 2009. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. Cell Cycle 8, 3519-3528.

Bogatcheva, N.V., Verin, A.D., 2008. The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function. Microvascular Research 76, 202-207.

Bogatcheva, N.V., Zemskova, M.A., Poirier, C., Mirzapoiazova, T., Kolosova, I., Bresnick, A.R., Verin, A.D., 2011. The suppression of myosin light chain (MLC) phosphorylation during the response to

lipopolysaccharide (LPS): beneficial or detrimental to endothelial barrier? Journal of Cellular Physiology 226, 3132-3146.

Bonanno, J.A., Yi, G., Kang, X.J., Srinivas, S.P., 1998. Reevaluation of Cl-/HCO3- exchange in cultured bovine corneal endothelial cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science 39, 2713-2722.

Brackenbury, W.J., 2012. Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. Channels (Austin, Tex.) 6, 352-361.

Brailoiu, G.C., Brailoiu, E., Chang, J.K., Dun, N.J., 2008. Excitatory effects of HIV-1 Tat on cultured rat cerebral cortical neurons. Neuroscience 151, 701-710.

Braun, T., Dods, R.F., 1975. Development of a Mn-2+-sensitive, "soluble" adenylate cyclase in rat testis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 72, 1097-1101.

Brown, M.D., Sacks, D.B., 2009. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. Cellular Signalling 21, 462-469.

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Walter, P., 2014. The Cytoskeleton. Molecular Bioology of the Cell. Garland Science, pp. 889-962.

Caldieri, G., Sigismund, S., 2016. Spatial resolution of cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. The Journal of Cell Biology 214, 125-127.

Calebiro, D., Nikolaev, V.O., Gagliani, M.C., de Filippis, T., Dees, C., Tacchetti, C., Persani, L., Lohse, M.J., 2009. Persistent cAMP-Signals Triggered by Internalized G-Protein–Coupled Receptors. PLOS Biology 7, e1000172.

Cantiello, H.F., Patenaude, C., Zaner, K., 1991. Osmotically induced electrical signals from actin filaments. Biophysical Journal 59, 1284-1289.

Cargnello, M., Roux, P.P., 2011. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. Microbiology and Molecular Biology Reviews 75, 50-83.

Carpenter, R.S., Parsons, S.M., 1978. Electrogenic behavior of synaptic vesicles from Torpedo californica. Journal of Biological Chemistry 253, 326-329.

Carrasco, M.A., Riveros, N., Ríos, J., Müller, M., Torres, F., Pineda, J., Lantadilla, S., Jaimovich, E., 2003. Depolarization-induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. American Journal of Physiology - Cell Physiology 284, C1438-C1447.

Carrillo-Sepúlveda, M.A., Barreto-Chaves, M.L.M., 2010. Phenotypic modulation of cultured vascular smooth muscle cells: a functional analysis focusing on MLC and ERK1/2 phosphorylation. Molecular and Cellular Biochemistry 341, 279-289.

Casar, B., Crespo, P., 2016. ERK Signals: Scaffolding Scaffolds? Frontiers in Cell and Developmental Biology 4, 49.

Cavey, M., Lecuit, T., 2009. Molecular bases of cell-cell junctions stability and dynamics. Cold Spring Harb Perspect Biol 1, a002998.

Cohen-Armon, M., Sokolovsky, M., 1993. Evidence for involvement of the voltage-dependent Na+ channel gating in depolarization-induced activation of G-proteins. Journal of Biological Chemistry 268, 9824-9838.

Cong, W., Shen, J., Xuan, Y., Zhu, X., Ni, M., Zhu, Z., Hong, G., Lu, X., Jin, L., 2014. A simple, rapid and low-cost staining method for gel-electrophoresis separated phosphoproteins via the fluorescent purpurin dye. Analyst 139, 6104-6108.

Conti, M., Mika, D., Richter, W., 2014. Cyclic AMP compartments and signaling specificity: Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. The Journal of General Physiology 143, 29-38.

Conti, M.A., Kawamoto, S., Adelstein, R.S., 2008. Non-Muscle Myosin II. Myosins: A Superfamily of Molecular Motors. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 223-264.

Cook, S., McCormick, F., 1993. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. Science 262, 1069-1072.

Coradini, D., Casarsa, C., Oriana, S., 2011. Epithelial cell polarity and tumorigenesis: new perspectives for cancer detection and treatment. Acta Pharmacol Sin 32, 552-564.

Correa, V., Chifflet, S., Marmorstein, A., McKay, B., 2005. Cambios en la distribución del citoesqueleto de actina en células MDCK en respuesta a modificaciones en el Na+ extracelular: Papel del ENaC. XI Jornadas de la SUB, Lavalleja, Minas.

Corvol, J.-C., Valjent, E., Toutant, M., Enslen, H., Irinopoulou, T., Lev, S., Hervé, D., Girault, J.-A., 2005. Depolarization Activates ERK and Proline-rich Tyrosine Kinase 2 (PYK2) Independently in Different Cellular Compartments in Hippocampal Slices. Journal of Biological Chemistry 280, 660-668.

Cowell, B.A., Evans, D.J., Fleiszig, S.M.J., 2005. Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on Pseudomonas aeruginosa invasion. FEMS Microbiology Letters 250, 71-76.

Creighton, J., Zhu, B., Alexeyev, M., Stevens, T., 2008. Spectrin-anchored phosphodiesterase 4D4 restricts cAMP from disrupting microtubules and inducing endothelial cell gap formation. Journal of Cell Science 121, 110-119.

Chang, Y.-C., Nalbant, P., Birkenfeld, J., Chang, Z.-F., Bokoch, G.M., 2008. GEF-H1 Couples Nocodazole-induced Microtubule Disassembly to Cell Contractility via RhoA. Molecular Biology of the Cell 19, 2147-2153.

Chen, J., Martinez, J., Milner, T.A., Buck, J., Levin, L.R., 2013. Neuronal Expression of Soluble Adenylyl Cyclase in the Mammalian Brain. Brain research 1518, 1-8.

Chifflet, S., Correa, V., Nin, V., Justet, C., Hernandez, J.A., 2004. Effect of membrane potential depolarization on the organization of the actin cytoskeleton of eye epithelia. The role of adherens junctions. Exp Eye Res 79, 769-777.

Chifflet, S., Hernandez, J.A., 2012. The plasma membrane potential and the organization of the actin cytoskeleton of epithelial cells. Int J Cell Biol 2012, 121424.

Chifflet, S., Hernandez, J.A., Grasso, S., 2005. A possible role for membrane depolarization in epithelial wound healing. Am J Physiol Cell Physiol 288, C1420-1430.

Chifflet, S., Hernandez, J.A., Grasso, S., Cirillo, A., 2003. Nonspecific depolarization of the plasma membrane potential induces cytoskeletal modifications of bovine corneal endothelial cells in culture. Exp Cell Res 282, 1-13.

Chifflet, S., Justet, C., Hernández, J.A., Nin, V., Escande, C., Benech, J.C., 2012. Early and late calcium waves during wound healing in corneal endothelial cells. Wound Repair and Regeneration 20, 28-37.

Chu, Y.S., Thomas, W.A., Eder, O., Pincet, F., Perez, E., Thiery, J.P., Dufour, S., 2004. Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. J Cell Biol 167, 1183-1194.

de Rooij, J., Zwartkruis, F.J.T., Verheijen, M.H.G., Cool, R.H., Nijman, S.M.B., Wittinghofer, A., Bos, J.L., 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. Nature 396, 474-477.

Dejana, E., Tournier-Lasserve, E., Weinstein, B.M., 2009. The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. Developmental cell 16, 209-221.

Dema, A., Perets, E., Schulz, M.S., Deák, V.A., Klussmann, E., 2015. Pharmacological targeting of AKAP-directed compartmentalized cAMP signalling. Cellular Signalling 27, 2474-2487.

Deng, M., Ding, W., Min, X., Xia, Y., 2011. MLCK-independent phosphorylation of MLC20 and its regulation by MAP kinase pathway in human bladder smooth muscle cells. Cytoskeleton 68, 139-149.

Dhillon, A.S., Pollock, C., Steen, H., Shaw, P.E., Mischak, H., Kolch, W., 2002. Cyclic AMP-Dependent Kinase Regulates Raf-1 Kinase Mainly by Phosphorylation of Serine 259. Molecular and Cellular Biology 22, 3237-3246.

Di Paolo, G., Antonsson, B., Kassel, D., Riederer, B.M., Grenningloh, G., 1997. Phosphorylation regulates the microtubule-destabilizing activity of stathmin and its interaction with tubulin. FEBS Letters 416, 149-152.

Dietrich, U., Krüger, P., Käs, J.A., 2011. Structural investigation on the adsorption of the MARCKS peptide on anionic lipid monolayers – effects beyond electrostatic. Chemistry and Physics of Lipids 164, 266-275.

Dodge-Kafka, K.L., Soughayer, J., Pare, G.C., Carlisle Michel, J.J., Langeberg, L.K., Kapiloff, M.S., Scott, J.D., 2005. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. Nature 437, 574-578.

Drenckhahn, D., Wagner, J., 1986. Stress fibers in the splenic sinus endothelium in situ: molecular structure, relationship to the extracellular matrix, and contractility. The Journal of Cell Biology 102, 1738-1747.

Dudek, S.M., Garcia, J.G.N., 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. Journal of Applied Physiology 91, 1487-1500.

Ebisuya, M., Kondoh, K., Nishida, E., 2005. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. Journal of Cell Science 118, 2997-3002.

Ebrahim, S., Fujita, T., Millis, Bryan A., Kozin, E., Ma, X., Kawamoto, S., Baird, Michelle A., Davidson, M., Yonemura, S., Hisa, Y., Conti, Mary A., Adelstein, Robert S., Sakaguchi, H., Kachar, B., 2013. NMII Forms a Contractile Transcellular Sarcomeric Network to Regulate Apical Cell Junctions and Tissue Geometry. Current Biology 23, 731-736.

Edelhauser, H.F., 2006. The Balance between Corneal Transparency and Edema The Proctor Lecture. Investigative Ophthalmology & Visual Science 47, 1755-1767.

Edwards, H.V., Christian, F., Baillie, G.S., 2012. cAMP: Novel concepts in compartmentalised signalling. Seminars in Cell & Developmental Biology 23, 181-190.

Ellerbroek, S.M., Wennerberg, K., Burridge, K., 2003. Serine Phosphorylation Negatively Regulates RhoA in Vivo. Journal of Biological Chemistry 278, 19023-19031.

Eng, C.H., Huckaba, T.M., Gundersen, G.G., 2006. The Formin mDia Regulates GSK3β through Novel PKCs to Promote Microtubule Stabilization but Not MTOC Reorientation in Migrating Fibroblasts. Molecular Biology of the Cell 17, 5004-5016.

Etienne-Manneville, S., 2010. From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. Current Opinion in Cell Biology 22, 104-111.

Fujishiro, S.-h., Tanimura, S., Mure, S., Kashimoto, Y., Watanabe, K., Kohno, M., 2008. ERK1/2 phosphorylate GEF-H1 to enhance its guanine nucleotide exchange activity toward RhoA. Biochemical and Biophysical Research Communications 368, 162-167.

Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., Kaibuchi, K., 2002. Rac1 and Cdc42 Capture Microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. Cell 109, 873-885.

Gao, T., Puri, T.S., Gerhardstein, B.L., Chien, A.J., Green, R.D., Hosey, M.M., 1997. Identification and Subcellular Localization of the Subunits of L-type Calcium Channels and Adenylyl Cyclase in Cardiac Myocytes. Journal of Biological Chemistry 272, 19401-19407.

Getz, T.M., Dangelmaier, C.A., Jin, J., Daniel, J.L., Kunapuli, S.P., 2010. Differential phosphorylation of myosin light chain (Thr)18 and (Ser)19 and functional implications in platelets. Journal of Thrombosis and Haemostasis 8, 2283-2293.

Giepmans, B.N.G., van Ijzendoorn, S.C.D., 2009. Epithelial cell–cell junctions and plasma membrane domains. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1788, 820-831.

Girault, A., Brochiero, E., 2014. Evidence of K+ channel function in epithelial cell migration, proliferation, and repair. American Journal of Physiology - Cell Physiology 306, C307-C319.

Goeckeler, Z.M., Wysolmerski, R.B., 2005. Myosin Phosphatase and Cofilin Mediate cAMP/cAMPdependent Protein Kinase-induced Decline in Endothelial Cell Isometric Tension and Myosin II Regulatory Light Chain Phosphorylation. Journal of Biological Chemistry 280, 33083-33095.

Goldmann, W.H., 2008. Actin: A molecular wire, an electrical cable? Cell Biology International 32, 869-870.

Gomez, G.A., Daniotti, J.L., 2007. Electrical properties of plasma membrane modulate subcellular distribution of K-Ras. FEBS Journal 274, 2210-2228.

González-Mariscal, L., Tapia, R., Chamorro, D., 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1778, 729-756.

Goode, B.L., Eck, M.J., 2007. Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly. Annual Review of Biochemistry 76, 593-627.

Gorovoy, M., Niu, J., Bernard, O., Profirovic, J., Minshall, R., Neamu, R., Voyno-Yasenetskaya, T., 2005. LIM Kinase 1 Coordinates Microtubule Stability and Actin Polymerization in Human Endothelial Cells. Journal of Biological Chemistry 280, 26533-26542.

Goswami, C., Kuhn, J., Heppenstall, P.A., Hucho, T., 2010. Importance of Non-Selective Cation Channel TRPV4 Interaction with Cytoskeleton and Their Reciprocal Regulations in Cultured Cells. PLOS ONE 5, e11654. Gout, S., Marie, C., Lainé, M., Tavernier, G., Block, M.R., Jacquier-Sarlin, M., 2004. Early enterocytic differentiation of HT-29 cells: biochemical changes and strength increases of adherens junctions. Experimental Cell Research 299, 498-510.

Gupton, S.L., Salmon, W.C., Waterman-Storer, C.M., 2002. Converging Populations of F-Actin Promote Breakage of Associated Microtubules to Spatially Regulate Microtubule Turnover in Migrating Cells. Current Biology 12, 1891-1899.

Haan, C., Behrmann, I., 2007. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. Journal of Immunological Methods 318, 11-19.

Häfner, S., Adler, H.S., Mischak, H., Janosch, P., Heidecker, G., Wolfman, A., Pippig, S., Lohse, M., Ueffing, M., Kolch, W., 1994. Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. Molecular and Cellular Biology 14, 6696-6703.

Haidari, M., Zhang, W., Chen, Z., Ganjehei, L., Warier, N., Vanderslice, P., Dixon, R., 2011. Myosin light chain phosphorylation facilitates monocyte transendothelial migration by dissociating endothelial adherens junctions. Cardiovascular Research 92, 456-465.

Harrison, R.E., Turley, E.A., 2001. Active Erk Regulates Microtubule Stability in H-ras-Transformed Cells. Neoplasia (New York, N.Y.) 3, 385-394.

Hartsock, A., Nelson, W.J., 2008. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1778, 660-669.

Hassan-Zadeh, E., Hussain, F., Huang, J., 2017. Gramicidin Peptides Alter Global Lipid Compositions and Bilayer Thicknesses of Coexisting Liquid-Ordered and Liquid-Disordered Membrane Domains. Langmuir 33, 3324-3332.

Hastie, L.E., Patton, W.F., Hechtman, H.B., Shepro, D., 1997. H2O2-induced filamin redistribution in endothelial cells is modulated by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. J Cell Physiol 172, 373-381.

Head, B.P., Patel, H.H., Roth, D.M., Lai, N.C., Niesman, I.R., Farquhar, M.G., Insel, P.A., 2005. Gprotein-coupled Receptor Signaling Components Localize in Both Sarcolemmal and Intracellular Caveolin-3-associated Microdomains in Adult Cardiac Myocytes. Journal of Biological Chemistry 280, 31036-31044.

Heasman, S.J., Ridley, A.J., 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. Nat Rev Mol Cell Biol 9, 690-701.

Hirano, M., Hirano, K., 2016. Myosin di-phosphorylation and peripheral actin bundle formation as initial events during endothelial barrier disruption. Scientific Reports 6, 20989.

Hirata, H., Gupta, M., Vedula, S.R.K., Lim, C.T., Ladoux, B., Sokabe, M., 2015. Actomyosin bundles serve as a tension sensor and a platform for ERK activation. EMBO Reports 16, 250-257.

Hirata, H., Sokabe, M., 2015. A novel role of actomyosin bundles in ERK signaling. Communicative & Integrative Biology 8, e1017176.

Hobiger, K., Friedrich, T., 2015. Voltage sensitive phosphatases: emerging kinship to protein tyrosine phosphatases from structure-function research. Frontiers in Pharmacology 6.

Houslay, M.D., 2010. Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. Trends in Biochemical Sciences 35, 91-100.

Houslay, M.D., Kolch, W., 2000. Cell-Type Specific Integration of Cross-Talk between Extracellular Signal-Regulated Kinase and cAMP Signaling. Molecular Pharmacology 58, 659-668.

Hubbard, S.R., Till, J.H., 2000. Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. Annual Review of Biochemistry 69, 373-398.

Huveneers, S., Oldenburg, J., Spanjaard, E., van der Krogt, G., Grigoriev, I., Akhmanova, A., Rehmann, H., de Rooij, J., 2012. Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control forcedependent remodeling. The Journal of Cell Biology 196, 641.

llatovskaya, D.V., Pavlov, T.S., Levchenko, V., Negulyaev, Y.A., Staruschenko, A., 2011. Cortical actin binding protein cortactin mediates ENaC activity via Arp2/3 complex. The FASEB Journal 25, 2688-2699.

Im, E., Kazlauskas, A., 2007. Src Family Kinases Promote Vessel Stability by Antagonizing the Rho/ROCK Pathway. Journal of Biological Chemistry 282, 29122-29129.

Ishii, M., Inanobe, A., Fujita, S., Makino, Y., Hosoya, Y., Kurachi, Y., 2001. Ca²⁺ Elevation Evoked by Membrane Depolarization Regulates G Protein Cycle via RGS Proteins in the Heart. Circulation Research 89, 1045-1050.

Ivanov, A.I., 2008. Actin motors that drive formation and disassembly of epithelial apical junctions. Front Biosci 13, 6662-6681.

Ivanov, A.I., McCall, I.C., Babbin, B., Samarin, S.N., Nusrat, A., Parkos, C.A., 2006. Microtubules regulate disassembly of epithelial apical junctions. BMC Cell Biol 7, 12.

Ivanov, A.I., McCall, I.C., Parkos, C.A., Nusrat, A., 2004. Role for Actin Filament Turnover and a Myosin II Motor in Cytoskeleton-driven Disassembly of the Epithelial Apical Junctional Complex. Molecular Biology of the Cell 15, 2639-2651.

Ivanov, A.I., Parkos, C.A., Nusrat, A., 2010. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. Am J Pathol 177, 512-524.

Izdebska, M., Zieli, #x144, ska, W., Grzanka, D., Gagat, M., 2018. The Role of Actin Dynamics and Actin-Binding Proteins Expression in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Its Association with Cancer Progression and Evaluation of Possible Therapeutic Targets. BioMed Research International 2018, 13.

Jalimarada, S.S., Shivanna, M., Kini, V., Mehta, D., Srinivas, S.P., 2009. Microtubule disassembly breaks down the barrier integrity of corneal endothelium. Experimental Eye Research 89, 333-343.

Janmey, P.A., 1998. The Cytoskeleton and Cell Signaling: Component Localization and Mechanical Coupling. Physiological Reviews 78, 763-781.

Jay, D., García, E.J., de la Luz Ibarra, M., 2004. In situ determination of a PKA phosphorylation site in the C-terminal region of filamin. Molecular and Cellular Biochemistry 260, 49-53.

Justet, C., Evans, F., Vasilskis, E., Hernández, J., Chifflet, S., 2013. ENaC contribution to epithelial wound healing is independent of the healing mode and of any increased expression in the channel. Cell Tissue Res, 1-12.

Kakiashvili, E., Speight, P., Waheed, F., Seth, R., Lodyga, M., Tanimura, S., Kohno, M., Rotstein, O.D., Kapus, A., Szászi, K., 2009. GEF-H1 Mediates Tumor Necrosis Factor-α-induced Rho Activation and Myosin Phosphorylation. Journal of Biological Chemistry 284, 11454-11466.

Kalaji, R., Wheeler, A.P., Erasmus, J.C., Lee, S.Y., Endres, R.G., Cramer, L.P., Braga, V.M.M., 2012. ROCK1 and ROCK2 regulate epithelial polarisation and geometric cell shape. Biology of the Cell 104, 435-451.

Kapus, A., Janmey, P., 2013. Plasma Membrane—Cortical Cytoskeleton Interactions: A Cell Biology Approach with Biophysical Considerations. Comprehensive Physiology. John Wiley & Sons, Inc.

Karimova, G., Ladant, D., 2007. cAMP Assays. Cold Spring Harbor Protocols 2007, pdb.prot4739.

Kassianidou, E., Hughes, J.H., Kumar, S., 2017. Activation of ROCK and MLCK tunes regional stress fiber formation and mechanics via preferential myosin light chain phosphorylation. Molecular Biology of the Cell 28, 3832-3843.

Katoh, K., Kano, Y., Ookawara, S., 2008. Role of stress fibers and focal adhesions as a mediator for mechano-signal transduction in endothelial cells in situ. Vascular Health and Risk Management 4, 1273-1282.

Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M., Kaibuchi, K., 1999. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rhokinase in vivo. J Cell Biol 147, 1023-1038.

Kee, S.-H., Steinert, P.M., 2001. Microtubule Disruption in Keratinocytes Induces Cell-Cell Adhesion through Activation of Endogenous E-Cadherin. Molecular Biology of the Cell 12, 1983-1993.

Kelkar, D.A., Chattopadhyay, A., 2007. The gramicidin ion channel: A model membrane protein. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1768, 2011-2025.

Kelley, L.C., Hayes, K.E., Ammer, A.G., Martin, K.H., Weed, S.A., 2010. Cortactin Phosphorylated by ERK1/2 Localizes to Sites of Dynamic Actin Regulation and Is Required for Carcinoma Lamellipodia Persistence. PLoS ONE 5, e13847.

Kelley, L.C., Hayes, K.E., Ammer, A.G., Martin, K.H., Weed, S.A., 2011. Revisiting the ERK/Src cortactin switch. Communicative & Integrative Biology 4, 205-207.

Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K., 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rhoassociated kinase (Rho-kinase). Science 273, 245-248.

Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P., Brautigan, D.L., 2000. Agonists Trigger G Protein-mediated Activation of the CPI-17 Inhibitor Phosphoprotein of Myosin Light Chain Phosphatase to Enhance Vascular Smooth Muscle Contractility. Journal of Biological Chemistry 275, 9897-9900.

Koch, B.D., Blalock, J.B., Schonbrunn, A., 1988. Characterization of the cyclic AMP-independent actions of somatostatin in GH cells. I. An increase in potassium conductance is responsible for both the hyperpolarization and the decrease in intracellular free calcium produced by somatostatin. Journal of Biological Chemistry 263, 216-225.

Kohr, M.J., Traynham, C.J., Roof, S.R., Davis, J.P., Ziolo, M.T., 2010. cAMP-independent Activation of Protein Kinase A by the Peroxynitrite Generator SIN-1 Elicits Positive Inotropic Effects in Cardiomyocytes. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 48, 645-648.

Kolodecik, T.R., Shugrue, C.A., Thrower, E.C., Levin, L.R., Buck, J., Gorelick, F.S., 2012. Activation of Soluble Adenylyl Cyclase Protects against Secretagogue Stimulated Zymogen Activation in Rat Pancreaic Acinar Cells. PLOS ONE 7, e41320.

Konig, S., Béguet, A., Bader, C.R., Bernheim, L., 2006. The calcineurin pathway links hyperpolarization (Kir2.1)-induced Ca²⁺ signals to human myoblast differentiation and fusion. Development 133, 3107-3114.

Konig, S., Hinard, V., Arnaudeau, S., Holzer, N., Potter, G., Bader, C.R., Bernheim, L., 2004. Membrane hyperpolarization triggers myogenin and myocyte enhancer factor-2 expression during human myoblast differentiation. J Biol Chem 279, 28187-28196.

Koyama, M., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Shiraki, K., Takase, K., Hartshorne, D.J., Nakano, T., 2000. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. FEBS Letters 475, 197-200.

Krendel, M., Zenke, F.T., Bokoch, G.M., 2002. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. Nat Cell Biol 4, 294-301.

Kritzer, M.D., Li, J., Dodge-Kafka, K., Kapiloff, M.S., 2012. AKAPs: The architectural underpinnings of local cAMP signaling. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 52, 351-358.

Lang, F., Föller, M., Lang, K.S., Lang, P.A., Ritter, M., Gulbins, E., Vereninov, A., Huber, S.M., 2005. Ion Channels in Cell Proliferation and Apoptotic Cell Death. The Journal of Membrane Biology 205, 147-157.

Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., Bertoglio, J., 1996. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. The EMBO Journal 15, 510-519.

Laub, F., Korenstein, R., 1984. Actin polymerization induced by pulsed electric stimulation of bone cells in vitro. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 803, 308-313.

Lechler, T., Fuchs, E., 2007. Desmoplakin: an unexpected regulator of microtubule organization in the epidermis. The Journal of Cell Biology 176, 147-154.

Lee, S.H., Dominguez, R., 2010. Regulation of Actin Cytoskeleton Dynamics in Cells. Molecules and cells 29, 311-325.

Lee, Y.S., Marmorstein, L.Y., Marmorstein, A.D., 2014. Soluble adenylyl cyclase in the eye. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1842, 2579-2583.

Leinweber, B.D., Leavis, P.C., Grabarek, Z., Wang, C.L., Morgan, K.G., 1999. Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. Biochemical Journal 344, 117-123.

Letort, G., Ennomani, H., Gressin, L., Théry, M., Blanchoin, L., 2015. Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton. F1000Research 4, F1000 Faculty Rev-1940.

Leventis, R., Silvius, J.R., 1998. Lipid-Binding Characteristics of the Polybasic Carboxy-Terminal Sequence of K-ras4B. Biochemistry 37, 7640-7648.

Levin, M., 2009. Bioelectric mechanisms in regeneration: Unique aspects and future perspectives. Semin Cell Dev Biol 20, 543-556.

Levin, M., 2014. Molecular bioelectricity: how endogenous voltage potentials control cell behavior and instruct pattern regulation in vivo. Molecular Biology of the Cell 25, 3835-3850.

Levin, M., Martyniuk, C.J., 2017. The bioelectric code: An ancient computational medium for dynamic control of growth and form. Biosystems.

Levin, M., Pezzulo, G., Finkelstein, J.M., 2017. Endogenous Bioelectric Signaling Networks: Exploiting Voltage Gradients for Control of Growth and Form. Annual Review of Biomedical Engineering 19, 353-387.

Li, S., Allen, K.T., Bonanno, J.A., 2011. Soluble adenylyl cyclase mediates bicarbonate-dependent corneal endothelial cell protection. American Journal of Physiology-Cell Physiology 300, C368-C374.

Lim, W.A., Pawson, T., 2010. Phosphotyrosine Signaling: Evolving a New Cellular Communication System. Cell 142, 661-667.

Liu, B.P., Chrzanowska-Wodnicka, M., Burridge, K., 1998. Microtubule Depolymerization Induces Stress Fibers, Focal Adhesions, and DNA Synthesis via the GTP-Binding Protein Rho. Cell Adhesion and Communication 5, 249-255.

Liu, C., Zuo, J., Pertens, E., Helli, P.B., Janssen, L.J., 2005. Regulation of Rho/ROCK signaling in airway smooth muscle by membrane potential and [Ca2+]i. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289, L574-582.

Liu, F., Verin, A.D., Borbiev, T., Garcia, J.G.N., 2001. Role of cAMP-dependent protein kinase A activity in endothelial cell cytoskeleton rearrangement. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 280, L1309-L1317.

Liu, K.C., Cheney, R.E., 2012. Myosins in cell junctions. Bioarchitecture 2, 158-170.

Livne, A., Geiger, B., 2016. The inner workings of stress fibers – from contractile machinery to focal adhesions and back. Journal of Cell Science 129, 1293-1304.

Lorenowicz, M.J., Fernandez-Borja, M., van Stalborch, A.-M.D., van Sterkenburg, M.A.J.A., Hiemstra, P.S., Hordijk, P.L., 2007. Microtubule dynamics and Rac-1 signaling independently regulate barrier function in lung epithelial cells. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 293, L1321-L1331.

Lovrić, J., Dammeier, S., Kieser, A., Mischak, H., Kolch, W., 1998. Activated Raf Induces the Hyperphosphorylation of Stathmin and the Reorganization of the Microtubule Network. Journal of Biological Chemistry 273, 22848-22855.

Luther, P.W., Peng, H.B., Lin, J.J.-C., 1983. Changes in cell shape and actin distribution induced by constant electric fields. Nature 303, 61.

Ma, Y., Pitson, S., Hercus, T., Murphy, J., Lopez, A., Woodcock, J., 2005. Sphingosine Activates Protein Kinase A Type II by a Novel cAMP-independent Mechanism. Journal of Biological Chemistry 280, 26011-26017.

MacCormick, M., Moderscheim, T., van der Salm, Louise W M., Moore, A., Pryor, Shona C., McCaffrey, G., Grimes, Mark L., 2005. Distinct signalling particles containing ERK/MEK and B-Raf in PC12 cells. Biochemical Journal 387, 155-164.

Machnicka, B., Grochowalska, R., Bogusławska, D.M., Sikorski, A.F., Lecomte, M.C., 2012. Spectrinbased skeleton as an actor in cell signaling. Cellular and Molecular Life Sciences 69, 191-201.

Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Narumiya, S., 1999. Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. Science 285, 895-898.

Magalhaes, M.A.O., Glogauer, M., 2010. Pivotal Advance: Phospholipids determine net membrane surface charge resulting in differential localization of active Rac1 and Rac2. Journal of Leukocyte Biology 87, 545-555.

Martinez-Pinna, J., Gurung, I.S., Vial, C., Leon, C., Gachet, C., Evans, R.J., Mahaut-Smith, M.P., 2005. Direct Voltage Control of Signaling via P2Y1 and Other Gαq-coupled Receptors. Journal of Biological Chemistry 280, 1490-1498.

Martinez-Quiles, N., Ho, H.-Y.H., Kirschner, M.W., Ramesh, N., Geha, R.S., 2004. Erk/Src Phosphorylation of Cortactin Acts as a Switch On-Switch Off Mechanism That Controls Its Ability To Activate N-WASP. Molecular and Cellular Biology 24, 5269-5280.

Matsuoka, Y., Li, X., Bennett, V., 2000. Adducin: structure, function and regulation. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 57, 884-895.

Mavria, G., Vercoulen, Y., Yeo, M., Paterson, H., Karasarides, M., Marais, R., Bird, D., Marshall, C.J., 2006. ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. Cancer Cell 9, 33-44.

Mazzochi, C., Benos, D.J., Smith, P.R., 2006. Interaction of epithelial ion channels with the actinbased cytoskeleton. American Journal of Physiology-Renal Physiology 291, F1113-F1122.

McKenzie, J.A., Ridley, A.J., 2007. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability. J Cell Physiol 213.

Meads, T., Schroer, T.A., 1995a. Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. Cell Motility and the Cytoskeleton 32, 273-288.

Meads, T., Schroer, T.A., 1995b. Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. Cell Motil Cytoskeleton 32.

Mege, R.M., Gavard, J., Lambert, M., 2006. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. Curr Opin Cell Biol 18, 541-548.

Mège, R.M., Ishiyama, N., 2017. Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at Adherens Junctions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 9.

Mendoza, M.C., Vilela, M., Juarez, J.E., Blenis, J., Danuser, G., 2015. ERK reinforces actin polymerization to power persistent edge protrusion during motility. Science Signaling 8, ra47-ra47.

Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T., Takeichi, M., 2008. Anchorage of Microtubule Minus Ends to Adherens Junctions Regulates Epithelial Cell-Cell Contacts. Cell 135, 948-959.

Miki, T., Iwanaga, T., Nagashima, K., Ihara, Y., Seino, S., 2001. Roles of ATP-sensitive K+ channels in cell survival and differentiation in the endocrine pancreas. Diabetes 50, S48.

Millán, J., Cain, R.J., Reglero-Real, N., Bigarella, C., Marcos-Ramiro, B., Fernández-Martín, L., Correas, I., Ridley, A.J., 2010. Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. BMC Biology 8, 11.

Mizuno, K., 2013. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. Cellular Signalling 25, 457-469.

Mogensen, M.M., Malik, A., Piel, M., Bouckson-Castaing, V., Bornens, M., 2000. Microtubule minusend anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein. Journal of Cell Science 113, 3013-3023.

Moss, D.K., Bellett, G., Carter, J.M., Liovic, M., Keynton, J., Prescott, A.R., Lane, E.B., Mogensen, M.M., 2007. Ninein is released from the centrosome and moves bi-directionally along microtubules. Journal of Cell Science 120, 3064-3074.

Moy, A.B., Shasby, S.S., Scott, B.D., Shasby, D.M., 1993. The effect of histamine and cyclic adenosine monophosphate on myosin light chain phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. The Journal of Clinical Investigation 92, 1198-1206.

Murata, Y., Okamura, Y., 2007a. Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in Xenopus oocytes coexpressing sensors of PIP2. The Journal of Physiology 583, 875-889.

Murata, Y., Okamura, Y., 2007b. Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in Xenopus oocytes coexpressing sensors of PIP(2). The Journal of Physiology 583, 875-889.

Müsch, A., 2004. Microtubule Organization and Function in Epithelial Cells. Traffic 5, 1-9.

Nadella, K.S., Saji, M., Jacob, N.K., Pavel, E., Ringel, M.D., Kirschner, L.S., 2009. Regulation of actin function by protein kinase A-mediated phosphorylation of Limk1. EMBO Reports 10, 599-605.

Newell-Litwa, K.A., Horwitz, R., Lamers, M.L., 2015. Non-muscle myosin II in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. Disease Models & amp; Mechanisms 8, 1495-1515.

Nilius, B., Droogmans, G., 2001. Ion Channels and Their Functional Role in Vascular Endothelium. Physiological Reviews 81, 1415-1459.

Nin, V., Hernandez, J.A., Chifflet, S., 2009. Hyperpolarization of the plasma membrane potential provokes reorganization of the actin cytoskeleton and increases the stability of adherens junctions in bovine corneal endothelial cells in culture. Cell Motil Cytoskeleton 66, 1087-1099.

Noda, Y., Sasaki, S., 2008. Actin-binding channels. In: Neumann, I.D., Landgraf, R. (Eds.), Progress in Brain Research. Elsevier, pp. 551-557.

Nordström, E., Fisone, G., Kristensson, K., 2009. Opposing effects of ERK and p38-JNK MAP kinase pathways on formation of prions in GT1-1 cells. The FASEB Journal 23, 613-622.

Nunes, K.P., Rigsby, C.S., Webb, R.C., 2010. RhoA/Rho-kinase and vascular diseases: what is the link? Cell Mol Life Sci 67, 3823-3836.

Obara, Y., Horgan, A.M., Stork, P.J.S., 2007. The requirement of Ras and Rap1 for the activation of ERKs by cAMP, PACAP, and KCl in cerebellar granule cells. Journal of Neurochemistry 101, 470-482.

Obara, Y., Labudda, K., Dillon, T.J., Stork, P.J.S., 2004. PKA phosphorylation of Src mediates Rap1 activation in NGF and cAMP signaling in PC12 cells. Journal of Cell Science 117, 6085-6094.

Okamura, Y., Dixon, J.E., 2011. Voltage-Sensing Phosphatase: Its Molecular Relationship With PTEN. Physiology 26, 6-13.

Olivotto, M., Arcangeli, A., Carla, M., Wanke, E., 1996. Electric fields at the plasma membrane level: a neglected element in the mechanisms of cell signalling. Bioessays 18, 495-504.

Onuma, E.K., Hui, S.W., 1988. Electric field-directed cell shape changes, displacement, and cytoskeletal reorganization are calcium dependent. The Journal of Cell Biology 106, 2067-2075.

Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S., Gundersen, G.G., 2001. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. Nat Cell Biol 3, 723-729.

Pardo, L.A., 2004. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. Physiology (Bethesda) 19, 285-292.

Pawlak, G., Helfman, D.M., 2002. MEK Mediates v-Src-induced Disruption of the Actin Cytoskeleton via Inactivation of the Rho-ROCK-LIM Kinase Pathway. Journal of Biological Chemistry 277, 26927-26933.

Pellegrin, S., Mellor, H., 2007. Actin stress fibres. Journal of Cell Science 120, 3491-3499.

Pittet, D., Di Virgilio, F., Pozzan, T., Monod, A., Lew, D.P., 1990. Correlation between plasma membrane potential and second messenger generation in the promyelocytic cell line HL-60. Journal of Biological Chemistry 265, 14256-14263.

Pollard, T.D., Blanchoin, L., Mullins, R.D., 2000. Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 29, 545-576.

Prahalad, P., Calvo, I., Waechter, H., Matthews, J.B., Zuk, A., Matlin, K.S., 2004. Regulation of MDCK cell-substratum adhesion by RhoA and myosin light chain kinase after ATP depletion. American Journal of Physiology-Cell Physiology 286, C693-C707.

Prasain, N., Alexeyev, M., Balczon, R., Stevens, T., 2009. Soluble adenylyl cyclase-dependent microtubule disassembly reveals a novel mechanism of endothelial cell retraction. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 297, L73-L83.

Prasain, N., Stevens, T., 2009. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. Microvascular Research 77, 53-63.

Prat, A.G., Xiao, Y.F., Ausiello, D.A., Cantiello, H.F., 1995. cAMP-independent regulation of CFTR by the actin cytoskeleton. American Journal of Physiology-Cell Physiology 268, C1552-C1561.

Priel, A., Ramos, A.J., Tuszynski, J.A., Cantiello, H.F., 2006. A Biopolymer Transistor: Electrical Amplification by Microtubules. Biophysical Journal 90, 4639-4643.

Prunier, C., Prudent, R., Kapur, R., Sadoul, K., Lafanechère, L., 2017. LIM kinases: cofilin and beyond. Oncotarget.

Qiao, J., Huang, F., Lum, H., 2003. PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 284, L972-L980.

Ramachandran, C., Patil, R.V., Sharif, N.A., Srinivas, S.P., 2011. Effect of Elevated Intracellular cAMP Levels on Actomyosin Contraction in Bovine Trabecular Meshwork Cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science 52, 1474-1485.

Ramos, J.W., 2008. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. The International Journal of Biochemistry & amp; Cell Biology 40, 2707-2719.

Rao, J.N., Platoshyn, O., Li, L., Guo, X., Golovina, V.A., Yuan, J.X., Wang, J.Y., 2002. Activation of K(+) channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding. Am J Physiol Cell Physiol 282, C885-898.

Reilein, A., Yamada, S., Nelson, W.J., 2005. Self-organization of an acentrosomal microtubule network at the basal cortex of polarized epithelial cells. The Journal of Cell Biology 171, 845-855.

Ren, J.-G., Li, Z., Sacks, D.B., 2007. IQGAP1 modulates activation of B-Raf. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 10465-10469.

Ren, Y., Li, R., Zheng, Y., Busch, H., 1998. Cloning and Characterization of GEF-H1, a Microtubuleassociated Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rac and Rho GTPases. Journal of Biological Chemistry 273, 34954-34960.

Reszka, A.A., Seger, R., Diltz, C.D., Krebs, E.G., Fischer, E.H., 1995. Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 8881-8885.

Rodgers, L.S., Fanning, A.S., 2011. Regulation of epithelial permeability by the actin cytoskeleton. Cytoskeleton 68, 653-660.

Rodriguez-Boulan, E., Macara, I.G., 2014. Organization and execution of the epithelial polarity programme. Nature Reviews Molecular Cell Biology 15, 225.

Rodriguez, O.C., Schaefer, A.W., Mandato, C.A., Forscher, P., Bement, W.M., Waterman-Storer, C.M., 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. Nat Cell Biol 5.

Roos, M.H., van Rodijnen, W.F., van Lambalgen, A.A., ter Wee, P.M., Tangelder, G.J., 2006. Renal microvascular constriction to membrane depolarization and other stimuli: pivotal role for rho-kinase. Pflügers Archiv 452, 471-477.

Roskoski, R., 2012. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. Pharmacological Research 66, 105-143.

Roy, M., Li, Z., Sacks, D.B., 2004. IQGAP1 Binds ERK2 and Modulates Its Activity. Journal of Biological Chemistry 279, 17329-17337.

Roy, M., Li, Z., Sacks, D.B., 2005. IQGAP1 Is a Scaffold for Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. Molecular and Cellular Biology 25, 7940-7952.

Sahai, E., Marshall, C.J., 2002. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. Nat Cell Biol 4, 408-415.

Sahai, E., Olson, M.F., Marshall, C.J., 2001. Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. The EMBO Journal 20, 755-766.

Salmon, W.C., Adams, M.C., Waterman-Storer, C.M., 2002. Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. The Journal of Cell Biology 158, 31-37.

Samak, G., Aggarwal, S., Rao, R.K., 2011. ERK is involved in EGF-mediated protection of tight junctions, but not adherens junctions, in acetaldehyde-treated Caco-2 cell monolayers. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 301, G50-G59.

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, 3429-3439.

Sanchez, A.D., Feldman, J.L., 2016. Microtubule-organizing centers: from the centrosome to non-centrosomal sites. Current Opinion in Cell Biology.

Sasaki, S., Yui, N., Noda, Y., 2014. Actin directly interacts with different membrane channel proteins and influences channel activities: AQP2 as a model. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1838, 514-520.

Satpathy, M., Gallagher, P., Lizotte-Waniewski, M., Srinivas, S.P., 2004. Thrombin-induced phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II in cultured bovine corneal endothelial cells. Experimental Eye Research 79, 477-486.

Sayner, S., Stevens, T., 2006. Soluble adenylate cyclase reveals the significance of compartmentalized cAMP on endothelial cell barrier function. Biochemical Society Transactions 34, 492-494.

Sayner, S.L., 2011. Emerging themes of cAMP regulation of the pulmonary endothelial barrier. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 300, L667-L678.

Sayner, S.L., Alexeyev, M., Dessauer, C.W., Stevens, T., 2006. Soluble Adenylyl Cyclase Reveals the Significance of cAMP Compartmentation on Pulmonary Microvascular Endothelial Cell Barrier. Circulation Research 98, 675-681.

Sayner, S.L., Balczon, R., Frank, D.W., Cooper, D.M.F., Stevens, T., 2011. Filamin A is a phosphorylation target of membrane but not cytosolic adenylyl cyclase activity. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 301, L117-L124.

Schmid, A., Meili, D., Salathe, M., 2014. Soluble adenylyl cyclase in health and disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1842, 2584-2592.

Schneeberger, K., Roth, S., Nieuwenhuis, E.E.S., Middendorp, S., 2018. Intestinal epithelial cell polarity defects in disease: lessons from microvillus inclusion disease. Disease Models & amp; Mechanisms 11.

Schnittler, H., Taha, M., Schnittler, M.O., Taha, A.A., Lindemann, N., Seebach, J., 2014. Actin filament dynamics and endothelial cell junctions: the Ying and Yang between stabilization and motion. Cell Tissue Res 355, 529-543.

Schofield, A.V., Steel, R., Bernard, O., 2012. Rho-associated Coiled-coil Kinase (ROCK) Protein Controls Microtubule Dynamics in a Novel Signaling Pathway That Regulates Cell Migration. Journal of Biological Chemistry 287, 43620-43629.

Senju, Y., Kalimeri, M., Koskela, E.V., Somerharju, P., Zhao, H., Vattulainen, I., Lappalainen, P., 2017. Mechanistic principles underlying regulation of the actin cytoskeleton by phosphoinositides. Proceedings of the National Academy of Sciences 114, E8977-E8986.

Shen, L., Black, E.D., Witkowski, E.D., Lencer, W.I., Guerriero, V., Schneeberger, E.E., Turner, J.R., 2006. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. Journal of Cell Science 119, 2095-2106.

Shen, Q., Rigor, R.R., Pivetti, C.D., Wu, M.H., Yuan, S.Y., 2010. Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. Cardiovascular Research 87, 272-280.

Sheth, P., Seth, A., Thangavel, M., Basuroy, S., Rao, R.K., 2004. Epidermal Growth Factor Prevents Acetaldehyde-Induced Paracellular Permeability in Caco-2 Cell Monolayer.

Shivanna, M., Jalimarada, S.S., Srinivas, S.P., 2010. Lovastatin inhibits the thrombin-induced loss of barrier integrity in bovine corneal endothelium. J Ocul Pharmacol Ther 26, 1-10.

Shivanna, M., Srinivas, S.P., 2009. Microtubule stabilization opposes the $(TNF-\alpha)$ -induced loss in the barrier integrity of corneal endothelium. Experimental Eye Research 89, 950-959.

Sigal, C.T., Zhou, W., Buser, C.A., McLaughlin, S., Resh, M.D., 1994. Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. Proceedings of the National Academy of Sciences 91, 12253-12257.

Simons, K., Fuller, S.D., 1985. Cell Surface Polarity in Epithelia. Annual Review of Cell Biology 1, 243-288.

Smith, L.G., Li, R., 2004. Actin Polymerization: Riding the Wave. Current Biology 14, R109-R111.

Song, B., Zhao, M., Forrester, J.V., McCaig, C.D., 2002. Electrical cues regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 13577-13582.

Srinivas, S.P., 2010. Dynamic Regulation of Barrier Integrity of the Corneal Endothelium. Optometry & Vision Science 87, E239-E254 210.1097/OPX.1090b1013e3181d39464.

Srinivas, S.P., Satpathy, M., Guo, Y., Anandan, V., 2006. Histamine-Induced Phosphorylation of the Regulatory Light Chain of Myosin II Disrupts the Barrier Integrity of Corneal Endothelial Cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science 47, 4011-4018.

Srinivasan, S., Spear, J., Chandran, K., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Avadhani, N.G., 2013. Oxidative Stress Induced Mitochondrial Protein Kinase A Mediates Cytochrome C Oxidase Dysfunction. PLoS ONE 8, e77129.

Stamatovic, S.M., Sladojevic, N., Keep, R.F., Andjelkovic, A.V., 2015. PDCD10 (CCM3) regulates brain endothelial barrier integrity in cerebral cavernous malformation type 3: role of CCM3-ERK1/2-cortactin cross-talk. Acta Neuropathologica 130, 731-750.

Steegborn, C., 2014. Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases — similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1842, 2535-2547.

Su, Y., Tian, L., Yu, M., Gao, Q., Wang, D., Xi, Y., Yang, P., Lei, B., Ma, P.X., Li, P., 2017. Cationic peptidopolysaccharides synthesized by 'click' chemistry with enhanced broad-spectrum antimicrobial activities. Polymer Chemistry 8, 3788-3800.

Suarez, C., Kovar, D.R., 2016. Internetwork competition for monomers governs actin cytoskeleton organization. Nat Rev Mol Cell Biol 17, 799-810.

Sumigray, K.D., Foote, H.P., Lechler, T., 2012. Noncentrosomal microtubules and type II myosins potentiate epidermal cell adhesion and barrier formation. The Journal of Cell Biology 199, 513-525.

Sun, X.C., Zhai, C.-B., Cui, M., Chen, Y., Levin, L.R., Buck, J., Bonanno, J.A., 2003. HCO 3 – -dependent soluble adenylyl cyclase activates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in corneal endothelium. American Journal of Physiology-Cell Physiology 284, C1114-C1122.

Sundelacruz, S., Levin, M., Kaplan, D.L., 2008. Membrane Potential Controls Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. PLoS ONE 3, e3737.

Surapisitchat, J., Beavo, J.A., 2011. Regulation of Endothelial Barrier Function by Cyclic Nucleotides: The Role of Phosphodiesterases. In: Francis, S.H., Conti, M., Houslay, M.D. (Eds.), Phosphodiesterases as Drug Targets. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 193-210.

Szaszi, K., Sirokmany, G., Di Ciano-Oliveira, C., Rotstein, O.D., Kapus, A., 2005. Depolarization induces Rho-Rho kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in kidney tubular cells. Am J Physiol Cell Physiol 289, C673-685.

Taguchi, K., Ishiuchi, T., Takeichi, M., 2011. Mechanosensitive EPLIN-dependent remodeling of adherens junctions regulates epithelial reshaping. The Journal of Cell Biology 194, 643-656.

Tanaka, N., Meng, W., Nagae, S., Takeichi, M., 2012. Nezha/CAMSAP3 and CAMSAP2 cooperate in epithelial-specific organization of noncentrosomal microtubules. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 20029-20034.

Tojkander, S., Gateva, G., Lappalainen, P., 2012. Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. Journal of Cell Science 125, 1855-1864.

Toya, M., Takeichi, M., 2016. Organization of Non-centrosomal Microtubules in Epithelial Cells. Cell Structure and Function 41, 127-135.

Tresguerres, M., Levin, L.R., Buck, J., 2011. Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. Kidney international 79, 1277-1288.

Tuszyński, J.A., Portet, S., Dixon, J.M., Luxford, C., Cantiello, H.F., 2004. Ionic Wave Propagation along Actin Filaments. Biophysical Journal 86, 1890-1903.

Umnov, M., Palusinski, O.A., Deymier, P.A., Guzman, R., Hoying, J., Barnaby, H., Yang, Y., Raghavan, S., 2007. Experimental evaluation of electrical conductivity of microtubules. Journal of Materials Science 42, 373-378.

van Nieuw Amerongen, G.P., Beckers, C.M.L., Achekar, I.D., Zeeman, S., Musters, R.J.P., van Hinsbergh, V.W.M., 2007. Involvement of Rho Kinase in Endothelial Barrier Maintenance. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 27, 2332-2339.

Verin, A.D., Birukova, A., Wang, P., Liu, F., Becker, P., Birukov, K., Garcia, J.G.N., 2001. Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 281, L565-L574.

Verin, A.D., Gilbert-McClain, L.I., Patterson, C.E., Garcia, J.G.N., 1998. Biochemical Regulation of the Nonmuscle Myosin Light Chain Kinase Isoform in Bovine Endothelium. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 19, 767-776.

Vetterkind, S., Poythress, R.H., Lin, Q.Q., Morgan, K.G., 2013. Hierarchical scaffolding of an ERK1/2 activation pathway. Cell Communication and Signaling : CCS 11, 65-65.

Vial, E., Sahai, E., Marshall, C.J., 2003. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. Cancer Cell 4, 67-79.

Vicente-Manzanares, M., Horwitz, A.R., 2010. Myosin light chain mono- and di-phosphorylation differentially regulate adhesion and polarity in migrating cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 402, 537-542.

Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., Horwitz, A.R., 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. Nat Rev Mol Cell Biol 10, 778-790.

Vossler, M.R., Yao, H., York, R.D., Pan, M.-G., Rim, C.S., Stork, P.J.S., 1997. cAMP Activates MAP Kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-Dependent Pathway. Cell 89, 73-82.

Waheed, F., Speight, P., Kawai, G., Dan, Q., Kapus, A., Szaszi, K., 2010. Extracellular signal-regulated kinase and GEF-H1 mediate depolarization-induced Rho activation and paracellular permeability increase. Am J Physiol Cell Physiol 298, C1376-1387.

Wang, L., Zhou, P., Craig, R.W., Lu, L., 1999. Protection from Cell Death by mcl-1 Is Mediated by Membrane Hyperpolarization Induced By K+ Channel Activation. The Journal of Membrane Biology 172, 113-120.

Wang, Q., Patton, W.F., Chiang, E.T., Hechtman, H.B., Shepro, D., 1996. Filamin translocation is an early endothelial cell inflammatory response to bradykinin: Regulation by calcium, protein kinases, and protein phosphatases. J. Cell. Biochem 62, 383–396.

Wang, S., Melkoumian, Z., Woodfork, K.A., Cather, C., Davidson, A.G., Wonderlin, W.F., Strobl, J.S., 1998. Evidence for an early G1 ionic event necessary for cell cycle progression and survival in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. J Cell Physiol 176, 456-464.

Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M., Narumiya, S., 1997. p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila

diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. The EMBO Journal 16, 3044-3056.

Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T., Kaibuchi, K., 2004. Interaction with IQGAP1 Links APC to Rac1, Cdc42, and Actin Filaments during Cell Polarization and Migration. Developmental cell 7, 871-883.

Waterman-Storer, C.M., Salmon, E.D., 1997. Actomyosin-based Retrograde Flow of Microtubules in the Lamella of Migrating Epithelial Cells Influences Microtubule Dynamic Instability and Turnover and Is Associated with Microtubule Breakage and Treadmilling. The Journal of Cell Biology 139, 417-434.

Waterman-Storer, C.M., Worthylake, R.A., Liu, B.P., Burridge, K., Salmon, E.D., 1999. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. Nat Cell Biol 1, 45-50.

Wen, Y., Eng, C.H., Schmoranzer, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E.J.S., Chen, M., Wallar, B.J., Alberts, A.S., Gundersen, G.G., 2004. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. Nat Cell Biol 6, 820-830.

Wenjun, D., Xi, L., Guiling, F., Xingsheng, Z., Yanying, S., Tianzhen, W., Ran, Z., Guangyu, W., Ci, Z., Yuanyuan, Z., Fei, Y., Xiaoming, J., Fengmin, Z., Zhaohua, Z., Xiaobo, L., 2014. From cell membrane to the nucleus: an emerging role of E-cadherin in gene transcriptional regulation. Journal of Cellular and Molecular Medicine 18, 1712-1719.

Wortzel, I., Seger, R., 2011. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. Genes Cancer 2, 195-209.

Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M., Sturgill, T., 1993a. Inhibition of the EGFactivated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. Science 262, 1065-1069.

Wu, J.C., Gregory, C.W., Dephilip, R.M., 1993b. P-Cadherin and E-Cadherin Are Co-expressed in MDCK Cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 195, 1329-1335.

Wu, Y., Kanchanawong, P., Zaidel-Bar, R., 2015. Actin-Delimited Adhesion-Independent Clustering of E-Cadherin Forms the Nanoscale Building Blocks of Adherens Junctions. Developmental cell 32, 139-154.

Yanazume, T., Hasegawa, K., Wada, H., Morimoto, T., Abe, M., Kawamura, T., Sasayama, S., 2002. Rho/ROCK Pathway Contributes to the Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase/GATA-4 during Myocardial Cell Hypertrophy. Journal of Biological Chemistry 277, 8618-8625.

Yang, M., Brackenbury, W.J., 2013. Membrane potential and cancer progression. Frontiers in Physiology 4.

Yang, W.-P., Onuma, E.K., Hui, S.-W., 1984. Response of C3H/10T1/2 fibroblasts to an external steady electric field stimulation: Reorientation, shape change, conA receptor and intramembranous particle distribution and cytoskeleton reorganization. Experimental Cell Research 155, 92-104.

Yano, T., Kanoh, H., Tamura, A., Tsukita, S., 2017. Apical cytoskeletons and junctional complexes as a combined system in epithelial cell sheets. Annals of the New York Academy of Sciences, n/a-n/a.

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. The Journal of Cell Biology 203, 605-614.

Yao, Z., Seger, R., 2009. The ERK signaling cascade—Views from different subcellular compartments. BioFactors 35, 407-416.

Yeaman, C., Grindstaff, K.K., Nelson, W.J., 1999. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. Physiol Rev 79, 73-98.

Yeung, T., Terebiznik, M., Yu, L., Silvius, J., Abidi, W.M., Philips, M., Levine, T., Kapus, A., Grinstein, S., 2006. Receptor Activation Alters Inner Surface Potential During Phagocytosis. Science 313, 347-351.

Ying-Ting, Z., Hayashida, Y., Kheirkhah, A., He, H., Sue-Yue, C., Tseng, S.C.G., 2008. Characterization and Comparison of Intercellular Adherent Junctions Expressed by Human Corneal Endothelial Cells in Vivo and in Vitro. Investigative ophthalmology & visual science 49, 3879-3886.

Yoon, S., Seger, R., 2006. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. Growth Factors 24, 21-44.

Young, S.W., Dickens, M., Tavaré, J.M., 1994. Differentiation of PC12 cells in response to a cAMP analogue is accompanied by sustained activation of mitogen-activated protein kinase. FEBS Letters 338, 212-216.

Zaccolo, M., Pozzan, T., 2002. Discrete Microdomains with High Concentration of cAMP in Stimulated Rat Neonatal Cardiac Myocytes. Science 295, 1711-1715.

Zhang, J., Betson, M., Erasmus, J., Zeikos, K., Bailly, M., Cramer, L.P., Braga, V.M.M., 2005. Actin at cell-cell junctions is composed of two dynamic and functional populations. Journal of Cell Science 118, 5549-5562.

Zhao, J., Wei, J., Mialki, R., Zou, C., Mallampalli, R.K., Zhao, Y., 2012. Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Regulates Cortactin Ubiquitination and Degradation in Lung Epithelial Cells. The Journal of biological chemistry 287, 19105-19114.

Zhao, M., Song, B., Pu, J., Wada, T., Reid, B., Tai, G., Wang, F., Guo, A., Walczysko, P., Gu, Y., Sasaki, T., Suzuki, A., Forrester, J.V., Bourne, H.R., Devreotes, P.N., McCaig, C.D., Penninger, J.M., 2006. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-[gamma] and PTEN. Nature 442, 457-460.

Zhu, B., Zhang, L., Creighton, J., Alexeyev, M., Strada, S.J., Stevens, T., 2010. Protein kinase A phosphorylation of tau-serine 214 reorganizes microtubules and disrupts the endothelial cell barrier. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 299, L493-L501.

Zippin, J.H., Chen, Y., Nahirney, P., Kamenetsky, M., Wuttke, M.S., Fischman, D.A., Levin, L.R., Buck, J., 2002. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. The FASEB Journal.