



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Análisis *in silico* de arpin, un inhibidor del complejo Arp2/3:
implicaciones para la regulación de la barrera epitelial”**

TESIS

Que presenta

Q.F.B. Karina Belén Hernández Almaraz

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR**

Director de la tesis

Dr. Michael Schnoor

Índice

INTRODUCCIÓN	1
Tejido Epitelial.....	1
Participación del complejo de unión apical en la regulación de la barrera epitelial intestinal durante salud e inflamación	3
Funciones del citoesqueleto de actina en los tejidos epiteliales.....	7
Complejo Arp2/3	8
Factores promotores de nucleación.....	11
Proteínas inhibitorias del complejo Arp2/3.....	12
Justificación	17
Hipótesis	18
Objetivo General.....	18
Objetivos específicos	18
Métodos	19
Análisis <i>in silico</i>	19
Resultados	22
Arpin se expresa de manera ubicua.....	22
Arpin tiene características que sugieren su localización en el citoplasma.....	25
Arpin presenta modificaciones postraduccionales que podrían modular su participación en la barrera epitelial intestinal.....	27
Arpin posee dominios putativos con los que podría interactuar con proteínas que se ubican en la membrana plasmática.....	29
Arpin podría estar interactuando directa o indirectamente con proteínas de unión.....	31
El gen ARPIN tiene sitios de unión para diversos factores de transcripción involucrados en la respuesta inflamatoria.....	33
Discusión	35
Conclusiones.....	40
Perspectivas.....	41
Referencias.....	42

Dedicatoria

A mis padres, Soledad Almaraz Gopar y Reynaldo Hernández Hernández. Por estar siempre en cada paso que he dado a lo largo de mi desarrollo profesional, dando las mejores palabras y ejemplo ante circunstancias de la vida misma y seguir adelante. Los amo.

A mi hermano, Jairo. Siempre dándome un cambio de perspectiva para seguir en el camino por más "difícil" que pudiera parecer. Te amo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca recibida durante el periodo 2019-2021.

Al Dr, Michael Schnoor, por aceptarme en su equipo de trabajo y por sus consejos durante el desarrollo de este trabajo.

A mis padres, gracias por todo lo dado incondicionalmente. Y siempre alentándome a seguir las metas.

Al M. en C. Armando Montoya García, por todo el conocimiento que me ha dado desde el primer momento, y a lo largo de este año. Gracias por la paciencia.

A mis compañeros de laboratorio, por sus consejos transmitidos a la distancia.

A mis asesores, Dra. Abigail Betanzos Fernández y Dr. Vianney Ortiz Navarrete, por su tiempo y asesoría otorgada.

A mis amigos; Fernanda, Juve, Miguel y Arturo, por todas las experiencias compartidas desde que comenzamos juntos esta etapa de nuestras vidas. Los quiero mucho.

Abstract

Epithelial tissue is comprised of a cellular layer of closely attached cells that covers the inside of organs and surfaces of the body. Although epithelia can differ in structure and function, they share characteristics like maintaining cellular polarity with three distinct regions: that apical region that is in contact with the external medium, the lateral region that establishes cell-cell contacts, and basal region that adheres to extracellular material such as the basal membrane. Intercellular junctions responsible for regulating epithelial permeability are constituted by the apical junction complex with tight (TJ) and adherent junctions (AJ). TJ are formed by transmembranal proteins such as occludin and claudins and scaffolding proteins such as the ZO family. AJ are mostly comprised of E-cadherin, and scaffolding proteins of the catenin family. The actin cytoskeleton is connected to junctions via the scaffolding proteins building the perijunctional actin ring that provides mechanical stability to the junctions. Actin filaments are generated by different actin nucleators like the Arp2/3 complex that generates branched actin filament networks. Arp2/3 activation is achieved via different nucleation-promoting factors such as WASP, N-WASP, WASH, WHAMM, and WAVE; and Arp2/3 inhibition is regulated by proteins such as Gadkin, Pick1, and Arpin. Arpin is a recently discovered protein that antagonizes WAVE in lamellipodia. However, the functions of Arpin in epithelia are unknown. In this study, we performed detailed in silico analyses to understand the intrinsic characteristics that could suggest the participation of arpin in epithelial barrier regulation. We found that Arpin has an isoelectric point of 5.56-5.6 and a hydrophilic score of cytoplasmatic proteins. Arpin has different sites of phosphorylation along its sequence including S2, Y5, S48, S86 which could regulate its cellular functions. Also, arpin possesses binding sites to the μ subunit of the AP-4 complex, and SH2 motif that would allow for association with the apical junction complex proteins E-cadherin, occludin, and claudins, and an acidic motive that allows for binding to Arp2/3 and tankyrases. The regulatory sequence of the ARPIN gene contains putative binding sites for transcription factors such as IRF1, STAT-1, and Rel-A which could explain the observed negative regulation of ARPIN expression during inflammation. In summary, these data suggest that arpin is a cytoplasmatic proteins that may also associate with the apical junction complex under certain conditions to regulate intestinal epithelial barrier integrity. These in silico data pave the way for the design of appropriate experimental studies to analyze the mechanisms of how Arpin regulates intestinal barrier integrity in vivo and in vitro.

Resumen

El tejido epitelial consiste en células estrechamente agregadas que se adhieren firmemente entre sí, formando láminas celulares que recubren el interior de los órganos y cubren la superficie del cuerpo. A pesar de que los epitelios pueden diferir en estructura y función, comparten características como mantener polaridad celular, formando tres regiones: una región apical; que está en contacto con el medio externo, una región lateral; que ejerce las uniones célula-célula y la región basal; que se adhiere a materiales extracelulares como la membrana basal. Las uniones intercelulares que mantienen la barrera epitelial están constituidas por el complejo de unión apical, que integra las uniones estrechas incluyendo proteínas transmembranales como ocludina y claudinas y proteínas de andamiaje de la familia ZO; y las uniones adherentes con E-cadherina, α -catenina y β -catenina. El citoesqueleto de actina está conectado a las uniones y forma el anillo perijuncional que las sostiene. Los filamentos de actina son generados por diferentes nucleadores de actina, como el complejo Arp 2/3, que forma redes de actina ramificada. Su activación es regulada por diferentes factores promotores de nucleación como los de la familia WASP, N-WASP, WASH, WHAM y WAVE, mientras que su inhibición es regulada por proteínas como Gadin, Pick1 y arpin. Arpin es una proteína recientemente descubierta que antagoniza la actividad de WAVE en lamelipodios. Actualmente, poco se sabe de su función en tejido epitelial. En este estudio, se realizó el análisis *in silico* para conocer las propiedades intrínsecas que podrían sugerir su participación en la regulación de la barrera epitelial. Se encontró que arpin es una proteína hidrofílica con un punto isoeléctrico de 5.56-5.6 similar a proteínas citoplasmáticas. Arpin presenta diferentes sitios de fosforilación a lo largo de su secuencia como en S2, Y5, S48 y S86; que podrían regular sus funciones celulares. Además, posee motivos de unión al dominio μ del complejo AP-4, un motivo SH2 que podrían generar asociación con proteínas de unión del complejo apical como E-cadherina y ocludina, y un motivo ácido que permite la unión con el complejo Arp2/3 y tanquirasas. La secuencia reguladora del gen *arpin* presenta sitios putativos de unión a factores de transcripción como IRF1, STAT1 y Rel-A, que podría explicar que el tratamiento con IFN- γ y TNF- α provoca una disminución en su expresión. Estos datos revelan que arpin tiene características de proteínas citoplasmáticas, pero que también podría interactuar con proteínas del complejo de unión apical. Además, arpin es blanco para modificaciones postraduccionales que podrían modular su interactoma y su localización. Estas características sugieren su participación en la regulación de la barrera intestinal que se investigará experimentalmente en el futuro.

INTRODUCCIÓN

Tejido Epitelial

Los epitelios son tejidos avasculares que recubren las superficies externas del cuerpo y revisten las cavidades internas cerradas y los sistemas que comunican con el exterior (digestivo, respiratorio y genitourinario). Las células que integran los epitelios poseen tres características principales: forman uniones intercelulares, tienen polaridad morfológica y funcional (región apical, región lateral y región basal) y su superficie basal esta adherida a una membrana basal subyacente. Los epitelios se clasifican con respecto a la cantidad de estratos celulares (simples y estratificados) y la forma de las células más superficiales (planas, cúbicas y cilíndricas) [1].

Los epitelios sirven como barrera entre el contenido luminal y el tejido intersticial subyacente. Los epitelios también regulan el transporte de agua, nutrientes e iones; garantizando una homeostasis del microambiente. Para funcionar como barrera, las células epiteliales están conectadas por tres estructuras intercelulares: uniones estrechas (UE), uniones adherentes (UA) y desmosomas (**figura 1**).

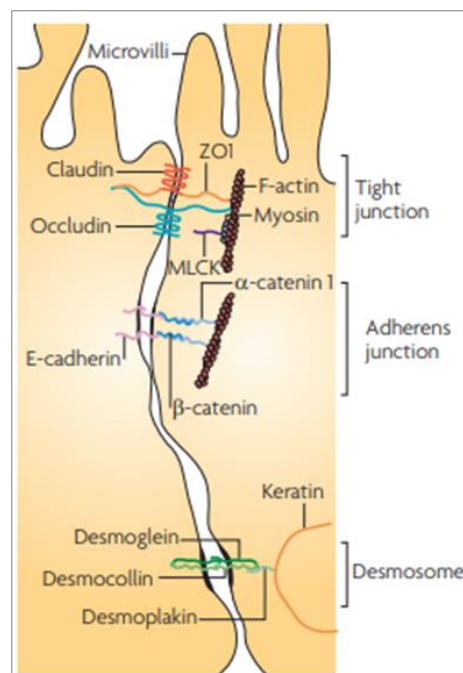


Figura 1.- Principales uniones y proteínas transmembranales en los epitelios. Se muestran las principales proteínas transmembranales en las uniones del epitelio intestinal, asociadas a uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas. Tomado de Turner 2009 [2].

El complejo de unión apical, integrado por las uniones estrechas y las uniones adherentes, juega un papel fundamental en la regulación de la barrera epitelial ya que rodea la porción apical de las células epiteliales adyacentes promoviendo la estabilización del epitelio; y define las propiedades de la barrera transepitelial: 1) la función de compuerta, que determina la polaridad de las células epiteliales; 2) la función de señalización, que afecta vías reguladoras; y 3) la función de barrera, que mantiene la integridad del epitelio y controla la permeabilidad epitelial [3] [4]. Su estabilidad es mantenida gracias a su conexión con el anillo actomiosina perijuncional constituido por F-actina y miosina II no muscular. El anillo actomiosina perijuncional está ubicado adyacente a las UE y UA, y conectado a las proteínas de andamiaje del complejo de unión apical. Mientras que los desmosomas median la adhesión intercelular y la comunicación entre las células epiteliales adyacentes [5].

Las uniones estrechas están conformadas por una red compleja de proteínas transmembranales (incluyendo ocludina, claudina-1,-2,-3,-4,-5,-8,-15 y moléculas de adhesión de unión “JAMs”), que unen células epiteliales adyacentes gracias a interacciones homologas entre sí [6]. Las claudinas tienen motivos de unión a dominios GUK y PDZ, respectivamente, que se unen a proteínas citosólicas de andamiaje de la familia zónula occludens (ZO) [7], que conectan al citoesqueleto de actina a través de proteínas de unión a actina, así como a través de su dominio de unión actina en su extremo carboxilo terminal [8] [9] [10].

Las uniones adherentes se sitúan debajo de las uniones estrechas, y están caracterizadas por mantener la unión entre célula-célula de 10-20 nm. La principal proteína transmembranal de las UA es E-cadherina, una glicoproteína dependiente de Ca^{2+} [11] que posee en su lado carboxilo-terminal el dominio yuxtamembranal (JMD) donde se une p120-catenina y el dominio de unión a catenina (CBD) donde se une directamente β -catenina [12] [13] [14] [15], la cual se une a α -catenina que se conecta a filamentos de actina u otras proteínas citoplasmáticas (vinculina, α -actinina, complejo Arp2/3, forminas), que ayudan a la formación del anillo de actomiosina perijuncional, el cual mantiene estabilizado el complejo de unión apical [16].

Participación del complejo de unión apical en la regulación de la barrera epitelial intestinal durante salud e inflamación

La monocapa epitelial del intestino es una barrera selectiva que permite la absorción de nutrientes y electrolitos, además, protege los tejidos subyacentes de la infiltración de antígenos y bacterias presentes en el lumen. La alteración de esta barrera se ha asociado con la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), sin embargo, aún no se conocen por completo los mecanismos que causan estas alteraciones.

El epitelio del sistema gastrointestinal es una capa única de células columnares que requiere de una regulación estricta en la expresión, distribución y función de las proteínas del complejo de unión apical para regular el paso específico de iones y macromoléculas. Esta regulación es conferida por el transporte paracelular y el transporte transcelular (difusión pasiva, transcitosis y transportadores). Dentro del transporte paracelular, la participación de las uniones estrechas es relevante debido a las características intrínsecas que poseen tanto ocludina y claudinas. Ocludina, a través del dominio ocludina / ELL de bobina en espiral C-terminal (OCEL) genera la regulación de la selectividad por tamaño que permiten el paso de macromoléculas [17]. Claudinas regulan la selectividad iónica determinada principalmente por los residuos de aminoácidos presentes en su primer dominio extracelular que permiten la formación de poros [3].

Usando células *knock-down* de ocludina, con las que se evaluó el flujo paracelular de macromoléculas, se demostró que su eliminación aumentó el flujo de moléculas desde 2.9 Å hasta 36 Å de radio y que el dominio OCEL (del inglés, *Occludin C-terminal coiled-coil /ELL domain*) es necesario para mantener interacciones entre ocludina y ZO-1 y estar localizada en las uniones estrechas [18], [17]. La ocludina presenta fosforilaciones en residuos de treonina (T403 y T404) que permite su localización en las uniones estrechas, mientras que la desfosforilación en residuos de serina (S408) reduce la permeabilidad paracelular estabilizando su interacción con ZO-1, debido a que en ensayos de unión de proteínas *in vitro* se demostró que la fosforilación de S408 dada por la proteína cinasa CK2 reduce la interacción entre ocludina y ZO-1 provocando aumento de la permeabilidad paracelular, mientras que al inhibir la función de CK2 hubo un aumento en la unión ocludina-ZO-1 y una disminución en la permeabilidad paracelular [19] [20] [21].

Las claudinas son proteínas que poseen cuatro dominios transmembranales y dos bucles extracelulares, siendo el primero hidrófobo que determina la selectividad paracelular catiónica o

aniónica [22] [18] y su función formadora de poro. Actualmente se han descrito 27 claudinas que se expresan en los tejidos con una distribución heterogénea espacio-temporal de las diferentes claudinas en el tracto gastrointestinal [23] [24], otorgando así propiedades fisiológicas diferentes en el espacio paracelular a lo largo del intestino. Por ejemplo, las claudina-1, -3 y -4 participan en la formación de barrera; manteniendo la integridad de las uniones estrechas en el colon mientras que claudina-2 y claudina-15 fungen como formadoras de poro; regulando el transporte paracelular de Na⁺ y agua [9]. La formación de poro es dada por la repulsión de cargas por residuos de igual carga en el ECL1 (del inglés Extracellular Loop 1), mientras que la formación de barrera se da por la atracción de diferentes cargas dados por diferentes residuos en el ECL1. El segundo bucle causa estrechamiento de la hendidura paracelular [25].

Tanto JAM-A y JAM-C se expresan en células epiteliales intestinales y su fosforilación en la serina 284 y serina 281 son requeridas para que se localicen en las uniones estrechas, respectivamente [26]. La función de JAM-A en la barrera epitelial del colon se analizó en ratones JAM1^{-/-}, observando que su eliminación desencadena un aumento de infiltrado leucocitario en la mucosa del colon, y un aumento en la permeabilidad para macromoléculas e iones, debido a un aumento en la expresión de claudina-10 y claudina-15, caracterizadas por ser formadoras de poro [27].

Las proteínas ZO (ZO-1, ZO-2, ZO-3) son proteínas de andamiaje que proporcionan una base para el ensamblaje de proteínas en la superficie citoplasmática de las uniones intercelulares, así como generar un enlace entre las proteínas integrales de la membrana y la F-actina. Esta base estructural es conferida por los diferentes dominios que poseen; PDZ (PSD-95 / Dlg / ZO-1) (PDZ1-3), dominio SH3, dominio GUK (del inglés *Guanylate kinase*), dominio variable (U1-U6) y dominio ABR (del inglés *Actin Binding Region*). Su participación en la estabilización de las uniones estrechas se da mediante el dominio PDZ-1 que es un sitio de unión con las claudinas, mientras que el dominio PDZ-3 se une a las JAMs. El dominio GUK une a las ocludinas. A su vez, las tres proteínas ZO pueden interconectarse gracias al dominio PDZ-2, y debido a que las tres proteínas ZO poseen dominio SH3 y ABR pueden realizar interconexión con proteínas de unión a actina o directamente con F-actina, estableciendo la localización y estabilización de ZO-1, ZO-2 y ZO-3 en las uniones estrechas [28]. Se ha reportado que el IFN- γ genera una mayor disminución en la expresión y estabilidad de ZO-1 comparado con ZO-2, a su vez, se ha sugerido que debido a la disminución de expresión de ZO-1 la localización de ZO-2 y ocludinas se ve disminuida en las

uniones estrechas, además, se determinó que la disminución de ZO-1 y la dinámica del citoesqueleto de actina, ocasiona daño en la integridad de las uniones estrechas, sin embargo, hay una recuperación de ambas al remover IFN- γ , induciendo la reorganización de las UE [29].

Las uniones adherentes, mantienen la asociación física entre las células, la regulación del citoesqueleto de actina, las vías de señalización intracelular y la regulación transcripcional. La unión entre células se da porque E-cadherina puede generar interacción con E-cadherinas de la célula vecina a través de sus dominios extracelulares. La estabilidad de E-cadherina implica, tanto su asociación hemofílica con E-cadherinas de la misma célula como su asociación con el complejo de cateninas que a su vez, estas últimas pueden interactuar con filamentos de actina que le permite mantener todo el complejo estable, sin embargo, bajo contexto inflamatorio, E-cadherina se endocita, lo que conlleva a la pérdida de las uniones interepitelial y un aumento en la permeabilidad [30].

La barrera intestinal epitelial es comprometida por infecciones, enfermedades inflamatorias intestinales (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), síndrome del intestino irritado, así como cáncer. Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) tienen una causa multifactorial que provocan episodios repetitivos de inflamación, debido a que las células activadas del sistema inmunológico montan una respuesta Th1 con la liberación de una amplia gama de citocinas proinflamatorias, así como el aumento del reclutamiento leucocitario, generando un cambio en la expresión de las proteínas de uniones y cambios en la permeabilidad epitelial. En muestras de pacientes con EII se han encontrado altos niveles de TNF- α e IFN- γ , las cuales tienen un papel importante en la disrupción de las uniones intercelulares por internalización de proteínas de UE y UA y por ende la desregulación de la permeabilidad epitelial [31] [32]. También, se ha encontrado un aumento en IL-13, que provoca un incremento en la expresión de claudina-2, así aumentando el flujo de iones [33] [34]. Además, el TNF- α induce apoptosis en el epitelio mediado por el receptor TNFR1, por lo tanto, la integridad de las monocapas del epitelio intestinal se ve afectado, provocando un aumento del flujo paracelular y transcelular (**figura 2**). Se ha reportado que la liberación de elastasa de neutrófilos promueve la escisión de E-cadherina, contribuyendo también a la disrupción de las uniones adherentes aumentando el espacio paracelular, provocando aumento en la permeabilidad epitelial [35]. Es importante tener en cuenta que los cambios de expresión de las claudinas en una respuesta inflamatoria generan un cambio en las propiedades de barrera,

debido al reemplazo de claudinas formadoras de barreras con claudinas formadoras de poros, influyendo en el movimiento de iones y fluidos a través de las células. Por ejemplo, el IFN- γ promueve la endocitosis de claudina-1, mientras que TNF- α e IL-13 aumentan la expresión de claudina-2 [8].

No obstante, se han reportado mecanismos regulatorios que tratan de compensar la pérdida de la función de la barrera epitelial, como la extrusión de células epiteliales apoptóticas, que consiste en la formación de un anillo de actomiosina que se contrae tanto en la célula apoptótica como en las células adyacentes para permitir la expulsión de la célula apoptótica de la monocapa y así mantener el epitelio intacto. Se sabe que las células vivas en contacto directo con las células apoptóticas experimentan un alargamiento en la dirección de la célula apoptótica mediado por E-cadherina que previene la disrupción de las uniones durante este proceso [36] [37].

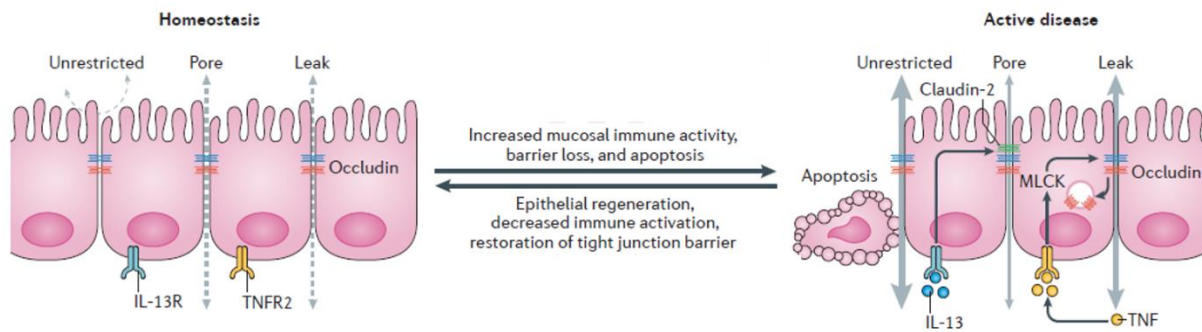


Figura 2.- Permeabilidad de las células epiteliales intestinales durante la homeostasis y enfermedad intestinal inflamatoria. A la izquierda se muestra la regulación de la permeabilidad del epitelio intestinal por el flujo paracelular de iones y macromoléculas en condiciones basales. Del lado derecho se muestra que la presencia de citoquinas inflamatorias como TNF- α genera un aumento de la permeabilidad de macromoléculas, mientras que la IL-13 genera un efecto adverso aumentando la expresión de claudina-2, aumentando así el flujo de iones. Ante un proceso inflamatorio se genera apoptosis generando mayor disrupción de barrera. Tomado y modificado de Odenwald y Turner (2016). [8]

El TNF- α promueve la endocitosis de ocludina y claudinas generando un aumento del flujo paracelular [38] [39], sin embargo, hay reportes donde demuestran que la ausencia de ocludina no afecta el flujo paracelular. Este hallazgo ha sido evaluado en diferentes líneas celulares, así como utilizando nuevos enfoques experimentales como “Sandwich assay”, que permite la localización de moléculas trazadoras a través del lado apical-basal, basándose en una interacción avidina-biotina. Los dextranos biotinilados y fluorescentes se unen a la avidina colocada basolateralmente durante el paso paracelular, permitiendo una visualización más específica de la localización de

macromoléculas por tiempo y espacio, [40]. También, se reportó que en ratones *knock-out* de ocludina ante el estímulo de TNF- α se generó una protección del epitelio por una disminución de la expresión de caspasa-3 evitando así la apoptosis epitelial [41].

Como se mencionó previamente, la participación del citoesqueleto de actina en la integridad epitelial es importante, y estímulos inflamatorios generan cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina y como consecuencia una desestabilización del complejo de unión apical como se describe en detalle en seguida.

Funciones del citoesqueleto de actina en los tejidos epiteliales.

El citoesqueleto de actina se forma a partir de subunidades monoméricas globulares (G-actina) que polimerizan para formar una estructura de dos hebras filamentosas conocida como F-actina. Dicha polimerización se genera a partir de la activación de la G-actina por Mg^{2+} que desencadena un cambio conformacional necesario para dar comienzo a la nucleación de más monómeros de G-actina y generar alargamiento del filamento de actina. La forma que adquiere la F-actina depende de las proteínas de unión a actina, las cuales pueden generar redes de F-actina, F-actina ramificada, F-actina no ramificada y haces de actina contráctiles en células no musculares (fibras de estrés) [42].

En las células epiteliales, el citoesqueleto de actina proporciona estabilidad y forma a la célula, gracias a la presencia de F-actina cortical organizada en una malla ubicada alrededor del complejo de unión apical. En la región apical múltiples filamentos se organizan en la misma orientación para la formación de microvellosidades (en células epiteliales transportadoras como del intestino y riñón), mientras que en la región apico-lateral se genera el cinturón circunferencial conocido como anillo de actomiosina perijuncional ubicado adyacentemente al complejo de unión apical. Este anillo de actomiosina perijuncional mantiene interacción con las proteínas del complejo de unión apical estables, debido a que F-actina interactúa directamente con ZO-1, el cual interactúa con proteínas de UE y UA, lo que le da estabilidad a la barrera epitelial [43] [44] [45].

En condiciones normales, la F-actina y la G-actina mantienen un equilibrio dinámico para la formación de estas estructuras. Sin embargo, cuando se rompe este equilibrio, la función de barrera se daña. Ante estímulos inflamatorios la estructura de la F-actina perijuncional junto con el desanclaje del complejo de unión apical ha sido evidente en células epiteliales del colon, observando una reorganización de la F-actina perijuncional formando estructuras contráctiles

como fibras de estrés. Las células epiteliales expresan miosina no muscular tipo II (NM-II), la cual se une a los filamentos de actina debido a las fosforilaciones en su cadena ligera reguladora en los residuos de serina 19, y treonina 18 [46]. Se ha determinado que TNF- α e IFN- γ aumentan la expresión de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), así como la cinasa ROCK, que conllevan a una hiperfosforilación de NM-II. NM-II se ensambla en filamentos bipolares a través de interacciones entre sus dominios alargados. Estos filamentos se unen a la actina a través de sus dominios de cabeza y la actividad de ATPasa de la cabeza permite un cambio conformacional que mueve los filamentos de actina de manera antiparalela, proceso regulado por la fosforilación de las cadenas reguladoras de miosina [32] [47]. Este suceso se ve atenuado por la desfosforilación de las cadenas ligeras reguladoras de NM-II mediante la fosfatasa de cadena ligera de miosina (MLCP); que inhibe la formación de puentes cruzados de miosina con actina [48].

La participación de diferentes proteínas nucleadoras juegan un rol importante en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina, la formación de anillo perijuncional y por ende la estabilidad del complejo de unión apical. Esta dinámica es regulada por diferentes nucleadores de actina como el complejo Arp2/3 que tiene la característica de generar redes de actina ramificada.

Complejo Arp2/3

El complejo Arp2/3 fue identificado al coimmunoprecipitar con profilina como un conjunto proteico de siete subunidades en *Acanthamoeba castellanii* [49]. Este complejo está muy conservado entre especies y genera la red de filamentos de actina ramificada responsable de generar una fuerza para la formación de protuberancias de las células eucariotas móviles.

El complejo Arp2/3 está conformado por dos proteínas tipo actina 2 y 3, así como 5 subunidades (ARPC1-5) que sirven de andamiaje al complejo. La estructura cristalina del complejo Arp2/3 bovino reveló que las subunidades ARPC2 y ARPC4 forman un sitio en el cual las subunidades Arp2 y Arp3 se anclan, y las subunidades ARPC3, ARPC5 y ARPC1 se encuentran alrededor de las proteínas Arp2 y Arp3 (**Figura 3**). Arp3 y Arp2 tienen 42 y 19 residuos de aminoácidos extra que la actina, respectivamente, y tienen la mayoría de los residuos de aminoácidos que interactúan con el trifosfato de adenosina (ATP) en la actina, que le permite la nucleación de actina, así como brindarles afinidad a los factores promotores de nucleación. Los residuos glicina 46, cisteína 54, valina 347 y leucina 358 que poseen los subdominios 3 y 4 de Arp2, y residuos de tirosina 325 a

glutamina 335 de los subdominios 2 y 3 de Arp3, son de importancia para mantener contacto con las subunidades ARPC5, ARPC3 y ARPC2 del complejo Arp2/3 para generar el sitio donde se unirán los activadores o inhibidores del complejo. Cuando el complejo se encuentra en una conformación inactiva, las subunidades Arp2 y Arp3 se encuentran alejadas, mientras que, cuando el complejo se activa estas dos subunidades se juntan [50]. Una vez activo, Arp2 y Arp3 forman las dos primeras subunidades del filamento hijo, el filamento madre presenta una distorsión que origina un surco en el cual las hélices C-terminales de ARPC2 y ARPC4 se colocan, ARPC3 estabiliza a Arp3 en el estado activo sobre el filamento madre, ARPC5 mantiene contacto con el filamento madre y mantiene a Arp2 en el complejo cuando está activo y ARPC1 mantiene contactos menores con el filamento madre. Estas interacciones promueven la formación de ramificaciones de actina con un ángulo aproximado de 70° a partir de filamentos preformados (“filamento madre”) [51].

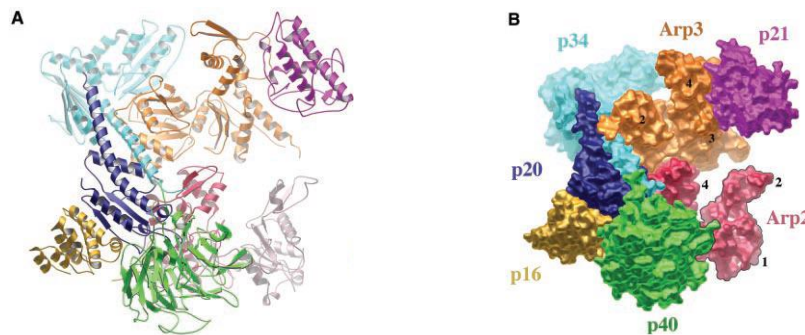


Figura 3.- Estructura del complejo Arp2/3. A) Diagrama de listón de la estructura de cristal del complejo Arp2/3 bovino con sus subunidades marcadas de diferente color. B) Diagrama de relleno de espacio de la organización del complejo Arp2/3; p40(ARPC1), p34(ARPC2), p21 (ARPC3), p20 (ARPC4), p16(ARPC5). Los subdominios homólogos a la actina de Arp2 y Arp3 se marcan con los números 1-4. Tomado de Robinson et. al (2001) [50]

La participación del complejo Arp2/3 en los procesos celulares ha sido estudiado mediante su inhibición empleando inhibidores exógenos, así como la obtención de líneas celulares con pérdida de la expresión génica de algunas de sus subunidades. Cabe destacar que la pérdida de una subunidad causa la pérdida completa del complejo Arp2/3 funcional que requiere de todas sus 7 subunidades.

En fibroblastos deficientes de la subunidad ARPC3 no se observó la formación de lamelipodios y se identificó que tienen una deficiencia para mantener la direccionalidad del movimiento [52].

Mediante la eliminación de ARPC2 y Arp2 se evidenció que se requiere al complejo Arp2/3 para la formación de lamelipodios para llevar a cabo la haptotaxis, proceso en el cual las células pueden detectar y responder a los gradientes de la composición de la matriz extracelular y migrar de forma direccional [53].

La participación del complejo Arp2/3 en la integridad de la barrera epitelial ha sido asociada por la colocalización de la proteína activadora de Arp2/3, WAVE2, en las uniones adherentes, también se ha reportado que la delección de otro activador de Arp2/3, N-WASP, en intestino provoca alteración en la estructura de las uniones estrechas; provocando un aumento del flujo paracelular y disminución de la resistencia transepitelial, sugiriendo que Arp2/3 podría participar en la regulación de las uniones adherentes y estrechas [54] [55]. También, se ha establecido que la pérdida de ArpC3 afecta la estructura de la epidermis y en los queratinocitos deficientes de ARPC3, las uniones estrechas se ven onduladas, generando así una disminución de la resistencia transepitelial [56].

El uso de inhibidores exógenos ha ayudado a conocer el papel que tiene el complejo Arp2/3 en la regulación de ocludina en las uniones estrechas. Se ha reportado que el inhibidor farmacológico CK-666 es específico para el complejo Arp2/3 y ejerce su efecto al estabilizar el estado inactivo del complejo, bloqueando el acercamiento de Arp2 y Arp3 necesario para la activación del complejo [57]. Por ejemplo, en células endoteliales microvasculares de cerebro inmortalizadas (hCMEC/D3) se observó que la metanfetamina induce una disrupción de las uniones estrechas, debido a la endocitosis de ocludina y al incremento en las fibras de estrés. Al usar el inhibidor farmacológico CK-666, se encontró una reducción en la endocitosis de ocludina y una reducción en la formación de fibras de estrés. Adicionalmente, ensayos *in vivo* revelaron que el pretratamiento con el CK-666 tuvo un efecto protector contra la metanfetamina, evitando un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, demostrando así el importante papel del complejo Arp2/3 en la dinámica de ocludina y en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica [58]. Sin embargo, el uso de CK666 en monocapas de la línea celular MDCK debilitó las uniones adherentes debido a que la formación de lamelipodios se interrumpió, y se ha visto un incremento en la permeabilidad epitelial, lo que sugiere que el complejo Arp2/3 participa en la regulación de la barrera epitelial [59] [60]. Esta discrepancia en los resultados merece

aclaración, empleando más estudios para elucidar como Arp2/3 afecta las uniones bajo ciertas condiciones.

El complejo Arp2/3 por sí solo es un activador débil para ramificar los filamentos de actina, por lo tanto, para su completa y efectiva activación requiere de factores promotores de nucleación.

Factores promotores de nucleación

Los factores promotores de nucleación (NPF, *por sus siglas en inglés, nucleation-promoting factors*) son proteínas caracterizadas por su carboxilo-terminal que contiene tres motivos peptídicos cortos; conocido como WCA o VCA (**figura 4**). El motivo ácido (A) se une al complejo Arp2/3, el motivo central (C) genera el cambio conformacional de activación dentro del complejo y el motivo WH2 (WASp-homology 2) une la G-actina, acercándosela al complejo Arp2/3 y promoviendo así el inicio de la formación de las ramas de actina [61]. El amino-terminal tiene un papel de regulación al determinar cuando el motivo WCA se encuentra oculto (inactivo). Cuando las proteínas pequeñas GTPasas, cinasas o fosfatidilinositol bajo diferentes contextos, se unen al amino-terminal bajo diferentes contextos; el motivo WCA es expuesto y, por tanto, puede unirse al complejo Arp2/3 [62]. Además, este dominio define las diferentes familias de NPF que se ubican en los distintos compartimentos subcelulares. Los NPF se han clasificado en clase I y clase II; la clase I se conforma por proteínas de la familia WAVE, la familia N-WASP, la familia WASH y la familia WHAMM; mientras que en la clase II se encuentran cortactina y HS-1, caracterizándose por tener solamente el motivo ácido en el extremo amino-terminal y por carecer del motivo WH2 para unirse a la G-actina (**figura 4**) [61] [62]. Se sabe que WAVE2 y el complejo Arp2/3 participan en la nucleación de actina en las uniones adherentes y que son necesarios para mantener la unión y tensión contractil [54]. N-WASP asegura el mantenimiento homeostático de los filamentos de actina en los anillos apicales de actina de manera independiente al complejo Arp2/3 ya que estabiliza los filamentos nacientes y permite su incorporación a los anillos apicales [63].

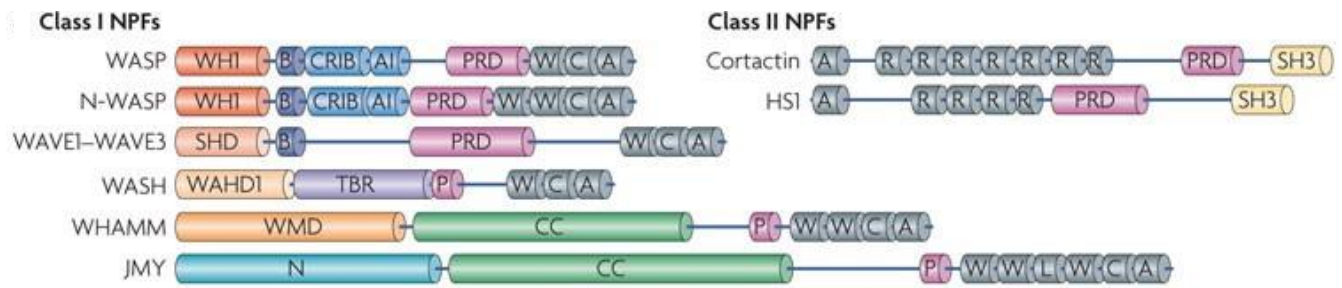


Figura 4.- Organización de los diferentes activadores del complejo Arp2/3. Las proteínas están clasificadas acorde a la localización del dominio ácido (A). Todos los activadores de Clase I contienen su dominio WCA en el extremo carboxilo-terminal con el que activan al complejo Arp2/3, mientras que los activadores de Clase II poseen el dominio ácido en el extremo amino-terminal. Tomado de Campellone y Welch (2010) [62].

Debido a que la ramificación de actina mediada por el complejo Arp2/3 puede iniciarse por muchos estímulos, la actividad de este complejo tiene que estar estrictamente regulada para evitar un exceso de polimerización de actina. Esta regulación se logra a través de proteínas inhibitorias que se unen directa o indirectamente al complejo Arp2/3. Para tal fin las células expresan ciertas proteínas inhibitorias como pick1, gadkin, coroninas y arpin. Estos inhibidores se encuentran localizados en diferentes dominios subcelulares, por lo que se cree que su función es compartimentalizada.

Proteínas inhibitorias del complejo Arp2/3

Pick1

Su nombre deriva al estar asociado con la C-cinasa-1 (del inglés *protein interacting with C-kinase-1*). En su amino-terminal posee un dominio PDZ mientras que en el carboxilo-terminal un dominio BAR y un motivo ácido (**figura 5**), con los cuales mantiene la unión con F-actina y el complejo Arp2/3, respectivamente [64]. Su actividad inhibitoria por competencia con NPF, es mediada por la GTPasa Arf1, cuando este último se une al dominio PDZ [65]. La expresión de Pick1 en las líneas celulares CaCO-2 y MDCK ha sido demostrada, a su vez, en células MDCK colocaliza con las proteínas del complejo de unión apical, β -catenina y JAM-A, sugiriendo que puede tener una participación en la regulación de las uniones estrechas [66], que aún se desconoce.

Gadkin

También es conocido como γ -BAR. Es codificado por el gen *APIAR*. Esta proteína está localizada en la superficie de los endosomas, por lo tanto, en células dendríticas deficientes de gadkin se

observó que el complejo Arp2/3 se asocia más con los endosomas y promueve la polimerización de F-actina [61]. Esta asociación es dada porque gadkin posee un motivo ácido (**figura 5**) con el que interactúa con el complejo Arp2/3 y lo inhibe por competencia con NPF. En ausencia de señales promigratorias, gadkin colocaliza Arp2/3 y el complejo adaptador de clatrina AP-1 previniendo su activación por secuestro a los endosomas [67]. Se distribuye en el citosol y está enriquecido en la región perinuclear colocalizando con el adaptador de clatrina- AP-1 para regular la dinámica de las vesículas endocíticas [64]. La participación de Gadkin aún no se ha estudiado en el epitelio intestinal.

Coroninas

Las coroninas son inhibidores indirectos del complejo Arp2/3, ya que previenen la unión del complejo a los filamentos de actina, promoviendo la desramificación de F-actina (**figura 5**). Existen siete genes que codifican para 7 diferentes proteínas de coroninas en mamíferos: clase I: coronina-1A, 1B y 6; clase II: coronina-2A y 2B; y clase III: coronina-7 [64]. Se ha encontrado la expresión de coronina-1B en células epiteliales Caco-2 manteniendo contacto con E-cadherina, participando en la reorganización de los filamentos de actina en las uniones adherentes, manteniendo la integridad de las uniones, así como regulando el mecanismo de extrusión de células epiteliales apoptóticas de la monocapa [37].

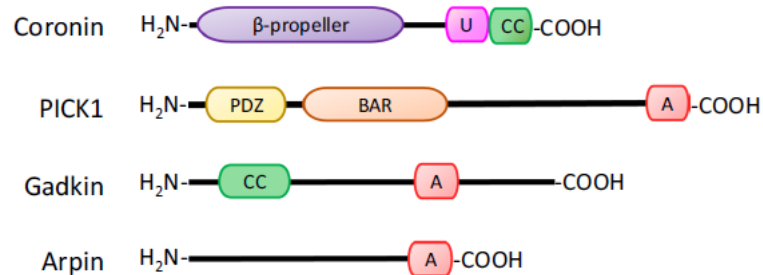


Figura 5.- Dominios estructurales de inhibidores del complejo Arp2/3. Coronina contiene su dominio β-propeller en el extremo amino-terminal que une F-actina mientras que su región única (U), que une microtubulos y el dominio CC (*del inglés coiled-coil*), que une F-actina y el complejo Arp2/3 se encuentran en el extremo carboxilo-terminal. Pick1 contiene su dominio PDZ, que une proteínas con motivos de unión a PDZ tipo II y su motivo BAR, que une lípidos de membranas en el extremo amino-terminal. Gadkin posee una región CC (*del inglés Coiled-Coil*) en el extremo amino-terminal. Arpin solamente contiene un motivo ácido A. El motivo ácido de Pick1, gadkin y arpin con que se unen al complejo Arp2/3 está en el extremo carboxilo-terminal. Tomado de Chañez-Paredes et al 2019. [64]

Arpin

Arpin es una proteína identificada recientemente a partir de un análisis bioinformático que mostró el motivo ácido típico de los NPF, en el que el triptófano se encuentra en la antepenúltima posición (**figura 6a**). Su extremo carboxilo-terminal tiene el sitio de unión a Arp2/3, sin embargo, no posee los motivos W y C característicos de los NPF. Los análisis *in vitro* comprobaron que arpin es un inhibidor competitivo del complejo Arp2/3 mediante la unión del motivo ácido (**figura 6 b y c**) y co-localizó parcialmente con el complejo WAVE, localizándose en la punta de los lamelipodios de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), junto con Brk1, una subunidad del complejo WAVE suponiendo que arpin antagoniza la actividad de WAVE2 (**figura 6d**). [68].

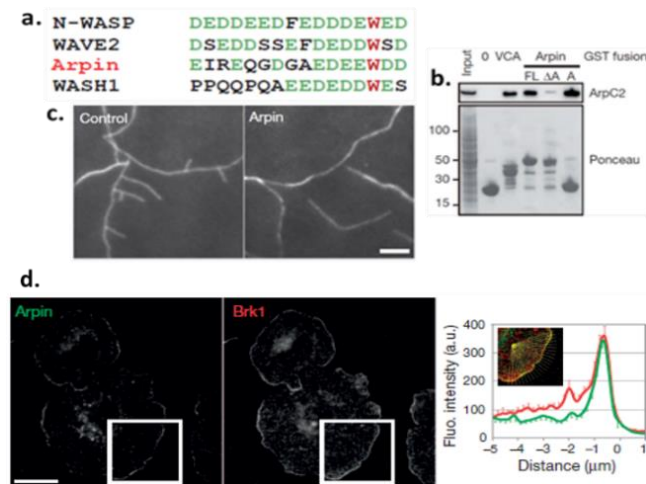


Figura 6.- Arpin inhibe al complejo Arp2/3. a) Alineación del motivo ácido de NPF del complejo Arp2/3 y arpin. b) Arpin se une al complejo Arp2/3 a través del motivo ácido; glutatión-s-transferasa (GST) *pull-down* con arpin recombinante de longitud total (FL, del inglés *full-length*), con sólo los últimos 16 aminoácidos (A), arpin ΔA sin el dominio ácido, o el dominio VCA de N-WASP como control positivo. c) Ensamblaje de redes de actina ramificada monitoreadas por microscopía TIRF usando actina marcada con rodamina. Barra de escala, 5 μm . d) Colocalización de arpin con Brk1 en lamelipodios de MEFs. Barra de escala 20 μm . Tomado de Dang et. Al (2013) [53].

Estudios de microscopía electrónica han sugerido que arpin se une al complejo Arp2/3 en dos sitios potenciales, uno ubicado cerca de la interfaz de las subunidades Arp3 y ARPC2, y el otro cerca de la interfaz de Arp2 y Arp3. Arpin podría tener más afinidad con Arp2 que Arp3, sitio donde estuvo más enriquecido. La unión de arpin induce cambios en la posición de la subunidad ARPC2 [69], que implicaría en la inhibición de la nucleación por competencia con el VCA de WAVE2.

La participación de arpin en los procesos celulares hasta la fecha sólo se ha atribuido a la inhibición del complejo Arp2/3, a través del motivo ácido carboxilo terminal que le permite su unión al

complejo Arp2/3 [68] y en la direccionalidad de la migración celular, ya que arpin controla la alternancia entre una fase de migración activa y una fase "inactiva" caracterizada por una baja velocidad y persistencia direccional [70]. Sin embargo, la disminución de su expresión también se ha correlacionado con el desarrollo de cáncer. En cáncer de mama, por ejemplo, la expresión del mRNA de arpin es reducida en muestras tumorales comparado con tejido paratumoral o tejido no canceroso. Una correlación entre la expresión de arpin y las manifestaciones clínicas fue evidente, es decir, mayor el progreso de la enfermedad menor la expresión de arpin [71]. En otro análisis de pacientes con cáncer gástrico se encontró la misma correlación en su baja expresión [72]. Esto debido a que en condiciones normales es un inhibidor de la migración celular, sin arpin la función de lamelipodios es continua y como consecuencia aumenta la migración e invasividad celular.

En células epiteliales Caco2 depletadas de arpin se encontró una disminución en la resistencia transepitelial y un aumento en el flujo paracelular (**figura 7 a y b**) que es debida a una posible estructuración ondulatoria de uniones estrechas en ausencia de arpin. Además, se observó que arpin interacciona con las proteínas de unión E-cadherina, claudina-1 y ocludina (**figura 7 c y d**), sugiriendo que arpin podría participar en la correcta localización de estas proteínas transmembranales en las uniones estrechas y adherentes. Además, usando faloidina, se observó un aumento de filamentos de actina, así como, fibras de estrés a lo largo de las células Caco-2 depletadas de arpin (**figura 7 e**).

Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los cuales arpin regula las uniones estrechas y actina.

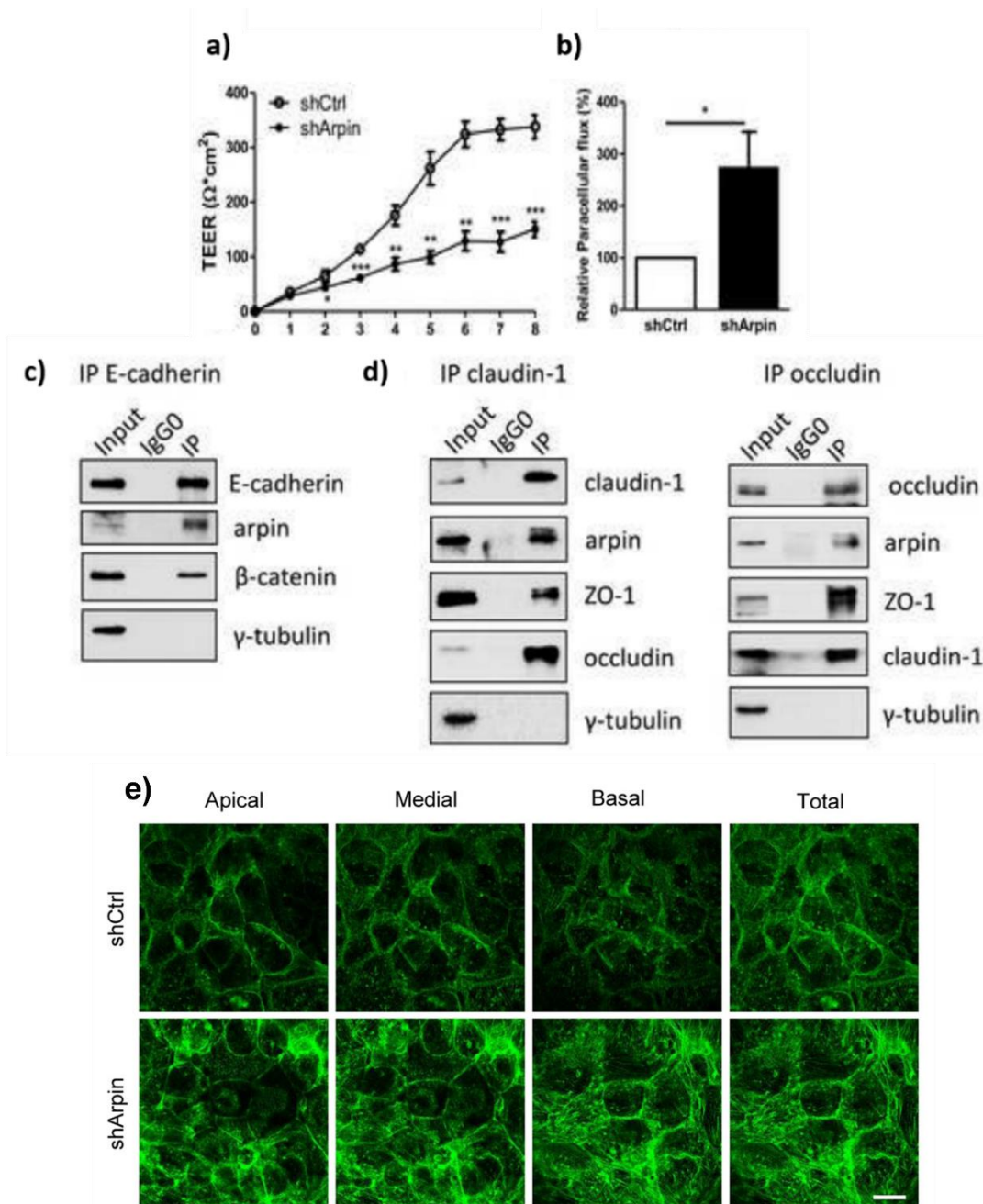


Figura 7.- Papel de arpin en las células epiteliales. a) Medición de la TEER durante la formación de monocapa de células epiteliales Caco2 depletadas de arpin (shArpin) y controles (shCtrl) por 8 días. b) Medición del flujo paracelular con FITC-dextran (4kD) en monocapa de células epiteliales Caco2 depletadas de arpin y controles. c) Western blot de la co-inmunoprecipitación de E-cadherina reveló que arpin está presente en las uniones adherentes. d) Western blots de las co-inmunoprecipitaciones de claudina-1 y occludina revelaron la presencia de arpin en uniones estrechas. e) Inmunofluorescencia de la ubicación de los filamentos de actina apical, media y basal en las células Caco-2 de control y con depleción de arpin, teñidas con faloidina; n = 4. Barra = 20 mm. Tomado de Chañez-Paredes et al 2021 [74]

Justificación

La barrera epitelial contribuye al mantenimiento de la homeostasis del microambiente intestinal. Una disrupción de la barrera causada por inflamación puede causar daño tisular y contribuir al desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales. La integridad del epitelio se da gracias a la presencia de uniones estrechas y uniones adherentes; constituidas por diferentes proteínas integrales de membrana que permiten la unión célula-célula, formando así un sellado estable epitelial. Este sellado se logra debido a que el citoesqueleto de actina perijuncional ancla a las proteínas del complejo de unión apical generando una fuerza mecánica que estabiliza el contacto. El citoesqueleto de actina a su vez es regulado por el complejo Arp2/3. La participación del complejo Arp2/3 en la integridad de la barrera intestinal ha sido poco estudiada, tanto en condiciones basales como en estados inflamatorios, sin embargo, se sabe que WAVE-2, un activador del complejo Arp2/3, fortalece la unión celular. La regulación de la activación del complejo es controlada por diferentes inhibidores como arpin, un inhibidor recientemente descrito. Demostramos que arpin se expresa en células epiteliales intestinales y regula la permeabilidad, pero aún se desconoce si eso se debe a la inhibición de Arp2/3 o alteraciones en la arquitectura de uniones estrechas o el citoesqueleto de actina. Tampoco se sabe si arpin controla la migración de células epiteliales de colon. Por ende, es importante conocer más detalles sobre la regulación de arpin y posibles funciones que pretendemos estudiar en este trabajo de manera *in silico* e *in vitro*.

La bioinformática es un campo interdisciplinario que desarrolla métodos y herramientas para generar predicciones que permiten orientar a la respuesta de preguntas biológicas como complemento de los métodos experimentales. Esta disciplina ahora es de gran relevancia dentro del campo de investigación ya que facilita el diseño de estudios experimentales. Por ende, empleamos varias herramientas bioinformáticas para responder algunas preguntas relacionadas a las funciones de arpin.

Hipótesis

Arpin es un importante regulador de la barrera epitelial intestinal.

Objetivo General

Analizar las propiedades intrínsecas de arpin que le permiten regular la integridad de la barrera epitelial.

Objetivos específicos

1. Analizar la expresión de arpin a nivel de mRNA y proteína.
2. Conocer las propiedades fisicoquímicas de arpin que sugieren su ubicación subcelular.
3. Encontrar posibles modificaciones postraduccionales de arpin que podrían permitir su participación en la regulación de la integridad epitelial.
4. Identificar dominios proteicos de arpin e interacciones proteicas.
5. Investigar posibles elementos regulatorios del gen de *ARPIN* que podrían afectar su expresión durante la inflamación en el epitelio intestinal.

Métodos

Análisis in silico

La secuencia proteica de arpin y la secuencia nucleotídica genómica se obtuvieron de la plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Números de acceso NP_872422.1 y NM_182616.4).

Con la finalidad de obtener y comparar la expresión de arpin a nivel de mRNA y proteína, se utilizó la base de datos Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), la cual tiene el objetivo de integrar todas las proteínas humanas en células, tejidos y órganos; integrando las diferentes "ómicas" que actualmente se han desarrollado, tales como: genómica, transcriptómica, proteómica. Estos datos son compilados por la misma base de datos y clasificados respecto a la ómica de interés.

Para conocer las características fisicoquímicas de arpin, se utilizaron las bases de datos ExPasy (<https://www.expasy.org/>), con sus herramientas ProtParam y ProtScale, así como, ProtPi (<https://www.protpi.ch/>). ExPasy es un portal de recursos bioinformáticos del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB), que brinda acceso a bases de datos y herramientas de software, desarrolladas por su grupo SIB. Dentro de estas herramientas está ProtParam, la cual permite la inserción de la secuencia peptídica que es evaluada por el servidor; y ProtScale que calcula y representa en forma de gráfico bidimensional el perfil producido por cualquier escala de aminoácidos en una proteína seleccionada. Tanto ProtParam como ProtScale generan los datos a partir de la secuencia de aminoácidos introducida. Teniendo la secuencia, las bases de datos poseen diferentes escalas que fueron obtenidas por datos experimentales, esta escala puede ser elegida por el usuario. Una escala de aminoácidos se define mediante un valor numérico asignado a cada tipo de aminoácido. Nosotros utilizamos la escala Kyte y Doolittle, que es una escala que mide la hidrofobicidad de los aminoácidos. Las regiones con un valor positivo son hidrófobas. Esta escala se puede utilizar para identificar tanto las regiones expuestas a la superficie como las regiones transmembranales, porque la base de datos da la opción de elegir el tamaño de ventana, que es la longitud del intervalo que se utilizará para el cálculo del perfil, es decir, el número de aminoácidos examinados a la vez para determinar secciones de carácter hidrofóbicas. ProtPi calcula el punto isoeléctrico a partir de la fórmula de Henderson-Hasselbalch, que muestra la relación entre el pH o pOH de una solución y el pK_a o pK_b y la relación de las concentraciones de las especies químicas disociadas a partir de la secuencia dada.

Para identificar las modificaciones postraduccionales de arpin, se utilizaron dos bases de datos; NetPhos3.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) y Phosphosite (<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>). La primera predice sitios de fosforilación de serina, treonina o tirosina en proteínas eucariotas, así como las cinasas que podrían estar mediándolo; utilizando conjuntos de redes neuronales, que son un modelo basado en el funcionamiento cerebral, es decir, es un grupo interconectado de nodos similar a la vasta red de neuronas en el cerebro biológico, que al dar ciertos parámetros hay una forma de combinarlos para predecir un cierto resultado. La segunda base consiste en la obtención de datos curados, es decir, la organización e integración de datos recopilados de diversas fuentes, los cuales integra fuentes de datos de alto rendimiento, consideradas así porque todos los sitios con modificación postraduccionales derivados de espectrometría de masas son probabilísticos por naturaleza (descubiertos mediante espectrometría de masas); y de bajo rendimiento (se enfoca en solo unos pocos sitios de modificación, porque cuando los autores informan sobre sitios recién descubiertos en dichos artículos sin utilizar espectrometría de masas, estos tienen que ser validados) obtenidos a partir de la revisión de artículos.

Con el propósito de conocer los posibles dominios e interacciones de arpin, se utilizaron las bases de datos The Eucaryotic Lineal Motiv Resource for functional sites (ELM) (<http://elm.eu.org/>) y Pathway Commons: A Resource for Biological Pathway Analysis (<https://www.pathwaycommons.org/>), respectivamente. ELM hace una distinción entre coincidencias que corresponden a motivos validados experimentalmente ya seleccionados y coincidencias que corresponden a motivos putativos basados en la secuencia. Pathway Commons, recopila y difunde datos de interacciones y vías biológicas. Los datos son recopilados de distintas bases de datos como Biological Pathway Exchange (BioPAX) y el formato Proteomics Standards Initiative Molecular Interactions (PSI-MI), y luego se integran. BioPAX, es un lenguaje compartido para facilitar la comunicación entre diversos sistemas de software y establecer una representación del conocimiento, admitiendo el intercambio de datos entre grupos de datos. PSI-MI, permite la descripción de datos de interacción molecular y facilita el intercambio de datos entre bases de datos y usuarios sin pérdida de información.

Para conocer si el gen *ARPIN* posee sitios putativos de unión a factores de transcripción, se utilizó la base de datos JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>), la cual es una base de datos de acceso abierto, constituida por perfiles de sitios de unión de factores de transcripción basados en matrices de peso de posición (PWM o PSSM), que se define como una matriz, $W(b, i)$, de números para cada posible base ($b = A, C, G \text{ o } T$) en cada posición ($i = 1 \text{ a } L$) en un L sitio de unión de proteínas. Dicha matriz proporciona una puntuación aditiva para cualquier secuencia de longitud (L) sumando los elementos de W que corresponden a la secuencia.

Resultados

Arpin se expresa de manera ubicua

Para entender mejor posibles funciones tejido-específicas de arpin, primero analizamos su patrón de expresión. El gen de arpin se ubica en el cromosoma 15 en la hebra anti-sentido del ADN. Actualmente se desconoce la regulación transcripcional, es decir, no se conoce la ubicación de sus regiones regulatorias *cis* que la mayoría de los eucariontes poseen; la caja TATA y la secuencia Inr, que sirven como sitios de unión específicos para factores de transcripción generales para generar el Complejo de Preinicio de la transcripción, caja GC; localizada aproximadamente 100 pb río arriba de la caja TATA, posibles potenciadores y silenciadores de la función génica. (**figura 8**).

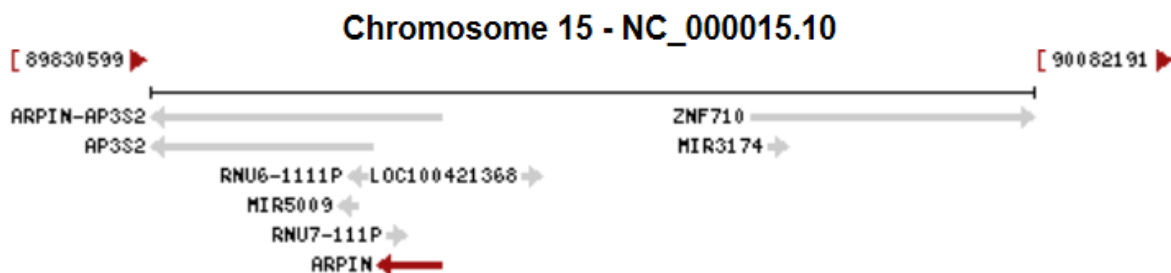


Figura 8.- Contexto genómico de arpin. El gen de arpin se ubica en el cromosoma 15 en la hebra anti-sentido. Imagen obtenida de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=348110>)

Para conocer cómo se encuentra la expresión a nivel de mRNA en diferentes tejidos y/u órganos, se utilizó la base de datos “The Human Protein Atlas”, la cual nos arrojó la compilación de 3 bases de datos (GTx, FANTOM 5 y FPA), que integran la expresión de arpin a nivel de mRNA. Esta compilación primero se normalizó para cada base a TPM (Transcripts Per Kilobase Million), que mide la frecuencia de transcripción de un gen específico, posteriormente fue normalizada a TMM (trimmed mean of M values), que estima factores de escala entre muestras que se pueden incorporar en los métodos estadísticos utilizados para el análisis de la expresión diferencial. Esta normalización es necesaria en situaciones en las que la distribución subyacente de las transcripciones expresadas entre muestras es marcadamente diferente. Consecutivamente, se

realizó una escala, los métodos de escala son enfoques de pretratamiento de datos que dividen cada variable por un factor, el factor de escala, que es diferente para cada variable, su objetivo es ajustar las diferencias entre los diferentes datos, convirtiendo los datos en diferencias en relación con el factor de escala. Utilizaron la escala de Pareto, que utiliza la raíz cuadrada de la desviación estándar como factor de escala. Finalmente, los tres conjuntos de datos de transcriptómica se integraron, mediante la corrección por lotes a través de la función “removeBatchEffect” del paquete R Limma, y por último, los valores de expresión de la transcripción resultantes, denominados expresión normalizada (NX), se calcularon para cada gen en cada muestra. Al realizar la búsqueda de la expresión de arpin, observamos que arpin se expresa a nivel de mRNA en todos los órganos y/o tejidos analizados. La base de datos categoriza los resultados como enriquecido (NX cuatro veces mayor que cualquier otro tejido o tipo de célula), grupo enriquecido (niveles de NX de un grupo (de 2 a 5 tejidos o de 2 a 10 tipos de células o de 2 a 5 regiones del cerebro) al menos cuatro veces más que cualquier otro tejido / región / tipo de célula), mejorado (niveles de NX de un grupo (de 1 a 5 tejidos o de 1 a 10 tipos de células o de 1 a 5 regiones del cerebro) al menos cuatro veces la media de otros tipos de tejidos / regiones / células), baja especificidad ($NX \geq 1$), y no detectado ($NX < 1$). Al analizar la gráfica que agrupa los datos por tejido, órgano y tipo celular (**figura 9**), observamos que no hay ningún órgano y/o tejido enriquecido, porque ninguno de ellos presenta NX cuatro veces mayor que cualquier otro órgano y/o tejido. De acuerdo con la categorización, todos los órganos y tejidos tienen baja especificidad ya que presentan $NX \geq 1$. Al analizar por grupo enriquecido, es decir, que integra diferentes tipos celulares de un mismo órgano y/o sistema (**figura 9**), observamos que arpin no está enriquecido por grupo, ya que ningún grupo de 2 a 5 tejidos presenta NX cuatro veces mayor a los otros grupos. Sin embargo, al hacer el análisis para la categorización de grupo mejorado, encontramos que el grupo del tracto gastrointestinal se considera como grupo mejorado, ya que, tomando en cuenta la categorización, este grupo presenta un NX de 78.2 ($\bar{X}=15.64$), y al hacer la comparativa de NX, es 4 veces mayor la media de cada grupo, y ningún otro grupo presenta niveles de NX mayor a la media.

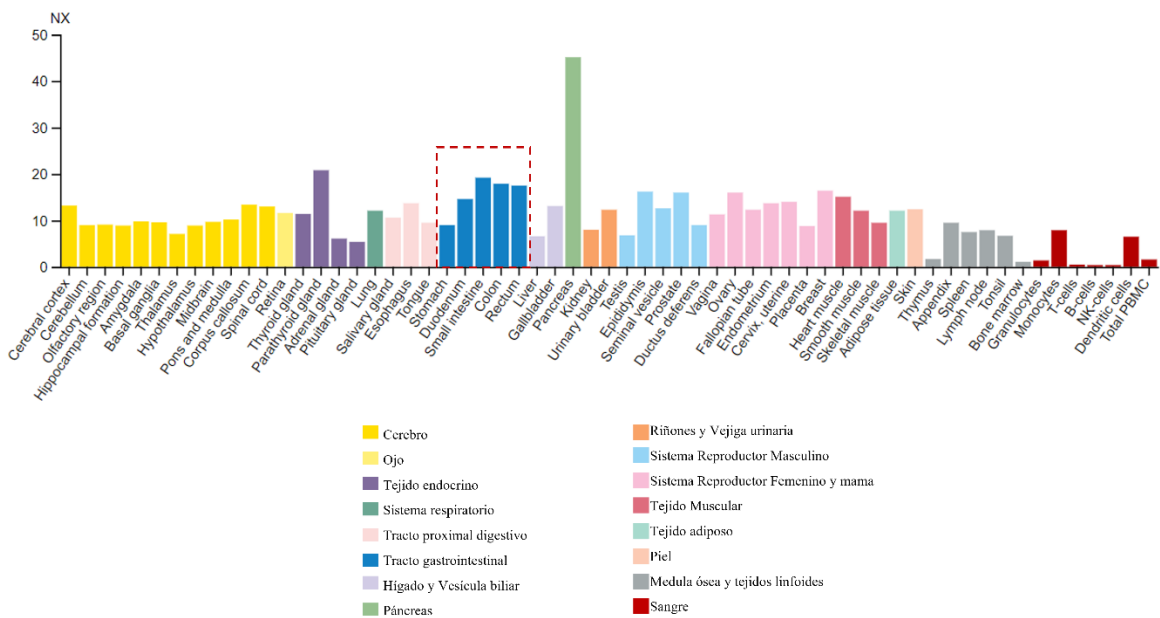


Figura 9.- Conjunto de datos de la expresión a nivel de mRNA de arpin en diferentes tejidos. La expresión de arpin a nivel de mRNA de diferentes tejidos obtenida de "The Human Protein Atlas" (<https://www.proteinatlas.org/>), Se muestra el conjunto de datos obtenidos de la compilación de las bases de datos FATOM5, GTEX y HPA. Arpin se expresa de manera ubicua. El rectángulo punteado indica que el grupo del tracto gastrointestinal es considerado como grupo mejorado, con respecto a la categorización que realiza la base de datos.

Se utilizó la misma base de datos para conocer los niveles proteicos de arpin (**figura 10**). La evaluación de los niveles proteicos, hecha por la base de datos, fue a partir de inmunohistoquímica, donde cada tejido es examinado para determinar la presencia global de arpin, y, posteriormente, se anota la inmunoreactividad en los diferentes tipos de células presentes en los tejidos. Los parámetros de anotación básicos incluyen una evaluación de i) intensidad de tinción (negativa, débil, moderada o fuerte), ii) fracción de células teñidas (<25%, 25-75% > 75%) y iii) localización subcelular (nuclear y / o citoplasmático / membranoso), por lo tanto, todos esos factores son incluidos para hacer la clasificación del score alto, medio, bajo y no detectado. Bajo estos parámetros, los datos muestran que los niveles proteicos de arpin, si bien fueron detectados en la mayoría de los tejidos, muestran diferentes scores entre sí, que podría ser dado por los factores como el anticuerpo, número de muestras. Observando grupos de tejidos, ninguno de ellos posee scores altos, sin embargo, al observar cada sección (tejido u órgano) de cada grupo de tejido analizado, observamos que solo la glándula salivar, duodeno, intestino delgado, colon,

recto, vesícula biliar, páncreas, riñones, testículos y próstata presentan alto score. Las secciones de los otros tejidos muestran medio y bajo score, sin embargo, se observa que, en secciones de cada grupo como el cerebelo, hipocampo, núcleo caudado del cerebro y el bazo, no fue detectada la proteína arpin. Estos datos podrían ser tomando en cuenta los factores que utiliza la bases de datos para su categorización, sin embargo, es factible pensar que la regulación transcripcional de arpin podría ser tejido-específico, dado que en estos tejidos la expresión del mRNA arpin está presente, pero los niveles proteicos no.

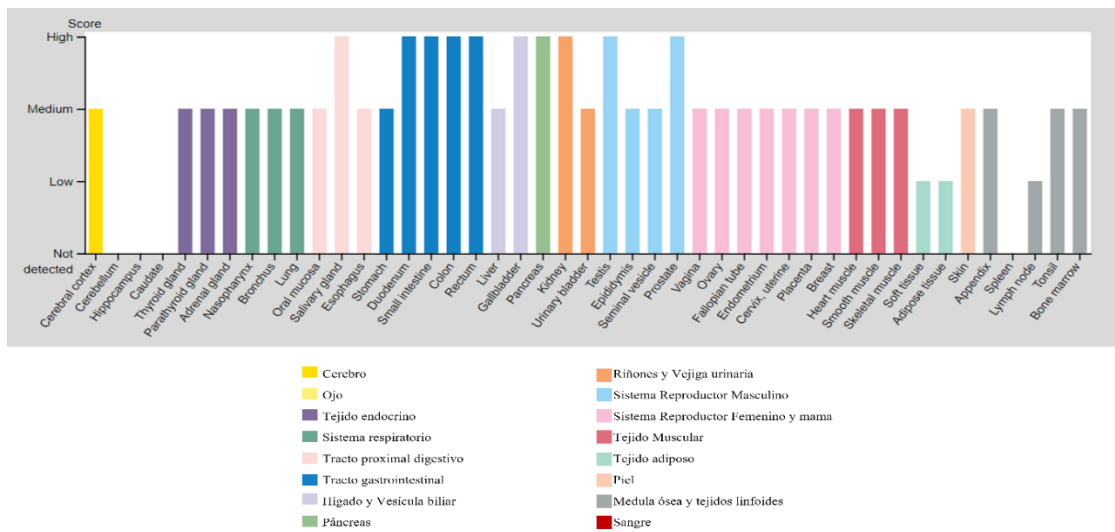


Figura 10.-Niveles de proteína de arpin. Se muestran los niveles de proteína de los diferentes órganos y tejidos indicados (eje x), el cual va desde no detectado hasta altos niveles (eje y). Estos datos fueron obtenidos de la base de datos "The Human Protein Atlas" (<https://www.proteinatlas.org/>).

Arpin tiene características que sugieren su localización en el citoplasma

Se sabe que arpin se ubica en la punta de los lamelipodios en fibroblastos de ratón en movimiento [68]. Con el fin de ampliar el panorama de su posible localización celular, usamos las herramientas ProtParam y ProtScale de la base de datos Expasy, así como, ProtPi, para determinar características fisicoquímicas intrínsecas de arpin que permitan predecir su localización preferencial, con base a su composición de aminoácidos, su hidrofilia o hidrofobia. (**figura 11**).

Estos datos muestran la clasificación del porcentaje de los diferentes residuos de aminoácidos que posee arpin. Arpin está constituida por un 15.93% de residuos ácidos, 15.93% de residuos básicos, 27.86% de residuos hidrofílicos y un 40.25% de residuos hidrofóbicos. El punto isoelectrico (pI) de arpin está en un rango de 5.56-5.6 y el promedio total de hidropatía GRAVY (*del inglés average hydrophobicity and hydrophilicity*) fue de -0.57. La hidrofobicidad de la cadena lateral de los residuos de aminoácidos que constituyen a la proteína, demostrada en la gráfica (**figura 11**) Valores negativos indican hidrofilia, mientras que valores positivos indican residuos hidrofóbicos. Estos valores fueron obtenidos mediante la normalización del promedio de las energías libres de transferencia de vapor de agua y las fracciones normalizadas de las cadenas laterales completamente enterradas de proteínas globulares [73]. Con base a esta escala, indica que arpin presenta en su mayoría residuos hidrofílicos, lo cuales integran tanto residuos de aminoácidos clasificados como ácidos, básicos e hidrofílicos que pueden tener contacto con el agua.

Estos datos sugieren que arpin podría localizarse en el citoplasma, ya que se ha reportado que los puntos isoelectricos de las proteínas pueden orientar su ubicación; proteínas con pI que va de 5.0 a 6.0 tienden a ser citoplasmáticas, mientras que las proteínas transmembrana va de 8.5 a 9.0 [68].

Nombre		Clasificación	Número	% contenido
Ácido Glutámico	E	Ácido	20	8.85%
Ácido aspártico	D	Ácido	16	7.08%
Lisina	K	Básico	15	6.64%
Arginina	R	Básico	14	6.19%
Histidina	H	Básico	7	3.10%
Pirrolisina	O	Básico	0	0%
Glicina	G	Hidrofílico	22	9.73%
Treonina	T	Hidrofílico	14	6.19%
Serina	S	Hidrofílico	13	5.75%
Asparagina	N	Hidrofílico	8	3.54%
Glutamina	Q	Hidrofílico	4	1.77%
Cisteína	C	Hidrofílico	2	0.88%
Leucina	L	Hidrofóbico	21	9.29%
Alanina	A	Hidrofóbico	20	8.85%
Valina	V	Hidrofóbico	12	5.31%
Prolina	P	Hidrofóbico	9	3.98%
Isoleucina	I	Hidrofóbico	8	3.54%
Metionina	M	Hidrofóbico	6	2.65%
Fenilalanina	F	Hidrofóbico	6	2.65%
Tirosina	Y	Hidrofóbico	5	2.21%
Triptófano	W	Hidrofóbico	4	1.77%
Total:			226	100%

Punto isoelectrico	5.56-5.6
GRAVY	-0.57

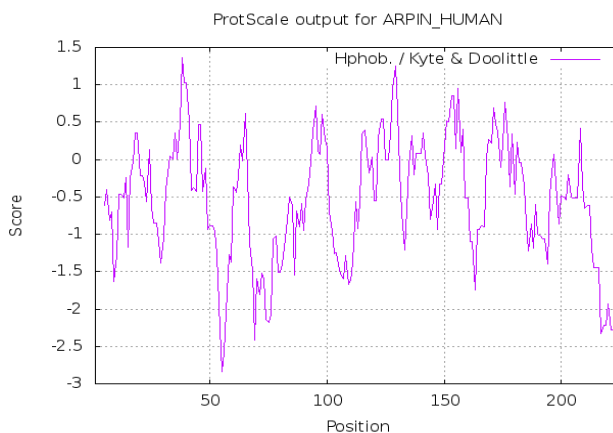


Figura 101.- Características fisicoquímicas de arpin. En la tabla izquierda se muestra el porcentaje de residuos de aminoácidos que constituyen a arpin, así como, su clasificación. La tabla derecha muestra el punto isoelectrico, y el promedio total de hidropatía con el score GRAVY (del inglés average hydrophobicity and hydrophobicity). La gráfica muestra la hidrofobicidad de las cadenas

laterales de cada residuo de aminoácido en la escala de Kyte y Doolittle, escala que determina la hidrofobicidad de los aminoácidos (eje Y, valores positivos aminoácido hidrofóbico, valores negativos hidrofílico) de la secuencia proteica (en el eje X).

Arpin presenta modificaciones postraduccionales que podrían modular su participación en la barrera epitelial intestinal

Las modificaciones postraduccionales (PTM) son cambios bioquímicos de los aminoácidos de una proteína que afectan su conformación, estabilidad, localización y función. Debido a que no hay evidencia concisa que determine las modificaciones postraduccionales de arpin, así como sus implicaciones; decidimos utilizar las bases de datos PhosphoSite y NetPhos3.1 para identificar posibles sitios de esas modificaciones. La base de datos NetPhos3.1 predice todos los sitios putativos de fosforilaciones dentro de una proteína. Esta predicción se basa en que a partir de patrones conocidos de los aminoácidos que están localizados cerca del residuo modificado, se genera una red neuronal, que reconoce los patrones observados y conserva la capacidad de generalizar y reconocer patrones similares, pero no idénticos. El score indica valores cercanos a 1.0 para los verdaderos sitios de fosforilación y valores cercanos a 0.0 para los sitios sin fosforilación. A su vez, también integra patrones de reconocimiento por cinasas como PKA (*del inglés protein kinase A*), PKC (*del inglés protein kinase C*), PKG (*del inglés protein kinase G*), CaM-II (*del inglés Calcium-Calmodulin-dependent Protein Kinase II*), cdc2 (*del inglés cell division control protein 2 homolog*), CKII (*del inglés Casein Kinase II*). Encontramos 22 sitios putativos de fosforilación de arpin en residuos de 12 serinas, 9 treoninas y 1 tirosina, así como, las posibles cinasas que podrían estar realizándolo, incluyendo PKA, PKC, PKG, P38mapk, GSK3 (*del inglés Glycogen synthase kinase-3*), cdc1, CKI y CKII (**figura 12**).

Los datos obtenidos de la base de datos PhosphoSite muestra datos experimentales obtenidos de espectrometría de masas, a partir de diversos estudios publicados (ver métodos). Los datos muestran que arpin posee sitios para fosforilaciones, ubiquitilación y monometilación en diferentes residuos de aminoácidos que constituyen la proteína. No se encontraron sitios para acetilaciones, sumoylaciones, palmitoilaciones y glicosilaciones (**figura 12**). Al realizar la comparativa entre las bases de datos NetPhos3.1 y Phosphosite, identificamos que las fosforilaciones en Serina 2, Serina 48, Serina 86, Serina 194 y Treonina 112 han sido encontradas a través de espectrometría de masas.

a)

MSRIYHDGALRNKAVQSVRLPGAWDPAAHQGGNGVLLLEGELIDVSRHSIL	#	50
DTHGRKERYVLYIRPSHIHRRKFDAKGNEIEPNFSATRKVNTGFLMSSY	#	100
KVEAKGDTDRLTPEALKGLVKNPELLALTESLTPDHTVAFWMPESMEVM	#	150
ELELGAGVRLKTRGDGPFLLDSLAKLEAGTVTKCNFTGDGKTGASWTDNIM	#	200
AOKCSKGAAAEIREQDGAEDEEWD	#	250
[S].....S.....[S]	#	50
.T.....Y.....S.....[S]T.....SS.	#	100
.....T..[T].....S.T.....S	#	150
.....T.....S.....T.....T.....T..[S].....	#	200
.....S.....		

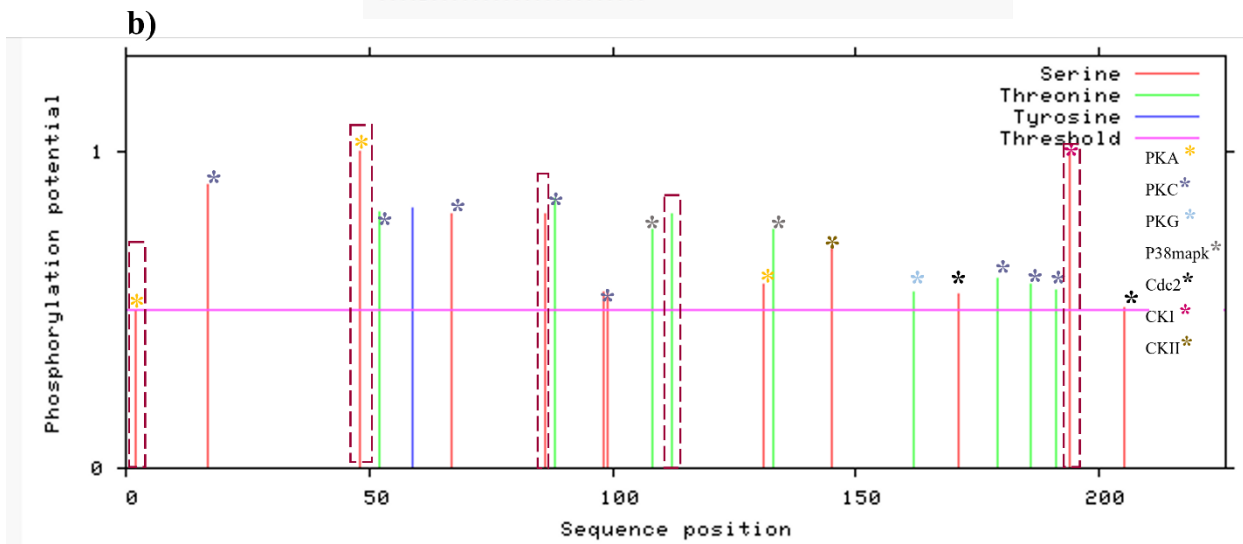


Figura 112.- Sitios putativos de fosforilación de arpin obtenidos de NetPhos3.1. A) Se muestra la secuencia de aminoácidos que constituyen a arpin, así como, la ubicación de solamente las serinas, treoninas y tirosinas abajo. B) En el eje Y está el potencial de fosforilación (probabilidad obtenida por el coeficiente de correlación de Matthews (MCC), que indica una tasa estadística confiable produciendo una puntuación alta solo si la predicción obtuvo buenos resultados en las cuatro categorías de la matriz (verdaderos positivos, falsos negativos, verdaderos negativos y falsos positivos)), El eje X demarca la posición de residuos de serina, treonina y tirosina. * cada color muestra la diferente cinasa que podría estar realizando la fosforilación. Thershold (línea rosa), es el umbral que define si el resultado está por encima, por debajo o dentro de un rango, con base al estadístico usado. Cuadro con línea sólida y línea discontinua color guinda, indican las fosforilaciones encontradas por espectrometría de masas.

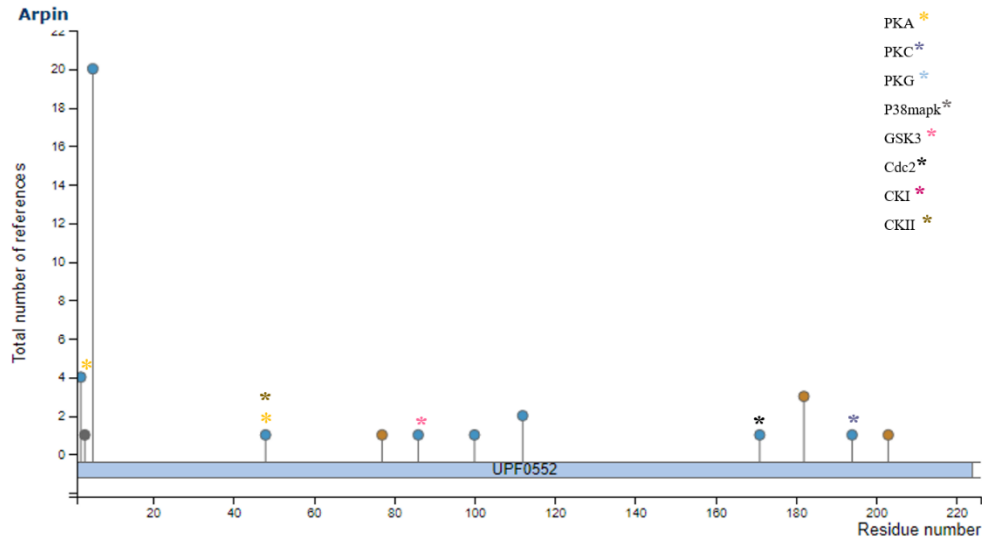


Figura 123.-Modificaciones postraduccionales de arpin. Se muestran las modificaciones postraduccionales identificadas por espectrometría de masas (ver métodos). En el eje Y está el total de referencias donde se ha encontrado la modificación. En el eje X los aminoácidos donde se ubica la modificación. Los asteriscos representan las cinasas putativas que podrían ejercer la modificación obtenidos en la base de datos NetPhos3.1.

Arpin posee dominios putativos con los que podría interactuar con proteínas que se ubican en la membrana plasmática.

Al conocer los dominios de una proteína se pueden conocer las funciones de esta, ya que los dominios pueden ser conservados en otras proteínas con función conocida. Utilizamos la base de datos “the eucaryotic linear motif resource for functional site in proteins” (ELM) para conocer los dominios putativos de arpin (**figura 14**). Se encontraron diferentes sitios de fosforilación, así como, sitio de escisión de caspasa-3 y 7; motivos de unión a ligando como la subunidad μ que se ubica en el complejo adaptador AP-4 ubicado en la membrana plasmática y en la membrana plasmática de Golgi, se expresa en células epiteliales, células epiteliales de páncreas, células endoteliales

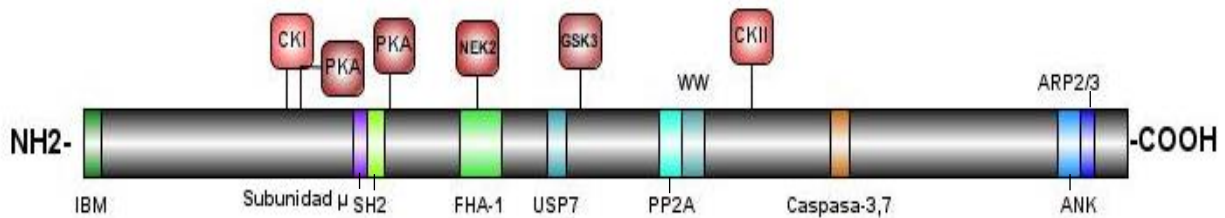


Figura 134.-Dominios putativos de arpin. Se muestran los sitios con mayor score (la predicción recibe una puntuación de 0 a 1, donde 1 significa que la secuencia de consulta es idéntica a la secuencia de la base de datos y la predicción puede considerarse una instancia de ELM verificada experimentalmente). En el extremo amino terminal se ubica el dominio IBM (del inglés Inhibitor of Apoptosis Proteins Binding Motive), Subunidad μ , SH2 (del inglés Src Homology 2), FHA-1 (del inglés forkhead-associated), USP7 (del inglés ubiquitin specific protease 7), PP2A (del inglés Protein phosphatase 2A), dominio WW, dominio de escisión de caspasa-3,7, dominio de unión al complejo arp 2/3, repeticiones de anquirina (ANK), así como, diferentes sitios de fosforilación (cinastas en rojo). Imagen creada con Domain Graph (<http://dog.biocuckoo.org/>)

Para conocer las posibles dianas con las que interactúa arpin, utilizamos la base de datos "Pathway Commons" para conocer su interactoma, encontrando que arpin se puede unir teóricamente a diferentes proteínas, incluyendo la subunidad AP4M1 del complejo AP-4, el cual se ubica en la membrana plasmática de células epiteliales, sugiriendo que arpin podría estar teniendo contacto con proteínas ubicadas en la membrana plasmática. También puede unirse con la proteína fosfatasa 2 (PP2A), lo que sugiere que esta proteína podría regular algunos sitios de fosforilación de arpin. A través del motivo FHA-1, ya que este motivo reconoce treoninas fosforiladas, arpin podría estar reconociendo estas fosforilaciones en proteínas del complejo de unión apical. Sin embargo, solo existe evidencia experimental que arpin interactúa con E-cadherina con el complejo Arp2/3 y las tanquirasas 1 y 2, que son poli-ADP-ribosiltransferasas involucradas en varios procesos como la vía de señalización Wnt, la longitud de los telómeros y el tráfico de vesículas. (**figura 15**). No obstante, es importante verificar si arpin pudiese estar asociándose a estas proteínas y como estas interacciones se ven implicadas en sus funciones.

Arpin podría estar interactuando directa o indirectamente con proteínas de unión.

Previamente demostramos que arpin co-inmunoprecipita con proteínas del complejo de unión apical [74], sin embargo, no sabemos si eso ocurre de forma directa o indirectamente. Es por ello que utilizamos la base de datos “The Eucaryotic Linear Motif Resource for Functional Site in Proteins” con la que también analizamos los posibles dominios con los cuales las proteínas de unión podrían estar interactuando con arpin. Encontramos que E-cadherina posee un dominio SH3 y un dominio de unión a la subunidad μ en el lado citoplasmático, sugiriendo que arpin, que posee motivos ricos en prolina, podría estar interactuando con el dominio SH3 de E-cadherina. Además, E-cadherina, con su motivo de unión a la subunidad μ , podría interactuar con complejos AP. Ocludina posee un dominio de unión a la subunidad μ en su porción citoplasmática, con el cual podría estar manteniendo contacto con arpin. β -catenina posee un dominio FHA-1, el cual podría estar reconociendo alguna de las fosforilaciones presentes en arpin, y así mantener una interacción directa con β -catenina. Además, β -catenina tiene un motivo de unión a PDZ en su lado citoplasmático, el cual se une a proteínas de la familia ZO, por ende, β -catenina tiene contacto indirecto con las proteínas de unión estrecha, dado que arpin co-inmunoprecipita con proteínas de unión estrecha, es factible pensar que es así como arpin mantiene contacto con estas proteínas. (figura 16).

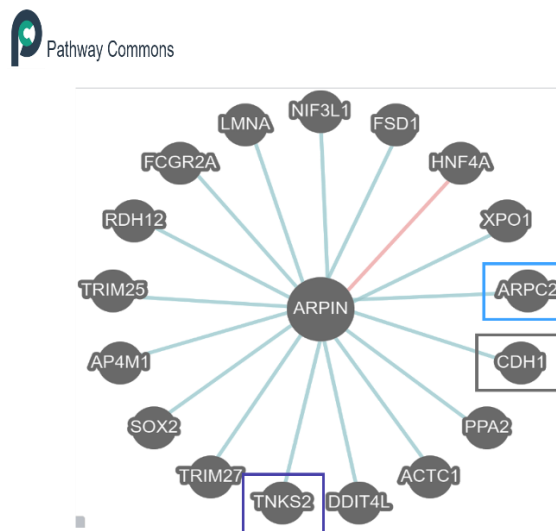


Figura 145.-Interactoma de arpin obtenido de Pathway Commons. HNF4A(del inglés hepatocyte nuclear factor 4-alpha), XPO1 (del inglés exportin-1), ArpC2 (subunidad dos del

complejo arp 2/3), CDH1 (del inglés cadherin-1), PPA2 (del inglés inorganic pyrophosphatase 2), ACTC1 (del inglés actin, alpha cardiac muscle 1), DDIT4L (del inglés DNA damage-inducible transcript 4-like protein), TNKS2 (del inglés Tankyrase 2), TRIM27 (del inglés tripartite motif 27), SOX2 (del inglés SRY-related HMG-box transcription factor), AP4M1 (del inglés AP-4 complex subunit mu-1), TRIM25 (del inglés tripartite motif 25), RFH12, (del inglés retinol dehidrogenase 12), FCGR2A (del inglés Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor), LMNA (del inglés lamin), NIF3L1 (del inglés NIF3-like protein 1) y FSD1 (del inglés fibronectin type III). Los cuadros indican las proteínas que interactúan con arpin que se han demostrado experimentalmente. Línea azul indica union y la línea roja indica que regula su expresión al poseer motivos que coinciden con la anotación del factor de su transcripción.

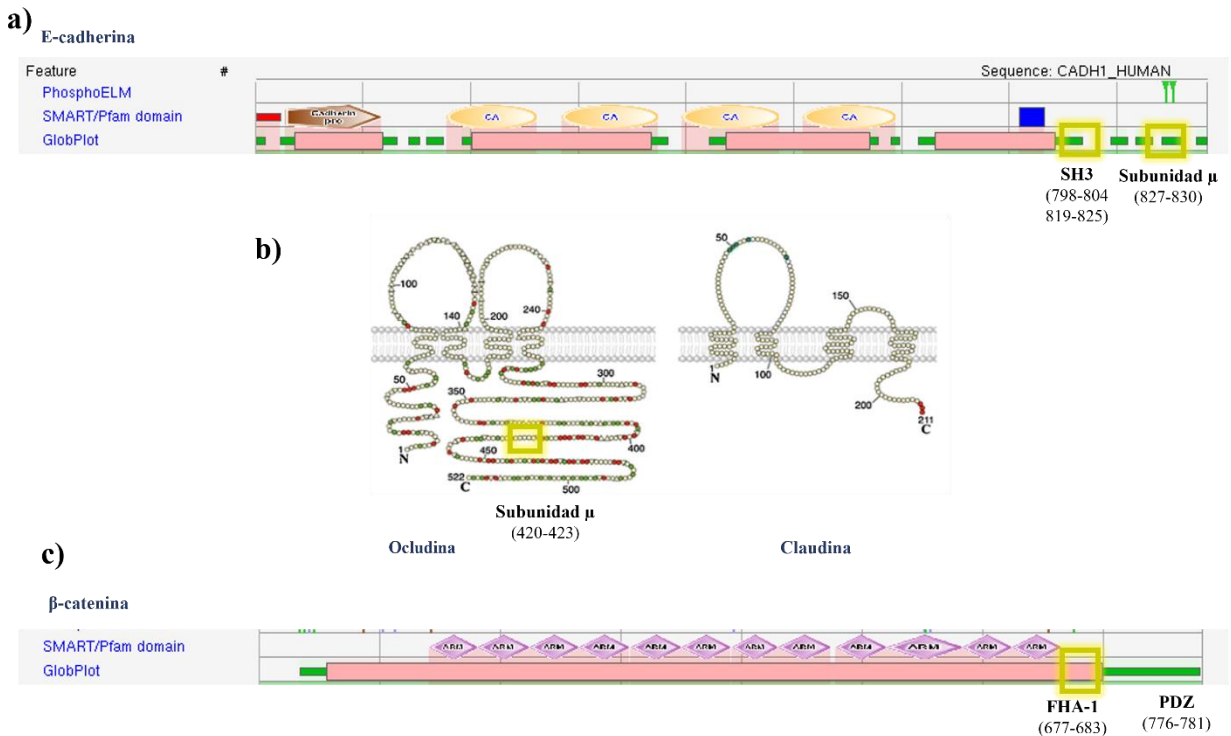


Figura 156.-Dominios putativos con los que arpin podría estar interactuando con proteínas de las uniones interepiteliales. A) Representación de la secuencia proteica de E-cadherina. B) Representación de la secuencia proteica de ocludina y claudina. C) Representación de la secuencia proteica de β-catenina. Rectángulo amarillo indican los sitios putativos de unión con arpin.

El gen ARPIN tiene sitios de unión para diversos factores de transcripción involucrados en la respuesta inflamatoria.

Para conocer el efecto que ejercen estímulos inflamatorios, nuestro grupo evaluó el efecto de IFN- γ y TNF- α sobre la expresión de arpin mRNA y otros dos inhibidores del complejo Arp2/3, PICK1 y APIAR (homólogo humano de gadkin murino). Encontraron que el estímulo inflamatorio sólo bajó los niveles de mRNA de arpin sin afectar los mRNAs de PICK1 y APIAR. Al mismo tiempo, los niveles de proteína de arpin estaban disminuidos durante la inflamación [74]. Estos hallazgos nos hicieron analizar sitios de regulación dirigidos por factores de transcripción inducidos ante estos estímulos. Para conocer si arpin posee posibles sitios de unión a factores de transcripción activados por estos estímulos, usamos una secuencia de 2000 pb rio arriba del sitio de inicio de la transcripción de arpin que fue analizada por la base de datos JASPAR. Encontramos sitios putativos de unión para IRF1 que corresponde a un factor de respuesta de interferón-1, y Rel-A y STAT1 (*del inglés Signal transducer and activator of transcription 1*) que son activados por TNF- α (figura 17). Estos datos nos sugieren que la expresión de *ARPIN* podría estar siendo regulado a través de estos factores de transcripción durante la inflamación, y así contribuir a la pérdida de la barrera epitelial intestinal en enfermedades inflamatorias intestinales.

Estos hallazgos establecen una base para futuras estrategias experimentales para conocer los mecanismos de como arpin está participando en la regulación de la barrera epitelial intestinal.



Figura 1716.-Secuencias putativas de unión a factores de transcripción en la secuencia rio arriba del inicio de la transcripción de arpin. Encontramos sitios de unión a IRF1 (del inglés Interferon Response

Factor 1), color verde, secuencias -1664 a -1653, -1095 a -1084 y -338 a -327; STAT1, color azul oscuro, secuencia -407 a -397; y Rel-A, color violeta, secuencias -1846 a -1837, -1389 a -1380, -309 a -300. atg es el sitio de inicio de la transcripción de arpin.

Discusión

Actualmente, se sabe que la función de arpin antagoniza la activación del complejo Arp2/3, de manera similar a otros dos inhibidores; Pick1 y Gadkin. Estas tres proteínas endógenas poseen en su extremo carboxilo-terminal un motivo ácido que le permite unirse al complejo Arp2/3 y ejercer su función. Debido a que se ha demostrado que arpin co-localiza con el factor promotor de nucleación WAVE2 en los lamelipodios durante la migración, se propuso que arpin antagoniza la función de WAVE2 [68]. Porque WAVE2 participa en el mantenimiento de las uniones intercelulares epiteliales [54], hipotetizamos que arpin pudiese tener una participación en la regulación de la estabilidad de las uniones epiteliales y por ende en la regulación de la barrera intestinal.

En este estudio, se analizaron características proteicas de arpin *in-silico*, que podrían apoyar nuestra idea de que arpin regule la barrera epitelial intestinal. Este análisis se realizó utilizando distintas bases de datos que permitieron responder: 1) como es la expresión de arpin en diferentes tejidos, 2) predecir su localización subcelular a partir de características propias de las proteínas, 3) identificar las posibles modificaciones postraduccionales que pudieran regular su función e interacciones con otras proteínas.

Encontramos que arpin se expresa de manera ubicua en todos los tejidos y órganos analizados, aunque en diferentes niveles, confirmando así datos experimentales de Chánez-Paredes y colaboradores (2021), que analizaron los niveles de arpin en las líneas celulares Caco2 y HEK293T, así como, en pulmón, corazón, riñones, colon, hígado, bazo y cerebro de ratón [74]. La expresión a nivel de proteína que se obtuvo de la base de datos “The Human Protein Atlas”, muestra un patrón de expresión sin correlación con la expresión a nivel de mRNA en algunos tejidos, que podría ser dado por factores como el número de muestras analizadas, así como la calidad del anticuerpo utilizado. Sin embargo, podríamos sugerir que esta falta de correlación entre los niveles de mRNA y proteína en varios tejidos ocurre porque arpin podría tener regulación post-transcripcional diferente por RNA no codificantes cortos como los miRNAs. miRNAs inhiben la expresión de genes diana homólogos de tres formas: desencadenan la destrucción del mRNA codificado por el gen diana, inhiben la traducción del mRNA o inducen modificaciones de cromatina dentro del gen diana [75]. Estos mecanismos hacen pensar que el mRNA de arpin podría estar siendo degradado por un miRNA, lo que conlleva a diferencias entre los niveles de mRNA y

proteína ya que afectaría directamente la síntesis *de novo* de la proteína. Sin embargo, sería importante verificar experimentalmente si arpin es un blanco de un miRNA en los diferentes tejidos, ya que se ha documentado que esta regulación afecta funciones celulares y desencadena estados patológicos. Por ejemplo, se ha reportado que los miRNAs miR-24-1 y let-A disminuyen Arp2 y Arp3, tanto mRNA como proteína, que conlleva a la disminución en la proliferación y migración celular en la enfermedad Hirschsprung, que es un trastorno anormal congénito causado por la ausencia de células ganglionares (aganglionosis) en una longitud variable del tracto gastrointestinal, caracterizado por la migración defectuosa de las células de la cresta neural entérica (ENCC) y su colonización fallida al intestino distal durante la embriogénesis de 5 a 12 semanas [76]. Estos datos relacionados con el complejo Arp2/3 implican que arpin, como inhibidor de Arp2/3, también podría tener regulación postranscripcional que esté regulando sus niveles de proteína en los tejidos y/u órganos que afecten sus funciones.

Conocer características fisicoquímicas de las proteínas pueden orientar a su ubicación subcelular, por ejemplo, se ha reportado que los puntos isoeléctricos (pI) de las proteínas afectan su ubicación: proteínas con pI entre 5.0 a 6.0 tienden a ser citoplasmáticas, mientras que las proteínas transmembranales tienen pI entre 8.5 a 9.0 [77]. Otro parámetro que orienta a la ubicación subcelular de una proteína es el promedio total de hidropatía que indica si una proteína es hidrofílica (valores negativos) o hidrofóbica (valores positivos). Además, este valor tiene correlación con la escala Kyte y Doolittle, que determina la hidrofobicidad a partir de la cadena lateral de los residuos de aminoácidos [73]. Arpin presenta un pI de 5.56 a 5.6 y un promedio de hidropatía (valor GRAVY) de -0.57. Estos datos implican que arpin es una proteína hidrofílica que se localiza primordialmente en el citoplasma.

Las proteínas globulares tienen la característica de tener la mayoría de sus residuos hidrofóbicos manteniendo contacto uno con otro para evitar que tengan contacto con el agua, por ende, adoptan esa estructura. La estructura de Arpin se caracterizó mediante dispersión de rayos x de ángulo pequeño (*por sus siglas del inglés SAXS*) como una estructura semi globular, al tener la medida del tamaño de la muestra (R_g) de 26.8 Å , valor similar como otra proteína globular de 25 kD como quimotripsinogeno. Además, al realizar la reconstrucción ab initio; arpin mostró un núcleo compacto y alargado con una extensión lineal móvil, que corresponde a su extremo carboxilo terminal con el cual puede unirse con el complejo Arp2/3 y las tanquirasas 1 y 2 [78]. Arpin posee

un 40.25% de residuos hidrofóbicos los que en su mayoría mantendrían contacto unos con otros para genera el núcleo alargado de su estructura, mientras que los residuos ácidos (15.93%), básicos (15.93%) e hidrofílicos (27.86%) estarían intercalados para estar expuestos al medio acuoso y brindarle la hidrofilia encontrada. Estas características claramente sugieren que arpin se encuentra primordialmente en el citoplasma, lo que también sugieren estudios de inmunofluorescencia en diferentes células como fibroblastos y células epiteliales [68] [74] . Además, es factible que arpin podría establecer contacto con proteínas transmembranales como las del complejo de unión apical a través de sus residuos hidrofóbico como, por ejemplo, se ha descrito para la unión vinculina- β -catenina, mediado por los residuos M8 de β -catenina y A50 de vinculina [79].

La localización y función de las proteínas puede ser influenciada por las modificaciones postraduccionales que pueden presentar las proteínas. Encontramos que arpin presenta sitios para fosforilaciones (S2, Y5, S48, S86, Y100, T112, S171, S194), mono-metilacion (R3) y ubiquitilaciones (K77, K182, K203), las cuales no están ubicadas en sus motivos funcionales reportados (210-226). Estas modificaciones podrían brindarle funciones adicionales a arpin, como darle estabilidad para que mantenga contacto con proteínas del complejo de unión apical y mantener la arquitectura de las uniones intercelulares, también podrían ayudar a que arpin mantenga contacto célula-célula durante la migración celular. Por ejemplo, se sabe que las proteínas de unión presentan fosforilaciones, las cuales pueden promover su localización en las uniones; por ejemplo, la fosforilación de T191 es necesaria para la localización de claudina-1 en células HaCaT [80], también la fosforilación de vinculina en Y822 promueve que vinculina se una al complejo de cateninas en las uniones adherentes en células MDCK y MCF10A [81]. Deshiere y colaboradores observaron en células MCF-10A depletadas de la cinasa CKII- β , la pérdida de polaridad asociada con un comportamiento migratorio aleatorio individual, fenotipo también observado en fibroblastos depletados de arpin [68] , por lo que nos lleva a pensar que arpin podría ser fosforilado por CKII para controlar la direccionalidad de la migración celular. Se sabe que la fosforilación en la Serina 416 de Pick1 le da la capacidad de interactuar con el receptor de glutamato 2 (GluA2) necesaria para su eliminación de la membrana plasmática sináptica [82]. Es importante mencionar que en el futuro pretenderemos conocer que cinasas actúan sobre arpin y las implicaciones del efecto.

Las metilaciones son mediadas por diferentes arginina metiltransferasas, este tipo de modificación no afecta la carga del residuo, sin embargo, la adición de grupos metilo aumenta el impedimento estérico lo que afecta la interacción proteína-proteína. Por ende, la presencia de la mono-metilación de arpin en células HEK293 podría impedir su localización en el complejo de unión apical generando alteraciones en la arquitectura de las uniones intercelulares. Se sabe que un nucleador de actina, Cob1 (*del inglés Cordon blue*), es metilado en su extremo carboxilo terminal por PRMT2 (*del inglés Protein Arginine Methyltransferase 2*) que permite su asociación con actina durante la dendritogenesis (fase del proceso de la diferenciación neuronal caracterizada por el crecimiento de dendritas pre-existentes y la formación de nuevas dendritas) [83]. Sin embargo, sería importante conocer cuál es el efecto de esta modificación en proteínas de unión a Arp2/3 como arpin en células epiteliales y como podría afectar la estabilidad de las uniones interepiteliales.

La degradación o reciclamiento de las proteínas es una forma de regular las funciones celulares. La degradación proteica es mediada por diferentes proteasas, como catepsinas, calpaínas; y las ubiquitininasas [84]. Arpin posee tres sitios de ubiquitilaciones (K77, K182, K203) en células Hep2, esto sugiere que arpin podría ser degradada a través del proteosoma, no obstante, sería importante saber bajo qué contexto celular su ubiquitilación está ocurriendo. De manera importante, se sabe que otro inhibidor del complejo Arp2/3, Pick 1, es monoubiquitilada por la Ub-ligasa E3 parkina, la cual depende de la unión Pick1-parkina a través del dominio PDZ de pick. Esta monoubiquitilación no causa la degradación proteosomal, sino al contrario, sirve para regular la función del canal iónico ASIC2a en neuronas, dado que PKC potencia la actividad de canal a través de Pick1, la ubiquitinación por parkina regula este proceso. [85]. Estos datos sugieren que la ubiquitilación de arpin también regula sus funciones celulares, pero es importante analizarlos en células epiteliales tratadas con inhibidores de ubiquitininasas.

Arpin puede unirse al complejo Arp2/3 mediante el motivo ácido ubicado en su carboxilo terminal y también puede mantener contacto con las tanquirasas 1 y 2 a través de una de las repeticiones de anquirina que posee, y estas uniones podrían jugar un papel importante para el control de la migración a la que a arpin se le ha atribuido. Debido a que se observó que la unión de tanquirasas a arpin disminuye la persistencia direccional observada en células MCF10A depletadas de arpin [86]. Además, el antagonismo de WAVE realizado por arpin regula la formación de lamelipodios, estructura que se forma durante la migración. Por otra parte,

encontramos que arpin tiene diferentes dominios putativos de unión, como el dominio de la subunidad μ con el cual podría estar interactuando con el complejo AP-4 a través de su subunidad AP-4M1. Este complejo es uno de cuatro adaptadores que regulan diferentes tipos de formación de vesículas y selección de moléculas cargo para introducir las a esas vesículas. Se ha reportado que el complejo AP-4 puede participar en la red trans-golgi para ubicar proteínas en el lado basolateral en células MDCK y podría localizarse en un compartimento endosómico temprano [87]. Además, hay evidencia que E-cadherina puede mantener contacto con el complejo AP-1 a través de fosfatidilinositol fosfato quinasa tipo I γ (PIPKI γ) que mantiene contacto directo con el complejo AP-1 en células epiteliales MDCK. Esta interacción es una señal fundamental para el direccionamiento exocítico y la clasificación basolateral de E-cadherina [88]. Estos datos sugieren que el dominio de unión a la subunidad μ que posee arpin podría permitir su interacción con proteínas de las uniones que poseen esta subunidad como E-cadherina y ocludina y así su localización en la región basolateral de las células epiteliales y su participación en la regulación de las uniones intercelulares. Sin embargo, no hay evidencia de si otros inhibidores del complejo Arp2/3 poseen un mecanismo similar, por lo que es importante poder dilucidarlo en el futuro.

Hemos demostrado que arpin co-immunoprecipita con las proteínas de unión ocludina, ZO-1, claudina-1 y E-cadherina [74], pero no se sabe si estas interacciones son directa o indirectamente. El lado citoplasmático de E-cadherina puede asociarse con proteínas como las cateninas y a través de esta interacción con otras proteínas como vinculina, α -actinina, y filamentos de actina [89]. La base de datos “The Eukaryotic Linear Resource for Functional Sites” mostró que E-cadherina posee un motivo SH3, así como un motivo de unión a la subunidad μ . Estos datos implican que arpin podría asociarse a E-cadherina directamente a través del motivo SH3 gracias a secuencias ricas en prolina de arpin, o indirectamente a través de alguna interacción con los complejos adaptadores. Utilizando este mismo enfoque, la base de datos mostró que β -catenina posee un motivo de unión a PDZ, el cual se une al dominio PDZ de ZO-3 [90]; y a su vez ZO-3 se asocia solamente con ZO-1 [91]. Todas estas interacciones sugieren que si arpin se está uniendo directa o indirectamente a E-cadherina y/o β -catenina, se puede conectar también a ZO-3 que se une a ZO-1 para permitir una asociación indirecta de arpin a la unión estrecha. Será importante verificar experimentalmente las interacciones de arpin con proteínas del complejo de unión apical usando proteínas o dominios recombinantes para entender mejor los mecanismos de como arpin participa

en la regulación de la barrera epitelial intestinal. Por otro lado, es importante conocer si estos mecanismos dependen de su función como inhibidor del complejo Arp2/3.

Adicionalmente, demostramos que arpin se disminuye en células Caco-2 en respuesta a las citosinas pro-inflamatorias TNF α e IFN- γ , tanto a nivel de mRNA como de proteína [74]. De manera importante, también observaron una disminución de la proteína en el colon de ratones con colitis experimental y en pacientes con colitis ulcerativa con inflamación aguda [74]. Estos datos sugieren la existencia de secuencias regulatorias de *ARPIN* que permiten la unión a factores de transcripción conocidos para regular la respuesta inflamatoria como son IRF1, STAT1 y Rel-a. Usando la base de datos “JASPAR” verificamos la presencia de estas secuencias, pero falta analizar experimentalmente que factores exactamente son los responsables para la inhibición de la expresión de *ARPIN* durante la inflamación. Es tentativo especular que, durante una inflamación epitelial, la ausencia de arpin afecte la permeabilidad del epitelio provocando alteraciones en la arquitectura epitelial por regular la endocitosis de proteínas del complejo de unión apical por hiperactivación del complejo Arp2/3. Así, arpin podría afectar reciclaje o degradación proteosomal de las proteínas de unión, provocando la desestabilización de las uniones intercelulares. En células Caco-2 se observó la internalización de β -catenina y claudina-1, así como incremento en la permeabilidad epitelial [74], resultados que fundamentan nuestra idea de la función de arpin en la regulación de la arquitectura de las uniones. Estos procesos inflamatorios también aumentan los niveles de las cinasas ROCK y MLCK; la fosforilación de la cadena ligera de miosina, así provocando la contracción del anillo perijuncional que debilita a las uniones estrechas y adherentes; proceso que también contribuye a la disrupción de la barrera epitelial. Por ende, será importante investigar en detalle, como arpin regula el citoesqueleto de actina y la arquitectura de las uniones, y si eso depende de su inhibición del complejo Arp2/3.

Conclusiones

Este estudio realizado por análisis bioinformáticos reveló importantes características intrínsecas de arpin como punto isoeléctrico, hidrofilia e hidrofobicidad que sugieren posibles funciones de arpin en la regulación de la barrera intestinal epitelial como mantener la arquitectura de las uniones intercelulares, así como participar en la endocitosis de proteínas de unión bajo condiciones inflamatorias. Al hacer comparativas experimentales con algunas proteínas de unión a actina, así como, otros inhibidores del complejo Arp2/3, podemos deducir que arpin podría comportarse de

manera similar a vinculina, el complejo Arp2/3 con respecto a la regulación del citoesqueleto de actina y la endocitosis de proteínas de uniones. Sin embargo, es importante comprobar experimentalmente los datos para revelar los mecanismos de como arpin regula la barrera epitelial intestinal.

Perspectivas

- Conocer la interacción de arpin con proteínas del complejo de unión apical.
- Validar si la secuencia río arriba del sitio de inicio de la transcripción de arpin posee sitios de reconocimiento a IRF1, STAT-1 y Rel-a.
- Identificar de qué manera arpin mantiene contacto con las proteínas de unión.
- Conocer si arpin controla la migración de células epiteliales de colon de manera dependiente o independiente del complejo arp2/3.
- Conocer los mecanismos de regulación de la barrera por arpin tanto in vivo e in vitro.
- Analizar si ratones deficientes de arpin son más susceptibles a colitis experimental.

Referencias

- [1] M. H. Ross y W. Pawlina, *Histología, Texto y Atlas a color con Biología Celular y Molecular*, 5a ed., Panamericana, 2007.
- [2] J. R. Turner, «Intestinal mucosal barrier function in health and disease,» *Nature Reviews immunology*, vol. 9, 2009.
- [3] A. G. Markov, J. R. Aschenbach y S. Amasheh, «The epithelial barrier and beyond: Claudins as amplifiers of physiological organ functions,» *IUBMB Life*, 2017.
- [4] S. Citi, «The mechanobiology of tight junctions,» *Biophysical Reviews*, vol. 11, n° 5, 2019.
- [5] A. P. Kowalczyk y K. J. Green, «Structure, Function and Regulation of Desmosomes,» *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 116, 2013.
- [6] «Molecular structure and assembly of the tight junction,» *American Journal of Physiology*, vol. 274, n° 1, 1998.
- [7] M. S. Balda y K. Matter, «Tight junctions,» *Journal of Cell Science*, vol. 111, 1998.
- [8] M. A. Odenwald y J. R. Turner, «The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target?,» *NATURE REVIEWS GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY*, vol. 14, pp. 9-21, 2016.
- [9] V. García Hernández, M. Quiros y A. Nusrat, «Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation,» *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1397, n° 1, 2017.
- [10] N. Khan y A. R. Asif, «Transcriptional Regulators of Claudins in Epithelial Tight Junctions,» 2015.
- [11] C. Yoshida y M. Takeichi, «Teratocarcinoma Cell Adhesion: Identification of a Cell-Surface Protein Involved in Calcium-Dependent Cell Aggregation,» *Cell*, vol. 217, 1982.
- [12] A. S. Yap, C. M. Niessen y B. M. Gumbiner, «The Juxtamembrane Region of the Cadherin Cytoplasmic Tail Supports Lateral Clustering, Adhesive Strengthening, and Interaction With p120ctn,» *Journal of Cell Biology*, vol. 141, n° 3, 1998.
- [13] M. Overduin, T. S. Harvey, S. Bagby, K. I. Tong, P. Yau, M. Takeichi y M. Ikur, «Solution Structure of the Epithelial Cadherin Domain Responsible for Selective Cell Adhesion,» *Science*, vol. 267, n° 5196, 1995.

- [14] M. Ozawa, H. Baribault y R. Kelmer, «The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species,» *The EMBO Journal*, vol. 8, nº 6, 1989.
- [15] H. Aberle, S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler y H. Hoschuetzky, «Assembly of the Cadherin-Catenin Complex in Vitro With Recombinant Proteins,» *Journal of Cell Science*, vol. 107, 1994.
- [16] D. L. RIMM, E. R. KOSLOV , P. KEBRIAIEI, C. D. CIANCI y J. S. MORROW, « α (E)-Catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex,» *PNAS*, vol. 92, 1995.
- [17] M. M. Buschmann, L. Shen, H. Rajapakse, . D. R. Raleigh, . Y. Wang, . Y. Wang, A. Lingaraju, J. Zha, E. Abbott, . E. M. McAuley, L. A. Breskin, L. Wu, K. Anderson, J. R. Turner y C. R. Weber, «Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux,» *Molecular Biology of the Cell*, vol. 24, nº 19, 2013.
- [18] R. Al Sadi, . K. Khatib, . S. Guo, . D. Ye, . M. Youssef y T. Ma, «Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier,» *American Journal of Physiology : Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 300, nº 6, 2011.
- [19] A. Sakakibara, M. Furuse, . M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka y S. Tsukita, «Possible Involvement of Phosphorylation of Occludin in Tight Junction Formation,» *The Journal of Cell Biology*, vol. 137, nº 6, 1997.
- [20] D. R. Raleigh, . D. M. Boe, D. Yu, . C. R. Weber, . A. M. Marchiando, E. M. Bradford, . Y. Wang, L. Wu, E. E. Schneeberger, L. Shen y J. R. Turner, «Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function,» *Journal of Cell Biology*, vol. 193, nº 3, 2011.
- [21] T. Suzuki, B. C. Elias, A. Seth, L. Shen, . J. R. Turner, . F. Giorgianni, D. Desiderio, . R. Guntaka y . R. Rao, «PKC ϵ Regulates Occludin Phosphorylation and Epithelial Tight Junction Integrity,» *PNAS*, vol. 106, nº 1, 2009.
- [22] M. Furuse, K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto y S. Tsukita, «Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions With No Sequence Similarity to Occludin,» *The Journal of Cell Biology*, vol. 141, nº 7, 1998.
- [23] O. R. Colegio, . C. Van Itallie, . C. Rahner y J. Melvin Anderson, «Claudin extracellular domains determine charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture,» vol. 284, nº 6, 2003.

- [24] C. Van Itallie, A. S. Fanning y J. M. Anderson, «Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins,» *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, vol. 285, n° 6, 2003.
- [25] G. Krause, L. Winkler, C. Piehl, I. Blasing, J. Piontek y S. L. Muller, «Structure and Function of Extracellular Claudin Domains,» *Molecular Structure and Function of The Tight Junctions*, vol. 1165, pp. 33-43, 2009.
- [26] K. Ebnet, «Junctional Adhesion Molecules (JAMs): Cell Adhesion Receptors With Pleiotropic Functions in Cell Physiology and Development,» *Physiological Reviews*, vol. 97, n° 4, 2017.
- [27] M. G. Laukoetter, P. Nava, W. Y. Lee, E. A. Severson, C. T. Capaldo, B. A. Babbin, I. R. Williams, M. Koval, E. Peatman, J. A. Campbell, T. S. Dermody, A. Nusrat y C. A. Parkos, «JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo,» *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, n° 13, 2007.
- [28] H. Bauer, J. Zweimueller-Mayer, P. Steinbacher, A. Lametschwandtner y H. C. Bauer, «The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins,» *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- [29] A. Youakim y M. Ahdieh, «Interferon- γ decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin,» *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 26, n° 5, 1999.
- [30] S. Mehta, A. Nijhuis, T. Kumagai, J. Lindsay y A. Silver, «Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ β -catenin) in inflammation bowel disease,» *Cell Tissue Res*, 2014.
- [31] M. Bruewer, A. Luegering, T. Kucha, C. A. Parkos, J. L. Madara, A. M. Hopkins y A. Nusrat, «Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms,» *The Journal of Immunology*, vol. 171, 2003.
- [32] F. Wang, B. T. Schwarz, W. V. Graham, Y. Wang, L. Su, D. R. Clayburgh, C. Abraham y J. R. Turner, «IFN- γ -induced TNFR2 Upregulation is Required for TNF-dependent Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction,» *Gastroenterology*, vol. 131, n° 4, 2006.
- [33] F. Heller, P. Florian, C. Bojarski, I. Fuss, W. Strober y J. Schulzke, «Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution,» *Gastroenterology*, vol. 129, n° 2, 2005.
- [34] C. R. Weber, D. R. Raleigh, L. Su, L. Shen, E. A. Sullivan, Y. Wang y J. R. Turner, «Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression

- to alter tight junction ion selectivity,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, n° 16, 2010.
- [35] H. H. Ginzberg, V. Cherapanov, Q. Dong, A. Cantin, C. McCulloch y G. P. Downey, «Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase,» *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 281, n° 3, 2001.
- [36] J. Rosenblatt, M. C. Raff y L. P. Cramer, «An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism,» *Cell*, vol. 11, 2001.
- [37] M. Michael, J. Meiring, B. Archarya, R. Parton, G. A. Gomez and A. s. Yap, "Coronin 1B Reorganizes the Architecture of F-Actin Networks for Contractility at Steady-State and Apoptotic Adherens Junctions," *Developmental Cell*, vol. 37, no. 1, 2016.
- [38] A. M. Marchiando, L. Shen, V. W. Graham, C. R. Weber, B. T. Schwartz, J. Austin, D. R. Raleigh, Y. Guan, A. Watson, M. Montrose y J. R. Turner, «Caveolin-1–dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo,» *Journals of Cell Biology*, vol. 189, n° 1, 2010.
- [39] C. Capaldo y A. Nusrat, «Cytokine of tight junctions,» *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1788, n° 4, pp. 864-871, 2009.
- [40] J. F. Richter, M. Hildner, R. Schmadauer, j. R. Turner, M. Schumann y J. Reiche, «Occludin knockdown is not sufficient to induce transepithelial macromolecule passage,» *Tissue Barriers*, vol. 7, n° 2, 2019.
- [41] W.-T. Kuo, L. Shen, L. Zuo, Y. Wang, S. P. Nielsen y J. R. Turner, «Inflammation-induced Occludin Downregulation Limits Epithelial Apoptosis by Suppressing Caspase-3 Expression,» *Gastroenterology*, vol. 157, n° 5, 2019.
- [42] T. D. Pollard, «Actin and Actin-Binding Proteins,» *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 8, n° 8, 2016.
- [43] R. B. Doctor, «The Actin Cytoskeleton in the Apical Domain of Epithelial Cells,» *Advances in Molecular and Cell Biology*, vol. 37, 2006.
- [44] J. R. Turner, «'Putting the squeeze' on the tight junction: understanding cytoskeleton regulation,» *Cell & Developmental Biology*, vol. 11, 2000.
- [45] J. L. Madara, «Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton,» *American Journal of Physiology*, 1987.

- [46] A. I. Ivanov, C. A. Parkos y A. Nusrat, «Cytoskeletal Regulation of Epithelial Barrier Function During Inflammation,» *American Journal of Pathology*, vol. 177, n° 2, 2010.
- [47] D. Ye, I. Ma y T. Ma, «Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier,» *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 290, n° 3, 2006.
- [48] D. J. Hartshorne, M. Ito y F. Erdodi, *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, vol. 19, pp. 325-341, 1998.
- [49] L. M. Machesky, S. J. Atkinson, C. Ampe, J. Vandekerckhove y T. D. Pollard, «Purification of a Cortical Complex Containing Two Unconventional Actins From *Acanthamoeba* by Affinity Chromatography on Profilin-Agarose,» *The Journal of Cell Biology*, vol. 127, n° 1, 1994.
- [50] R. C. Robinson, K. Turbedsky, D. A. Kaiser, J. B. Marchand, H. N. Higgs, S. Choe y T. D. Pollard, «Crystal Structure of Arp2/3 Complex,» *Science*, vol. 294, n° 5547, 2001.
- [51] I. Rouiller, . X.-P. Xu, . K. J. Amann, . C. Egile, . S. Nickell, . D. Nicastro, . R. Li, T. Pollard, N. Volkman y D. Hanein, «The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex,» *Journal of Cell Biology*, vol. 180, n° 5, 2008.
- [52] P. Suraneni, B. Rubinstein, J. R. Unruh, M. Durnin, D. Hanein y R. Li, «The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration,» *Journal of Cell Biology*, vol. 197, n° 2, 2012.
- [53] C. Wu, . S. B. Asokan, . M. E. Berginski, . E. M. Haynes, N. E. Sharpless, J. D. Griffith, . S. M. Gomez y . J. E. Bear, «Arp2/3 complex is critical for lamellipodia and organization of cell-matrix adhesion but dispensable for fibroblast chemotaxis,» vol. 148, n° 5, 2012.
- [54] S. Verma, S. P. H. Ping Han, . M. Michael, G. A. Gomez, . Z. Yang, R. D. Teasdale, . A. Ratheesh, . E. M. Kovacs, R. G. Ali y A. S. Yap, «A WAVE2–Arp2/3 actin nucleator apparatus supports junctional tension at the epithelial zonula adherens,» *Molecular Biology of the Cell*, vol. 23, n° 23, 2012.
- [55] J. J. Garber, E. M. Mallick, K. M. Scanlon, J. R. Turner, M. S. Donnenberg, J. M. Leong y S. B. Snapper, «Attaching-and-Effacing Pathogens Exploit Junction Regulatory Activities of N-WASP and SNX9 to Disrupt the Intestinal Barrier,» *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, vol. 5, n° 3, 2018.
- [56] K. Zhou, . A. Muroyama, J. Underwood, . R. Leylek, S. Ray, S. H. Soderling y T. Lechler, «Actin-related protein2/3 complex regulates tight junctions and terminal differentiation to

promote epidermal barrier formation,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, n° 40, 2013.

- [57] B. Hetrick, M. Suk Han, L. A. Helgeson y B. J. Nolen, «Small Molecules CK-666 adn CK-869 Inhibit Actin-Related Protein 2/3 Complex by Blocking an Activating Conformational Change,» *Chemistry & Biology*, vol. 20, n° 5, pp. 701-712, 2013.
- [58] M. Park, K. Hyun-Jung, B. Lim, A. Wylegala y M. Toborek, «Methamphetamine-induced Occludin Endocytosis Is Mediated by the Arp2/3 Complex-regulated Actin Rearrangement,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, n° 46, 2013.
- [59] A. R. Harris, A. Deaden y G. T. Charras, «Formation of adherens junctions leads to the emergence of a tissue-level tension in epithelial monolayers,» *Journal of Cell Science*, vol. 127, n° 11, 2014.
- [60] C. M. Van Itallie, A. J. Tietgens, E. Krystofiak, B. Kachar y J. M. Anderson, «A complex of ZO-1 and the BAR-domain protein TOCA-1 regulates actin assembly at the tight junction,» *Molecular Biology of the cell*, vol. 26, n° 15, 2015.
- [61] N. Molinie y . A. Gautreau, «The Arp2/3 Regulatory System and Its Deregulation in Cancer,» *Physiological Reviews*, vol. 98, 2018.
- [62] K. G. Campellone y M. D. Welch, «A nucleator arms race: cellular control of actin assembly,» *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 11, 2010.
- [63] E. Kovacs, S. Verma, R. Ali, A. Ratheesh, N. A. Hamilton, A. Akjmanova y A. Yap, «N-WASP regulates the epithelial junctional actin cytoskeleton through a non-canonical post-nucleation pathway,» *Nature Cell Biology*, vol. 13, pp. 934-943, 2011.
- [64] S. Chánez Paredes, A. Montoya García y M. Schnoor, «Cellular and pathophysiological consequences of Arp2/3 complex inhibition: role of inhibitory proteins and phymacological compounds,» *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 76, 2019.
- [65] D. L. Rocca, . M. Amici , A. Antoniou, E. Blanco Suarez, N. Halemani, K. Murk, J. McGarvey, N. Jaafari, J. R. Mellor, G. L. Collingridge y . J. G. Hanley, «The Small GTPase Arf1 Modulates Arp2/3-Mediated Actin Polymerization via PICK1 to Regulate Synaptic Plasticity,» *Neuron*, vol. 79, n° 2, 2013.
- [66] N. Reymond, S. Garrido Urbani, J. P. Borg, P. Dubreuil y M. Lopez, «PICK-1: A scaffold protein that interacts with Nectins and JAMs at cell junctions,» *FEBS Letters*, vol. 579, n° 10, pp. 2243-2249, 2005.
- [67] T. Maritzen, T. Zech, M. Schmidt, E. Krause, L. M. Machesky y V. Haucke, «Gadkin negatively regulates cell spreading and motility via sequestration of the actin-nucleating

ARP2/3 complex,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, n° 26, pp. 10382-10387, 2012.

- [68] I. Dang, R. Gorelik, A. Gautreau y e. a. , «Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration,» *Nature*, vol. 503, 2013.
- [69] O. S. Sokolova, A. Chemeris, S. Guo, S. L. Alioto, M. Gandhi, S. Padrick, . E. Pechnikova, V. David, . A. Gautreau y . B. L. Goode, «Structural basis of Arp2/3 complex inhibition by GMF, Coronin, and Arpin,» *Journal Molecular Biology*, vol. 429, n° 2, 2016.
- [70] R. Gorelik y A. Gautreau, «The Arp2/3 Inhibitory Protein Arpin Induces Cell Turning,» *Cytoskeleton*, vol. 72, pp. 362-371, 2015.
- [71] X. Liu, . B. Zhao, . H. Wang, Y. Wang, . M. Niu, M. Sun, Y. Zhao, R. Yao y Z. Qu, «Aberrant expression of Arpin in human breast cancer and its clinical significance,» *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 20, n° 3, 2016.
- [72] T. Li, . H. M. Zheng, N.-M. Deng, Y.-J. Jiang, J. Wang y . D.-L. Zhang, «Clinicopathological and prognostic significance of aberrant Arpin expression in gastric cancer,» *World Journal of Gastroenterology*, vol. 23, n° 8, 2017.
- [73] J. Kyte y R. F. Doolittle, «A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein,» *Journal of Molecular Biology*, 1982.
- [74] S. Cháñez Paredes, A. Montoya Garcia, K. F. Castro Ochoa, J. García Cordero, L. Cedillo Barron, M. Shibayama, P. Nava, S. Flemming, N. Schlegel, A. M. Gautreau, H. Vargas Robles, R. Mondragon Flores y M. Schnoor, «The Arp2/3 Inhibitory Protein Arpin Is Required for Intestinal Epithelial Barrier Integrity,» *Frontiers in cell and Developmental Biology*, vol. 9, n° 625719, 2021.
- [75] «Translation,» de *Molecular Biology of the Gene*, Seventh ed., Pearson, 2014.
- [76] W. Tang, P. Cai, W. Huo, . H. Li, . D. Zhu, H. Xie, P. Chen, . B. Hang, S. Wang y . Y. Xia, «Suppressive action of miRNAs to ARP2/3 complex reduces cell migration and proliferation via RAC isoforms in Hirschsprung disease,» *Journal of Cellular and Molecular medicine*, vol. 20, n° 7, pp. 1266-1275, 2016.
- [77] A. Kurotani, . A. A. Tokmakov, K.-I. Sato, . V. E. Stefanov, Y. Yamada y T. Sakurai, «Localization-specific distributions of protein pI in human proteome are governed by local pH and membrane charge,» *BMC Molecular and Cel Biology*, vol. 20, n° 36, 2019.

- [78] S. Fetics, A. I. Thureau, V. r. Campanacci, M. Aumont-Nicaise, I. Dang, A. Gautreau, J. Pérez y J. Cherfils, «Hybrid Structural Analysis of the Arp2/3 Regulator Arpin Identifies Its Acidic Tail as a Primary Binding Epitope,» *Cell Press*, pp. 252-260, 2016.
- [79] X. Peng, . L. E. Cuff, C. D. Lawton y K. A. DeMali, «Vinculin regulates cell-surface E-cadherin expression by binding to β -catenin,» *Journal of Cell Science*, vol. 123, n° 4, 2010.
- [80] K. Marunaka, M. Kobayashi, . S. Shu, . T. Matsunaga y A. Ikari, «Brazilian Green Propolis Rescues Oxidative Stress-Induced Mislocalization of Claudin-1 in Human Keratinocyte-Derived HaCaT Cells,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n° 16, 2019.
- [81] J. L. Bays, X. Peng, C. E. Tolbert, C. Guilluy, A. E. Angell, Y. Pan, R. Superfine, K. Burrige y K. A. DeMali, «Vinculin phosphorylation differentially regulates mechanotransduction at cell–cell and cell–matrix adhesions,» *Journad of Cell Biology*, vol. 205, n° 2, 2014.
- [82] S. Yagishita, . M. Murayama, T. Ebihara, K. Maruyama y A. Takashima, «Glycogen Synthase Kinase 3 β -mediated Phosphorylation in the Most C-terminal Region of Protein Interacting with C Kinase 1 (PICK1) Regulates the Binding of PICK1 to Glutamate Receptor Subunit GluA2,» *Journal Biological Chemistry*, vol. 290, n° 49, pp. 29438-29448, 2015.
- [83] W. Hou, S. Nemitz, S. Schopper, M. Lund Nielsen, M. Manfred Kessels y B. Qualmann, «Arginine Methylation by PRMT2 Controls the Functions of the Actin Nucleator Co,» *Developmental Cell*, vol. 45, pp. 262-275, 2018.
- [84] D. Nandi, P. Tahiliani, A. Kumar y D. Chandu, «The ubiquitin-proteasome system,» *Journal of Biosciences* , vol. 31, n° 1, pp. 137-155, 2006.
- [85] M. Joch, A. R. Ase, C. Chen, P. A. MacDonald, M. Kontogianea, A. Corera, A. Brice, P. Séguéla y E. Fon, «Parkin-mediated Monoubiquitination of the PDZ Protein PICK1 Regulates the Activity of Acid-sensing Ion Channels,» *Molecular Biology of the Cell*, vol. 18, n° 8, pp. 2105-3118, 2007.
- [86] G. Simanov, I. Dang, A. I. Fokin, K. Oguievetskaia, V. Campanacci, J. Cherfils y A. M. Gautreau, «Arpin Regulates Migration Persistence by Interacting with Both Tankyrases and the Arp2/3 Complex,» *International Journal of Science*, vol. 22, n° 4115, 2021.
- [87] T. Simmen, . S. Höning, . A. Icking, . R. Tikkanen y . W. Hunziker, «AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells,» *Nature Cell Biology*, vol. 4, pp. 154-159, 2002.

- [88] K. Ling, S. F. Bairstow, C. Carbonara, D. A. Turbin, D. Huntsman y R. Anderson, «Type I γ phosphatidylinositol phosphate kinase modulates adherens junction and E-cadherin trafficking via a direct interaction with μ 1B adaptin,» *Journal of Cell Biology*, vol. 176, n $^{\circ}$ 3, 2007.
- [89] B. M. Gumbine, «Regulation of Cadherin Adhesive Activity,» *Journal of Cell Biology*, vol. 148, n $^{\circ}$ 3, pp. 399-404, 2000.
- [90] T. Gujral, E. S. Karp, M. Chan, B. Chang y G. MacBeath, «Family-wide investigation of PDZ domain-mediated protein–protein interactions implicates β -catenin in maintaining the integrity of tight junctions,» *Chemistry & Biology*, vol. 20, n $^{\circ}$ 6, pp. 816-827, 2013.
- [91] J. Haskins, L. Gu, E. Wittchen, J. Hibbard y B. Stevenson, «ZO-3, a Novel Member of the MAGUK Protein Family Found at the Tight Junction, Interacts with ZO-1 and Occludin,» *Journal Cell of Biology*, vol. 141, n $^{\circ}$ 1, pp. 199-208, 1998.