



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de la región promotora de claudina 6 y sus
posibles factores de transcripción**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

JORGE HIRAM ROMERO ESTRADA



**DIRECTOR DE TESIS: DRA. ERIKA PATRICIA
RENDON HUERTA
CD. MX. 2023**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Estudio de la región promotora de claudina 6 y sus posibles factores de transcripción

realizado por **Jorge Hiram Romero Estrada** con número de cuenta **310294373** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez



Propietaria Dra. Edna Ayerim Mandujano Tinoco



Propietaria Dra. Erika Patricia Rendón Huerta
Tutora



Suplente Dra. Ana Cristina Torres Martínez



Suplente Dr. César Noé Cortés Rubio

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 30 DE NOVIEMBRE DE 2022

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Agradecimientos

Primero que nada, quiero agradecer a mi mamá, Mireya Estrada, por todo su apoyo incondicional, todo su amor y buenos consejos, incluso durante momentos complicados, gracias por ser el mejor ejemplo que pueda tener.

También quiero agradecer a mi padre, Daniel Romero, por inculcarme la curiosidad que hoy me tienen haciendo ciencia.

A mi hermano Fernando Romero por apoyarme siempre y demostrar que se pueden hacer las cosas aun cuando el panorama es complicado.

A mis amigos de la carrera, Dominique, Carlos Spore, Yandreiv y Aka

A mis amigos y compañeros del laboratorio, especialmente a Martin que siempre estuvo ahí para recomendarme música y equipos Pokémon, a Frank, Naresh, Carlos, Priss, Sanyog, Osmar y Verania que me ayudo con varios experimentos.

A Anita por su apoyo y por adoptarme en el laboratorio como su alumno.

A los doctores, por ayudarme siempre con mis dudas académicas y por brindarme el espacio y recursos para completar este proyecto.

Al Futbol Club Barcelona por alegrarme cada fin de semana especialmente cuando le ganan al Madrid.

Este proyecto fue financiado con el apoyo del PAPIIT, proyecto IN218019.

Índice

Índice de figuras	III
Abreviaturas	IV
Resumen	1
Antecedentes.....	2
Claudinas.....	2
Claudina 6	6
Cáncer	7
<i>Helicobacter pylori</i>	10
Regulación de la transcripción.....	11
Regulación transcripcional de claudinas.....	13
CREB	13
Yin Yang 1.....	14
Planteamiento del problema.....	15
Justificación	15
Hipótesis	16
Objetivo	16
Materiales y métodos.....	17
Cultivos de células AGS.....	17
Búsqueda de los probables sitios de unión de factores de transcripción en la región promotora de <i>CLDN6</i>	17
Clonación de la región promotora de <i>CLDN6</i> y subclonación de 2 fragmentos de 1421 y 901 pb respectivamente.....	17
Incorporación de las SR1 y SR2 en el pMetLuc2.....	21
Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 α con el vector pMetLuc2 + SR1 o SR2.....	23
Tratamiento de células AGS con el LPS de <i>H. pylori</i>	24
Inmunoréplicas tipo Western	24
Transfección de las células AGS con el vector pMetLuc2-SR1 o -SR2 y medición de la actividad de Luciferasa	26
Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	27
Resultados	30
Análisis bioinformático del promotor de claudina 6	30
La exposición a LPS de <i>H. pylori</i> induce un aumento en la expresión de claudina 6, CREB y YY1.....	30

Construcción del vector SR1 y SR2	32
SR1 es la región que regula la expresión de CLDN6 cuando las células AGS son expuestas a LPS de <i>H. pylori</i>	34
CREB y YY1 se localizan en la región promotora de CLDN6 en células AGS tratadas con LPS.....	36
Discusión.....	38
Conclusiones.....	41
Perspectivas.....	41
Referencias	43

Índice de figuras

Figura 1: Estructura general de las claudinas y su clasificación.	3
Figura 2: Esquema de los tipos de interacción entre claudinas.	3
Figura 3: A: Esquema de los elementos reguladores	12
Figura 4: Esquema donde se enfatiza los sitios de unión de los primers forward y reverse	18
Figura 5: Esquema de clonación de las SR1 y SR2	19
Figura 6: Actividad de la luciferasa en células AGS transfectadas con el vector pMetLuc2-SR1 O -SR2 y tratadas con 10 ng/mL de LPS de H. pylori a diferentes tiempos.	27
Figura 7: A) Esquema posicional de los primers utilizados en el ensayo de ChIP B) Ensayo de ChIP.	29
Figura 8: Esquema en donde se señalan las posiciones de los sitios putativos de unión para YY1 y CREB dentro del promotor de CLDN6.	30
Figura 9: LPS incrementa la expresión de CLDN6, CREB y YY1 en células AGS.	31
Figura 10: Representación de la correlación de Pearson	32
Figura 11: A) Esquema del promotor con de CDLN6	33
Figura 12: Análisis de la orientación correcta de las SR1 y SR2 con las enzimas de restricción EcoR1 + BamH1	34
Figura 13: Actividad transcripcional mediada por fragmentos del promotor de CLDN6	35
Figura 14: Actividad de luciferasa normalizada a diferentes tiempos	36
Figura 15: CREB y YY1 se unen al promotor de CDLN6 en la región 901 a 1421 pb	37

Abreviaturas

<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
UE	Uniones Estrechas
ZO	<i>Zona occludens</i>
MUPP1	Proteínas con dominios múltiples PDZ
JAM	Del inglés <i>Junction Adhesion Molecule</i>
<i>CLDN6</i>	El gen de claudina 6
CLDN6	La proteína Claudina 6
cagPAI	Isla de patogenicidad
CagA	Gen A asociado a la citotoxina
VacA	Citotoxina vacuolizante
LPS	Lipopolisacárido
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
IFN γ	Interferón gamma
ILs	Interleucinas
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
PKs	Proteínas cinasas
CaMK	Cinasa dependiente de calmodulina
CREBBP	Acetilinasas de histonas de unión a CREB
YY1	<i>Yin Yang 1</i>

SR1	Región desde 0 hasta 1421 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción
SR2	Región desde 0 hasta 901 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción
AGS	Línea celular de adenocarcinoma gástrico humano
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
MSI	Inestabilidad de microsatélites

Resumen

El cáncer gástrico es la quinta causa de muerte asociada a cáncer a nivel mundial. Uno de los factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer gástrico es la infección con *Helicobacter pylori*, una bacteria Gram-negativa. Se conoce que esta bacteria promueve la carcinogénesis gástrica principalmente mediante dos proteínas oncogénicas, CagA y VacA. Sin embargo, el lipopolisacárido presente en la pared celular de esta bacteria también puede participar en los procesos oncogénicos.

La Claudina 6 es una proteína transmembranal que forma parte de las Uniones Estrechas que de forma normal solo se expresa en tejidos embrionarios. Se ha demostrado que en tejidos de cáncer gástrico hay un incremento en su expresión con respecto al tejido adyacente y que una alta expresión de claudina 6 se asocia con una mala prognosis para el paciente. En ensayos *in vitro* su sobreexpresión aumenta la proliferación e invasividad de células de adenocarcinoma gástrico humano. Debido al número de reportes de esta claudina en tejidos de cáncer gástrico y otros tipos de cáncer, se ha sugerido que puede desempeñar el rol de oncogén.

El lipopolisacárido de *Helicobacter pylori* incrementa significativamente la expresión de Claudina 6 en las células de adenocarcinoma gástrico humano a través de la activación del TLR2 y la cinasa ERK1/2, sin embargo, se desconocen que factores de transcripción participan, así como las secuencias localizadas en el promotor que regulan su expresión. Con base en esto, el objetivo de este trabajo se centró en identificar a los factores de transcripción que regulan la expresión de Claudina 6 y las secuencias dentro de su promotor a las cuales se unen esos factores de transcripción cuando las células son expuestas al LPS de *H. pylori*.

En este trabajo encontramos que la región localizada entre 901 pb y 1421 pb *rió arriba* del sitio de inicio de la transcripción en el promotor de claudina 6, contiene regiones a las cuales se unen CREB y YY1, los cuales regulan positivamente su expresión.

Antecedentes

Uniones Estrechas

Las uniones estrechas (UE) forman parte de los complejos de uniones intercelulares y estas se encuentran localizadas en la región latero-apical de las células epiteliales adyacentes. Las UE mantienen la polaridad celular y funcionan como una barrera evitando la traslocación de proteínas del lado apical al basolateral y viceversa y regulando el flujo de iones y moléculas a través del espacio paracelular [1]. Las UE están constituidas por más de 40 proteínas citosólicas y transmembranales. Entre las proteínas citosólicas se encuentran las proteínas ZO (*Zona occludens*), MUPP1 (proteínas con dominios múltiples PDZ), cingulina, proteínas involucradas en vías de señalización, proteínas de anclaje, entre otras. Dentro de las proteínas transmembranales se encuentran las JAM (del inglés *Junction Adhesion Molecule*), la tricelulina, la ocludina y las claudinas las cuales son los componentes más importantes y abundantes de las uniones estrechas [1].

Claudinas

Las claudinas son un grupo de proteínas integrales de membrana que tienen un papel fundamental en el funcionamiento de las uniones estrechas en los epitelios y endotelios. A la fecha se conocen 27 isoformas reportadas en ratón. Las claudinas se clasifican en dos grupos de acuerdo a las homologías en sus secuencias; el primer grupo está conformado por las “claudinas clásicas” que incluyen a las claudinas de la 1 a la 10, 14, 15, 17 y 19; mientras que el segundo grupo está formado por las claudinas restantes las cuales son llamadas “claudinas no clásicas” [2]. Las claudinas están conformadas por cuatro dominios transmembranales, una asa intracelular y dos asas extracelulares, y sus dominios amino y carboxilo terminal intracelulares [2]. Las asas extracelulares son importantes para generar el contacto célula-célula interactuando con las claudinas de la célula adyacente [2]. La primera asa extracelular tiene una longitud de ~50 residuos de aminoácidos, contiene dos cisteínas que están involucradas en la función de barrera y las cargas positivas y negativas permiten la formación de poros. La segunda asa extracelular tiene una longitud de más o menos 25 residuos de aminoácidos, esta asa se asocia en una interacción homofílica entre dos claudinas de diferentes membranas celulares, y cumple una función de adhesión celular, lo que permite el estrechamiento de la hendidura paracelular [33]. Dentro de las regiones intracelulares, el N-terminal está conformado por más o menos 7 res. de aminoácidos, el asa intracelular por más o menos 12 res. de aminoácidos y el C-terminal tiene una longitud variable que va de los 25 a los 50 res. de aminoácidos; esta región es importante para la señalización celular (**Figura 1**) [2,32].

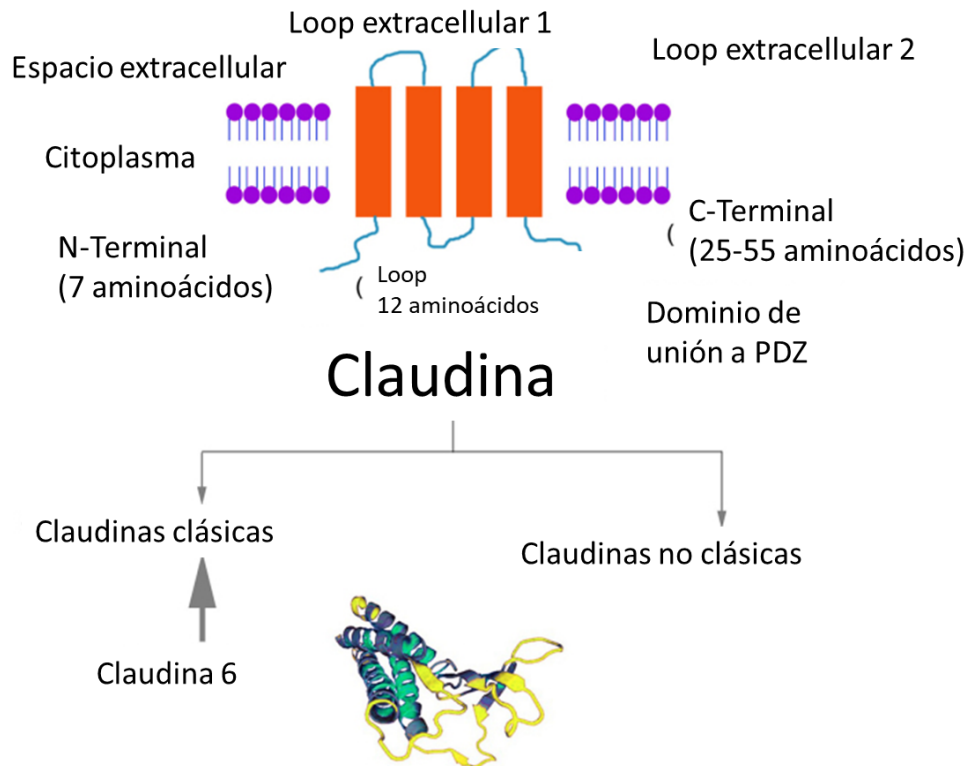


Figura 1: Estructura general de las claudinas y su clasificación (claudinas clásicas y no clásicas).

Las claudinas se pueden asociar entre ellas en dos orientaciones ortogonales, interactuando con claudinas de la misma membrana plasmática, lo que se conoce como interacción *cis* [2]. Además, se ha observado la interacción entre claudinas de membranas opuestas, lo que se conoce como interacción *trans* [2]. Por otro lado, las claudinas pueden tener interacciones homofílicas y heterofílicas, en la primera se generan interacciones entre las mismas isoformas de claudinas y en la segunda entre claudinas de isoformas diferentes (**Figura 2**) [2].

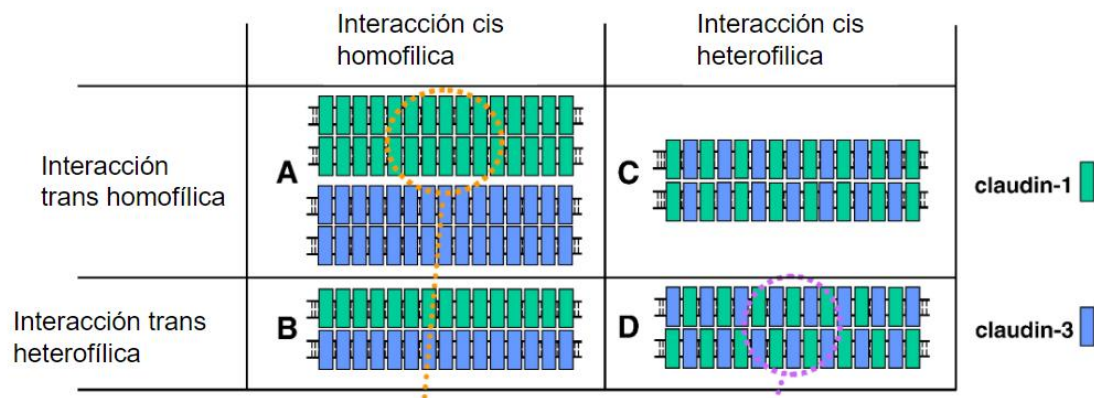


Figura 2: Esquema de los tipos de interacción entre claudinas.

La expresión de las claudinas es tejido específico y en todos los tejidos epiteliales se expresa por lo menos un tipo de claudina, sin embargo, de forma general varias proteínas se expresan simultáneamente y esto depende de la función del tejido en el cual se encuentren [4].

Un ejemplo de esto es el tejido epitelial de riñón, donde en el glomérulo se presenta una gran expresión de la claudina 5 [43], sin embargo, en el túbulo renal proximal las claudinas más abundantes son la claudina 2, 10 y la 17 debido a que esta parte del riñón se encarga de reabsorber los iones que dejó pasar el glomérulo [4].

En el caso del estómago de rata, la claudina 3 es la más abundante en las células epiteliales de la membrana basolateral, mientras que la claudina 4 es la más abundante en las glándulas gástricas. Por otro lado, la claudina 5 se expresa en ambos tejidos [4]. En el caso del intestino de ratón las claudinas más abundantes son la claudina 2, 3, 7 y 15 y las claudinas que no fueron son 6, 16, 19, 22 y 24 [4]. La función fisiológica de las claudinas esta resumida en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Expresión y función de claudinas, modificado de Krause et al 2008

Claudina	Tejido	Función
1	Epitelios	Barrera Epidérmica en mamíferos
2	Epitelio intestinal, túbulo renal proximal, plexo coroideo	Incrementa la permeabilidad paracelular a cationes
3	Vesícula biliar, oído interno, endotelio capilar cerebral, epitelios intestinal y hepático Células epiteliales de la membrana basolateral del estomago	Constituyen las hebras de uniones estrechas en los endotelios
4	Vesícula biliar	
5	Endotelio, glomerulo	Reduce la permeabilidad paracelular a cationes
6	Epitelios embrionarios	Desempeña un rol durante la maduración de los epitelios
7	Duodeno, yeyuno, íleon, colon	Incrementa el sodio en el espacio paracelular y disminuye la permeabilidad a cloro.

8	Oído interno	Reduce la permeabilidad paracelular a cationes
9	Oído interno	Desempeña un rol en la permeabilidad paracelular durante los cambios de maduración
10	Próstata de ratón, túbulo renal proximal	
11	Células de Schwann y células de Sertoli	Conducción saltatoria
12	Duodeno, yeyuno, íleon, colon	
13	Duodeno, yeyuno, íleon, colon	Desempeña un rol en la permeabilidad paracelular durante los cambios de maduración
14	Oído interno	Reduce la permeabilidad paracelular a cationes
15	Endotelio de riñón Intestino	Incrementa la permeabilidad a sodio
16	Asa de Henle ascendente	Incrementa la permeabilidad paracelular a cationes
17	Riñón, lóbulo renal proximal	
18	Epitelio pulmonar de ratón	
19	Riñón y retina	Reduce la permeabilidad paracelular a cationes
20	Piel	
21		
22	Tráquea	
23	Colón, estomago, placenta, piel	
24		

Dado que la expresión de las claudinas es tejido específico, los cambios en los patrones de expresión de estas proteínas están relacionados con el desarrollo de varias enfermedades, como la enfermedad intestinal inflamatoria, la colitis ulcerativa y diferentes tipos de cáncer como el cáncer de mama, gástrico, pancreático, próstata y uterino [1].

Claudina 6

El gen de claudina 6 (*CLDN6*) en el ser humano está localizado en el cromosoma 16p13.3 y su expresión en condiciones normales está limitada a células troncales embrionarias, células epiteliales durante el desarrollo temprano, en el saco endolinfático del oído interno, las papilas gustativas y en diferentes tipos de cáncer [3]. En condiciones normales, la claudina 6 (*CLDN6*) funciona a manera de barrera de los iones Na^+ y Cl^- , sin embargo, cuando se altera su expresión esta función queda comprometida. La sobreexpresión de *CLDN6* en el desarrollo embrionario provoca la pérdida de la función normal de barrera en la piel, lo que provoca deshidratación transepidérmica y muerte neonatal [4].

El papel de *CLDN6* en el cáncer aún no está del todo claro, ya que su función varía dependiendo del tipo de cáncer. En cáncer de mama, por ejemplo, hay opiniones encontradas, ya que por un lado se describe a *CLDN6* como un gen supresor de tumores [5], mientras que en otras publicaciones parece comportarse como un oncogén [6]. En el cáncer gástrico *CLDN6* se describe como un oncogén al promover la migración y la invasión celular a través del eje Yap1-Snail [16, 44]. La relación de *CLDN6* con diferentes tipos de cáncer está resumida en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Expresión de claudina 6 en diferentes tipos de cáncer, modificado de Q Hu 2021.

Tipo de Cáncer	Función	Vía de señalización
Cáncer de mama	Inhíbe la proliferación e induce apoptosis	p38/MAPK
	Inhíbe migración e invasión	ASK1/p38/ JNK MMP2 B-catenina/SENP1/HIF1
	Promueve la resistencia a fármacos	GSTP1 AF6/ERK
Cáncer cérvico-uterino	Inhíbe proliferación e induce apoptosis	--
Meningioma	Inhíbe migración e invasión	MMP2/MMP9/ vimentina y N-Cadherina
Cáncer hepatocelular	Promueve proliferación	EGFR/AKT/mTOR
	Promueve migración e invasión	EGFR/AKT/mTOR E-cadherina, N-cadherina y Vimentina
	Promueve resistencia a fármacos	ZO2/YAP1
Cáncer gástrico	Promueve proliferación	Yap1/SNAIL
	Promueve migración e invasión	CLDN1/MMP2
Cáncer endometrial	Promueve proliferación	PI3K/AKT/mTOR

	Promueve migración e invasión	SFK/PI3K/AKT/ER α
Cáncer de ovario	Infiltración de células inmunes	Diferentes tipos celulares.

Cáncer

Históricamente el cáncer ha sido descrito como un grupo de enfermedades de rápida proliferación e incontrolable crecimiento celular [7]. El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. Dentro de este grupo de enfermedades destacan el cáncer de pulmón, colorrectal, de mama, de hígado y el gástrico [8].

El cáncer gástrico, es uno de los tipos de cáncer más común en humanos. Es una enfermedad heterogénea con diferencias en el fenotipo, pronosis y respuesta a los tratamientos [9]. Este tipo de cáncer es la quinta neoplasia más común a nivel mundial y la tercera causa de muerte asociada a cáncer, con una estimación de 783 000 muertes en 2018 [10]. En México el cáncer gástrico es la séptima neoplasia más común y la sexta causa de muerte [11].

El 95% de los casos de cáncer gástrico son adenocarcinomas seguido por el linfoma gástrico primario. Nakamura et al 1968 [12] clasificó histológicamente al adenocarcinoma gástrico en dos grandes tipos, el tipo diferenciado y el indiferenciado. Lauren en 1965 [13] lo clasifica en tipo intestinal y de tipo difuso, basándose en la estructura glandular. El tipo intestinal es el más común, con una alta incidencia en hombres mayores, aunque también es el que presenta mejor pronosis, mientras que el tipo difuso se presenta de forma más común en mujeres jóvenes [10]. Existen otros sistemas de clasificación, como el propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la cual se plantean 4 tipos: el papilar, el tubular, el mucinoso y el poco cohesivo. Aunque la clasificación de Lauren tiene problemas al clasificar del 15% al 20% de los carcinomas en alguno de los tipos propuestos, esta clasificación refleja las diferencias biológicas durante el progreso del tumor, además de que epidemiológicamente es más útil [14]. Por lo que las otras clasificaciones son un complemento a la clasificación de Lauren.

Las ciencias ómicas han permitido el análisis masivo de moléculas, permitiendo conocer los diferentes cambios genéticos y epigenéticos que pueden dirigir la carcinogénesis. Una de las grandes ventajas que tiene la clasificación molecular con respecto a las clasificaciones clásicas es que permite denotar la heterogeneidad de los tumores, esto posibilita la selección de tratamientos más específicos. Existen diferentes clasificaciones moleculares del cáncer gástrico, en 2011 Tan et al [45] identifico 2 grandes grupos de acuerdo con la expresión diferencial de genes, estos grupos son el tipo intestinal genómico y el tipo difuso genómico. En términos de la clasificación histológica propuesta por Lauren et al. el tipo intestinal genómico corresponde con el tipo intestinal propuesto por Lauren et al, mientras que el tipo difuso genómico corresponde con el tipo difuso en la clasificación de Lauren et

al. Los cambios moleculares, los tratamientos recomendados y el pronóstico están resumidos en la **tabla 3**.

Tabla 3: Descripción de los tipos moleculares de cáncer gástrico según Tan et al.

	Intestinal genómico	Difuso Genómico
Histología	Intestinal, Lauren et al	Difuso, Lauren et al
Alteraciones moleculares	Incremento en la expresión de genes relacionados con el <i>metabolismo de carbohidratos y proteínas</i> <i>FUT2</i> Adhesión celular <i>LGALS4, CDH17</i>	Incremento en la expresión de genes relacionados con la <i>proliferación celular y el metabolismo de ácidos grasos</i> <i>AURKB, ELOVL5</i>
Tratamiento	5-FU y oxaliplatin	Cis-platino
Prognosis	Mejor pronostico	Pronostico pobre

Por otro lado, en 2013 Lei et al [46] propuso otro sistema de clasificación donde separaba en tres subtipos; el proliferativo, el metabólico y el tipo mesenquimal. Dentro del tipo proliferativo se pueden clasificar el 73.6% de todos los tumores de tipo intestinal según Lauren et al. En el tipo metabólico entran el 53.6% de los casos clasificados como intestinal según Lauren et al. Para terminar en tipo mesenquimal solo incluye el 58.2% de los casos que Lauren et al clasifica como difuso. Las características moleculares están resumidas en la **tabla 4**.

Tabla 4: Descripción de los tipos moleculares propuestos por Lei et al.

	Proliferativo	Metabólico	Mesenquimal
Histología	73.6% intestinal, Lauren et al	53.6% intestinal, Lauren et al	58.2% difuso, Lauren et al
Alteraciones moleculares	Alteraciones en la expresión de genes relacionados con <i>ciclo celular, replicación.</i> CCNE1, MYC, K-RAS Alto índice de mutaciones en TP53	Alteraciones en la expresión de genes relacionados con <i>metabolismo.</i> SPEM Bajo índice de mutaciones en TP53	Alteración en la expresión de genes relacionados con <i>adhesión focal y matriz extracelular.</i> CD44, N-cadherina, VEGF Bajo índice de mutaciones en TP53
Tratamiento		5-FU	Inhibidores de las vías PI3K/AKT/mTOR

El TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) es un programa de investigación de genómica del cáncer, el cual ha recabado más de 20 mil muestras pareadas de 33 tipos de cáncer diferentes. Las muestras fueron analizadas con herramientas genómicas, transcriptómicas, epigenómicas y proteómicas. Con base en estos datos en 2014 el TCGA publicó su clasificación de cáncer gástrico, la cual presenta cuatro grupos; *tumores positivos al virus de Epstein-Barr (EBV)*, *tumores con microsatélites inestables (MSI)*, *tumores con estabilidad genómica* y *tumores con inestabilidad cromosómica*. Las características moleculares están resumidas en la **tabla 5**.

Tabla 5: Descripción de los tipos moleculares propuestos por el TCGA

	Positivos para EBV	MSI	Genoma estable	Inestabilidad cromosómica
Frecuencia	8.8%	21.7%	19.7%	49.8%
Demografía	Hombres (81%)	72 años (media)	59 años (media)	No específico
Histología			Difuso según Lauren et al	Intestinal según Lauren et al
Alteraciones moleculares	CIMP Sobreexpresión de PD-L1/2, JAK2 Mutación de PI3KCA, ARID1A, BCOR Señalización de células inmunes Silenciamiento de CDKN2A	CIMP Mutación en TP53, PI3KCA, ERBB3, ARID1A Silenciamiento de MLH1 Activación de vías mitóticas	Mutación en CDH1, RHOA Fusión de CLDN18 y ARHGAP Enriquecimiento de las vías de Adhesión celular y angiogénesis	Mutación en TP53, SMAD4 y APC Activación de la vía RKT-RAS
Objetivos moleculares	PI3KCA, JAK2, PD-L1/2	PI3KCA, ERBB2/3, EGFR, PD-L1, MLH1	RHOA, CLDN18	RKTs, EGFR, VEGFA, CCNE1, CDK6

Como se mencionó anteriormente, las claudinas son proteínas que presentan patrones de expresión aberrantes en los diferentes tipos de cáncer, un ejemplo de esto es la expresión de claudina 1 en cáncer de mama y colon donde esta proteína está disminuida [34].

Las claudinas pueden desempeñar tanto el papel de oncogenes, es decir, promoviendo el desarrollo del cáncer; o como gen supresor de tumores, es decir, frenando la transformación celular. Para CLDN6 diversos trabajos sugieren que esta proteína promueve el desarrollo del cáncer gástrico, además se encontró que los pacientes que presentan mayor expresión de esta proteína tienen una peor prognosis y menor supervivencia [16]. Por otro lado, en modelos *in vitro* con la línea celular de adenocarcinoma gástrico

humano (AGS) se demostró que la sobreexpresión de claudina 6 promueve la invasión a través de la sobreexpresión de claudina 1 y la activación de metaloproteasa-2 [17].

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria gramnegativa (bacilo) que es huésped de por lo menos la mitad de la población mundial y es la causa principal de úlceras gástricas, adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico [18]. *H. pylori* es una bacteria capaz de habitar el nicho que se genera en la mucosa gástrica, ya que su genoma incluye más de 300 genes especializados en resistir el ambiente ácido del estómago, entre los que se encuentra el gen que codifica para la ureasa. Esta proteína es la más abundante en *H. pylori* y se encarga de hidrolizar la urea en amonio y dióxido de carbono [18].

Todas las cepas de *H. pylori* inducen respuesta inmune a través de la activación de células inmunológicas y la infiltración de las mismas, además de la producción de anticuerpos. No obstante, solo el 15% de las infecciones por esta bacteria culmina en una úlcera gástrica y solo el 2% en adenocarcinoma gástrico [18]. Existen tres factores que determinan el desarrollo de la patología: 1) la virulencia específica de cada cepa de *H. pylori*, 2) el tipo y el grado de la respuesta inmune del hospedero a la infección y 3) los cofactores asociados al estilo de vida, entre los que se encuentra el tabaquismo y la dieta [18].

La isla de patogenicidad (*cagPAI*) es uno de los factores de virulencia más relevantes para la patogénesis de la bacteria, ésta isla fue adquirida por *H. pylori* a través de una fuente desconocida durante la evolución. Esta isla de patogenicidad contiene 30 genes y se localiza dentro del locus de la glutamato racemasa. Las cepas de *H. pylori* pueden contener la isla de patogenicidad completa (*cag+*), no tenerla (*cag-*) o tener fragmentos de ésta, las cuales de forma general se comportan similar al genotipo *cag-*.

La isla *cagPAI* codifica para un sistema de secreción de proteínas tipo IV, el cual es usado por la bacteria para translocar sus productos dentro de la célula huésped entre las que destacan la proteína CagA y peptidoglicanos. La proteína CagA, una vez translocada, es fosforilada en residuos de tirosina por las cinasas Src de la célula huésped activando diferentes vías de señalización como ERK1/2 y MAPK [18].

Por otro lado, la citotoxina vacuolizante (*VacA*) está presente en todas las cepas de *H. pylori*, pero es polimórfica, variando en dos regiones principalmente. *VacA* es una toxina formadora de poros, los cuales son selectivos a aniones y moléculas neutras pequeñas. *VacA* parece tener un efecto anti-inflamatorio ya que interfiere con la presentación de antígenos, inhibe de forma específica a las células T y detiene su proliferación [18].

Además de los factores de virulencia proteicos también existen otras biomoléculas capaces de interactuar con las células del epitelio gástrico y por lo tanto tener influencia en la

transformación celular de las mismas. El lipopolisacárido (LPS) es un componente importante de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. El LPS está compuesto por: el Lípido A, el cual es un dominio hidrofóbico que posee el principal factor de virulencia; el antígeno-O; y el centro o núcleo de oligosacárido.

La mayoría de los LPS son termoestables y producen una fuerte reacción inmunológica en los mamíferos. Dentro del huésped la región del lípido A es reconocida por los receptores en la superficie de macrófagos y células endoteliales [19]. El LPS es reconocido por el CD14, TLR2 y TLR4, entre otras moléculas, siendo el TLR2 importante en el contexto del cáncer gástrico ya que la activación de este receptor por la unión del LPS de *H. pylori* incrementa la expresión de diferentes claudinas, entre ellas la CLDN6 [20].

Regulación de la transcripción

La regulación de la transcripción está dada por la acción integrada de muchos elementos reguladores en *cis*, como el promotor central, los elementos cercanos al promotor y secuencias reguladoras conocidas como los elementos *tethering*, *enhancers*, *silencers* e *insulators*, los cuales se encuentran a una distancia considerable del sitio de inicio de la transcripción [23]. El promotor central es la región cercana al sitio de inicio de la transcripción, y se define como la región mínima que es suficiente para dirigir el inicio de la transcripción. Normalmente el promotor central se extiende a unos 40 pares de bases *rió arriba* del sitio de inicio de la transcripción [22], el cual contiene elementos de regulación para el gen que está controlando [21], dentro de estos elementos esta BRE (del inglés *TFIIB recognition element*), los elementos TATA, el iniciador (Inr) y los elementos río abajo del sitio de inicio de la transcripción, como DPE y DPC. La función del promotor es unir de forma correcta el complejo de inicio de la transcripción [22]. Los elementos *tethering*, un regulador en *cis* que por lo general se encuentran muy cercanos al promotor central, direccionan la actividad remota de los *enhancers* a un gen específico de entre todos los genes [22]. Por otro lado, los *enhancers* son pequeños segmentos de DNA que típicamente se encuentran a cientos de pares de bases del promotor central y funcionan como plataformas que reclutan factores de transcripción, por lo que tienen la capacidad inherente de funcionar de forma modular y autónoma [23]. La contraparte de éstos son los *silencers*, los cuales son secuencias de DNA que regulan de forma negativa la transcripción al interactuar con la maquinaria transcripcional o con *enhancers* (ambos reprimidos por los *silencers*) [23]. Los *insulators* son barreras que permiten separar regiones de cromatina y aislarlas del ambiente transcripcional cercano anulando, de una región específica, los efectos que promueven la activación (*enhancers*) y los efectos de represión (heterocromatina y *silencers*) (**Figura 3A**) [23].

En eucariontes la RNA polimerasa II (RNA Pol II) es la encargada de transcribir los genes. Esta proteína se encuentra presente en grandes cantidades dentro del núcleo celular, por lo tanto, la actividad de este complejo proteico debe ser regulada de forma muy precisa y dinámica [21]. La RNA Pol II además de requerir los factores de transcripción generales

(TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH), requiere del complejo mediador; el cual es necesario para establecer la transcripción dependiente del activador. También es necesario el reclutamiento de los complejos de remodelación de la cromatina, ya que alrededor de los sitios de inicio de la transcripción activos se observa la disminución de los nucleosomas cercanos, además del enriquecimiento de diferentes marcas en las histonas como la H3K4me3 y H3K27ac, las cuales son marcas de cromatina transcripcionalmente activa [47].

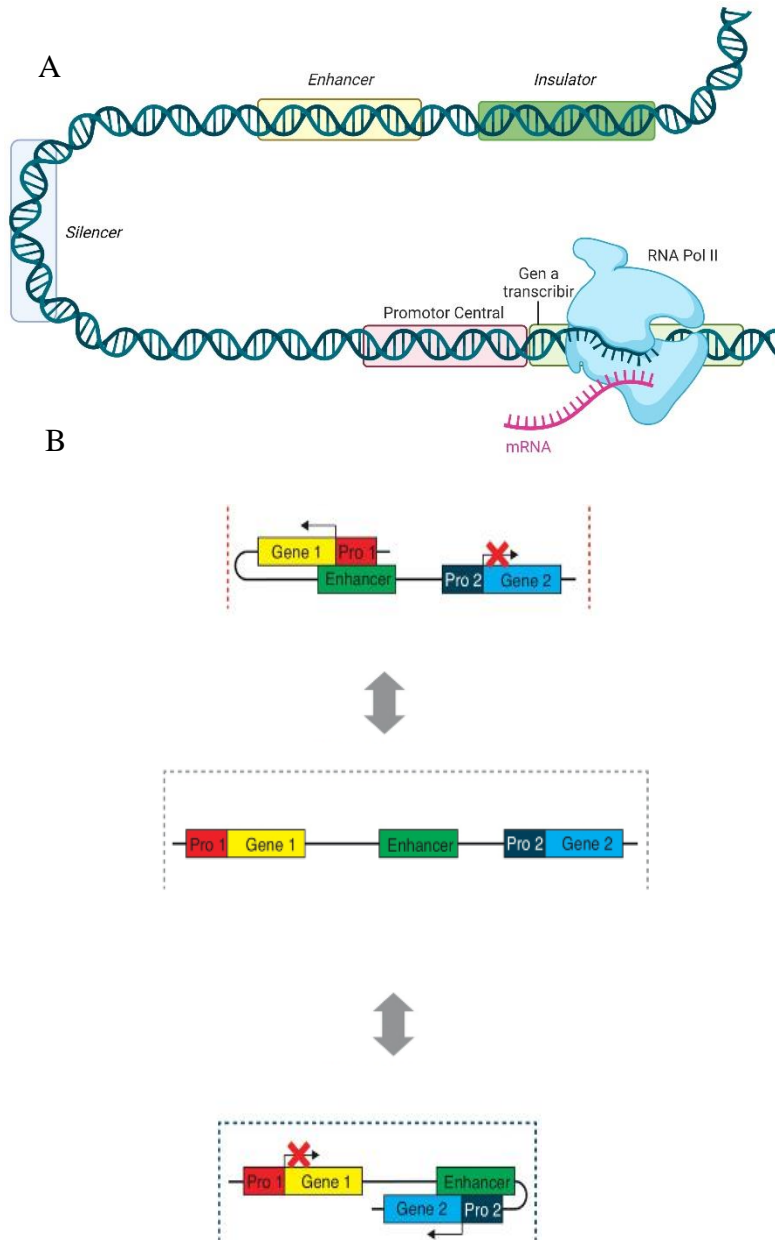


Figura 3: A: Esquema de los elementos reguladores. B: Esquema de un enhancer interactuando con dos promotores diferentes

Los factores de transcripción reconocen secuencias pequeñas de DNA que van desde los seis a los doce pares de bases, por lo que se requiere de un sistema más complejo que simplemente el reconocimiento del factor de transcripción a la secuencia específica [23]. Es aquí donde toman importancia la combinación de los diferentes elementos reguladores que se mencionaron previamente, un ejemplo de esto es la interacción promotor-*enhancer*. Normalmente esta pareja reguladora está unida por medio de un asa, promoviendo la cercanía de todos los elementos reguladores que fueron reclutados por el *enhancer* al promotor (**Figura 3B**) [35].

Regulación transcripcional de claudinas

Se conoce muy poco sobre los programas transcripcionales que dirigen la expresión de claudinas. Entre las vías de señalización relacionadas con su regulación genética se encuentran por ejemplo aquellas en las que participan la β -catenina, CDX2 y HNF α en el epitelio intestinal [36]. Específicamente la vía de β -catenina-TCF/LEF está relacionada con la expresión de claudina 1 en células de las criptas en el epitelio intestinal [37].

Los procesos de inflamación cambian los patrones de expresión de claudinas [37, 20] y en el cáncer gástrico los factores de riesgo más importantes como la presencia de *H. pylori* y la gastritis [18], que inducen vías de señalización inflamatorias que pueden estar regulando la expresión de las claudinas.

Diferentes estudios utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* demuestran que agentes inflamatorios como TNF- α , IFN γ , IL-1 β , IL-4 IL-6, IL-13 e IL-17 modifican la composición de claudinas en las UE de diferentes tipos celulares [38, 39, 40]. Se desconoce qué elementos de regulación promueven la transcripción del gen de CDLN6, en 2017 se propuso a CREB como uno de los posibles factores de transcripción que regulan la expresión de este gen en células humanas [3].

CREB

CREB (*cAMP response element-binding*) es una proteína modular que está conformada un dominio de cinasa inducible y un dominio rico en glutamina esenciales para la transactivación de CREB. Esta activación depende de la fosforilación reversible de varios residuos de serina, entre los que destacan la serina 133, enriquecida en tumores humanos, y el residuo de serina 142. La fosforilación se lleva a cabo por cinasas como la PKA, PKC, PKB, CaMK y p38 entre otras [28].

La proteína CREB fosforilada interactúa con múltiples co-activadores transcripcionales como las acetilasas de histonas de unión a CREB (CREBBP), esto mediante la unión del dominio de cinasa inducible y el dominio de interacción de CREBBP [29]. CREB es un activador de la transcripción y puede regular un gran número de procesos fisiológicos

dependiendo de su ubicación celular y sus patrones de fosforilación. Entre estos procesos destacan la proliferación celular, el ciclo celular, el metabolismo, la reparación de DNA, la diferenciación celular, la inflamación, la angiogénesis, la respuesta inmune y la supervivencia celular [28, 29].

La expresión de CREB es regulada por diversos mecanismos, como AMPc, la concentración de Ca^{2+} intracelular, factores de crecimiento como NGF, FGF y TGF- β y citosinas como la IL-4, IL-10 e IL-13 [28].

CREB está sobreexpresado en tumores de cáncer pulmonar, glioblastoma, cáncer de mama y melanoma. Además, la sobreexpresión de CREB está asociada con los parámetros clínico-patológicos como el estadio del tumor, grado, metástasis, un mal pronóstico y baja supervivencia del paciente [30].

Por otra parte, CREB se puede unir de forma directa con diversas proteínas entre ellas CEBPB y curiosamente con la proteína yin yang 1 (YY1). Por esta razón YY1 y CREB fueron seleccionadas para este proyecto, ya que ambas son proteínas que se asocian fuertemente con la progresión del cáncer y con el desarrollo de diferentes características esenciales del cáncer, de manera similar a lo que ocurre con claudina 6.

Yin Yang 1

Yin Yang 1 (YY1) es un factor de transcripción multidominio que contiene en su estructura a los llamados “dedos de zinc” C2H2. YY1 se encuentra expresado de forma constitutiva en todos los tejidos humanos y controla varios mecanismos celulares tales como la regulación transcripcional, la proliferación celular, la reparación de DNA, la remodelación de la cromatina, el reclutamiento de las proteínas del grupo Polycomb y las modificaciones epigenéticas [26]. YY1 es una proteína multi-dominio, su región N-terminal (1 a 100 residuos de aminoácidos) contiene el dominio de activación transcripcional, además de la secuencia de localización nuclear. Por otro lado, la región central (170 a 200 residuos de aminoácidos) y la cercana al C-terminal (333 a 397 residuos de aminoácidos) están relacionadas con la represión transcripcional. El C-terminal contiene un dominio de cuatro dedos de Zinc C2H2 que regula la unión con el DNA [26].

YY1 interactúa con una amplia gama de reguladores transcripcionales, entre los que destacan: la RNA polimerasa II, p300, c-Myc, pRb, HDACs, CREB, NOTCH, GATA3, Sp1, ATF6 y C/EBPb, todos ellos relacionados con la progresión del cáncer [26]. Diversos estudios han mostrado que YY1 regula a muchos genes tanto positiva como negativamente, y esto depende de las proteínas con las que interactúa y el contexto celular. En el caso del cáncer gástrico se conoce que su sobreexpresión está relacionada con una mal prognosis en los pacientes [27], además YY1 regula directamente la expresión de la metaloproteasa 14 en este tipo de cáncer, lo cual se asocia con la progresión del cáncer gástrico [41].

Planteamiento del problema

Las claudinas tienen un papel fundamental en mantener la polaridad celular y la homeostasis tisular. Sin embargo, en condiciones patológicas, la expresión de las claudinas se altera induciendo la proliferación, migración e invasividad celular. La expresión de claudina 6 está limitada a células troncales, células epiteliales durante el desarrollo embrionario y diferentes tipos de cáncer [20]. Se sugiere que la expresión de CLDN6 en tejidos adultos es un indicador de cambios moleculares muy tempranos que conllevan a la transformación celular. *H. pylori*, uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo del adenocarcinoma gástrico, incrementa la expresión de CLDN6 en este tipo de cáncer y el incremento en la expresión de esta proteína, en biopsias de pacientes con cáncer gástrico, se relaciona con una baja supervivencia. Se desconocen los factores de transcripción que regulan la expresión de CLDN6, así como la secuencia específica del promotor en la cual se unen los factores de transcripción, por lo cual es necesario el abordaje a este nivel para determinar qué mecanismos moleculares regulan CLDN6.

Justificación

De acuerdo con GLOBOCAN 2020, en México el cáncer gástrico ocupa el 4to lugar en incidencia y mortalidad en hombres y el 7mo lugar en mujeres. *H. pylori* incrementa el riesgo a desarrollar cáncer gástrico ya que promueve cambios celulares a través de sus citotoxinas o su LPS modificando así la conformación de las UE e induciendo la proliferación, la migración y la metástasis de las células tumorales. Las vías de señalización que *H. pylori* activa para inducir la expresión de CLDN6 están siendo estudiadas, sin embargo, no existen a la fecha reportes sobre la regulación transcripcional de esta proteína. Dado que la expresión de CLDN6 ocurre en una etapa muy temprana de la transformación celular, es de suma importancia confirmar si YY1 y/o CREB son los factores de transcripción que inducen la expresión de CLDN6, ya que esto nos permitiría establecer a YY1 y/o CREB como posibles marcadores de diagnóstico y también como posibles blancos terapéuticos.

Hipótesis

Los factores de transcripción YY1 y/o CREB inducen la transcripción de CLDN6, mediada por LPS de *H. pylori* en células de adenocarcinoma gástrico humano, en una región específica *río arriba* del sitio de inicio de la transcripción.

Objetivo

- Determinar si YY1 y/o CREB regulan la expresión de CLDN6 e identificar las secuencias del promotor en las cuales se unen utilizando como modelo de estudio células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) estimuladas con LPS de *H. pylori*.

Materiales y métodos

Cultivos de células AGS.

La línea celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) fue obtenida del *American Type Culture Collection* (Manassas, VA) (ATCC), esta línea celular fue aislada en 1979 de una paciente de 54 años caucásica con adenocarcinoma gástrico. La línea celular AGS es adherente y crece en monocapa, se utilizó el medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de L-Glutamina, 1% de antibiótico-antimicótico Gibco™ y 0.1 % de piruvato de sodio. Las células fueron crecidas en una incubadora con una temperatura constante de 37 °C y una saturación de CO₂ del 5%.

Búsqueda de los probables sitios de unión de factores de transcripción en la región promotora de *CLDN6*.

Con el fin de conocer los probables sitios de unión de YY1 y CREB dentro del promotor de claudina 6, se utilizó la herramienta online TFBIND (<https://tfbind.hgc.jp/>), la cual nos arrojó todos los probables sitios de unión para estos dos factores de transcripción en el promotor de claudina 6. Al inicio de la búsqueda, el número de posibles sitios de unión fue muy elevado, por lo que se modificó el valor de similitud mínimo de 0.5 a 0.8 para el caso de YY1 y 0.9 para el caso de CREB.

Clonación de la región promotora de *CLDN6* y subclonación de 2 fragmentos de 1421 y 901 pb respectivamente.

Para la obtención de la región promotora de *CLDN6*, se crecieron bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α en medio LB suplementado con Kanamicina a una concentración final de 50 µg/mL. Estas bacterias contienen al vector pMetLuc2 el cual a su vez portan a los 2000 pb del promotor de *CLDN6* humano. El cultivo creció toda la noche y posteriormente se extrajo el DNA mediante el kit *The Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*. La concentración y pureza del DNA se determinó en un Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000. Posteriormente se corroboró la presencia de la región de 2000 pb en el vector mediante una prueba con las enzimas de restricción EcoR1 y BamH1 de la compañía *New England Biolabs*.

La generación de los fragmentos de 1421 y 901 pb, desde ahora denominados SR1 y SR2 respectivamente, se realizó a partir de la región promotora completa contenida en el vector pMetLuc2 anteriormente descrito. Para generar las SR1 y SR2 río arriba del sitio de inicio de la transcripción, se diseñaron dos *primers forward*, en los cuales se agregó un sitio de corte

para EcoR1, y un *primer reverse*, (**Figura 4**) en el cual se agregó un sitio de corte para BamH1. Esto con la finalidad de generar extremos cohesivos en las regiones terminales de los *primers* y hacer más sencilla y específica la ligación de los segmentos con el vector pMetLuc2.

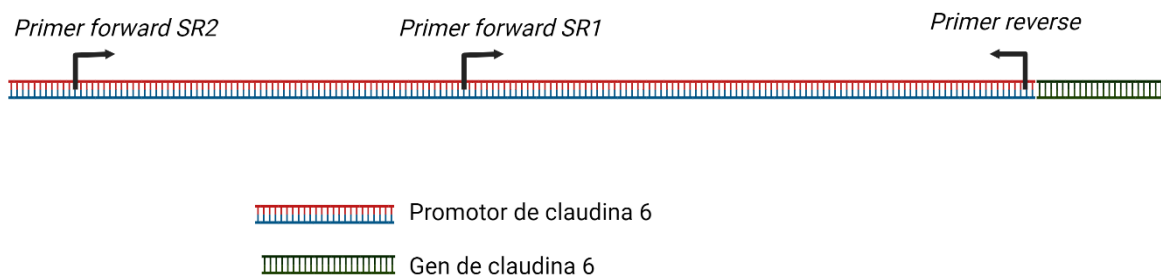


Figura 4: Esquema donde se enfatiza los sitios de unión de los primers forward y reverse dentro de la región 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del promotor de *CLDN6*

Primer forward para SR1

5' GCGCGAATTCGCCACTACAGCTTTGTTAAGGG 3'

Primer forward para SR2

5' GCGCGAATTCGGGCACCTGTAGTAGTCCC 3'

Primer Reverse para SR1 y SR2

5' GCGCGATCCAATTCCTAGGCCGAGTGTCG 3'

Para amplificar las regiones SR1 y SR2, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizándose el protocolo de la polimerasa *Hot Start Taq DNA Polymerase* de la compañía *New England Biolabs*. Utilizando el *primer forward* para SR1, se obtuvo un fragmento de 1421 pb, mientras que con el *primer forward* SR2 se obtuvo un fragmento de 901 pb. Para los ensayos de estandarización para determinar las temperaturas óptimas de alineamiento (T_m) para cada *primer*, se utilizó un termociclador (marca ESCO®), en el cual se colocó un programa con gradiente de temperatura como se muestra en la **Tabla 6**.

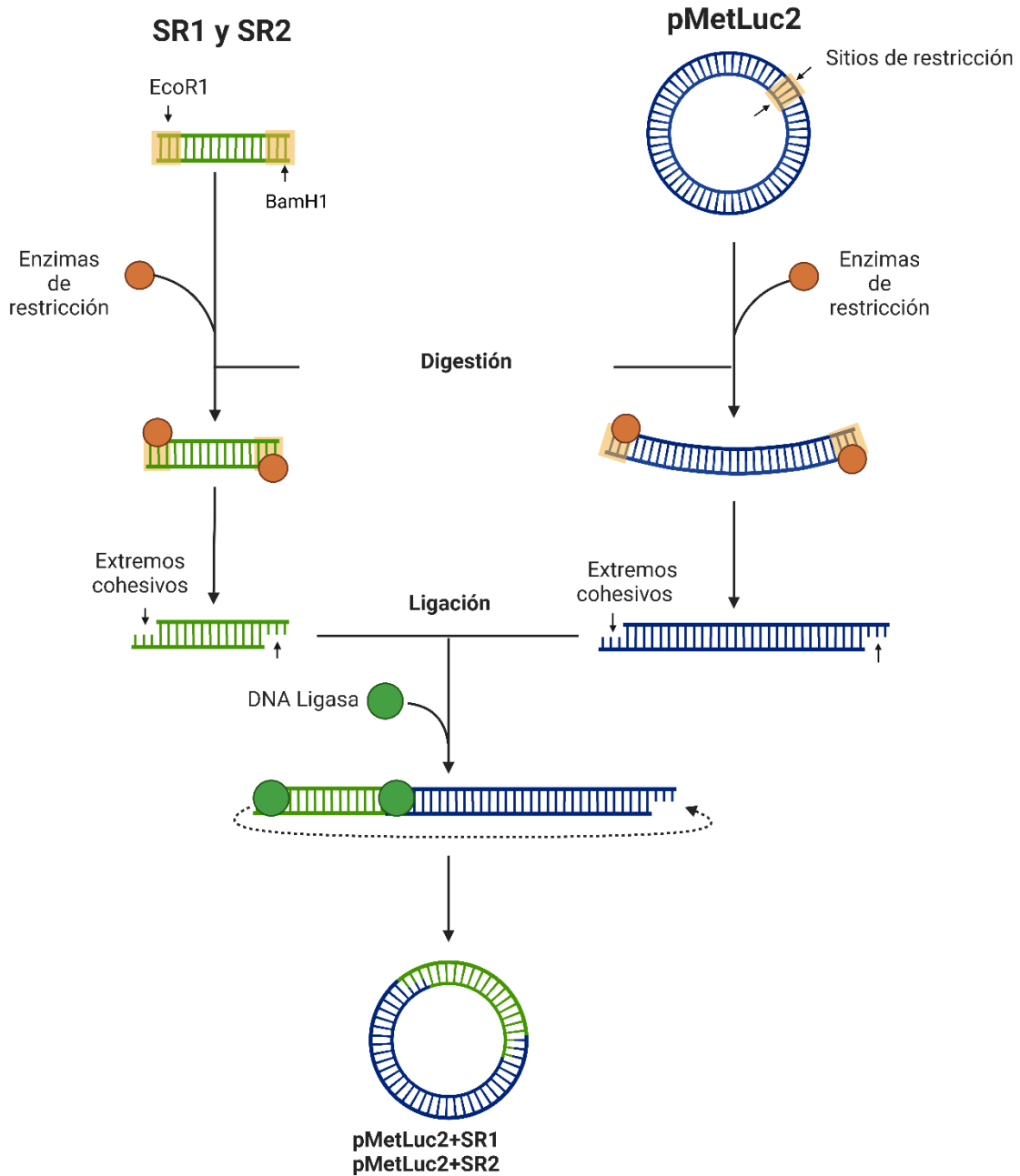


Figura 5: Esquema de clonación de las SR1 y SR2. En la primera etapa, las regiones a clonar se obtienen mediante PCR, posteriormente se generaron los extremos cohesivos con una doble digestión para finalizar con la reacción de ligación utilizando la DNA ligasa T

Tabla 6: Determinación de las Tms óptimas para amplificar mediante PCR A) SR1 y B) SR2

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
A	95 °C	3 minutos	1
	95 °C	30 segundos	30
	64.8 °C, 65.2 °C, 66.9 °C, 67.6 °C, 68.9 °C	30 segundos	30
	95 °C	3 minutos	30
	95 °C	3 minutos	1

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
B	95 °C	3 minutos	1
	95 °C	30 segundos	30
	66.1 °C, 66.9 °C, 68.2 °C, 68.9 °C, 70.3 °C	30 segundos	30
	95 °C	3 minutos	30
	95 °C	3 minutos	1

Se determinó que la Tm óptima para las SR1 y SR2 fue de 66.9 y 68.2°C respectivamente y con esto se realizaron las reacciones de amplificación descritas en las **Tablas 7 y 8** para cada *primer*.

Tabla 7: Protocolo de la reacción de amplificación mediante PCR para la SR1

Reactivo	Volumen
Buffer	2.5 µL
DNA templado	1 µL (5 ng)
Polimerasa	0.125 µL
dNTPs	0.5 µL (0.2 mM)
Primer Forward (SR1)	0.5 µL (0.2mM)
Primer Reverse	0.5 µL (0.2 mM)
H₂O	19.875 µL
Total	25 µL

Tabla 8: Protocolo de la reacción de amplificación mediante PCR para la SR2

Reactivo	Volumen
Buffer	2.5 μ L
DNA templado	1 μ L (5 ng)
Polimerasa	0.125 μ L
dNTPs	0.5 μ L (0.2 mM)
Primer Forward (SR2)	0.5 μ L (0.2mM)
Primer Reverse	0.5 μ L (0.2 mM)
H₂O	19.875 μ L
Total	25 μ L

Incorporación de las SR1 y SR2 en el pMetLuc2

Para insertar las SR1 y SR2 amplificadas dentro del vector de expresión de Luciferasa pMetLuc2, fue necesario digerir el vector con las enzimas EcoR1 y BamH1 (Thermofisher) siguiendo el protocolo que se muestra en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Reacción de restricción del plásmido pMetLuc2 con las enzimas EcoR1 y BamH1.

Reactivo	Volumen
Buffer <i>FastDigest</i> 10x	5 μ L
DNA (pMetLuc2)	28.5 μ L (5 μ g)
Enzima (BamH1+EcoR1)	1 μ L + 1 μ L
H₂O	11.5 μ L
Total	50 μ L

Con la finalidad de favorecer la ligación de SR1 y SR2 en el sentido correcto, se realizó la digestión de los productos de PCR siguiendo el protocolo que se muestra en las **Tablas 10 y 11**.

Tabla 10: Reacción de restricción de la SR1 con las enzimas EcoR1 y BamH1.

Reactivo	Volumen
Buffer <i>FastDigest</i> 10x	5 μ L
DNA (SR1)	14.3 μ L (1 μ g)
Enzima (BamH1+EcoR1)	1 μ L + 1 μ L
H₂O	28.7 μ L
Total	50 μ L

Tabla 11: Reacción de restricción de la SR2 con las enzimas EcoR1 y BamH1.

Reactivo	Volumen
Buffer <i>FastDigest</i> 10x	5 μ L
DNA (SR2)	20.8 μ L (1 μ g)
Enzima (BamH1+EcoR1)	1 μ L + 1 μ L
H ₂ O	22.2 μ L
Total	50 μ L

Para realizar la ligación de las SR1 y SR2 fue necesario desfosforilar los extremos del vector pMetLuc2 lineal para evitar la posible recircularización del mismo. Esto se realizó utilizando la fosfatasa alcalina CIP (New England Biolabs) siguiendo el protocolo que se muestra en la **Tabla 12**.

Tabla 12: Reacción para la desfosforilación del pMetLuc2.

Reactivo	Volumen
Buffer	4 μ L
DNA (pMetLuc2)	15.4 μ L (5 μ g)
CIP	1 μ L
H ₂ O	19.6 μ L
Total	40 μ L

Una vez desfosforilado el vector, y para una mayor eficiencia en la ligación, se realizó la purificación del DNA lineal del vector pMetLuc2 mediante la precipitación del DNA con etanol y glicógeno. Posteriormente se realizó la ligación, para lo cual se utilizó la ligasa T4 (New England Biolabs) y las reacciones mostradas en las **Tablas 13 y 14**. Los productos de la ligación se denominaron pMetLuc2-SR1 y pMetLuc2-SR2.

Tabla 13: Reacción con la ligasa T4 para la SR1

Reactivo	Volumen
Buffer	2 μ L
pMetLuc2 lineal	7.6 μ L (100 ng)
SR1	7.7 μ L (93.58 ng)
Ligasa T4	1 μ L
H ₂ O	1.8 μ L
Total	20 μ L

Tabla 14: Reacción con la ligasa T4 para la SR2.

Reactivo	Volumen
Buffer	2 μ L

pMetLuc2 lineal	7.6 μ L (100 ng)
SR2	4.6 μ L (62.58 ng)
Ligasa T4	1 μ L
H₂O	4.8 μ L
Total	20 μ L

Transformación de bacterias *E. coli* DH5 α con el vector pMetLuc2 + SR1 o SR2

Se descongelaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α en un baño de agua-hielo y posteriormente se agregaron 5 μ L del resultado de la ligación (pMetLuc2-SR1 o pMetLuc2-SR2) por cada 100 μ L de bacterias dentro de un tubo eppendorf. Se incubaron por 35 minutos en un baño de agua-hielo y se sometieron a un choque térmico de 42 °C por 90 segundos. Se incubaron por 4 minutos en un baño de agua-hielo para después agregar 900 μ L de medio LB a 37 °C durante una hora. Las bacterias se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos, se retiraron 700 μ L de medio y se resuspendió el restante. Se plaqueo en cajas Petri con medio LB-agar+ kanamicina (50 μ g/mL).

Con el fin de corroborar si las colonias obtenidas contenían el vector pMetLuc2-SR1 o pMetLuc2-SR2, se realizó una PCR de colonia utilizando como templado el DNA obtenido de las bacterias. Para esto se resuspendieron las colonias en 10 μ L de agua y se calentaron a 95°C por 10 minutos y posteriormente se realizó la reacción de PCR. El protocolo se muestra en la **Tabla 15**.

Tabla 15: Protocolo para la realización de la PCR de colonia

Reactivo	Volumen
Buffer	2.5 μ L
DNA templado	5 μ L
Polimerasa	0.125 μ L
dNTPs	0.5 μ L (0.2 mM)
Primer Forward (SR1 o SR2)	0.5 μ L (0.2mM)
Primer Reverse	0.5 μ L (0.2 mM)
H₂O	15.875 μ L
Total	25 μ L

De las colonias que fueron positivas para pMetLuc2-SR1 o pMetLuc2-SR2 se corroboró que contuvieran a los fragmentos SR1 o SR2 en el sentido correcto a través del diagnóstico con enzimas de restricción. En primer lugar, se realizó una prueba por diagnóstico de restricción para ambos SR utilizando las enzimas EcoR1 y BamH1 como se muestra en la **Tabla 16**.

Tabla 16: Reacción de restricción con las enzimas EcoR1 y BamH1.

Reactivo	Volumen
Buffer <i>FastDigest</i> 10x	2 μ L
DNA	0.5 μ g
Enzima (BamH1+EcoR1)	1 μ L + 1 μ L
H ₂ O	Ajustar volumen
Total	20 μ L

Posteriormente, se realizó la prueba por diagnóstico de restricción para la SR1 utilizando la enzima Eco53KI y para la SR2 utilizando la enzima AflII (New England BioLabs), **Tabla 17**. Las colonias negativas fueron descartadas.

Tabla 17: Restricción de las secuencias amplificadas SR1 Y SR2 con las enzimas Eco53KI y AflII.

Reactivo	Volumen
Buffer smartcut 10x	2.5 μ L
DNA	0.5 μ g
Eco53KI	1 μ L
H ₂ O	Ajustar volumen
Total	25 μ L

Tratamiento de células AGS con el LPS de *H. pylori*

Con el fin de evaluar si la expresión a nivel de proteína de CLDN6 correlaciona con la expresión de los factores de transcripción CREB y YY1, se cultivaron 3×10^5 células AGS en cajas Petri p-100 con medio DMEM pH 7.4 suplementado con 23 mM de NaHCO₃, 2 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-Glutamina, 100 μ g/mL de Penicilina/Estreptomicina y SFB al 10% (GIBCO). Una vez que las células alcanzaron el 90 % de confluencia, se trataron con 10 ng/mL de LPS de *H. pylori* en medio suplementado al 10% de SFB durante 0h, 4h, 8h, 12h, 24h y 48h (Chavarría et al, 2018 [20]). Después de cada tratamiento las células se lavaron 3 veces con PBS y se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento.

Inmunoréplicas tipo Western

Para llevar a cabo los ensayos de Western blot, se descongelaron las células AGS tratadas con el LPS de *H. pylori* y se les adicionó 1ml de buffer de Lisis pH 7.5 el cual contiene 20 mM de Tris base (SIGMA), 0.25 M de Dextrosa Anhidra (SIGMA), 10 mM de EGTA (SIGMA), 2 mM de EDTA (SIGMA), 20 μ g/mL de leupeptina, 1mg/mL de inhibidor de Tripsina de SIGMA y la

mezcla de Inhibidores de Fosfatasas I y II a una dilución 1:100 respectivamente (SIGMA). Posteriormente se despegaron las células mecánicamente, se recuperó la suspensión celular en un tubo de polipropileno y se sonicó por 1 minuto a una amplitud de 25%. Se centrifugó a 14 000 rpm en un rotor 70 Ti durante 30 minutos a 4 °C. Del sobrenadante se tomaron 900 µL a los cuales se le agregó la mitad del volumen de buffer de Laemli (SDS (4%), Tris pH 6.8 (0.125M), Glicerol (20%) y Azul de Bromofenol (0.04%)), el resto se utilizó para la cuantificación de proteínas. Posteriormente a las muestras con Laemli se les adicionó 5% de β-mercaptoetanol y se incubaron por 5 minutos a temperatura de ebullición. La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó cargando 30 µg de cada muestra en un gel al 12% y se aplicó un amperaje constante de 0.05 A durante 45 min. Al final de la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de Nitrocelulosa (Whatman) utilizando una cámara de transferencia Bio-Rad a un amperaje constante de 0.12 A por 1 hora. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau para corroborar la eficiencia de la transferencia y se destiñó con agua y TBS (Tris (20 mM), NaCl (136 mM) pH 7.6). Con el fin de bloquear los sitios de unión inespecíficos, la membrana se incubó con una solución de TBS y 5% de leche sin grasa a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente, se incubó con cada uno de los anticuerpos de interés en TTBS (TBS 1% de Tween-20) con las diluciones descritas en la **Tabla 18** durante toda la noche a 4 °C. Las membranas se lavaron durante 10 minutos tres veces con TTBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente (**Tabla 18**).

Tabla 18: Diluciones de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para el Western blot.

Anticuerpo primario	Dilución	Dilución anticuerpo secundario Anti-ratón
Claudina 6 (Mouse, Santa Cruz Biotechnology)	1:200	1:20000
CREB (Mouse, Santa Cruz Biotechnology)	1:500	1:5000
YY1 (Mouse, Santa Cruz Biotechnology)	1:400	1:10000

Las señales generadas por los anticuerpos se revelaron con el kit *SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo scientific) utilizando un escáner digital de la marca LI-COR.

Transfección de las células AGS con el vector pMetLuc2-SR1 o -SR2 y medición de la actividad de Luciferasa

El ensayo de gen reportero se utiliza para poner a prueba la función que tiene una secuencia genética en la regulación de un gen en particular. La secuencia a prueba es clonada normalmente río arriba del sitio de inicio de la transcripción de un gen que codifica para una proteína reportera, normalmente se utilizan proteínas bioluminiscientes, la más común es la luciferasa. En el caso particular de este proyecto se decidió trabajar con el vector pMetLuc2, el cual incluye ya incluye a la proteína luciferasa que proviene de *Metridia longa*, un copépodo marino. La razón por la que se utilizó este vector es que la luciferasa incluye un péptido señal que permite su secreción de las células, el cual facilita la recolección de la misma para su lectura mediante un kit de bioluminiscencia.

Se sembraron 1×10^5 células AGS en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con SFB al 10% hasta obtener una confluencia entre el 70% y el 80%. Por otro lado, se prepararon 2 tubos eppendorf etiquetados como A y B. El tubo A contenía 2.5 μg del DNA plasmídico (pMetLuc2+SR1, pMetLuc2+SR2 y pMetLuc2) en 125 μL de medio OptiMEM y el tubo B contenía 10 μL de lipofectamina-2000 (Thermofisher) 125 μL de medio OptiMEM. El contenido de cada tubo se mezcló con agitación suave y ambos tubos se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezclaron suavemente los contenidos de los tubos A y B y la mezcla se se colocó en un tubo etiquetado como C y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Para llevar a cabo la transfección de las células AGS, las cajas que contenían a estas células se lavaron dos veces con PBS y una vez con OptiMEM, después se agregó 1.5 mL de medio OptiMEM a cada pozo y se adicionaron 250 μL de la mezcla contenida en el tubo C. Se incubaron a 37 °C por 6 horas. Al concluir el tiempo se retiró el medio y se colocó DMEM fresco suplementado con 10% SFB durante toda la noche. Al día siguiente se inició el tratamiento con el LPS en las células ya transfectadas a diferentes tiempos (4, 8, 12, 24 y 48 hrs) como lo indica la **Figura 6**.

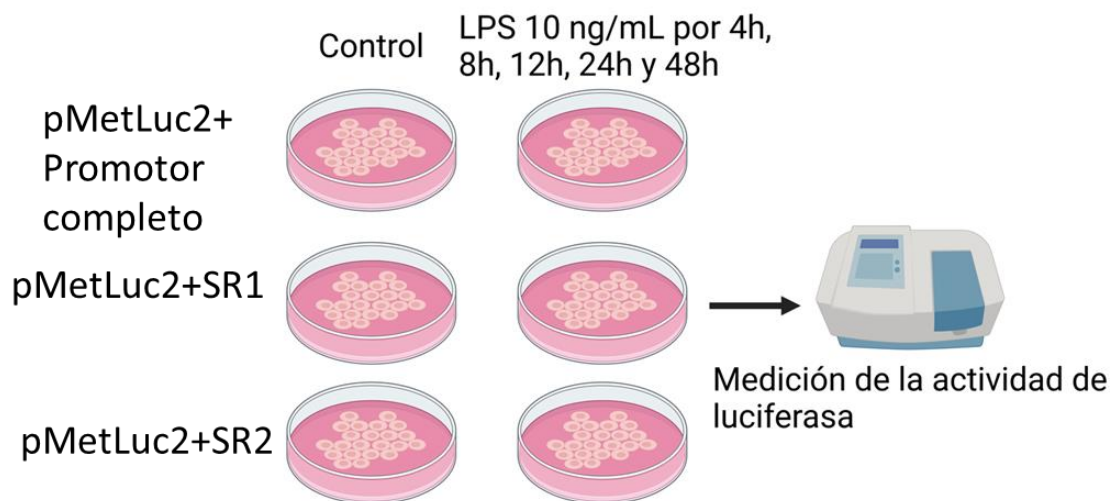


Figura 6: Actividad de la luciferasa en células AGS transfectadas con el vector pMetLuc2- SR1 O -SR2 y tratadas con 10 ng/mL de LPS de *H. pylori* a diferentes tiempos.

Una vez transcurrida la incubación con el LPS, se colectó el sobrenadante (medios condicionados) y se guardó a -70°C . Para medir la actividad transcripcional del promotor completo de CLDN6 y de las SR se midió la actividad de luciferasa de los medios condicionados utilizando el kit *Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase Reporter Assay* (TaKaRa) siguiendo el protocolo del fabricante. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Wallac) a 512 nm.

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Para determinar si los factores de transcripción CREB y YY1 participan en la regulación de la expresión de CLDN6, se realizó el ensayo de ChIP. Para esto se utilizó el kit EZ-ChIP™ (de la marca Merk) y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Se sembraron 2×10^6 de células AGS en cajas P100 las cuales fueron tratadas con 10 ng/mL de LPS de *H. pylori* por 24 horas. Posteriormente las células fueron fijadas con 1% de paraformaldehído en medio DMEM, esto con el fin de generar el *cross-linking* entre las proteínas y la cromatina. Posteriormente las células se levantaron mecánicamente de las cajas y se sonicaron dando 7 pulsos de 15 segundos a una amplitud 35%. Posteriormente se realizó la inmunoprecipitación de la cromatina. Para la etapa de inmunoprecipitación se utilizaron 5 μg de los mismos anticuerpos usados en los ensayos de Western Blot y que son específicos para las proteínas CREB y YY1 (**Tabla 18**). Para la purificación de la cromatina contenida en los inmunoprecipitados. En la **Figura 7B** se esquematizan los pasos seguidos durante el proceso de ChIP.

Se diseñaron 4 pares de *primers*, los cuales son detallados a continuación:

Primers 1: 901 a 1018 pb

Forward: GCCACTACAGCTTTGTTAAGGG
Reverse: CACTACCACGCCCGGCTAAC

Primers 2: 1018 a 1149 pb
Forward: GTTAGCCGGGCGTGGTAGTGGGC
Reverse: CGCCCAGTCTGGAGTGCAATGG

Primers 3: 1149 a 1279 pb
Forward: CCATTGCACTCCAGACTGGGCG
Reverse: TTCCTGACCTCGTGATCTGCC

Primers 4: 1279 a 1421 pb
Forward: GGCAGATCACGAGGTCAGGAAA
Reverse: GGGACTACTACAGGTGCCCG

La **Figura 7A** se esquematiza la posición de dichos primers en el promotor de *CLDN6*

Para amplificar la cromatina purificada después de la inmunoprecipitación se utilizó la *Ruby Hot Start Master (2x)* (Jena Bioscience) según el protocolo recomendado por el fabricante.

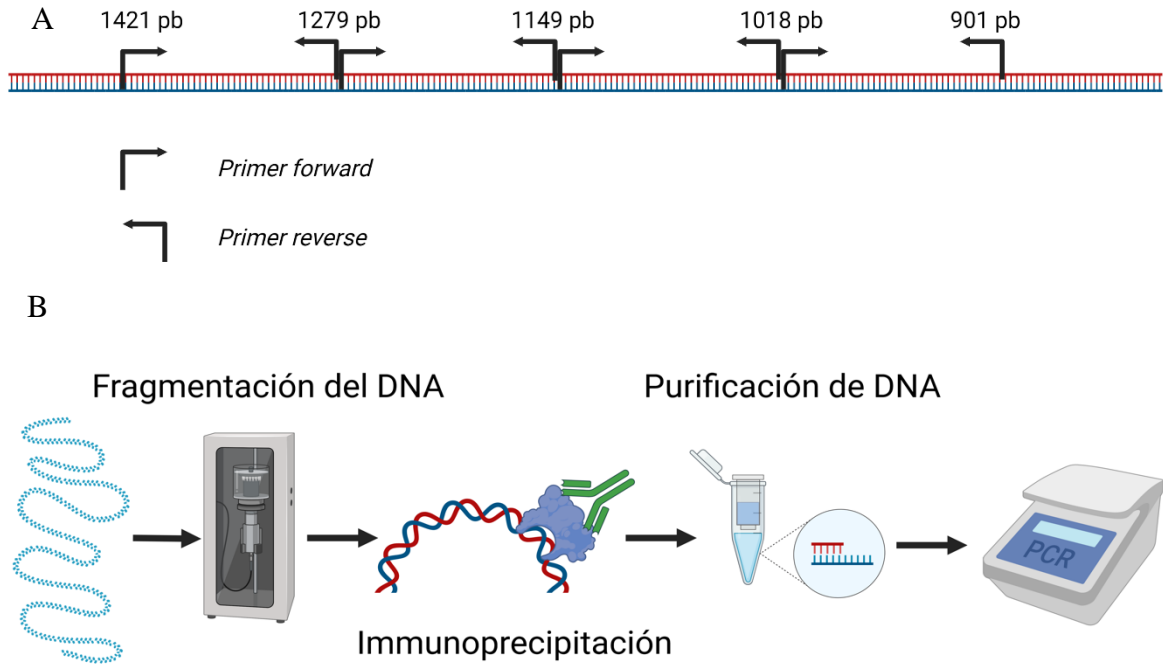


Figura 7:A) Esquema posicional de los primers utilizados en el ensayo de ChIP B) Ensayo de ChIP. Esquema del protocolo de ChIP en el que se lleva a cabo la fragmentación del material genético utilizando un sonicador, la inmunoprecipitación de la cromatina, la purificación del DNA y finalmente un qPCR del material purificado.

Resultados

Análisis bioinformático del promotor de claudina 6

Para inferir los posibles sitios de unión a factores de transcripción en el gen de *CLDN6* se realizó un análisis de la secuencia de 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *CLDN6* utilizando el software online TFBIND. Nuestro análisis encontró que existen 10 sitios putativos de unión para YY1 con un valor de similitud mayor a 0.8 y uno de ellos con un valor de 0.9, el cual es el punto más cercano al sitio de inicio de la transcripción; y 17 sitios putativos de unión para CREB con un valor de similitud entre 0.8 y 0.9 de similitud. La **Figura 8** muestra los sitios de unión para ambos factores de transcripción.

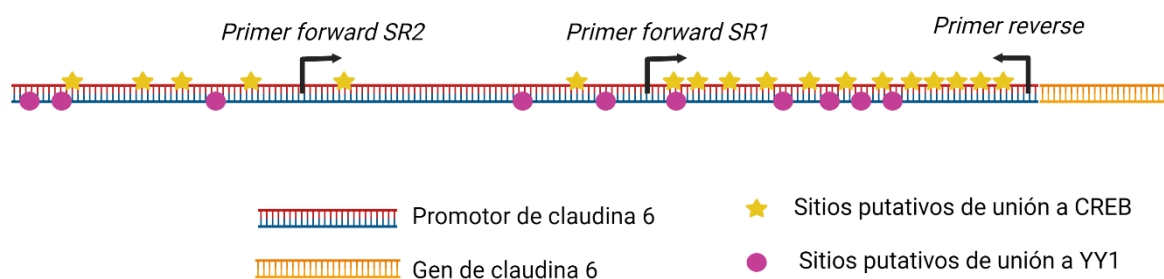


Figura 8: Esquema en donde se señalan las posiciones de los sitios putativos de unión para YY1 y CREB dentro del promotor de CLDN6.

La exposición a LPS de *H. pylori* induce un aumento en la expresión de claudina 6, CREB y YY1

Para corroborar que el LPS de *H. pylori* incrementa la expresión de claudina 6 a nivel de proteína, como previamente los demostró Chavarría et al en 2018 [20,] se realizaron ensayos de inmunoréplica tipo Western a partir de los lisados de las células AGS tratadas con 10 ng/mL del LPS a diferentes tiempos. Los resultados mostraron que el LPS efectivamente incrementó de manera significativa la expresión de claudina 6 con una mayor expresión a las 24 y 48 hrs de tratamiento (**Figura 9A**), además de incrementar la expresión de los factores de transcripción CREB y YY1 de forma significativa en los tiempos de exposición posteriores a 8 horas.

En la **Figura 9B** se muestra una representación gráfica de los cambios observados en el ensayo de western blot a partir de los datos obtenidos del análisis de densitometría. Con esos datos se realizó un análisis de correlación de Pearson entre la expresión de claudina 6 contra YY1 y CREB, el cual indicó que la expresión de claudina 6 y CREB tienen una r de 0.8312 con un valor de p menor a 0.05. YY1, por otro lado, no presentó correlación significativa (**Figura 10**).

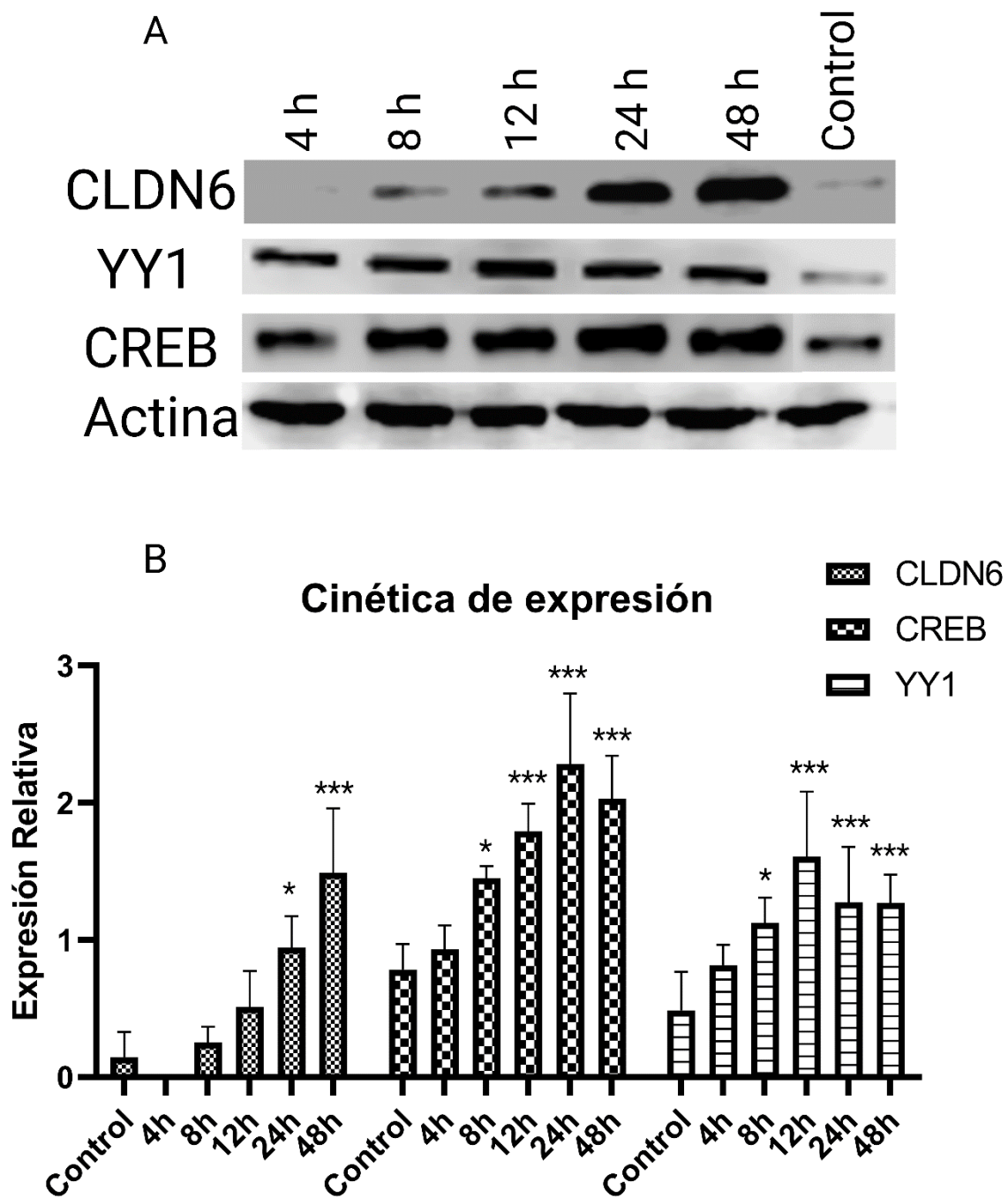


Figura 9: LPS incrementa la expresión de CLDN6, CREB y YY1 en células AGS. A) Western Blot representativo. n=3. B) Representación cuantitativa de la expresión de las proteínas claudina 6, CREB y YY1 con el tratamiento de 10ng/mL de LPS de *H. pylori*. *($p < 0.05$ comparando contra el control), ***($p < 0.001$ comparando contra el control).

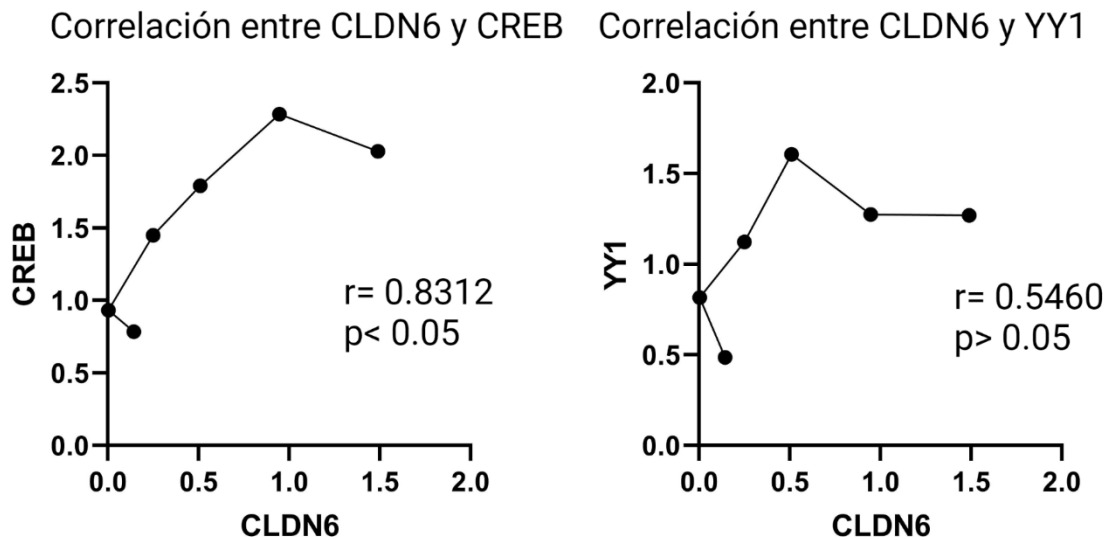


Figura 10: Representación de la correlación de Pearson

Construcción del vector SR1 y SR2

Con el fin de determinar la región responsable de aumentar la expresión de CLDN6 cuando las células AGS son expuestas al LPS de *H. pylori* se realizó la clonación de fracciones del promotor de *CLDN6* en el vector pMetLuc2, estas secuencias recibieron los nombres de SR1 y SR2, para posteriormente realizar un ensayo de gen reportero. Antes de esto tuvimos que validar la correcta construcción de los vectores pMetLuc2+SR1 y pMetLuc2+SR2.

Para determinar si las colonias de bacterias DH5 α transformadas contenían a los vectores pMetLuc+SR1 o pMetLuc+SR2, se realizaron ensayos de PCR. Como se observa en la **Figura 11B** las cinco colonias analizadas contenían al vector pMetLuc2+SR1, mientras que solo 4 colonias contenían al vector pMetLuc2+SR2. La colonia 3 que no contenía a SR2 fue descartada.

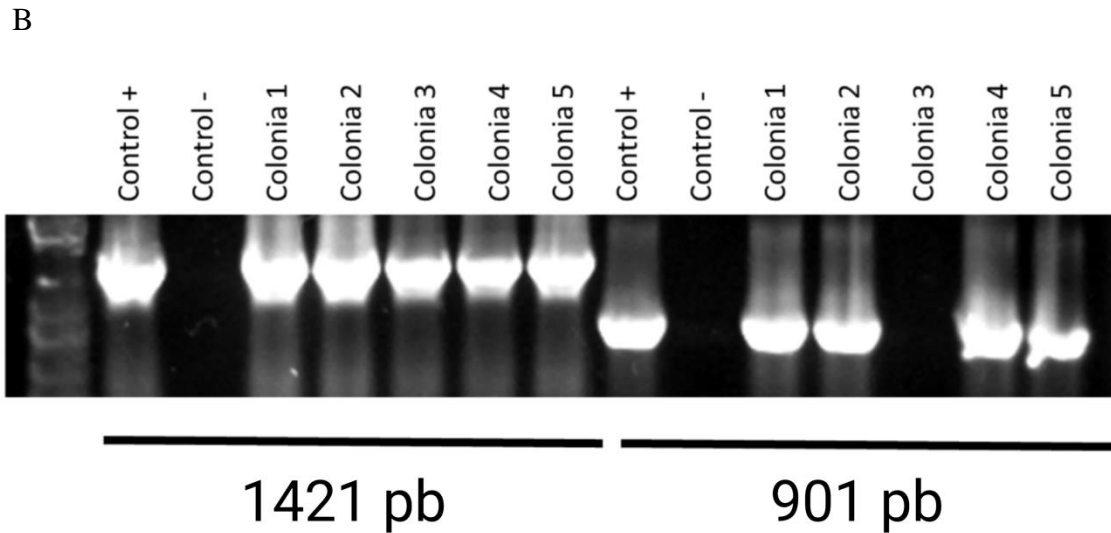
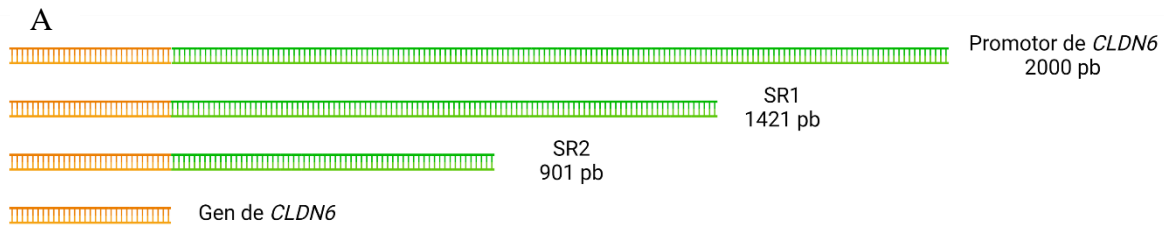


Figura 11: A) Esquema del promotor con de CDLN6: Esquema donde se puede observar las regiones SR1 y SR2 que fueron clonadas en el vector pMetLuc2.**B) Gel de agarosa donde se muestra el PCR realizada en colonias de las bacterias transformadas:** Se muestra la banda de 1421 pb que representa a la SR1 y la de 901 pb que representa a la SR2.

Posteriormente para conocer si los fragmentos SR1 y SR2 se encontraban orientados en la dirección correcta dichas colonias fueron crecidas en medio LB y se realizó la extracción de DNA plasmídico con el cual se realizaron dos diagnósticos por restricción. Como se muestra en la **figura 12** todas las colonias del SR1 fueron positivas, en el caso de SR2 de las cuatro colonias restantes, solo las colonias 1, 2 y 5 resultaron positivas. Las colonias negativas fueron descartadas.

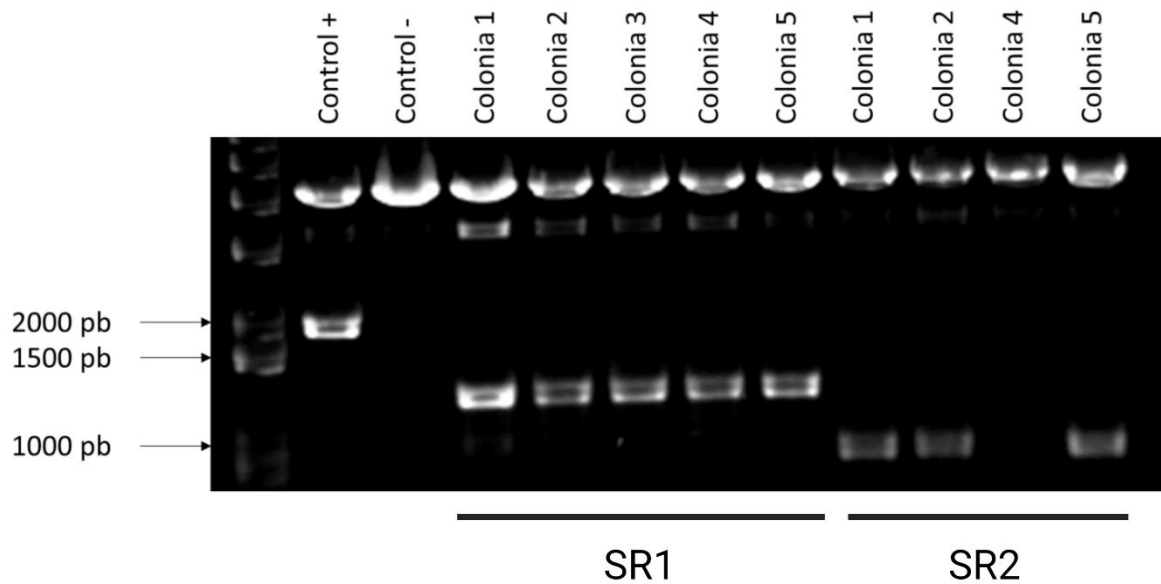


Figura 12: Análisis de la orientación correcta de las SR1 y SR2 con las enzimas de restricción EcoR1 + BamH1. Todas las colonias analizadas para la construcción pMetLuc2-SR1 fueron positivas y solo 4 colonias fueron positivas para la construcción pMetLuc2-SR2.

SR1 es la región que regula la expresión de CLDN6 cuando las células AGS son expuestas a LPS de *H. pylori*

Con el fin de conocer la región que aumenta la expresión de CLDN6 en células AGS expuestas a LPS de *H. pylori* se midió la actividad de luciferasa en los sobrenadantes de las células AGS que fueron transfectadas con dichos vectores. Como se puede observar en la **Figura 13**, ambas secuencias mostraron actividad del promotor dependiente del tiempo y la actividad transcripcional del vector pMetLuc+SR1 en las células AGS tratadas con LPS fue mayor en comparación con la SR1 no tratadas. En contraste, las células AGS que contenían al vector pMetLuc-SR2 tratadas con LPS no mostraron ninguna diferencia con respecto a su control.

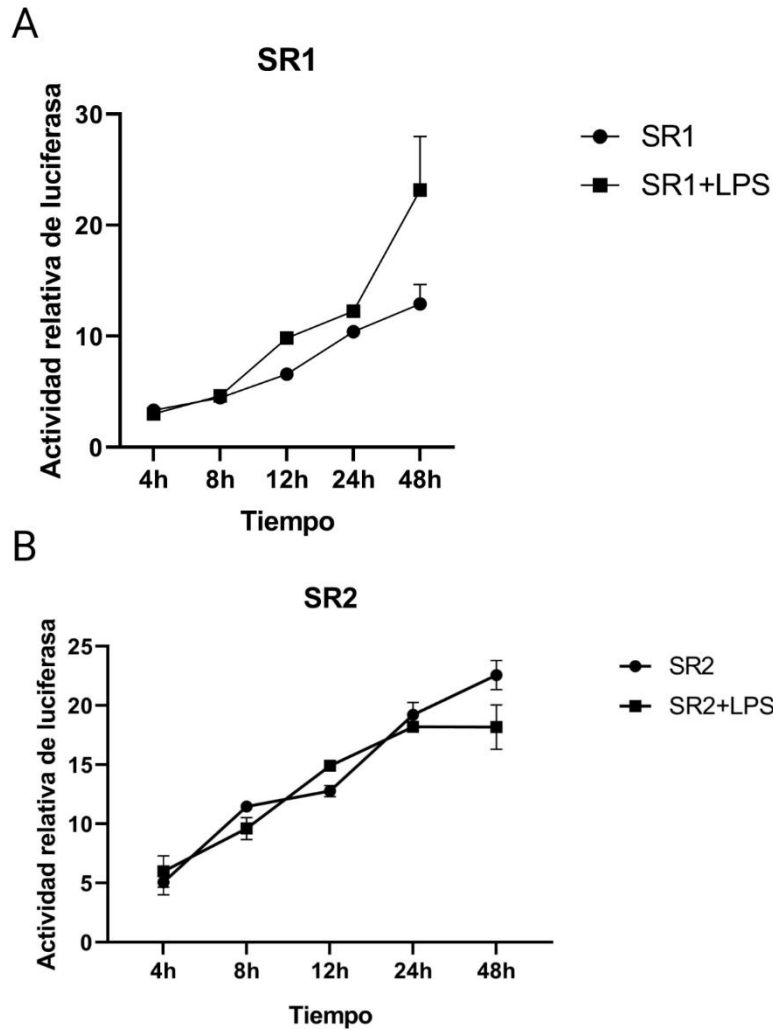


Figura 13: Actividad transcripcional mediada por fragmentos del promotor de *CLDN6*. A) Medición la actividad de la luciferasa en células AGS transfectadas con pMetLuc2+SR1. B) Medición la actividad de la luciferasa en células AGS transfectadas con pMetLuc2+SR2. n=3

Para determinar si el LPS promovió cambios significativos en la actividad de la luciferasa de las 3 regiones del promotor de *CLDN6* evaluadas, los datos se normalizaron con los valores sin tratamiento y se realizaron pruebas de *t* de Student. Dicho análisis mostró que cuando las células fueron expuestas al LPS de *H. pylori* durante 8 horas, las tres regiones del promotor que fueron evaluadas mostraron una actividad transcripcional similar, sin embargo, se observaron cambios significativos a partir de las 12 h de tratamiento. Cuando las células fueron expuestas durante 12 horas se observó un incremento significativo en la actividad transcripcional de luciferasa en las células que contenían al pMetLuc2+SR1 comparado con las células transfectadas con el pMetLuc2+SR2

Este incremento se mantuvo a las 24 y 48 h de tratamiento. La actividad transcripcional de las células que contenían a pMetLuc+SR2 no mostraron cambios significativos a lo largo de los tratamientos **Figura 14**. Estos resultados sugieren que muy probablemente la región que está involucrada en la regulación transcripcional se encuentra entre las 901 y 1421 pb.

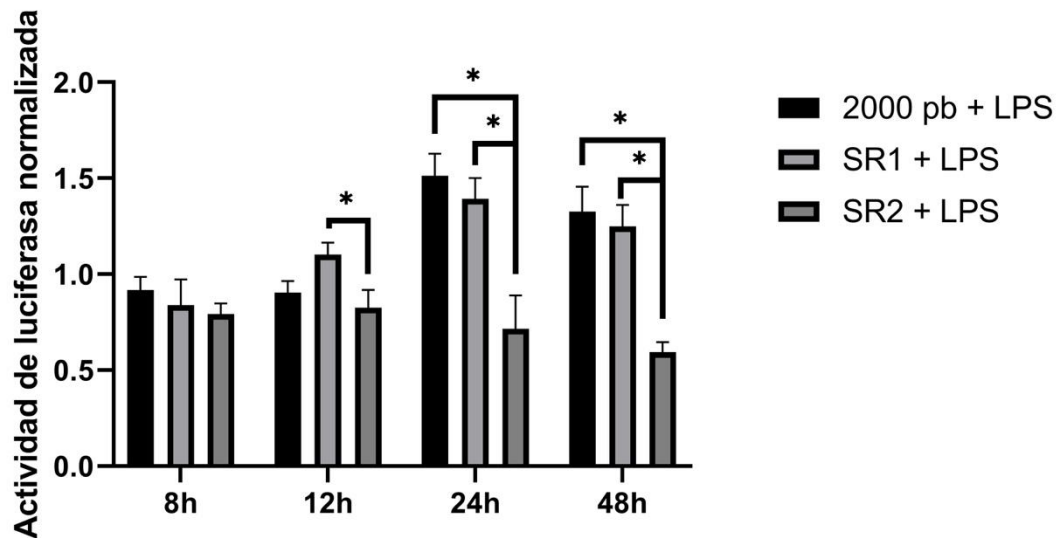


Figura 14: Actividad de luciferasa normalizada a diferentes tiempos. Medición de la actividad de la luciferasa de células AGS transfectadas con el pMetLuc2+Promotorde*CDLN6*, pMetLuc2+SR1 y pMetLuc2+SR2 y tratadas con LPS de *H. pylori*. * $p < 0.05$. n=3.

CREB y YY1 se localizan en la región promotora de CLDN6 en células AGS tratadas con LPS

Dado que nuestros resultados previos demuestran que la región que incrementa la expresión de CLDN6 en las células AGS tratadas con LPS de *H. pylori* se encuentra entre 901 y 1421 pb quisimos determinar si los factores de transcripción YY1 y CREB se unen a esta región, por lo que se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), utilizando células AGS tratadas con LPS durante 24 horas.

Como se observa previamente en la **Figura 8**, CREB y YY1 se unen a las secuencias predichas en las regiones que van de 901 a 1018 pb, de 1018 a 1149 pb y de 1279 a 1421 pb. Es importante mencionar que, además de las regiones predichas para la unión de estos factores de transcripción, se encontró que CREB se une débilmente a la región que va de 1018 a 1149 pb y YY1 se une fuertemente a la región de 1279 a 1421 pb. Ambos sitios de unión no han sido reportados previamente (**Figura 15**).

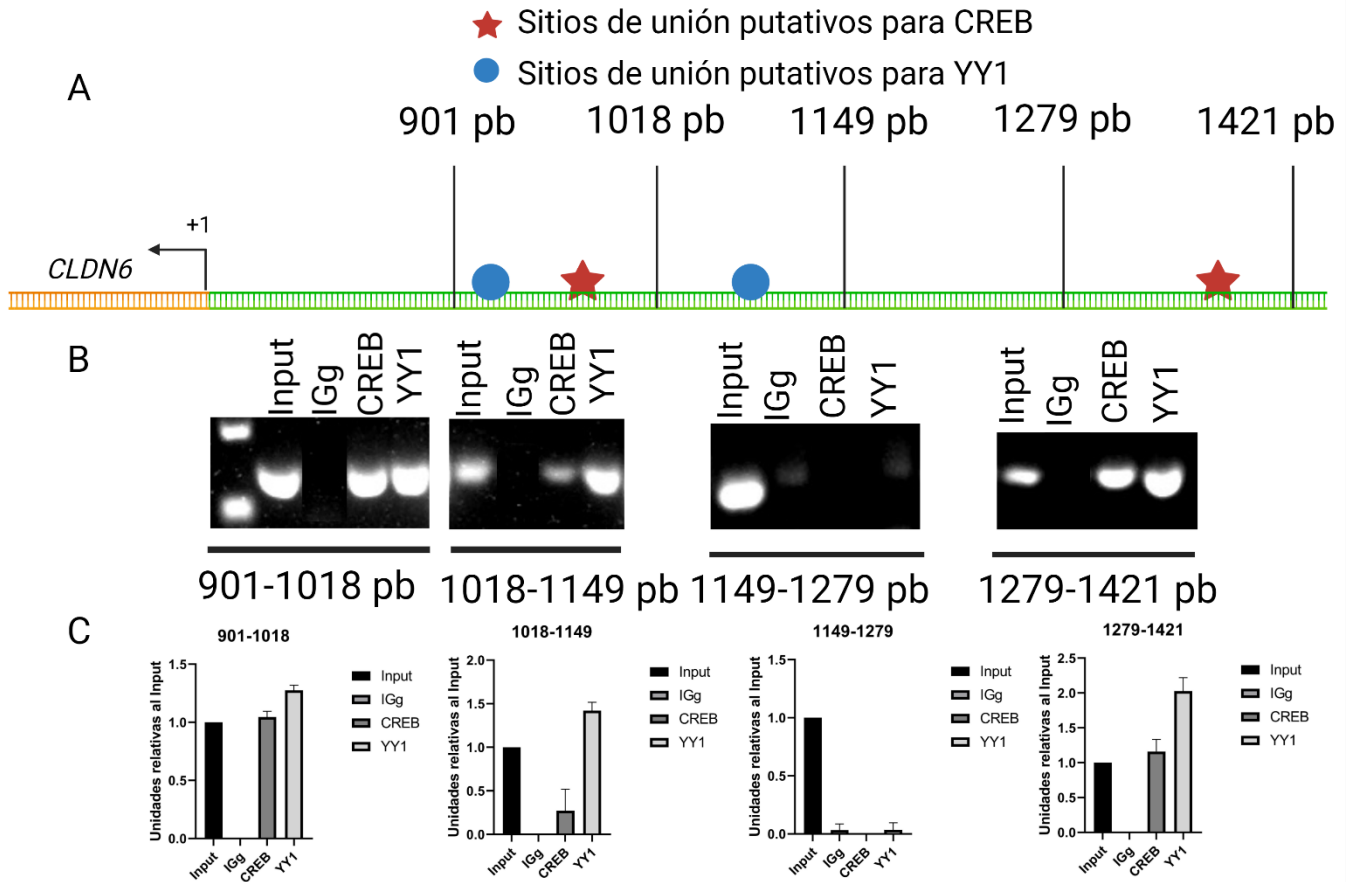


Figura 15: CREB y YY1 se unen al promotor de *CDLN6* en la región 901 a 1421 pb . A) Esquema donde se detalla los sitios de unión putativos para los factores de transcripción predichos por el análisis bioinformático. **B)** ChIP representativo, las células fueron tratadas con 10 ng/mL de LPS de *H. pylori* por 24 h. n=3. **C)** Representación cuantitativa del ensayo de ChIP.

Discusión

Las claudinas forman parte fundamental de las uniones estrechas, estas proteínas se encuentran en todos los tejidos y su expresión es específica. De las 27 isoformas reportadas en ratón, CLDN6 se expresa principalmente en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Estas proteínas cambian su expresión en diversos padecimientos entre ellos el cáncer.

En el cáncer gástrico se ha reportado que CLDN6 puede tener una expresión incrementada o disminuida, dependiendo de los modelos de estudio. Nuestro grupo de trabajo tiene evidencia de que la expresión incrementada de CLDN6, inducida por el LPS de *H. pylori*, promueve la migración e invasividad de células AGS a través de la activación de metaloproteasas [17, 20]. De la misma manera, muestras de pacientes con alta expresión de esta claudina tienen pobre pronóstico [44].

Debido a que existen muy pocos estudios acerca de cuáles son los factores de transcripción que regulan a CLDN6, este trabajo se enfocó en determinar si CREB y/o YY1 regulan positivamente la transcripción de esta proteína en células AGS expuestas al LPS de *H. pylori*.

Reportes previos de nuestro grupo sugerían la participación de diferentes factores de transcripción que regulan la expresión de CLDN6, entre ellos destacan AP-1, la cual está implicada en la regulación de las Claudinas 2 y 18 en cáncer de pulmón y gástrico [48], también nuestro grupo encontró evidencia que sugiere a CRE-BP como uno de los posibles factores de transcripción que regulan a *CLDN6*, curiosamente también fue postulado por Lin et al [3], en ese mismo trabajo ellos postulan como uno de los factores más probables a CREB y a al factor de transcripción SP1, el cual se encuentra sobreexpresado en cáncer gástrico y se asocia con un mal pronóstico para el paciente [49]. YY1 también fue postulado como uno de los posibles factores de transcripción para *CLDN6* por nuestro grupo. YY1 y CREB fueron seleccionados debido a su fuerte asociación con la progresión del cáncer gástrico y su relación con procesos de inflamación, como ocurre en una infección con *H. pylori*. Los otros factores de transcripción muestran evidencia suficiente para ser considerados como posibles factores de transcripción, estos podrían estar actuando de manera coordinada o en otras condiciones que no sean la exposición al LPS de *H. pylori*.

Con base en esto, los resultados obtenidos en este trabajo a través del programa TFBIND mostraron que los factores de transcripción CREB y YY1 tienen sitios probables de unión a la región de 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de CLDN6. La localización de estos sitios reveló 10 sitios de unión para YY1 (utilizando un factor de similitud mayor a 0.8) y 17 sitios de unión para CREB (utilizando un factor de similitud mayor a 0.9), lo que fortaleció la idea de que estos factores de transcripción podrían ser relevantes en la regulación de CLDN6.

CREB y YY1 son factores de transcripción cuya expresión está asociada a la progresión del cáncer. En el caso de CREB, por ejemplo, tiene una fuerte asociación con la regulación de genes proinflamatorios, migración e invasividad [28]. Mientras que YY1 se asocia fuertemente con la sobre expresión de genes relacionados con migración e invasividad en el cáncer gástrico [27]. En este trabajo demostramos que la exposición de las células AGS al LPS de *H. pylori*, el cual promueve la expresión de claudina 6, induce la expresión a nivel de proteína de CREB y YY1. De acuerdo con el análisis de Pearson se encontró una correlación entre la expresión de CREB con CLDN6. Aunque no encontramos correlación entre la expresión de CLDN6 y YY1 nosotros decidimos seguir adelante con este factor de transcripción debido a la clara tendencia que tienen la expresión de las dos proteínas, por otro lado, también la correlación entre lo que sugirió que YY1 y/o CREB pueden funcionar como posibles agentes reguladores de la expresión de CLDN6 en el contexto de la inflamación producida por la activación de la vía del TLR2 en presencia del LPS de *H. pylori* [20]. El incremento en la expresión de CLDN6 se debe a la actividad del TLR2 y la activación de diferentes cinasas, entre ellas, la más destacada es ERK1/2 [20]. La activación y expresión de CREB depende de la actividad de varias cinasas, entre ellas ERK1/2 [28], por lo que es razonable pensar que el incremento en la expresión de CREB se debe a la misma vía de señalización que CLDN6. Por otro lado, la activación de MAPK incrementa la expresión de YY1 [26], por lo que muy probablemente al activar estas vías de señalización relacionadas con ERK1/2 estaríamos también incrementando la expresión de YY1.

A la fecha no existen estudios concluyentes acerca de los factores de transcripción que regulan la expresión de claudina 6 y las regiones de DNA a las cuales se unen. Para identificar las regiones del promotor de claudina 6 que participan en su regulación, se utilizó el ensayo de actividad de luciferasa con el vector pMetLuc2, el cual codifica para una luciferasa del copépodo marino *Metridia longa*.

Las células AGS transfectadas con los vectores pMetLuc2+2000pb, pMetLuc2+SR1 o pMetLuc2+SR2 presentaron actividad de luciferasa independientemente del tratamiento con LPS. Esto se explica debido a que la línea celular AGS presenta una ligera expresión basal de claudina 6 (**Figura 9**), como ya previamente se había demostrado [20]. La secuencia promotora contenida en el vector pMetLuc+2000pb contiene 17 sitios de unión para CREB y 10 para YY1, la contenida en pMetLuc2+SR2 posee 5 sitios para YY1 y 11 para CREB y la que se encuentra en pMetLuc2+SR1 contiene 7 sitios de unión para YY1 y 13 para CREB, como se muestra en la **Figura 8**.

Interesantemente, los resultados obtenidos en el ensayo de actividad de la luciferasa sugieren que, de los 10 sitios de unión predichos para YY1 y 17 para CREB, solo dos sitios de unión para CREB y dos sitios de unión para YY1 contenidos entre la secuencia que va de 901 a 1421 son los importantes para la regulación de la transcripción del gen de claudina 6 cuando las células son expuestas al LPS de *H. pylori*. Los otros sitios de unión podrían funcionar en otro contexto celular o cuando las células son expuestas a otros tratamientos.

Los ensayos de ChIP confirmaron dicha hipótesis y revelaron un sitio de unión a YY1 no predicho por el análisis bioinformático. Las secuencias promotoras contienen elementos reguladores que pueden reprimir o inducir la transcripción. Uno de ellos son las secuencias llamadas *enhancers*. Éstas pueden encontrarse a miles de pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción y regular la transcripción a través de la interacción física de los factores de transcripción con dichos elementos reguladores [23]. Dado que el sitio de unión encontrado para YY1 se localiza a una distancia de más de 900 pb del sitio de inicio de la transcripción, podemos pensar que probablemente esta secuencia esté funcionando como un *enhancer* [23]. La unión de YY1 a esta secuencia fortalece la idea de que, como en muchos otros casos, YY1 funja como un mediador para generar un puente con CREB y el sitio de inicio de la transcripción de *CDLN6* [42].

Conclusiones

La progresión del cáncer gástrico está dada por diversos factores, entre ellos, sobresale la presencia de *H. pylori*, del que ya se conocen diferentes mecanismos de transformación celular inducidos por proteínas oncogénicas como VacA y CagA. Cabe resaltar que otros factores de virulencia como el LPS, incrementan la expresión de diferentes proteínas oncogénicas como la claudina 6, por lo que estudiar los mecanismos a través de los cuales induce la oncogénesis gástrica es cada vez más importante. Aún se desconocen los mecanismos moleculares que promueven este incremento. Los resultados de este trabajo demostraron que: 1) la expresión de CLDN6 en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) expuestas al LPS de *H. pylori* depende en gran medida de la secuencia del promotor que va de 901 a 1421 pb, 2) los factores de transcripción YY1 y CREB se unen a la región que va de 901 a 1421 pb y regulan la expresión de CLDN6.

Perspectivas

- Corroborar experimentalmente si YY1 interactúa con CREB o con la secuencia promotora que va de 1271 a 1421 pb tal como nuestros resultados sugieren.
- Estudiar otras claudinas asociada al cáncer gástrico como la claudina 9, la cual también es inducida por el LPS de *H. Pylori*. Sería interesante determinar si el mecanismo que regula la expresión de esta claudina es el mismo al reportado en este trabajo.
- Estudiar las modificaciones epigenéticas que permiten la unión de YY1 y CREB al promotor de claudina 6.
- Estudiar marcas epigenéticas en la región 901 a 1421 pb para determinar si se trata de un *enhancer* o no.

Referencias

1. Bhat, A. A., Uppada, S., Achkar, I. W., Hashem, S., Yadav, S. K., Shanmugakonar, M., ... Uddin, S. (2019). Tight Junction Proteins and Signaling Pathways in Cancer and Inflammation: A Functional Crosstalk. *Frontiers in physiology*, 9, 1942. doi:10.3389/fphys.2018.01942
2. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1778(3):631-45. Epub 2007 Oct 25. Review. PubMed PMID: 18036336.
3. Lin, D., Guo, Y., Li, Y., Ruan, Y., Zhang, M., Jin, X., ... Quan, C. (2017). Bioinformatic analysis reveals potential properties of human Claudin-6 regulation and functions. *Oncology reports*, 38(2), 875–885. doi:10.3892/or.2017.5756
4. Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013 Apr;93(2):525-69. doi: 10.1152/physrev.00019.2012. Review. PubMed PMID: 23589827; PubMed Central PMCID: PMC3768107.
5. Liu, Y., Jin, X., Li, Y., Ruan, Y., Lu, Y., Yang, M., ... Quan, C. (2016). DNA methylation of claudin-6 promotes breast cancer cell migration and invasion by recruiting MeCP2 and deacetylating H3Ac and H4Ac. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 35(1), 120. doi:10.1186/s13046-016-0396-x
6. Yang M, Li Y, Shen X, Ruan Y, Lu Y, Jin X, Song P, Guo Y, Zhang X, Qu H, Shao Y, Quan C. CLDN6 promotes chemoresistance through GSTP1 in human breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017 Nov 7;36(1):157. doi: 10.1186/s13046-017-0627-9. PubMed PMID: 29116019; PubMed Central PMCID: PMC5678781.
7. Waldum, H. L., & Fossmark, R. (2018). Types of Gastric Carcinomas. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 4109. doi:10.3390/ijms19124109
8. Aktipis, C. A., Boddy, A. M., Gatenby, R. A., Brown, J. S., & Maley, C. C. (2013). Life history trade-offs in cancer evolution. *Nature reviews. Cancer*, 13(12), 883–892. doi:10.1038/nrc3606
9. Oue, N., Sentani, K., Sakamoto, N., Uraoka, N., & Yasui, W. (2019). Molecular carcinogenesis of gastric cancer: Lauren classification, mucin phenotype expression, and cancer stem cells. *International Journal of Clinical Oncology*. doi:10.1007/s10147-019-01443-9
10. Rawla, P., & Barsouk, A. (2018). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Przegląd gastroenterologiczny*, 14(1), 26–38. doi:10.5114/pg.2018.80001
11. Gco.iarc.fr. (2020). Global Cancer Observatory. [online] Available at: <http://gco.iarc.fr/> [Accessed 23 Jan. 2020].
12. Nakamura K, Sugano H, Takagi K (1968) Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearances. *Gann* 59:251–258
13. Lauren P (1965) The two histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at histological classification. *Acta Pathol MicrobiolScand* 64:31–49

14. Waldum, H. L., & Fossmark, R. (2018). Types of Gastric Carcinomas. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 4109. doi:10.3390/ijms19124109
15. Gowrikumar, S., Singh, A. B., & Dhawan, P. (2019). Role of Claudin Proteins in Regulating Cancer Stem Cells and Chemoresistance-Potential Implication in Disease Prognosis and Therapy. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 53. doi:10.3390/ijms21010053
16. Kohmoto, T., Masuda, K., Shoda, K., Takahashi, R., Ujiro, S., Tange, S., ... Imoto, I. (2019). Claudin-6 is a single prognostic marker and functions as a tumor-promoting gene in a subgroup of intestinal type gastric cancer. *Gastric Cancer*. doi:10.1007/s10120-019-01014-x
17. Torres-Martínez AC, Gallardo-Vera JF, Lara-Holguin AN, Montañó LF, Rendón-Huerta EP. Claudin-6 enhances cell invasiveness through claudin-1 in AGShuman adenocarcinoma gastric cancer cells. *Exp Cell Res*. 2017 Jan1;350(1):226-235. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.11.025. Epub 2016 Dec 1. PubMed PMID:27914788.
18. Atherton JC. The pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:63-96. Review. PubMed PMID: 18039108.
19. Farhana A, Khan YS. Biochemistry, Lipopolysaccharide. 2020 Feb 5. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554414/> PubMed PMID: 32119301.
20. Chavarría-Velázquez CO, Torres-Martínez AC, Montañó LF, Rendón-Huerta EP. TLR2 activation induced by H. pylori LPS promotes the differential expression of claudin-4, -6, -7 and -9 via either STAT3 and ERK1/2 in AGS cells. *Immunobiology*. 2018 Jan;223(1):38-48. doi: 10.1016/j.imbio.2017.10.016. Epub 2017 Oct 6. PubMed PMID: 29031421.
21. Lenhard, B., Sandelin, A. & Carninci, P. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nature Rev. Genet.* 13, 233–245 (2012).
22. Haberle V, Lenhard B. Promoter architectures and developmental gene regulation. *Semin Cell Dev Biol*. 2016 Sep;57:11-23. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.01.014. Epub 2016 Jan 16. Review. PubMed PMID: 26783721.
23. Spitz F, Furlong EE. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet*. 2012 Sep;13(9):613-26. doi:10.1038/nrg3207. Epub 2012 Aug 7. Review. PubMed PMID: 22868264.
24. D'Auria F, Centurione L, Centurione MA, Angelini A, Di Pietro R. Regulation of Cancer Cell Responsiveness to Ionizing Radiation Treatment by Cyclic AMP Response Element Binding Nuclear Transcription Factor. *Front Oncol*. 2017 May 5;7:76. doi: 10.3389/fonc.2017.00076. eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 28529924; PubMed Central PMCID: PMC5418225.
25. Resende C, Regalo G, Durães C, Pinto MT, Wen X, Figueiredo C, Carneiro F, Machado JC. Interleukin-1B signalling leads to increased survival of gastric carcinoma cells through a CREB-C/EBPβ-associated mechanism. *Gastric Cancer*. 2016 Jan;19(1):74-84. doi: 10.1007/s10120-014-0448-x. Epub 2015 Mar 5. PubMed PMID: 2574022

26. Sarvagalla S, Kolapalli SP, Vallabhapurapu S. The Two Sides of YY1 in Cancer: A Friend and a Foe. *Front Oncol.* 2019 Nov 20;9:1230. doi:10.3389/fonc.2019.01230. eCollection 2019. Review. PubMed PMID: 31824839; PubMed Central PMCID: PMC6879672.
27. Kang W, Tong JH, Chan AW, Zhao J, Dong Y, Wang S. et al. Yin Yang 1 contributes to gastric carcinogenesis and its nuclear expression correlates with shorter survival in patients with early stage gastric adenocarcinoma. *J Transl Med.* 2014;12:80
28. Steven A, Seliger B. Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target. *Oncotarget.* 2016;7(23):35454-35465. doi:10.18632/oncotarget.7721
29. Wang F, Marshall CB, Ikura M. Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: structural and functional versatility in target recognition. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(21):3989-4008. doi:10.1007/s00018-012-1254-4
30. Sakamoto KM, Frank DA. CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy [published correction appears in *Clin Cancer Res.* 2009 May 15;15(10):3643]. *Clin Cancer Res.* 2009;15(8):2583-2587. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1137
31. Sawada N. (2013). Tight junction-related human diseases. *Pathology international*, 63(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/pin.12021>
32. Arabzadeh, A., Troy, T. C., & Turksen, K. (2006). Role of the Cldn6 cytoplasmic tail domain in membrane targeting and epidermal differentiation in vivo. *Molecular and cellular biology*, 26(15), 5876–5887. <https://doi.org/10.1128/MCB.02342-05>
33. Krause, G., Winkler, L., Piehl, C., Blasig, I., Piontek, J., & Müller, S. L. (2009). Structure and function of extracellular claudin domains. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165, 34–43. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04057.x>
34. Morin P. J. (2005). Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer research*, 65(21), 9603–9606. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2782>
35. Danino, Y. M., Even, D., Ideses, D., & Juven-Gershon, T. (2015). The core promoter: At the heart of gene expression. *Biochimica et biophysica acta*, 1849(8), 1116–1131. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.04.003>
36. Garcia-Hernandez, V., Quiros, M., & Nusrat, A. (2017). Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1397(1), 66–79. <https://doi.org/10.1111/nyas.13360>
37. Miwa, N., Furuse, M., Tsukita, S., Niikawa, N., Nakamura, Y., & Furukawa, Y. (2001). Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncology research*, 12(11-12), 469–476. <https://doi.org/10.3727/096504001108747477>
38. Wisner, D. M., Harris, L. R., 3rd, Green, C. L., & Poritz, L. S. (2008). Opposing regulation of the tight junction protein claudin-2 by interferon-gamma and interleukin-4. *The Journal of surgical research*, 144(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.03.059>

39. Al-Sadi, R., Ye, D., Boivin, M., Guo, S., Hashimi, M., Ereifej, L., & Ma, T. Y. (2014). Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PloS one*, 9(3), e85345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085345>
40. Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K. L., Powell, R. M., MacDonald, T. T., & Collins, J. E. (2005). Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 85(9), 1139–1162. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700316>
41. Zheng, L., Chen, Y., Ye, L., Jiao, W., Song, H., Mei, H., Li, D., Yang, F., Li, H., Huang, K., & Tong, Q. (2017). miRNA-584-3p inhibits gastric cancer progression by repressing Yin Yang 1-facilitated MMP-14 expression. *Scientific reports*, 7(1), 8967. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09271-5>
42. Weintraub, A. S., Li, C. H., Zamudio, A. V., Sigova, A. A., Hannett, N. M., Day, D. S., Abraham, B. J., Cohen, M. A., Nabet, B., Buckley, D. L., Guo, Y. E., Hnisz, D., Jaenisch, R., Bradner, J. E., Gray, N. S., & Young, R. A. (2017). YY1 Is a Structural Regulator of Enhancer-Promoter Loops. *Cell*, 171(7), 1573–1588.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.008>
43. Koda, R., Zhao, L., Yaoita, E., Yoshida, Y., Tsukita, S., Tamura, A., Nameta, M., Zhang, Y., Fujinaka, H., Magdeldin, S., Xu, B., Narita, I., & Yamamoto, T. (2011). Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell and tissue research*, 343(3), 637–648. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1117-y>
44. Yu, S., Zhang, Y., Li, Q., Zhang, Z., Zhao, G., & Xu, J. (2019). CLDN6 promotes tumor progression through the YAP1-snail1 axis in gastric cancer. *Cell death & disease*, 10(12), 949. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2168-y>
45. Tan, I. B., Ivanova, T., Lim, K. H., Ong, C. W., Deng, N., Lee, J., Tan, S. H., Wu, J., Lee, M. H., Ooi, C. H., Rha, S. Y., Wong, W. K., Boussioutas, A., Yeoh, K. G., So, J., Yong, W. P., Tsuburaya, A., Grabsch, H., Toh, H. C., Rozen, S., ... Tan, P. (2011). Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology*, 141(2), 476–485.e11. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.042>
46. Lei, Z., Tan, I. B., Das, K., Deng, N., Zouridis, H., Pattison, S., Chua, C., Feng, Z., Guan, Y. K., Ooi, C. H., Ivanova, T., Zhang, S., Lee, M., Wu, J., Ngo, A., Manesh, S., Tan, E., Teh, B. T., So, J. B., Goh, L. K., ... Rozen, S. G. (2013). Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology*, 145(3), 554–565. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.010>
47. Andersson, R., & Sandelin, A. (2020). Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. *Nature reviews. Genetics*, 21(2), 71–87. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0173-8>
48. Yano, K., Imaeda, T., & Niimi, T. (2008). Transcriptional activation of the human claudin-18 gene promoter through two AP-1 motifs in PMA-stimulated MKN45 gastric cancer cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 294(1), G336–G343. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00328.2007>

49. Yao, J. C., Wang, L., Wei, D., Gong, W., Hassan, M., Wu, T. T., Mansfield, P., Ajani, J., & Xie, K. (2004). Association between expression of transcription factor Sp1 and increased vascular endothelial growth factor expression, advanced stage, and poor survival in patients with resected gastric cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(12 Pt 1), 4109–4117. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0628>