



FACULTAD DE MEDICINA

“Caracterización y Regulación de Claudinas -6, -7 y -9 en Células Epiteliales”

Q.F.B. Verónica Elizabeth Zavala Zendejas

Tutor Principal: **Dra. Erika P. Rendón Huerta**

Comité Tutor: **Dra. Marina Macías Silva**
Dr. Luis Felipe Montaña Estrada



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.



INDICE GENERAL

	Página
Introducción.....	1
Uniones Celulares Epiteliales.....	2
Uniones Estrechas.....	4
Proteínas PAR.....	7
Proteínas MUPP1.....	7
AF-6/Afanida.....	8
Funciones de las proteínas transmembranales de las UE.....	8
Ocludina.....	8
Proteínas JAM (Junction Adhesion Molecule)	9
Claudinas.....	9
Regulación de la Distribución Subcelular de las Claudinas.....	11
Claudinas y Cáncer.....	15
Claudinas y señales de crecimiento.....	18
Claudinas y evasión de apoptosis.....	19
Claudinas, invasividad de tejidos y metástasis.....	20
Claudinas como marcadores tumorales, diagnosis y prognosis.....	21
Claudinas y Terapia.....	21
Planteamiento del Problema	23
Hipótesis.....	25
Objetivo General.....	26
Objetivos Específicos.....	26
Material y Métodos.....	27



Anticuerpos, Plásmidos, Enzimas	
Inhibidores y Ésteres de Forbol.....	27
Cultivos celulares.....	28
Construcción de vectores pcln2GFP, pcln6GFP pcln7GFP y pcln9GFP.....	29
Transfección de células.....	30
Medición de Resistencia Eléctrica Transepitelial (TER)	30
Flujo Paracelular de Manitol (PCF)	31
Potencial de Difusión (DP)	31
Tratamiento de Células LLC-PK ₁ con PDBu o hEGF.....	32
Fraccionamiento Celular y Western blot.....	32
Imágenes de Células Vivas por Microscopía Confocal e Inmunofluorescencia.....	33
Detección de mRNA de claudinas-2, -6, -7 y -9 En las células LLC-PK1 Transfectadas.....	34
Ensayo de Regeneración de Herida	35
Ensayo de Incorporación de BrdU.....	35
Ensayo de Migración en Matrigel (BD)	36
Análisis Estadístico	36
Resultados.....	37
Análisis de la expresión de claudinas en la línea celular LLC-PK ₁	37
Análisis de la expresión de claudinas en las líneas celulares transformadas AGS y MCF-7.....	39



Transfección de células LLC-PK ₁ , AGS y MCF-7 con vectores para la sobreexpresión de las claudinas 6, 7 o 9 acopladas a GFP	41
Funcionalidad de las claudinas 2, 6, 7 y 9.....	49
Función de compuerta de claudinas 2, 6, 7 y 9 en células LLC-PK ₁	49
Papel biológico de las claudinas 2, 6, 7 y 9 en células AGS.....	54
Efecto de la sobreexpresión de las claudinas en la proliferación Y migración de las células AGS.....	54
Expresión y localización de ZO-1, ocludina y Claudina-1 en células AGS transfectadas	61
Función de las claudinas 2, 6, 7 y 9 en células MCF-7	67
Efecto de la sobreexpresión de las claudinas en la proliferación E invasión de células MCF-7	67
Expresión y localización de ZO-1, ocludina y Claudina-1 en células MCF-7 transfectadas	71
Discusión.....	78
Conclusiones.....	84
Referencias.....	85
Anexo 1	91
Anexo 2	103



INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Factores que afectan la expresión de las claudinas.....	14
Tabla 2. Expresión de claudinas en diferentes tipos de tumores.....	17
Tabla 3. Función de compuerta de claudinas transfectadas en células LLC-PK ₁84
Tabla 4. Papel biológico de las claudinas en células transformadas.....	84



INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura del complejo de unión celular	3
Figura 2. Composición de las UE.....	6
Figura 3. Perfil de expresión de las claudinas de la línea celular LLC-PK ₁	38
Figura 4. Perfil de expresión de las claudinas en células AGS y MCF-7.....	40
Figura 5. Localización membranal de las claudinas sobreexpresadas En las células LLC-PK ₁	42
Figura 6. Sobreexpresión de las claudinas en células AGS y MCF-7	43
Figura 7. Detección de los niveles de mRNA de las claudinas sobreexpresadas en células AGS.....	44
Figura 8. Detección de los niveles de mRNA de las claudinas sobreexpresadas en células MCF-7.....	45
Figura 9. Detección de las claudinas sobreexpresadas en las células AGS usando anticuerpos contra la proteína GFP.....	46
Figura 10. Detección de las claudinas sobreexpresadas en las células MCF-7 usando anticuerpos contra la proteína GFP.....	47
Figura 11. Western blot de las claudinas sobreexpresadas en células AGS.....	48
Figura 12. Western blot de las claudinas sobreexpresadas en células MCF-7.....	49
Figura 13. Resistencia eléctrica transepitelial de células LLC-PK ₁ transfectadas Con vectores de expresión para las distintas claudinas.....	50

Figura 14. Flujo Paracelular de ^{14}C -Manitol a través de células LLC-PK ₁ que sobreexpresan las distintas claudinas.....	51
Figura 15. Permeabilidad a Cl^- a través de células LLC-PK ₁ transfectadas	52
Figura 16. Permeabilidad a Na^+ de células LLC-PK ₁ transfectadas	53
Figura 17. Comparación de la permeabilidad a Na^+ y Cl^- en las células transfectadas con distintas claudinas.....	53
Figura 18. Migración de las células AGS transfectadas con diferentes claudinas.....	55
Figura 19. Invasión de Matrigel por las células AGS que sobreexpresan Diferentes claudinas.....	56
Figura 20. Representación gráfica de la invasión de Matrigel Por las células AGS que sobreexpresan a las diferentes claudinas.....	57
Figura 21. Proliferación de las células AGS transfectadas con diferentes claudinas	59
Figura 22. Polimerización de filamentos de actina en las células AGS Que sobreexpresan diferentes claudinas.....	60
Figura 23. Zimograma de sobrenadantes de las células AGS Transfectadas con las diferentes claudinas.....	61
Figura 24. RT-PCR para determinar la expresión de mRNA de Claudina 1 en las células AGS transfectadas con las diferentes claudinas	62
Figura 25. Análisis por Western Blot de la expresión de la Claudina 1, Ocludina y ZO-1 en las células AGS que sobreexpresaban las diferentes claudinas	63
Figura 26. Localización de la Claudina 1 en células AGS control y que sobreexpresaban a las claudinas 2, 6, 7 y 9	64



Figura 27. Localización de ZO-1 en células AGS control y que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9	65
Figura 28. Localización de Ocludina en células AGS control y que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9	66
Figura 29. Invasión de Matrigel por las células MCF-7 transfectadas Con distintas claudinas	68
Figura 30. Representación gráfica de la invasión de Matrigel Por células MCF-7 que sobreexpresan distintas claudinas.....	69
Figura 31. Proliferación de las células MCF-7 que sobreexpresan a Las diferentes claudinas	70
Figura 32. Zimograma de sobrenadantes de células MCF-7 que sobreexpresan distintas claudinas	71
Figura 33. RT-PCR para determinar la expresión de mRNA de Claudina 1 en células MCF-7 transfectadas con las diferentes claudinas	72
Figura 34. Análisis por Western Blot de la expresión de la Claudina 1, Ocludina y ZO-1 en células MCF-7 que sobreexpresan las diferentes claudinas	73
Figura 35. Localización de la claudina 1 en células MCF-7 control y que sobreexpresan claudinas 2, 6, 7 y 9	74
Figura 36. Localización de ZO-1 en células MCF-7 control y que sobreexpresan claudinas 2, 6, 7 y 9	75
Figura 37. Localización de Ocludina en células MCF-7 control y que sobreexpresan claudinas 2, 6, 7 y 9	77

Figura 38. Efecto del tratamiento con ésteres de forbol sobre la resistencia transepitelial de la línea celular LLC-PK ₁ transfectadas con la claudina 6	91
Figura 39. Efecto del tratamiento con ésteres de forbol sobre el flujo paracelular de ¹⁴ C-Manitol	92
Figura 40. Efecto de los inhibidores de MAPK sobre la resistencia transepitelial de células LLC-PK ₁ transfectadas tratadas con ésteres de forbol	93
Figura 41. Efecto de la inhibición de ERK 1/2 previa al tratamiento con ésteres de forbol sobre el flujo paracelular de ¹⁴ C-manitol a través de las células LLC-PK ₁ transfectadas	94
Figura 42. Participación de las vías de MAPK y PKC en la redistribución subcelular de claudinas 6, 7 y 9 en las células LLC-PK ₁ transfectadas	95
Figura 43. Efecto del tratamiento con hEGF sobre la resistencia eléctrica transepitelial de la línea celular LLC-PK ₁	96
Figura 44. Efecto del tratamiento con hEGF sobre el flujo paracelular de manitol en la línea celular LLC-PK ₁	97
Figura 45. Efecto del hEGF sobre la localización subcelular de las claudinas 6, 7 y 9 en las células LLC-PK ₁ transfectadas	98
Figura 46. Efecto del hEGF sobre la localización subcelular de proteínas endógenas de la UE	99
Figura 47. Efecto de los inhibidores de MAPK y PKC sobre el flujo paracelular de manitol en células LLC-PK ₁ transfectadas y tratadas con hEGF	100



Figura 48. Efecto de los inhibidores de MAPK y PKC sobre la localización subcelular de las claudinas transfectadas en células LLC-PK1 tratadas con hEGF 101

Figura 49. Efecto de los inhibidores de MAPK y PKC sobre la localización subcelular de proteínas de UE endógenas de células LLC-PK1 tratadas con hEGF 102

Introducción:

Los organismos mantienen una interacción continua con el ambiente para poder realizar intercambio de nutrientes, gases, etc. En los organismos pluricelulares esta interacción está delimitada por los epitelios, los cuales generan compartimentos capaces de mantener de manera separada diversos contenidos, como sangre, orina, jugos gástricos, etc. Las células epiteliales regulan el transporte de iones, agua y otras moléculas de un compartimiento a otro, lo que las hace importantes para determinar la composición de los fluidos corporales y, en consecuencia, en la eliminación y captura de sustancias por el organismo. Las células epiteliales están polarizadas, es decir, exhiben dos dominios de membrana plasmática, conocidos como apical y baso-lateral con diferente composición, morfología y función. La membrana apical funciona capturando nutrientes y agua, secretando diversos productos y sirve como barrera entre el ambiente celular interno y el medio externo. Por otro lado, la membrana baso-lateral permite la adhesión al substrato y los contactos intercelulares, que por medio de diferentes complejos protéicos, se unen al citoesqueleto. La membrana baso-lateral es la frontera de la célula con el interior del organismo¹.

Uniones Celulares Epiteliales:

Como se mencionó anteriormente, las membranas baso-laterales de las células epiteliales se mantienen unidas entre sí por un complejo de unión celular. Este complejo está conformado por las uniones comunicantes (UC), los desmosomas, las uniones adherentes (UA) y las uniones estrechas (UE)² (Figura 1).

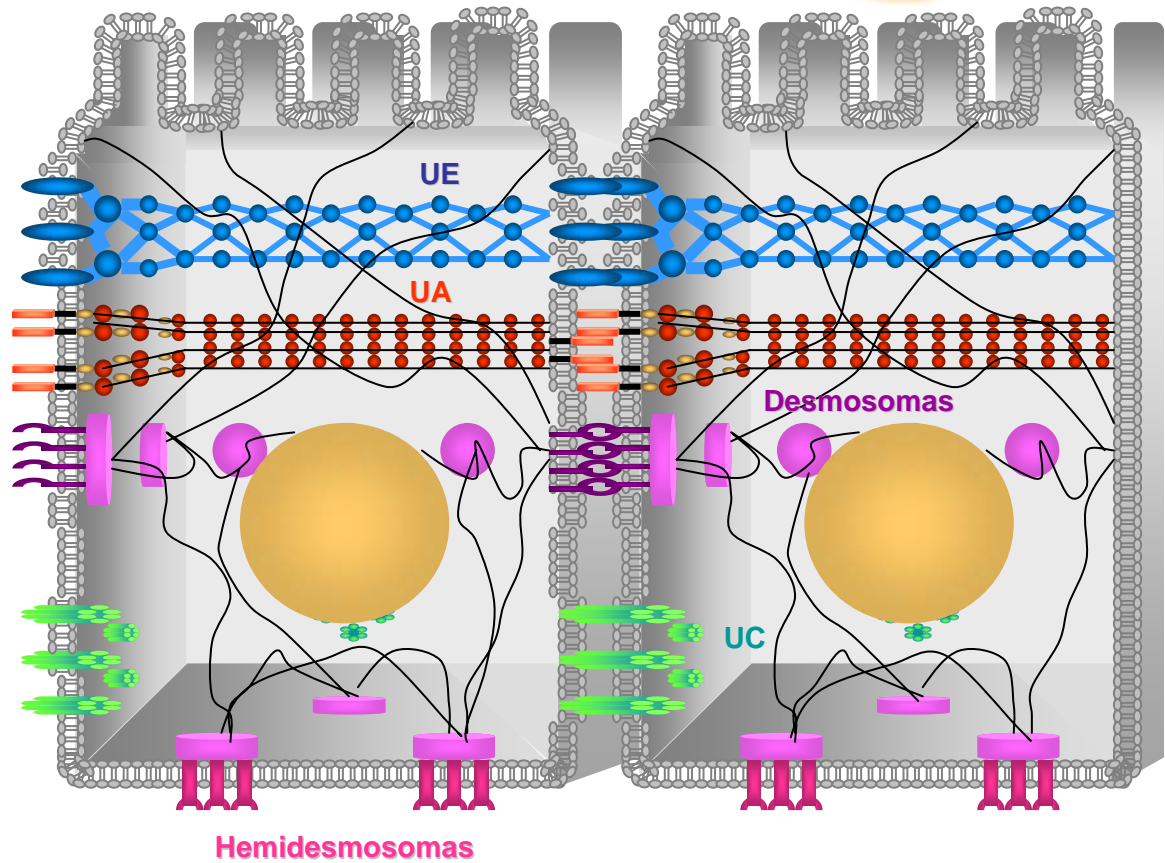


Figura 1 Estructura del complejo de unión celular. Las uniones célula-célula están formadas por a) desmosomas, que le dan fuerza adhesiva a las membranas basolaterales de las células y proveen de sitios de anclaje para filamentos intermedios; b) las uniones comunicantes, que forman canales entre células adyacentes permitiendo la comunicación entre ellas; c) las uniones adherentes (UA), que inician los contactos célula-célula; y d) las uniones estrechas (UE), que mantienen la polaridad del epitelio y funcionan como barrera paracelular en la región más apical de la membrana lateral de las células.

Las UC median la comunicación entre las células. Permiten el paso de iones y pequeñas moléculas de hasta 1000 Da entre el citoplasma de las células vecinas. Esto da lugar al acoplamiento metabólico y eléctrico entre las células³. Los desmosomas son sitios de anclaje para filamentos intermedios y puntos de contacto que fijan a las células adyacentes y a las células con la matriz extracelular. Las UA son las responsables de iniciar los contactos célula-célula. Forman un “cinturón de adhesión continuo” que sirve para mantener juntas a las células vecinas a través de una familia de moléculas de adhesión dependientes de Ca^{2+} , las cadherinas, que se unen a filamentos de actina y miosina.

Uniones Estrechadas:

Las UE rodean la región apical de la superficie lateral de las células epiteliales y endoteliales. Las UE tienen dos funciones canónicas: 1. de cerca, que mantiene la polaridad en los tejidos al restringir el libre movimiento de proteínas y lípidos en el plano de las membranas entre las superficies basolateral y apical⁴⁻⁷; y 2. de compuerta, que regula la difusión paracelular de iones, agua y moléculas de tamaño mediano ($\leq 15 \text{ \AA}$)^{8,9}. Las UE también participan en cascadas de señalización, regulación transcripcional, control del ciclo celular y tráfico vesicular¹⁰⁻¹³. Debido a la gran variedad de funciones que regulan las UE, su estructura y composición resultan más compleja que en otras uniones intercelulares¹⁴.

Las UE están formadas por al menos 40 proteínas diferentes, incluyendo proteínas transmembranales, como las claudinas, tricelulina, ocludina y JAM

(junction adhesión molecules), y proteínas citoplásmicas, que cumplen papeles de anclaje al citoesqueleto, andamiaje, polaridad celular, señalización y tráfico vesicular^{15,16} (Figura 2). Mientras que las proteínas citoplásmicas, también denominadas proteínas adaptadoras, regulan el ensamble y la función de las UE, así como la proliferación y la diferenciación celular¹⁷; las proteínas transmembranales de las UE interactúan con sus homólogas en la célula adyacente y forman una serie de barreras y canales en el espacio paracelular.

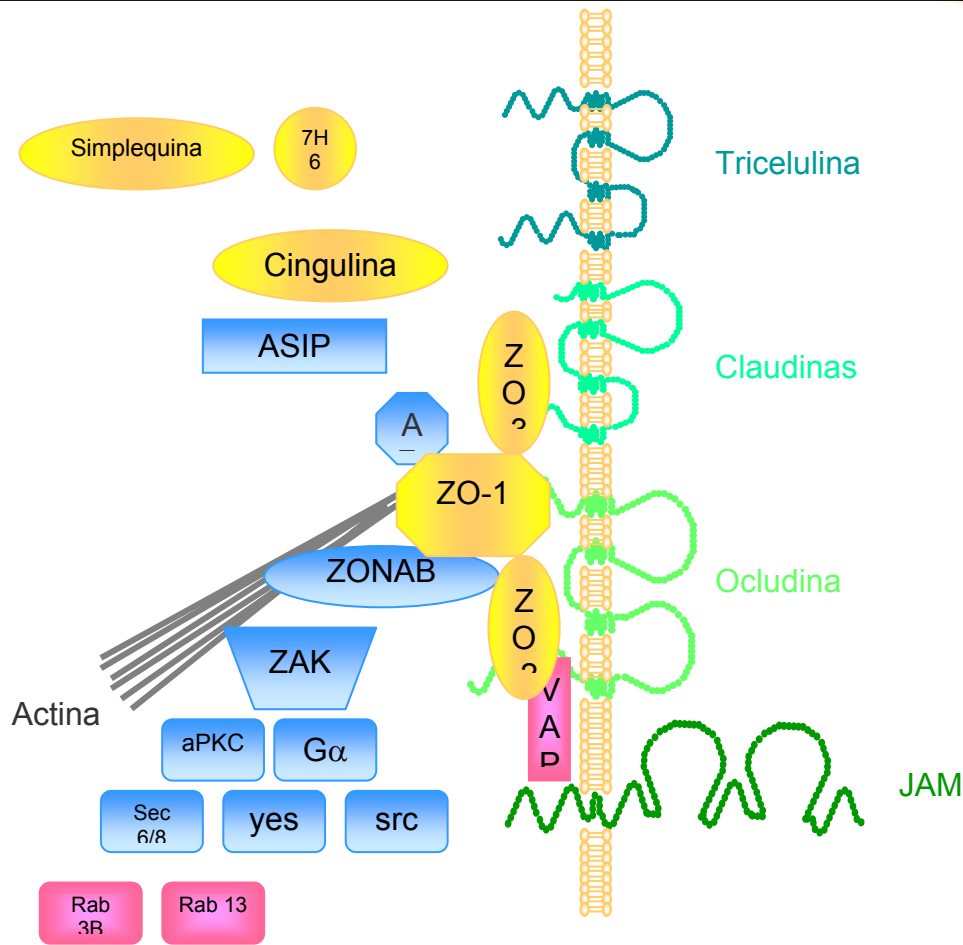


Figura 2. Composición de las UE. Representación esquemática de las proteínas que conforman a las UE y de la manera en la que éstas interactúan. Se indican las proteínas transmembranales (verde); las proteínas adaptadoras (amarillo), que se encargan de anclar a las proteínas transmembranales con los filamentos de actina; las proteínas de señalización (azul), que regulan el ensamblaje de estos complejos y las proteínas involucradas en el tráfico vesicular (rosa).

Proteínas de la familia MAGUK (membrane associated guanylate kinase homologues)

Las proteínas ZO-1, (zonula occludens 1), ZO-2 y ZO-3, son proteínas asociadas a las UE que contienen los dominios conservados PDZ, SH3 y GK. Los dominios PDZ son módulos de 80 a 90 aminoácidos que se unen a motivos específicos localizados en la región carboxilo terminal de varias proteínas o a otros dominios PDZ¹⁵. Los dominios SH3 son módulos no catalíticos de 50-70 aminoácidos que se unen a dominios GK o a ligandos de al menos siete residuos con la secuencia PXXP. El dominio GK es homólogo de la enzima guanilato cinasa que cataliza la conversión de GMP a GDP a expensas de ATP. En las proteínas ZO, el dominio GK no tiene la capacidad de unir GMP ni ATP, por lo que se asume que es enzimáticamente inactivo. Su papel biológico radica en sus propiedades de unión a dominios SH3 además de que se cree que estos dominios pueden activar a vías acopladas a proteínas G¹⁵.

Proteínas PAR

Las proteínas PAR (*partitioning-defective proteins*) son necesarias para mantener la polaridad embrionaria. PAR-3 contiene tres dominios PDZ y se une directamente a la región carboxilo terminal de JAM a través de su segundo dominio PDZ¹⁵. Par-3 se une a PAR-6 y a las PKCs atípicas λ y ζ .

Proteínas MUPP1

MUPP1 contiene 13 dominios PDZ por lo que funciona como una proteína de andamiaje multivalente. Interactúa con las claudinas a través de su dominio PDZ 10 y por el PDZ 9 con JAM¹⁵.

AF-6/Afadina

AF-6 es una proteína multidominio de 205 KDa. Tiene dos dominios de unión a Ras, un dominio de unión a PDZ y dominios de unión tipo kinesina y miosina. AF-6 contiene tres dominios ricos en prolina y una región de unión a F-actina¹⁵.

Proteínas transmembranales de las UE:

Ocludina

El nombre Ocludina deriva del latín *occludere*, que significa ocluir. Esta proteína transmembranal de 62-82 KDa forma los filamentos de las UE. La ocludina tiene cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares de tamaño similar y tres dominios citoplásmicos: los dominios amino y carboxilo terminal y una asa citoplásmica. La región C terminal es necesaria para la localización de la ocludina en las UE y es susceptible de fosforilación por PKC, CK2, p34^{cdc42}/ciclina B, y la tirosin cinasa c-Yes¹⁵. Mientras que la sobreexpresión de esta proteína en células MDCK incrementa la resistencia transepitelial (TER)¹⁸, el silenciamiento de la ocludina altera la funcionalidad de la barrera epitelial, sin modificar el ensamble de la red normal de UE¹⁹.

La región carboxilo terminal de la ocludina puede interactuar directamente con F-actina y con las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3 y con las proteínas de señalización PCK- ζ , c-Yes, la fosfatidilinositol 3 cinasa y con la conexina 26¹⁵.

Proteínas JAM (junction adhesion molecule)

JAM es una familia de glicoproteínas perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que median la adhesión independiente de Ca^{2+} . Dentro de esta familia se encuentran las proteínas CAR, JAM-1, JAM-2, JAM-3, ESAM, y CLMP²⁰. Esta familia de proteínas se caracteriza por tener tres dominios estructurales: 1) una región extracelular de 215 aminoácidos que contiene dos dominios variables tipo Ig, 2) un dominio transmembranal y 3) una cola corta intracelular de 45 aa con un dominio de unión a PDZ. Las proteínas JAM interactúan con los dominios PDZ de AF6, ASIP/Par-3 y ZO-1¹⁵. JAM-1 establece interacciones homotípicas, regula la permeabilidad de las UE y el tráfico de linfocitos, y sirve como receptor para reovirus¹. JAM-2 es una molécula que se expresa en células endoteliales y linfáticas y regula la migración transendotelial. JAM-3 se expresa en plaquetas humanas y media las interacciones entre leucocitos y plaquetas. JAM-4 se localiza en las UE de las células de yeyuno e íleon y en los túbulos renales proximales, donde regula la permeabilidad¹.

Claudinas

Los primeros miembros de la familia de las claudinas, del latín *claudere* (cerrar), fueron identificados en 1998 por Tsukita y colaboradores²¹. Esta familia está constituida por al menos 20 miembros. Las claudinas tienen diferente patrón de distribución entre los tejidos, lo que sugiere que tienen propiedades fisiológicas tejido específicas¹. Las claudinas son proteínas de peso molecular

entre los 20 y 27 KDa con cuatro cruces transmembranales y dos asas en la región extracelular. La primer asa es importante para la selectividad iónica de la ruta paracelular y como correceptor viral. En el caso de las claudinas 1, 6 y 9 la primer asa se une al Virus de la Hepatitis C y media su internalización^{22,23}. La segunda asa funciona como receptor de toxinas bacterianas, como es el caso de las claudinas 3, 4, 6 y 7 que unen a la enterotoxina de *Clostridium perfringens*²⁴. Las regiones amino (N-terminal) y carboxilo terminal (C-terminal) de las claudinas se encuentran expuestas al citosol, siendo el C-terminal importante para determinar la localización de estas proteínas. La región C-terminal, que se encuentra ampliamente conservada en los integrantes de esta familia, contiene motivos de unión a dominios PDZ, con los cuales las claudinas pueden interactuar con otras proteínas de las UE, tales como ZO, PATJ y MUPP1¹⁵. La región C-terminal de las claudinas se fosforila en residuos de serina y/o treonina, lo que regula su interacción con otras proteínas, su localización y su vida media^{24,25}. Los cambios en la fosforilación de las claudinas se asocian con modificaciones en la permeabilidad paracelular y la resistencia transepitelial de las células^{7,15,26}.

Las claudinas interactúan con otras proteínas de la misma familia presentes en la membrana plasmática de la misma célula, lo que se denomina interacción en *cis*; y con claudinas presentes en las membranas de células adyacentes, a lo que se le llama interacción en *trans*²⁷. Además, se pueden crear uniones entre claudinas iguales, conocidas como interacciones homotípicas, o entre claudinas diferentes, denominadas interacciones

heterotípicas. No todas las interacciones heterotípicas son compatibles, por ejemplo, la claudina 1 se une a la claudina 3, pero no a la claudina 2 o a la claudina 5^{28,29}. En cambio, las claudinas 2 y 5 son capaces de formar interacción heterotípica con la claudina 3. Otras interacciones heterotípicas incompatibles son la claudina 1 con la claudina 4, la claudina 3 con la claudina 4 y la claudina 4 con la claudina 5³⁰.

Las diferentes interacciones entre las claudinas dan lugar a la formación de poros paracelulares de diferentes diámetros que pueden ir de los 4 a los 50 Å. Las cargas presentes en los dominios extracelulares de estas proteínas permiten la discriminación entre aniones y cationes^{5,31}. Las células LLC-PK₁ y MDCK, han sido usados para sobreexpresar o silenciar claudinas en particular. Así, por ejemplo, se ha visto que las claudinas 2 y 10 hacen más laxas a las monocapas celulares; mientras que las claudinas 1, 4, 5, 7, 8, 11, 14, 15, 16, 18 y 19 vuelven más estrechos a los epitelios. Las claudinas 2, 15, 16 y 19 tienen preferencia por los cationes, mientras que la claudina 10a es selectiva a aniones¹⁴. Las claudinas 16 y 19 forman poros para la reabsorción del Mg⁺⁺ en el asa ascendente gruesa de Henle en la nefrona³².

Regulación de la Distribución Subcelular de las Claudinas

El reclutamiento a la membrana plasmática y la dimerización de ZO-1 y ZO-2 es indispensable para que se inicie la polimerización de las claudinas en filamentos de UE^{33,34}. Cabe resaltar que algunas claudinas, tales como la claudina 1 y 7, se distribuyen a lo largo de la membrana lateral sin formar

filamentos, por lo que se concluye que ante la presencia de ZO-1 y ZO-2 en la UE las claudinas se polimerizan formando filamentos, mientras que en la membrana lateral, la ausencia de las proteínas ZO impide su polimerización. La función de las claudinas en la membrana lateral se desconoce, aunque se sospecha que en esta región las claudinas se asocian a integrinas³⁵.

Dentro de las modificaciones postraduccionales que pueden sufrir las claudinas se encuentra la fosforilación, que afecta la localización de estas proteínas en la membrana plasmática, y da lugar a cambios en la permeabilidad paracelular. La fosforilación de las claudinas ocurre por acción de la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa C (PKC), y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), entre otras. La fosforilación por PKA de las claudinas 16 y 3, promueve la integración de la claudina 16 a las UE e induce la localización citosólica de claudina 3. La fosforilación por PKC de las claudinas 1 y 4, promueve la incorporación de ambas proteínas a las UE. La Claudina 1 es fosforilada por MAPK y WNK4. Esta última cinasa también fosforila a las claudinas 2, 3 y 4. El receptor con actividad de tirosina cinasa EphA2, fosforila a la claudina 4 impidiendo su integración a la UE^{24,36,37}.

Las citocinas y factores de crecimiento alteran a las UE. El interferón gamma (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) inducen la internalización de las claudinas 1, 4 y la ocludina, disminuyen la expresión de ZO-1, redistribuyen a ZO-2, y aumentan la permeabilidad paracelular de manera independiente a la cascada de señalización apoptótica inducida por citocinas en un modelo epitelial de intestino. Otras vías de señalización que regulan la

función de las UE pueden también regular el destino y la función de las diferentes claudinas. El AMPc por ejemplo, induce un aumento en los niveles de la claudina 5, y su fosforilación vía PKA. Así mismo, el AMPc produce una disminución de la claudina 1 en las células endoteliales porcinas^{4,38}. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) aumenta la cantidad de las claudinas 4 y 7 en las UE y relocaliza en el citosol a las claudinas 1 y 2, sin modificar a otras proteínas de las UE como a la ocludina y a las proteínas ZO-1 y ZO-3 en células MDCK³⁹.

En líneas de cáncer de mama, el factor de crecimiento hepático (HGF) produce hipermetilación del promotor de la claudina 7 y pérdida de los contactos celulares⁴.

Algunos factores de transcripción también regulan la expresión de varias claudinas. Tal es el caso del factor nuclear de hepatocito 4 alfa (HNF-4 α), que regula positivamente la expresión de las claudinas 6 y 7. La región proximal del promotor de la claudina 2 tiene sitios de unión a los factores de transcripción LEF-TCF y Cdx1, que se activan por la vía clásica de WNT. SNAIL es otro factor de transcripción que inhibe la expresión de las claudinas 1, 3, 4 y 7, así como de la ocludina, pero no de otros componentes de las UE, como ZO-1⁴⁰. SNAIL es necesario en la fase temprana de la embriogénesis y en la regulación de la transición epitelio-mesenquima (TEM)⁴.

Tabla 1. Factores que afectan la expresión de las Claudinas.

Factor	Claudinas	Células/Tejido	Efecto	Mecanismo	Referencia
EGF	Cldn-2↓	MDCK II	TER ↑	MAPK/ERK1/2	41
	Cldn-1, -3, -4 ↑				
HGF	Cldn-2↓	MDCK II	TER ↑	MAPK/ERK1/2	41,42
	Cldn-2↑	MDCK I	TER ↓		
	Cldn-7↓	MCF-7, T47D	ND	Metilación del promotor	43
GATA-4 CDX2, HNF1α	Cldn-2↑	Caco-2 HIEC	Mantiene expresión	Transcripción	44
CDX2, HNF1α	Cldn-2↑	Caco-2	ND	Transcripción	45
HNF-4 α	Cldn-6, -7↑	F9	Induce UE	-	46
Snail	Cldn-2, -4, -7↓	MDCK II	TER ↓	-	47
	Cldn-1↓	MDCK	ND	Transcripción/Iniciación de la Traducción	48,49
	Cldn-3, -4, -7↓	Eph4, CSG1	EMT	Transcripción	40
IL-1β	Cldn-2↑	Hígado, hepatocitos	ND	MAPK, PI3K	50
IL-17	Cldn-1, -2↑	T84	TER ↑	MEK	50
Hipoxia	Cldn-3↑	HUVEC	ND	Transcripción	51
INF, TNF, IL-1 β	Cldn-1↑	Caco-2	TER ↓	-	52
INF, TNF	Cldn-1 ↑, Cldn-2 ↓	MDCK	Flujo moléculas ↑ y TER	MEK 1, p38	53
	Internalización Cldn-1, -4	T84	TER ↓	-	54
AMPc	Fosforilación y Cldn-5 ↑	Células cerebrales endoteliales porcinas	TER ↑	PKA	55
TGF-β1	Cldn-1, -2 ↓	MDCK II	ND	ERK 1/2, PI3K, Snail	56

TER: Resistencia eléctrica transepitelial

EMT: Transición epitelio-mesénquima

ND: No Determinado

Como se puede observar en la Tabla 1, la expresión de cada claudina se regula de manera diferente. Los estudios realizados a la fecha se enfocan principalmente a las claudinas 1, 2, 3 y 4, por lo que los mecanismos de regulación del resto de las claudinas aún se desconocen.

Claudinas y Cáncer

El cáncer se define como el crecimiento tisular producido por la proliferación continua y desordenada de células, insensibles a estímulos apoptóticos y capaces de invadir y destruir otros tejidos.

Existen diversos tipos de cáncer, dependiendo del tejido del cual se originan. Los carcinomas proceden de tejidos epiteliales y constituyen aproximadamente el 90% de todos los tumores.

Durante la transformación celular ocurren alteraciones en las uniones celulares, entre ellas las UE. Inicialmente se pensaba que la pérdida de estas uniones era consecuencia de las transformaciones celulares. Sin embargo, esta idea ha ido cambiando y ahora se sugiere que las modificaciones observadas en las UE constituyen los primeros pasos para dar lugar a la transformación celular⁵⁷.

La pérdida de la función de cerca de las UE permite la libre difusión en el plano de la membrana de moléculas de la membrana basolateral a la membrana apical y viceversa. Esto da lugar a la pérdida de la polaridad celular. Así mismo, la pérdida de la función de compuerta de las UE da acceso incontrolado de factores de crecimiento y nutrientes a sus receptores.⁵⁷

La alteración en la expresión y localización de proteínas de las UE, se relaciona con varios tipos de tumores, incluyendo cáncer de estómago, mama, colon, páncreas, próstata, útero y ovario (Tabla 2.). Estos cambios se asocian con los fenotipos más invasivos de diferentes tipos de cáncer y por ende, con un mal pronóstico para los pacientes^{43,58-64}. Sin embargo, la relación entre la expresión de claudinas y su función en la progresión tumoral sigue sin ser comprendida por completo.

Tabla 2. Expresión de claudinas en diferentes tipos de tumores.

CLAUDINA	NEOPLASIA	EXPRESIÓN	LOCALIZACIÓN	REFERENCIA
Cldn-1	Colon	↑	Citoplasma	4
	Mama	↓	ND	62
	Esófago de Barret	↓	ND	4
Cldn-3	Cervix	↑	ND	65
	Ovario	↑	Membrana plasmática y citoplasma	4
Cldn-4	Próstata	↑	¿? Difuso	4
	Mama	↑	ND	4
	Ovario	↑	Membrana plasmática y citoplasma	4
Cldn-6	Páncreas	↑	Membrana plasmática	4
	Estómago	↓	ND	62
	Mama	↑	ND	4
	Próstata	↑	ND	62
	Glándula mamaria	↓	ND	4
	Cldn-7	Cabeza y cuello	↓	ND
Cldn-10	Mama	↓	Membrana plasmática	4
	Esófago (fenotipo invasivo)	↓	Membrana plasmática	66
	Estómago	↑	ND	67
	Cervix	↑	ND	65
Cldn-16	Hígado	↑	ND	62
	Tiroides	↑	ND	62
Cldn-23	Ovario	↑	ND	62
	Estómago	↓	ND	68
	Mama	↓	ND	68
Cldn-23	Páncreas	↓	ND	68

ND: No Determinado

Claudinas y señales de crecimiento

Las células normales requieren de señales de crecimiento para entrar a un estado proliferativo. Estas señales se transmiten por la unión de moléculas de señalización, como los factores de crecimiento (GF) a receptores transmembranales. Varias células tumorales son capaces de generar sus propias señales de crecimiento, reduciendo así la dependencia de la estimulación del microambiente en el tejido normal.

Como resultado de la polaridad celular, los receptores de factores a crecimiento (GFR) se localizan en la superficie basolateral de la célula, en contacto con el flujo sanguíneo y los fluidos intersticiales, mientras que los GF están compartimentalizados a muy altas concentraciones en los fluidos lumbinales de los tejidos epiteliales. Los epitelios regulan el paso de los GF por la vía transcelular e impiden por acción de las UE la difusión de estas moléculas por la vía paracelular. Si se debilitan las UE los GF pueden tener acceso ininterrumpido a sus respectivos receptores, y en consecuencia, mantienen activa la señal de proliferación y permiten el crecimiento continuo de las células⁵⁷.

Aunado a esto, se ha observado que en el tejido epitelial transformado, los GFR se localizan en la superficie apical y en consecuencia, contactan los fluidos lumbinales con altas concentraciones de su ligante⁵⁷. Estos cambios en la localización de los GFR se deben a que se pierde la función de cerca de las UE

Se ha observado el debilitamiento de las UE en varios tipos de neoplasias, incluyendo las de ovario, mama, hígado y colon, así como en estadios precancerosos del tracto gastrointestinal, como en el esófago de Barrett, la enfermedad de Crohn y la displasia gástrica, entre otros (Referencias en Tabla 2.). Estos cambios en la función de compuerta de los epitelios pre- o neoplásicos, se atribuyen principalmente a alteraciones en los niveles de expresión de las claudinas, así como en su localización subcelular.

Claudinas y evasión de apoptosis

La vida de las células se mantiene por señales de sobrevivencia generadas por las interacciones célula-matriz extracelular (ME) y célula-célula. La pérdida de estas uniones en una célula normal da lugar a la muerte celular programada o apoptosis. Durante la apoptosis se activan unas proteasas, denominadas caspasas, que conllevan a la muerte celular por la destrucción de los organelos y el genoma celular. La sobreexpresión de la claudina 1 en células de cáncer colorectal, así como de las claudinas 3 y 4 en células de cáncer de ovario aumenta la sobrevivencia celular al reducir la velocidad de la apoptosis. En cambio, la reexpresión de la claudina 1 en células de cáncer de mama da lugar a un aumento de la apoptosis en cultivos tridimensionales. Los mecanismos mediante los cuales las claudinas actúan para que dicho fenómeno suceda aún se desconocen⁶⁹.

Claudinas, invasividad de tejidos y metástasis:

Las claudinas 1, 2, 3, 4 y 5 reclutan y promueven la activación de las metaloproteinasas (MMP), lo que sugiere que estas proteínas participan en la invasividad y la metástasis⁶⁰. El aumento en la expresión de estas claudinas en algunos tipos de cáncer, como el cáncer de colon, ovario, páncreas y el adenocarcinoma gástrico, se asocia a un aumento en la capacidad invasiva de dichos carcinomas, como resultado del aumento en la actividad de la MMP-2⁷⁰. En el cáncer de mama, el tratamiento con sanguinarina, una sustancia que tiene efectos anti invasivos, disminuye la expresión de las claudinas e inhibe la actividad de las MMP-2 y MMP-9⁷¹.

La internalización de las claudinas, pero no de otras proteínas asociadas a las UE como ocludina o ZO-1, se asocia al movimiento de las células en la embriogénesis y el remodelaje tisular⁷², así como en fases avanzadas de algunos tipos de cáncer. Debido a que las interacciones célula-célula y célula-MEC son necesarias para la sobrevivencia celular y estas interacciones se pierden durante la invasión de las células a los tejidos, se podría sugerir que la internalización de las claudinas permite a las células evadir procesos apoptóticos.

En el cáncer de páncreas tubular y coloidal en fases invasivas, se ha observado un aumento significativo de la claudina 4 a nivel de ARNm y proteína⁴. La invasividad de células derivadas de tumor primario y metástasis de cáncer de colon, se asocia con el aumento en expresión de la claudina 1 y su deslocalización de la membrana plasmática al citoplasma y núcleo⁶⁰.

Las claudinas como marcadores tumorales, diagnóstico y prognosis.

La alta especificidad de los patrones de expresión de las claudinas en los tejidos normales y cancerosos, convierte a estas proteínas en marcadores moleculares útiles para el diagnóstico temprano y el pronóstico de varios tipos de cáncer. Por ello, es necesario caracterizar los perfiles de expresión de las claudinas en tejidos normales y cancerosos. Sin embargo, por falta de anticuerpos específicos dirigidos contra cada una de las claudinas, estos estudios no se han completado. Por ello, en cambio, se han realizado estudios para conocer los patrones a nivel de RNAm⁷³. La información que estos estudios muestran puede no ser de gran utilidad ya que no se comprueba la presencia de la proteína ni la localización de la misma en el tejido. Aún con estas desventajas, se ha logrado relacionar el nivel de expresión de ciertas claudinas con el pronóstico de algunas neoplasias. Por ejemplo: 1. la baja expresión de la claudina 1 presente en el cáncer de colon en etapa II, que se asocia con un pronóstico desfavorable y 2. la expresión de la claudina 10 se considera como un factor negativo en el pronóstico de recurrencia del carcinoma hepatocelular después de la hepatectomía⁶².

Claudinas y Terapia

Las claudinas 3 y 4 son receptores para la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (ECP). Ésta es un polipéptido de 35 kDa que, tras unirse a sus receptores en la membrana, crea pequeños poros, lo que da lugar a la pérdida de la regulación osmolar y finalmente a la muerte celular⁷⁴⁻⁷⁶. Las claudinas 3 y 4 se encuentran elevadas en una gran cantidad de carcinomas, por lo que se

proponen como posibles blancos terapéuticos para varios tipos de tumores. En Xenotransplantes de células de cáncer de páncreas, que expresan cantidades elevadas de la claudina 4, se ha observado que el tratamiento con ECP produce una disminución del tumor acompañado por necrosis. Observaciones similares se han realizado en células de cáncer de mama, que presentan niveles elevados de las claudinas 3 y 4⁷⁷. Sin embargo, existen algunos inconvenientes para el uso de la ECP en el tratamiento de tumores ya que varios tejidos normales, como pulmón, riñón e intestino, también expresan estas claudinas.

El uso de la ECP podría ser de gran utilidad como terapia localizada al momento de la remoción de un tumor y su estructura podría ser la base para el desarrollo de nuevos medicamentos. Así mismo, se ha sugerido que la capacidad de la ECP para destruir a las UE, puede ser útil, en combinación con la quimioterapia convencional, para incrementar el acceso de los agentes quimioterapéuticos al interior de los tumores⁶².

La terapia con anticuerpos dirigidos contra la claudina 4 constituye otra de las opciones a probar en lesiones primarias y metastásicas en cáncer de páncreas, ya que cerca del 100% de estos tumores expresan a esta proteína en la membrana. Sin embargo, y como se mencionó anteriormente, podrían presentarse efectos secundarios no deseables en esta terapia debido a que varios tejidos normales también expresan a esta claudina.

Planteamiento del problema:

Se ha demostrado la participación de las claudinas en varias patologías. Por ejemplo en las enfermedades renales, se les involucra por su papel en la regulación del flujo paracelular de iones⁷⁸; en las enfermedades infecciosas, porque funcionan como receptores de agentes patógenos como los virus^{22,23,79-82} y en las enfermedades crónico degenerativas, como el cáncer, porque su sobreexpresión evita la apoptosis y favorece la invasividad⁸³.

La localización de las claudinas en la membrana plasmática es indispensable para que ejerzan las funciones de regulación de la polaridad, el flujo paracelular y que actúen como receptores de agentes infecciosos. Por esta razón, el estudio de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de las claudinas en la membrana, podrá ayudarnos a comprender mejor el papel de estas proteínas en algunos de estos padecimientos. Este conocimiento también será de utilidad para diseñar fármacos que modifiquen la función de compuerta de los epitelios, favoreciendo así la absorción de moléculas a través de éstos.

A la fecha se sabe poco sobre los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión y la localización subcelular de diferentes claudinas.

Estudios previos en el laboratorio mostraron un aumento en la expresión y cambios en la localización subcelular de las claudinas 6, 7 y 9 en el adenocarcinoma gástrico humano. Por esta razón se decidió estudiar si cambian las propiedades de barrera de una línea celular epitelial no transformada, con la sobreexpresión de estas claudinas. Así mismo, se

analizaron los mecanismos involucrados en la regulación de la localización subcelular de las claudinas 6, 7 y 9.

Por otro lado, nuestro grupo reportó recientemente que la sobreexpresión de la claudina 9 se relaciona con un mal pronóstico en biopsias de adenocarcinoma gástrico humano⁸⁴. De la misma manera, otros grupos han demostrado que las claudinas -2 y -7 se sobre expresan en este tipo de neoplasias⁸⁵⁻⁸⁸. Estas observaciones nos condujeron a estudiar qué ventajas adquieren las células de adenocarcinoma gástrico humano con la expresión de estas claudinas.

En síntesis, el presente estudio busca comprender cómo afecta la expresión de las claudinas -2, -6, -7 y -9 a las capacidades de migración, invasión y proliferación de las células de adenocarcinoma gástrico AGS y de cáncer de mama MCF-7.

Hipótesis:

- Si la función de compuerta de las células LLC-PK₁ se debe al perfil de expresión de las claudinas endógenas, entonces la sobreexpresión de las claudinas-2, -6, -7 o -9 modificará la resistencia eléctrica transepitelial (TER), el flujo paracelular (PCF) y la permeabilidad a diferentes iones (PNa⁺/PCl⁻).
- La sobreexpresión de claudinas -2, -6, -7 o -9 en células epiteliales transformadas AGS y MCF-7 conferirá ventajas de crecimiento, migración e invasión.
- Si las vías de señalización de PKC y MAPK regulan el ensamblaje o desensamblaje de las UE, entonces la localización subcelular de las claudinas sobreexpresadas se modificará al activar estas vías con ésteres de forbol y factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Objetivo General:

- Determinar si la sobreexpresión de las claudinas 2, 6, 7 y 9 afecta la propiedad de compuerta de una línea celular epitelial no transformada, y la proliferación, migración e invasión celular de células transformadas.

Objetivos Específicos:

- Caracterizar la función de compuerta de las células LLC-PK₁ transfectadas de manera estable con las claudinas 2, 6, 7 y 9 mediante la medición de potencial de difusión (DP), resistencia eléctrica transepitelial (TER) y flujo paracelular de manitol (PCF).
- Identificar cambios en la velocidad de proliferación, la capacidad de migración y de invasividad de las células AGS que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9
- Determinar cambios en la velocidad de proliferación y capacidad de invasión de las células MCF-7 que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9.

Material y Métodos:

Anticuerpos, plásmidos, enzimas, inhibidores y ésteres de forbol. Los anticuerpos primarios empleados fueron policlonales de cabra anti-claudina 6 y 9 (Santa Cruz, Biotechnology Inc.). Los anticuerpos de conejo anti-claudina 1, 2, 7, claudina y ZO-1 y monoclonal de ratón anti-proteína verde fluorescente (GFP), así como los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (HRP) conejo anti-IgG de cabra HRP, cabra anti-IgG de ratón-HRP y cabra anti conejo-HRP fueron de ZYMED. Los anticuerpos de ratón anti-MMP-2 y MMP-7 se adquirieron en Calbiochem. Los anticuerpos secundarios acoplados a rodamina fueron de Abcam. El anticuerpo de ratón anti- α actina fue donado por el Dr. José Manuel Hernández del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV. El vector plasmídico pcDNA3.1/NT-GFP y las enzimas de restricción *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *KpnI* y *XbaI* empleadas, el Trizol, la Lipofectamina 2000, el kit single step RT-PCR y los iniciadores fueron adquiridos con Invitrogen. El éster de forbol empleado, 4-beta-forbol-12,13-dibutirato (PDBu), así como la Estaurosporina fueron adquiridos en SIGMA. Los inhibidores de MAPK PD98059, SP600125 y SB202190, así como el Factor de Crecimiento Epidérmico Humano recombinante (hEGF) fueron de BIOMOL. El medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el suero fetal bovino (FBS), la L-glutamina, el piruvato de sodio, la solución de antibióticos estreptomicina-penicilina y el G418

fueron adquiridos de Gibco. Las secuencias de los iniciadores empleados son las siguientes:

hACTIN forward	5`-TGAAGGTGACAGCAGTCGGTTG-3`
hACTIN reverse	5`-GGCTTTTAGGATGGCAAGGGAC-3`
hCLD1 forward	5`-TGCCCACCTGCAAACCTCTC-3`
hCLD1 reverse	5`-GCCTCTGTGTCACACGTAGTC-3`
hCLD2 forward	5`-GAAGACGCTTCTACTGAGAG-3`
hCLD2 reverse	5`-CACGATCCAGTGGTAGTG-3`
hCLD6 forward	5`-CAGTGCAGCTCCTTCAACC-3`
hCLD6 reverse	5`-CTGTTGGGCACTGCCACTTC-3`
hCLD7 forward	5`-TTTCTGAGGGCGGAAATGGC-3`
hCLD7 reverse	5`-GGCATCTAGACACTCCCATAGC-3`
hCLD9 forward	5`-ATGGCTTCGACCGGCTTAG-3`
hCLD9 reverse	5`-CAGGGCATCTGGTCATCAGG-3`

Cultivos celulares. Las células epiteliales no transformadas de riñón de cerdo LLC-PK₁, la línea celular de adenocarcinoma gástrico humano AGS y las células de cáncer de mama MCF-7 se mantuvieron en cajas petri de plástico a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, en medio Alpha-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO) y D-MEM (Sigma) con 5% de suero fetal bovino respectivamente, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina E y 100

µg/mL de estreptomycin. Las transfectantes estables fueron seleccionadas y mantenidas con medio DMEM con G-418 400 µg/ml.

Caracterización de la expresión de claudinas en las líneas celulares. A partir de extractos totales de dicha línea celular se realizaron ensayos de Western blot cargando 25 y 150 µg de proteína por carril para detectar la expresión de las claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15 y 16.

Construcción de vectores pcln2GFP, pcln6GFP, pcln7GFP y pcln9GFP. A partir del RNA total extraído de la línea celular AGS (Adenocarcinoma Gástrico Humano) y con el Kit Single Step RT-PCR (Invitrogen) se obtuvo el cDNA de las Claudinas 2, 6, 7 y 9 empleando los iniciadores correspondientes. Se colocaron 10 µL de Mezcla de Reacción, 0.5 µL de Iniciador A 10 µM, 0.5 µL de Iniciador B 10 µM, 2.5 µL de RNA 0.1 µg/µL, 0.4 µL de RT/Taq, 6.1 µL de H₂O por reacción y se sintetizó el cDNA bajo las siguientes condiciones: 55°C por 30 min, 94°C por 2 min, 40 ciclos de: 94°C por 20 seg, 56.9°C (cldn6 y 7) o 59.7°C (cldn9) por 30 seg, 72°C por 40 seg, y 7 min a 72°C. Para construir cada vector se tomaron 4 µL del producto obtenido de RT-PCR obtenido y que se incubaron con 1 µL del vector TOPO pcDNA3.1/NT-GFP y 1 µL de la solución salina por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente 20 min a 4°C. Se transformaron células de *Escherichia coli* DH5α competentes con 2 µL de esta reacción de clonación y se seleccionaron las células transformadas en placas de agar LB-Ampicilina 100 µg/mL. Se

seleccionaron 10 colonias para cada construcción y se realizó la extracción de plásmidos por mini-prep (Invitrogen). Se corroboró el sentido en el que se insertó la secuencia deseada empleando la enzima *Pst1* para las construcciones denominadas pcln9GFP y pcln7GFP y las enzimas *XcmI* y *EcoRV* para la construcción pcln2GFP. Se secuenciaron las construcciones obtenidas para verificar que no hubiera mutaciones.

Transfección de células Las células se sembraron en placas de 6 pozos (8×10^5 cel/pozo) para alcanzar confluencia al día siguiente. Se lavaron dos veces con PBS y se cambió el medio por Opti-Mem (GIBCO). La transfección se llevó a cabo con Lipofectamina 2000 de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen). Las líneas transfectadas estables fueron seleccionadas en medio Alpha-MEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina E y 100 μ g/mL de estreptomicina adicionado con 700 μ g/mL G418 (GIBCO) por 7 días.

Medición de resistencia eléctrica transepitelial (TER). Se sembraron 8×10^5 células de cada línea transfectada en insertos Millicell-CM Culture Plate Inserts (Millipore) de 4.2 cm² de área y 0.4 μ m de tamaño de poro. Para el tratamiento con ésteres de forbol, cuatro días después de sembradas las células, se cambió el medio de cultivo de la región apical y basal por medio fresco o medio con inhibidores de MAPK (50 μ M PD98059 para MEK1/2, 1 μ M SB202190 para p38 o 1 μ M SP600125 para JNK) y se incubó nuevamente por 1h para

posteriormente realizar una medición inicial de TER. Se adicionó PDBU para tener una concentración final de 2×10^{-7} M y se realizaron lecturas de TER cada 30 min por 2 h. La medición de TER se llevó a cabo con el voltímetro epitelial EVOM en la cámara de medición EndOHm (WPI). La resistencia se calculó mediante la medición del cambio de voltaje que resulta del paso de una corriente a través de la capa celular y fue normalizada por área del inserto. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Para el tratamiento con hEGF, cuatro días después de sembradas las células se cambió el medio de cultivo de la región apical y basal por medio fresco y se incubó nuevamente por 1h para posteriormente realizar una medición inicial de TER. Se adicionó hEGF para tener a una concentración final de 100 ng/mL y se realizaron lecturas de TER cada 30 min por 2 h. La medición de TER se llevó a cabo con el EVOM (WPI). Los ensayos fueron realizados por triplicado empleando como control células transfectadas con el vector solo.

Flujo paracelular de manitol (PCF). Después de las lecturas de TER se cambió el medio de cultivo de la región basolateral por medio con 0.2 μ Ci/mL de 14 C-Manitol (Perkin Elmer). Se tomaron muestras de 50 μ L por duplicado del medio de la región apical de los insertos cada 30 min durante 90 min y se obtuvieron lecturas de cuentas por minuto (CPM) en un contador de centelleo. Los datos se graficaron y se calculó la velocidad de flujo de 14 C-Manitol. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Potencial de difusión (DP). Después de obtener lecturas iniciales de TER el medio de cultivo apical y basolateral se reemplazó por una solución salina A (NaCl 140 mM) y se obtuvieron lecturas de voltaje. La solución salina de la región apical se reemplazó por la solución salina B (NaCl 70 mM y Manitol 135 mM para mantener la osmolaridad) y se midió el voltaje. La permeabilidad a sodio y cloruro (P_{Na^+}/P_{Cl^-}) se calculó usando la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz y la ecuación simplificada de Kimizuka-Koketsu⁸⁹.

Tratamiento de células LLC-PK₁ con PDBu o hEGF. Una vez que las células alcanzaron confluencia, se les substituyó el medio por medio Alfa-MEM libre de suero por 24 h. A estas células se les trató con inhibidores de MAPK (50 μ M PD98059 para MEK1/2, 1 μ M SB202190 para p38 o 1 μ M SP600125 para JNK) o Estaurosporina (100 nM) y se incubó por 1 h. Transcurrido ese tiempo se añadió hEGF (100 ng/mL) y se incubó por 3 h o PDBU (2×10^{-7} M) y se incubaron por 30 min.

Fraccionamiento celular y Western blot. Las células confluentes tratadas y no tratadas se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en 500 μ L de amortiguador A (Tris 20 mM, Dextrosa 0.25 M, EGTA 10 mM, EDTA 2 mM, pH 7.5), con inhibidores de proteasas (Leupeptina 20 μ g/mL e inhibidor de Tripsina 1 mg/mL) y cocteles de inhibidores de fosfatasa I y II (SIGMA). Las suspensiones se sonicaron y se centrifugaron por a 39,000 rpm ($156,553 \times g$), 30 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se colocó en un tubo nuevo y se marcó como fracción

citósica. El precipitado se resuspendió en 150 μ L de amortiguador A adicionado con 1% de Tritón X-100 y se incubó por 1 h a 4°C con agitación suave. Posteriormente se centrifugó nuevamente a 39,000 rpm, 30 min a 4°C. El sobrenadante se marcó como fracción soluble en Tritón X-100 (fracción membranal). Para obtener la fracción insoluble en Tritón X-100 (o fracción de citoesqueleto) se resuspendió el precipitado en 150 μ L de amortiguador de lisis (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, IGEPAL 1%, SDS 0.1% y Desoxicolato de Sodio 0.1%) con los mismos inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se incubó por 1 h a 4°C con agitación suave y se centrifugó por a 39,000 rpm, 30 min a 4°C. Alícuotas equivalentes a 20 μ g de proteína de cada fracción se cuantificadas empleando el Kit de determinación de proteína de Bio-Rad, se cargaron en geles de SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con 5% de leche libre de grasas en TBS durante 1 h y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa, empleando los reactivos ECL (Amersham, Arlington Heights, IL) como sustrato para la detección de la peroxidasa.

Imágenes de células vivas por microscopía confocal e inmunofluorescencia. Se sembraron 2.8×10^5 células LLC-PK₁ en placas para fluorescencia (WPI) y se observaron en un microscopio confocal Olympus. Se trataron las células con PDBU (2×10^{-7} M) capturando la imagen durante 15

minutos por espacios de 30 seg. Se empleó el marcador de membrana FM464 (Invitrogen) para corroborar la localización de las proteínas. Para la inmunofluorescencia las células LLC-PK₁ se sembraron en cubreobjetos tratados con Histogrip (ZYMED). Una vez que alcanzaron el 80% de confluencia se lavaron dos veces con PBS frío, se fijaron con metanol por 20 min a -20°C y se permeabilizaron con PBS + Tritón X-100 al 0.1% por 5 min a temperatura ambiente. Se bloquearon con PBS + 1% BSA por 30 min a 4°C y se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario, se lavaron 3 veces con PBS e incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a FITC, o Rodamina y se lavaron nuevamente tres veces con PBS. Los cubreobjetos se montados en portaobjetos con 5 µL de Antifade (Invitrogen) y se sellaron con barniz.

Detección de mRNA de las claudinas 2, 6, 7 y 9 en las células LLC-PK₁ transfectadas. Se extrajo RNA total de células LLC-PK₁, AGS y MCF-7 transfectadas con Trizol, siguiendo las especificaciones del fabricante (Invitrogen). A partir del RNA extraído se llevó a cabo el RT-PCR con el Kit Single Step RT-PCR (Invitrogen) para las Claudinas 2, 6, 7 y 9 empleando los iniciadores correspondientes. Se colocaron 10 µL de mezcla de reacción, 0.5 µL de Iniciador A 10 µM, 0.5 µL de Iniciador B 10 µM, 2.5 µL de RNA 0.1 µg/µL, 0.4 µL de RT/Taq, 6.1 µL de H₂O por reacción y se sintetizó el cDNA bajo las siguientes condiciones: 55°C por 30 min, 94°C por 2 min, 40 ciclos de: 94°C por 20 seg, 56.9°C (cldn6 y 7) o 59.7°C (cldn9) por 30 seg, 72°C por 40 seg, y 7 min a 72°C. El producto se resolvió en geles de agarosa al 1%.

Ensayo de regeneración de herida. 1×10^5 células AGS transfectadas con los vectores para la sobreexpresión de las claudinas-2, -6, -7 y -9 y sin transfectar se colocaron en placas de 6 pozos y se incubaron hasta alcanzar confluencia. Una vez que alcanzaron la confluencia se realizó una herida con la punta de una micropipeta y nuevamente se incubaron nuevamente para ver la regeneración celular en la zona afectada. Las imágenes del estado de la herida se capturaron al inicio y a las 2, 4, 6, 12, 24 y 36 h.

Ensayo de incorporación de BrdU. Para detectar la velocidad de proliferación de las células se empleó el kit BrdU Cell Proliferation (Calbiochem) y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente $100 \mu\text{L}$ de una suspensión de 1×10^4 células/mL de células AGS o MCF-7 se colocaron en placas de 96 pozos y se incubaron por 4 h para permitir su adhesión. Después de este tiempo se adicionaron 20 mL de la solución de BrdU y las placas se incubaron por 24h a 37°C con $5\% \text{ CO}_2$. Transcurrido este tiempo las células se fijaron y desnaturalizaron con $100 \mu\text{L}$ de la solución desnaturalizante y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Se adicionaron $100 \mu\text{L}$ por pozo de anti-BrdU (1:100) y las placas se incubaron a temperatura ambiente por 1h. Se lavó el exceso de anticuerpo y se adicionaron $100 \mu\text{L}$ del anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:1000) y se incubó por 30 min más. Se retiró y lavó el exceso de anticuerpo, se reveló y detectó la cantidad de BrdU

incorporada midiendo a 490 nm. La velocidad de proliferación de las células se registró capturando imágenes de las células a diferentes tiempos.

Ensayo de migración en Matrigel (BD). Antes de iniciar el trabajo con las células, los insertos con Matrigel se rehidrataron adicionando 0.5 mL de medio tibio e incubando por 2 h a 37°C y 5% CO₂. Se adicionaron 750 µL de medio con 5% de SFB a cada pozo de una placa de 24 pozos para servir como quimioatrayente y se colocó en cada pozo un inserto con Matrigel. En cada inserto se sembraron 2.5×10^4 células AGS o MCF-7. La placa se incubó por 36 h a 37°C y 5% CO₂ para permitir la migración de las células. Las células que no migraron y el Matrigel se removieron tallando ligeramente con un hisopo. Las células que migraron se detectaron en la membrana del inserto mediante la tinción con azul de Toluidina al 1%. Se contaron las células presentes en cuatro campos diferentes de cada una de las membranas empleadas.

Análisis estadístico. Todos los valores se expresan como promedio \pm desviación estándar (SD). Para evaluar si las diferencias observadas entre dos grupos eran significativas se empleó un análisis de T- de Student. Se consideró como diferencia significativa si $p < 0.05$.

Resultados:

Como primera instancia, se caracterizaron las propiedades funcionales que la sobreexpresión de las claudinas 2, 6, 7 y 9 confieren a la línea celular epitelial no transformada LLC-PK₁ y a las líneas celulares epiteliales transformadas AGS y MCF-7.

La línea celular epitelial LLC-PK₁ ha sido empleada por varios grupos para estudiar el funcionamiento y la regulación de las UE, sin embargo, no se tenía claro el perfil de expresión de las diferentes claudinas en esta línea celular. De igual manera, el patrón de expresión de las claudinas en las líneas celulares AGS y MCF-7 no se encontraba disponible en la bibliografía. Por esta razón, se caracterizó la expresión de estas proteínas, con diferentes anticuerpos disponibles en el mercado.

a) Análisis de la expresión de claudinas en la línea celular LLC-PK₁.

Se realizó un fraccionamiento celular para la detección de las diferentes claudinas endógenas presentes en las células LLC-PK₁. De las 14 claudinas probadas, se detectó la expresión de las claudinas 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 y 16 en extractos totales de la línea celular LLC-PK₁ (Figura 3).

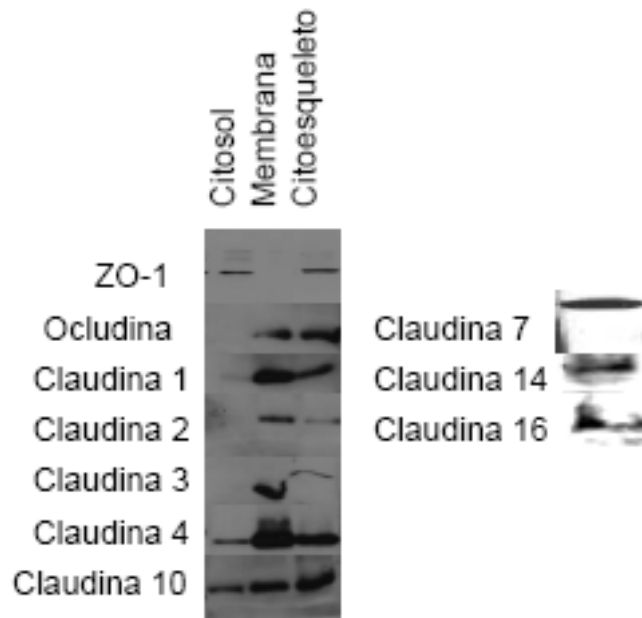


Figura 3. Perfil de expresión de las claudinas en la línea celular LLC-PK₁.

El lado izquierdo de la figura muestra el análisis por WB de las fracciones celulares obtenidas, marcadas como citosol, membrana y citoesqueleto. La figura de la derecha muestra los resultados obtenidos de extractos totales. Debido a que todas las claudinas tienen pesos moleculares similares, para la detección de cada una se empleó una membrana diferente. Se observa que las células LLC-PK₁ expresan de manera endógena a las claudinas 1, 2, 3, 4 y 10 principalmente en la fracción asociada a membrana, también denominada soluble en Tritón X-100. La expresión de las claudinas 7, 14 y 16 también se detectó en extractos totales de esta línea celular.

b) Análisis de la expresión de las claudinas en las líneas celulares transformadas AGS y MCF-7.

Varios reportes mencionan que las células AGS, por ser células transformadas, no forman contactos celulares funcionales, aún cuando expresan proteínas de UE^{81,90,91}. Las claudinas en esta línea celular no se encuentran localizadas en las regiones de contacto célula-célula, sino en el citosol. Por esta razón se decidió determinar la expresión de las diferentes claudinas en extractos celulares totales. De las 14 claudinas probadas, se detectó la expresión de las claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10, aunque en menor cantidad en las células MCF-7 que en las AGS (Figura 4).

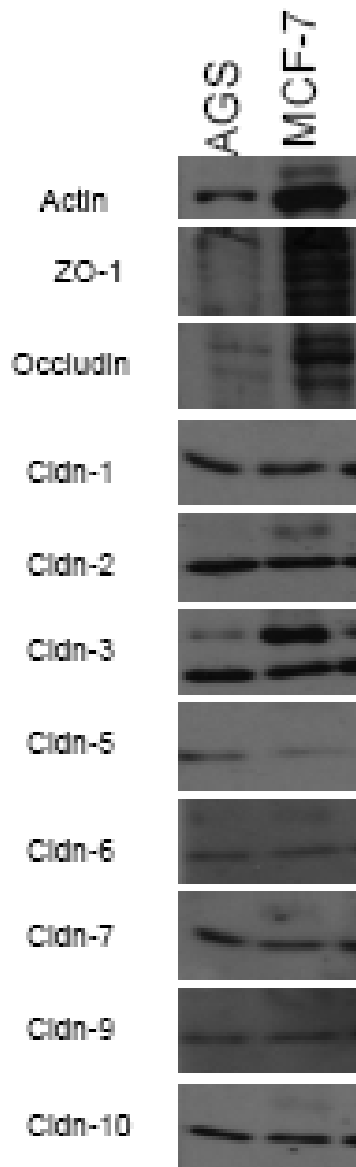


Figura 4. Perfil de expresión de las claudinas en células AGS y MCF-7. Se muestra el análisis por WB de extractos totales de ambas líneas celulares. Debido a que las células MCF-7 expresan a las claudinas en menor cantidad, se cargó en el gel el doble de proteína (50 μ g) para las células AGS (25 μ g).

Ambas líneas celulares expresan de manera endógena a las claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10.

c) Transfección de células LLC-PK₁, AGS y MCF-7 con vectores para la sobreexpresión de las claudinas 6, 7 y 9 acopladas a GFP.

Se empleó el vector TOPO pcDNA3.1/NT-GFP como base para la construcción de los plásmidos denominados pcln6GFP, pcln7GFP y pcln9GFP. Estos plásmidos se transfectaron en las tres líneas celulares. Para poder observar la función de compuerta conferida por las claudinas exógenas, éstas deben localizarse en regiones de contacto celular. La adición de la proteína GFP en la región C-terminal de las claudinas podría afectar su localización membranal, por esta razón se decidió añadir a la GFP en la región N-terminal. Para analizar si la proteína GFP no afecta la integración de las claudinas a la membrana plasmática, se observaron las células LLC-PK₁ transfectadas por microscopía confocal (Figura 5).

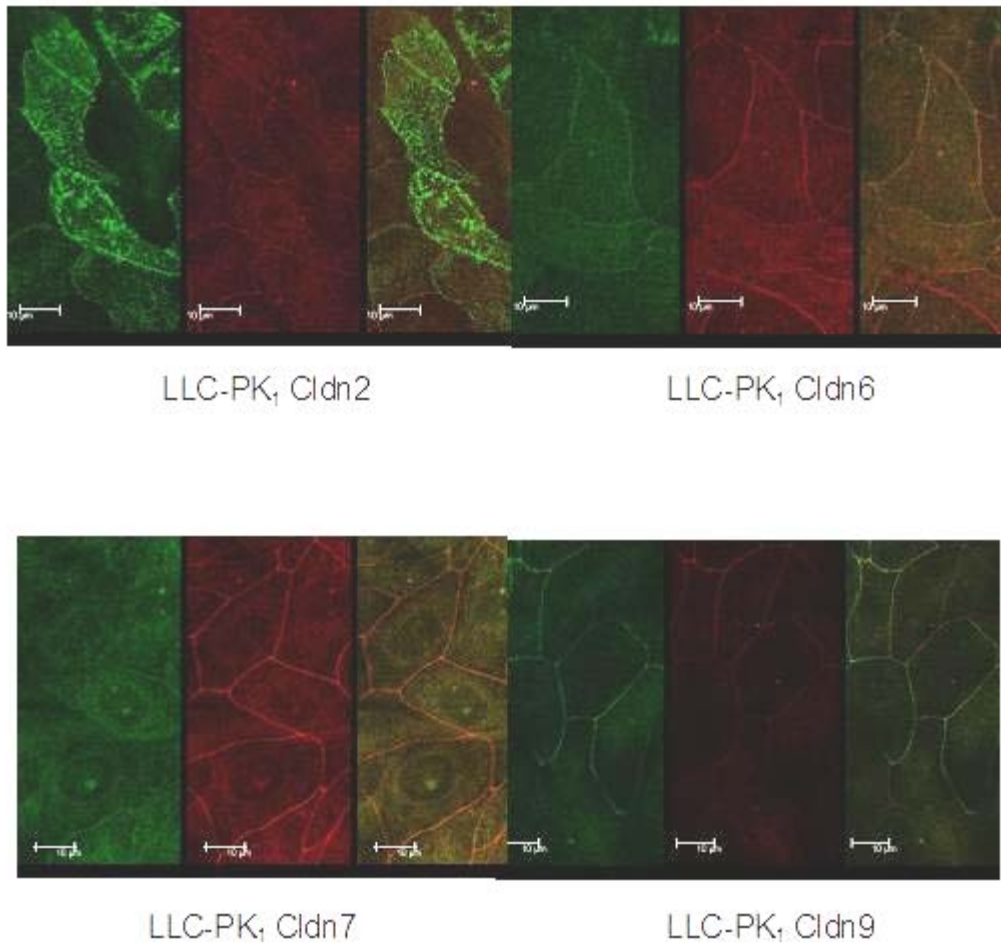


Figura 5. Las claudinas exógenas se localizan en la membrana plasmática de las células LLC-PK₁. De cada grupo de células transfectadas con los diferentes vectores se muestran tres imágenes. En cada juego de imágenes se muestra primero a la izquierda a la claudina sobreexpresada en verde. La imagen de en medio muestra en rojo el marcador de membrana FM464. La tercer imagen muestra la superposición de ambas imágenes, el color amarillo demuestra la localización en la membrana de las claudinas exógenas.

De igual manera, se determinó por microscopía confocal la localización de las claudinas exógenas en las líneas celulares AGS y MCF-7 (Figura 6). En este caso, las claudinas 2, 6, 7 y 9 no se localizan en las regiones de contacto celular, lo que sugiere la falta de funcionalidad de las UE y probablemente de otras uniones celulares en estas células.

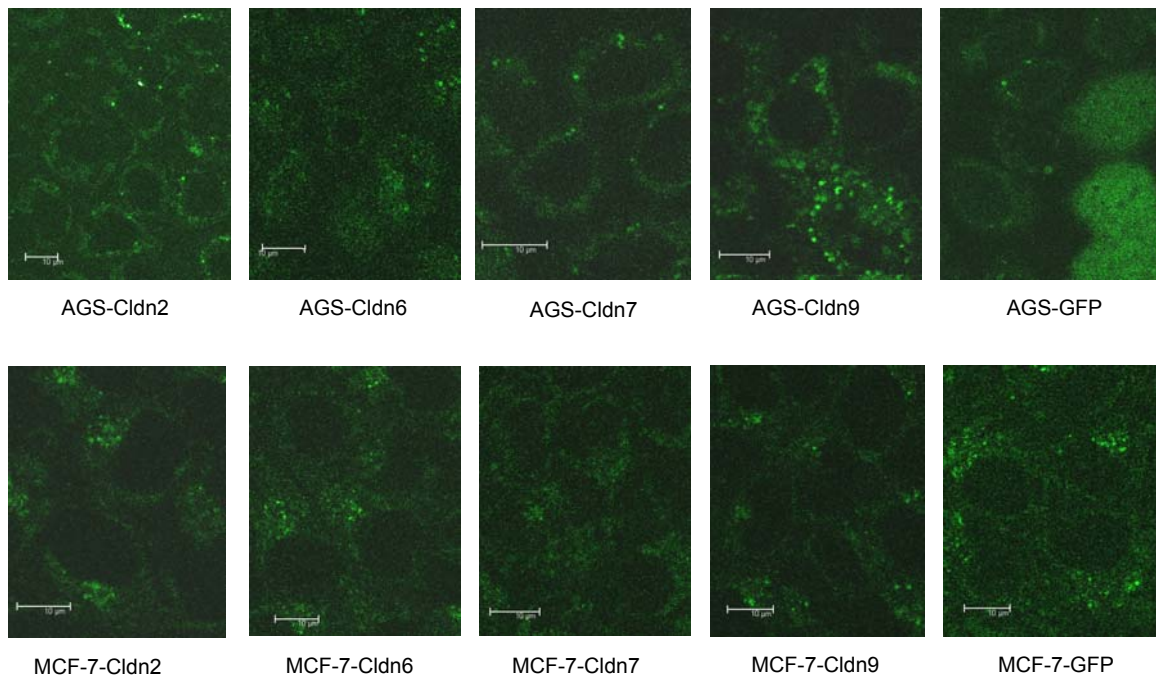


Figura 6. Sobreexpresión de las claudinas 2, 6, 7 y 9 en células AGS y MCF-7. La línea celular AGS no forma UE funcionales, por lo que es incapaz de integrar a las claudinas sobreexpresadas en la membrana plasmática. Al igual que las células AGS, la línea celular MCF-7 no localiza a las claudinas sobreexpresadas en las regiones de contacto célula-célula.

La detección por RT-PCR de los niveles de mRNA de las diferentes claudinas en las células transfectadas (Figuras 7 y 8) y el análisis por Western

Blot de los extractos celulares totales (Figuras 9 y 10), demuestran la expresión de estas proteínas en ambas líneas celulares. La detección por Western-Blot se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína GFP (Figuras 9 y 10), así como contra cada una de las claudinas transfectadas (Figuras 11 y 12).

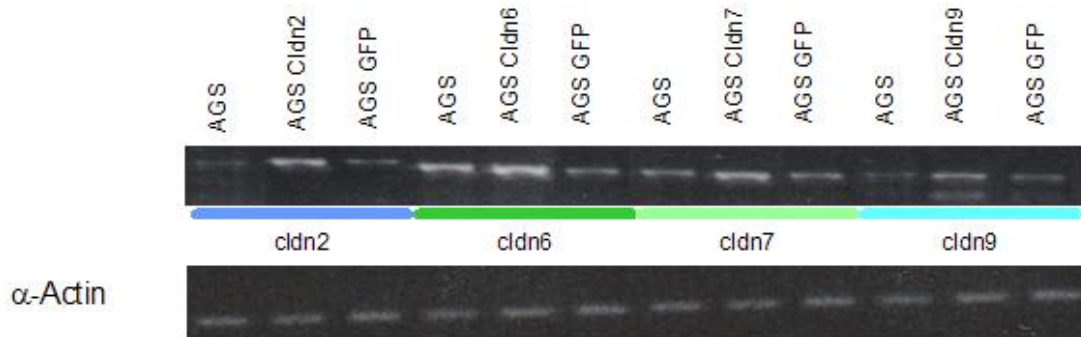


Figura 7. Detección de los niveles de mRNA de las claudinas sobreexpresadas en las células AGS. Se realizó RT-PCR para verificar si las líneas celulares presentan niveles elevados de mRNA de las claudinas transfectadas. Se empleó el RNA total extraído de las células control sin transfectar (AGS), de las células control transfectadas con el vector vacío (AGS GFP) y de las células transfectadas con el vector específico de cada claudina. Se empleó a la α -actina como control de carga.

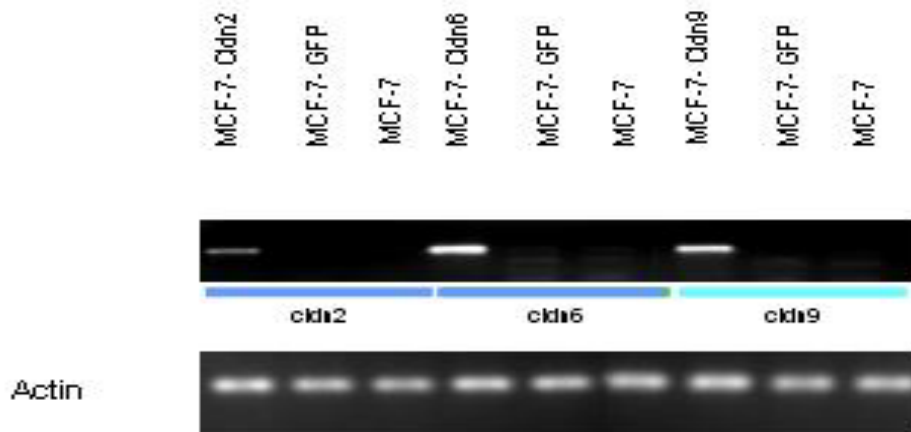


Figura 8. Detección de los niveles de mRNA de claudinas sobreexpresadas en las células MCF-7. Se realizó RT-PCR para analizar si las líneas celulares presentan niveles elevados de mRNA de las claudinas transfectadas. Se empleó el RNA total extraído de las células control sin transfectar (MCF-7), de las células control transfectadas con el vector vacío (MCF-7 GFP) y de las células transfectadas con el vector específico de cada claudina. Se empleó a la α -actina como control de carga.

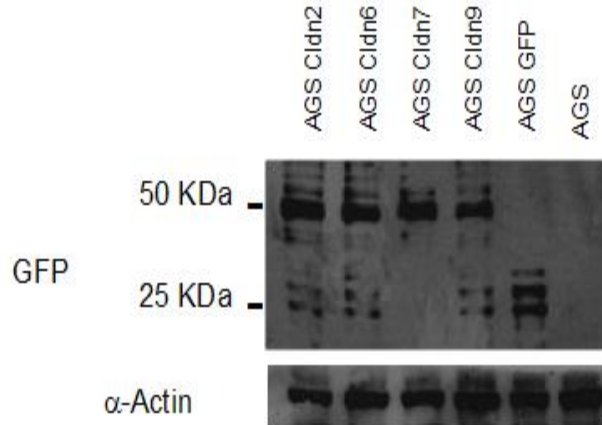


Figura 9. Detección de las claudinas exógenas en las células AGS mediante Western Blot usando anticuerpos contra la proteína GFP. A partir de extractos totales se detectó una banda de alrededor de 50 KDa que corresponde a las claudinas exógenas fusionadas a la proteína GFP. Las células transfectadas con el vector vacío (AGS GFP) muestran solo a la banda característica de la proteína GFP de alrededor de los 25 KDa. Las células control sin transfectar no presentan a esta proteína.

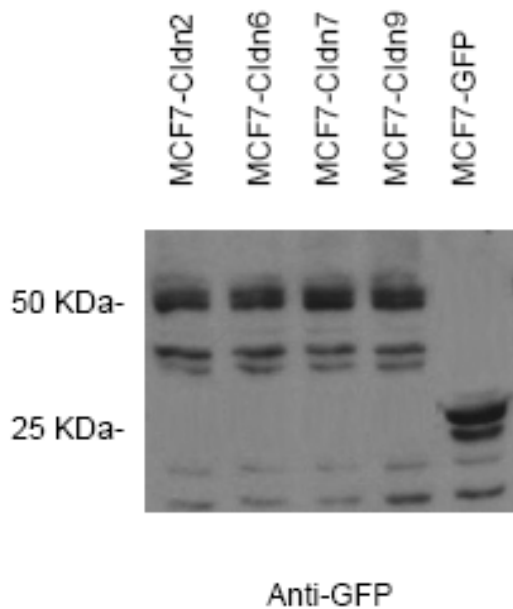


Figura 10. Detección de las claudinas exógenas en las células MCF-7 mediante Western Blot usando anticuerpos contra la proteína GFP. A partir de extractos totales se detectó una banda de alrededor de 50 KDa que corresponde a las claudinas exógenas fusionadas a la proteína GFP. Las células transfectadas con el vector vacío (MCF-7 GFP) muestran solo a la banda característica de la proteína GFP de alrededor de los 25 KDa. Las células control sin transfectar no presentan a esta proteína.

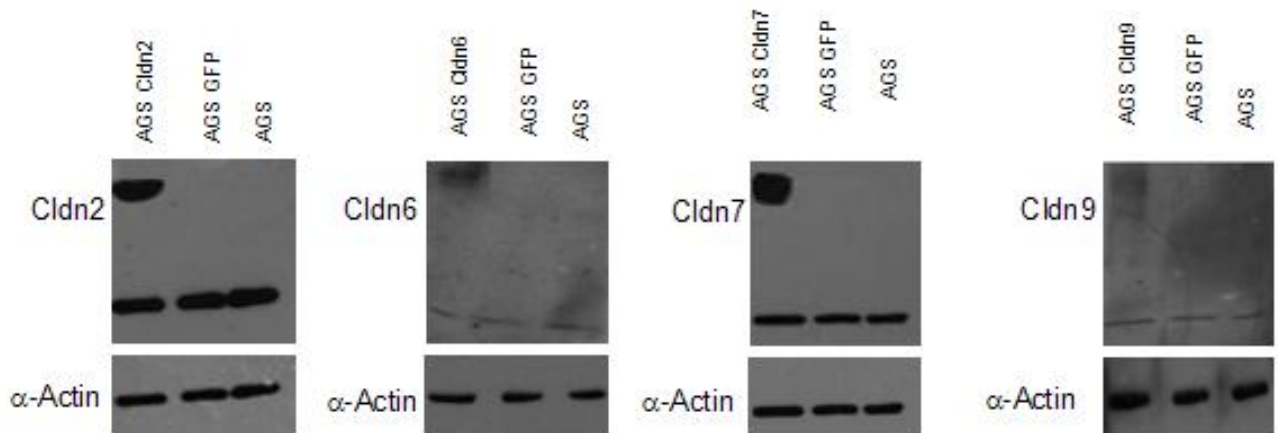


Figura 11. Western blot de las claudinas exógenas en las células AGS. En los extractos totales de las células transfectadas, se detecta una banda de alrededor de 50 KDa que corresponde a las claudinas exógenas fusionadas a la proteína GFP, así como la banda de aproximadamente 25 KDa que corresponde a las claudinas endógenas. Las células transfectadas con el vector vacío (AGS GFP) y las células control sin transfectar, muestran sólo a la banda característica de la claudina endógena analizada (de alrededor de los 25 KDa).

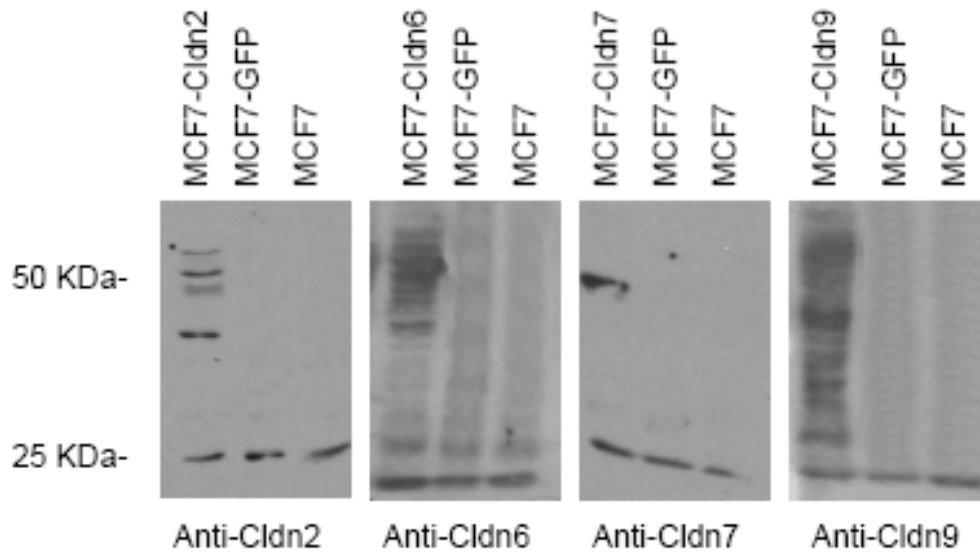


Figura 12. Western blot de las claudinas exógenas en las células MCF-7.

En los extractos totales de las células transfectadas, se detecta una banda de alrededor de 50 KDa que corresponde a las claudinas exógenas fusionadas a la proteína GFP, así como la banda de aproximadamente 25 KDa que corresponde a las claudinas endógenas. Las células transfectadas con el vector vacío (MCF-7 GFP) y las células control sin transfectar, muestran sólo a la banda característica de la claudina endógena analizada (de alrededor de los 25 KDa).

I. FUNCIONALIDAD DE LAS CLAUDINAS 2, 6, 7 Y 9.

a. Función de compuerta de las claudinas 2, 6, 7 y 9 en las células LLC-PK₁

Debido a que la propiedad de compuerta paracelular de los epitelios depende de las claudinas, se espera que al modificar el patrón de expresión de estas proteínas esta propiedad se altere. Los cambios en la función de

compuesta pueden ser cuantificados mediante la resistencia eléctrica transepitelial (TER), el flujo paracelular (PCF) de moléculas no cargadas, como el manitol, y la permeabilidad a iones. La sobreexpresión de la claudina 7 en la línea celular LLC-PK₁ indujo un incremento en la TER con respecto a las células transfectadas con GFP (control), mientras que la sobreexpresión de las claudinas 6 y 9 no produjo efecto alguno sobre la TER (Figura 13).

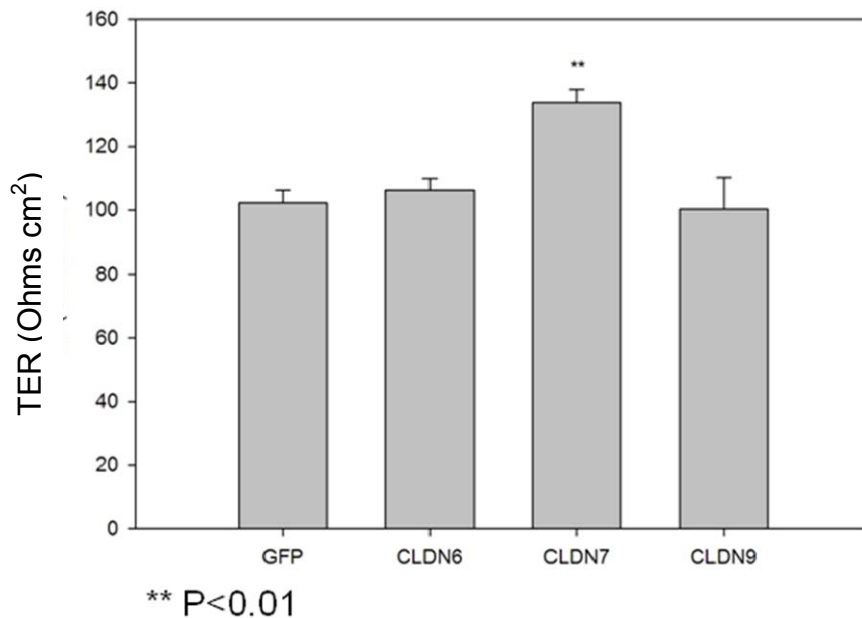


Figura 13. Resistencia eléctrica transepitelial de células LLC-PK₁ transfectadas con vectores de expresión para las distintas claudinas. La sobreexpresión de la claudina 7 induce un incremento en la TER de las células LLC-PK₁, mientras que las claudinas 6 y 9 no tienen efecto alguno sobre esta propiedad.

El PCF de pequeñas moléculas no cargadas, no se afectó por la sobreexpresión de ninguna de las claudinas probadas (Figura 14).

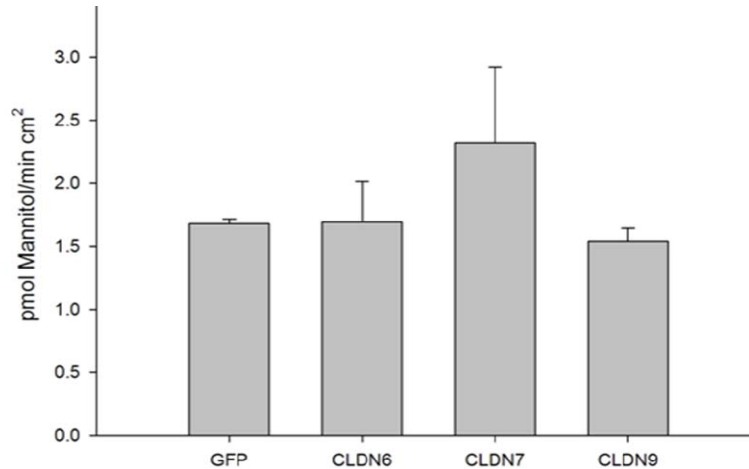


Figura 14. Flujo paracelular de ¹⁴C-Manitol a través de células LLC-PK₁ que sobreexpresan a distintas claudinas. La sobreexpresión de las claudinas no provocó cambios en la permeabilidad al manitol.

La permeabilidad tanto a Na⁺ como a Cl⁻ disminuyó al sobreexpresar a la claudina 7 en las células LLC-PK₁. La transfección con las claudinas 2 y 6 indujo una ligera disminución en la permeabilidad al Cl⁻ y la sobreexpresión de claudina 9 no indujo modificación alguna a la permeabilidad de las UE para estos iones (Figura 15 y 16). La sobreexpresión de estas claudinas no hizo que se perdiera la selectividad característica a aniones de la línea celular (Figura 17).

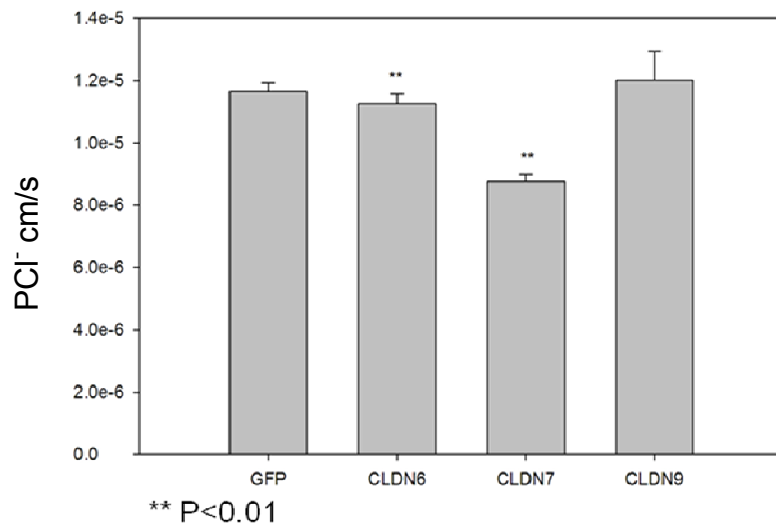


Figura 15. Permeabilidad a Cl⁻ a través de células LLC-PK₁ transfectadas.

La sobreexpresión de las claudinas 6 y 7 produce una reducción estadísticamente significativa de la permeabilidad a Cl⁻. En cambio la sobreexpresión de la claudina 9 no produce efecto alguno sobre la permeabilidad a Cl⁻.

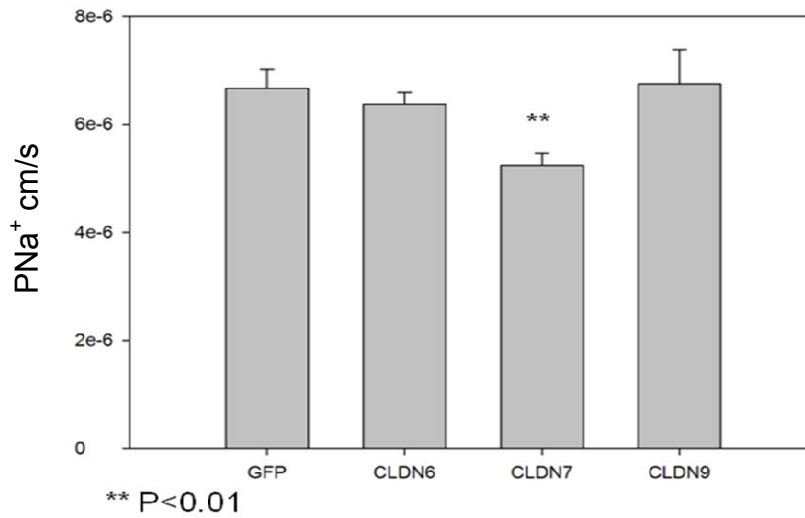


Figura 16. Permeabilidad a Na^+ en células LLC-PK₁ transfectadas. Únicamente la sobreexpresión de la claudina 7 indujo una disminución en la permeabilidad de Na^+ .

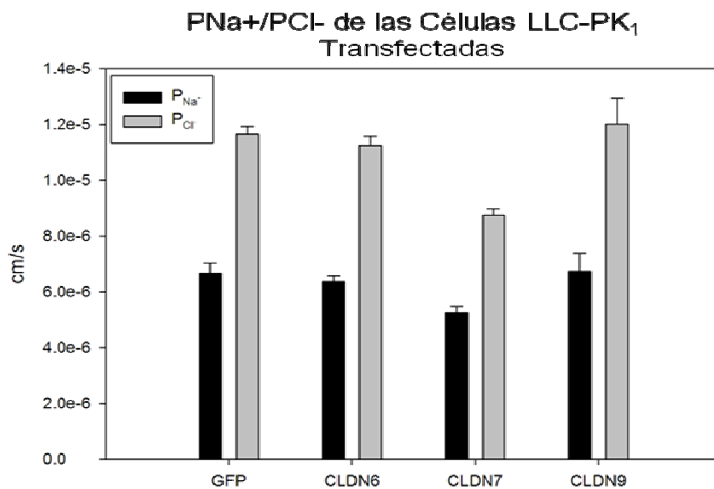


Figura 17. Comparación de la permeabilidad a Na^+ y Cl^- en células transfectadas con distintas claudinas. La línea celular LLC-PK₁ es permeable a aniones. La sobreexpresión de las claudinas 6, 7 o 9 en esta línea celular no revierte esta característica.

II. Papel biológico de las claudinas 2, 6, 7 y 9 en las células AGS

La función de barrera en las células AGS y MCF-7 se encuentra alterada, lo que impide hacer mediciones de TER y PCF. Por ello se evaluó la capacidad de migración, invasión y proliferación de estas líneas celulares.

a. Efecto de la sobreexpresión de las claudinas en la proliferación y migración de las células AGS. Mediante un ensayo de regeneración de una herida se observó que las células AGS que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9 son capaces de poblar nuevamente la zona afectada en menor tiempo que las células control, transfectadas con GFP solamente, y sin transfectar (Figura 18). Es importante resaltar que las células AGS que sobreexpresan a la claudina 9 inician el proceso de regeneración de herida a las 12 h, en comparación con las 24 h que necesitan las células que sobreexpresan a la claudina 6. El proceso de reparación de la herida fue evidente para las células que sobreexpresan a las claudinas 2 y 7 hasta las 36 h, mientras que las células control requieren de 48 h para cerrar la herida.

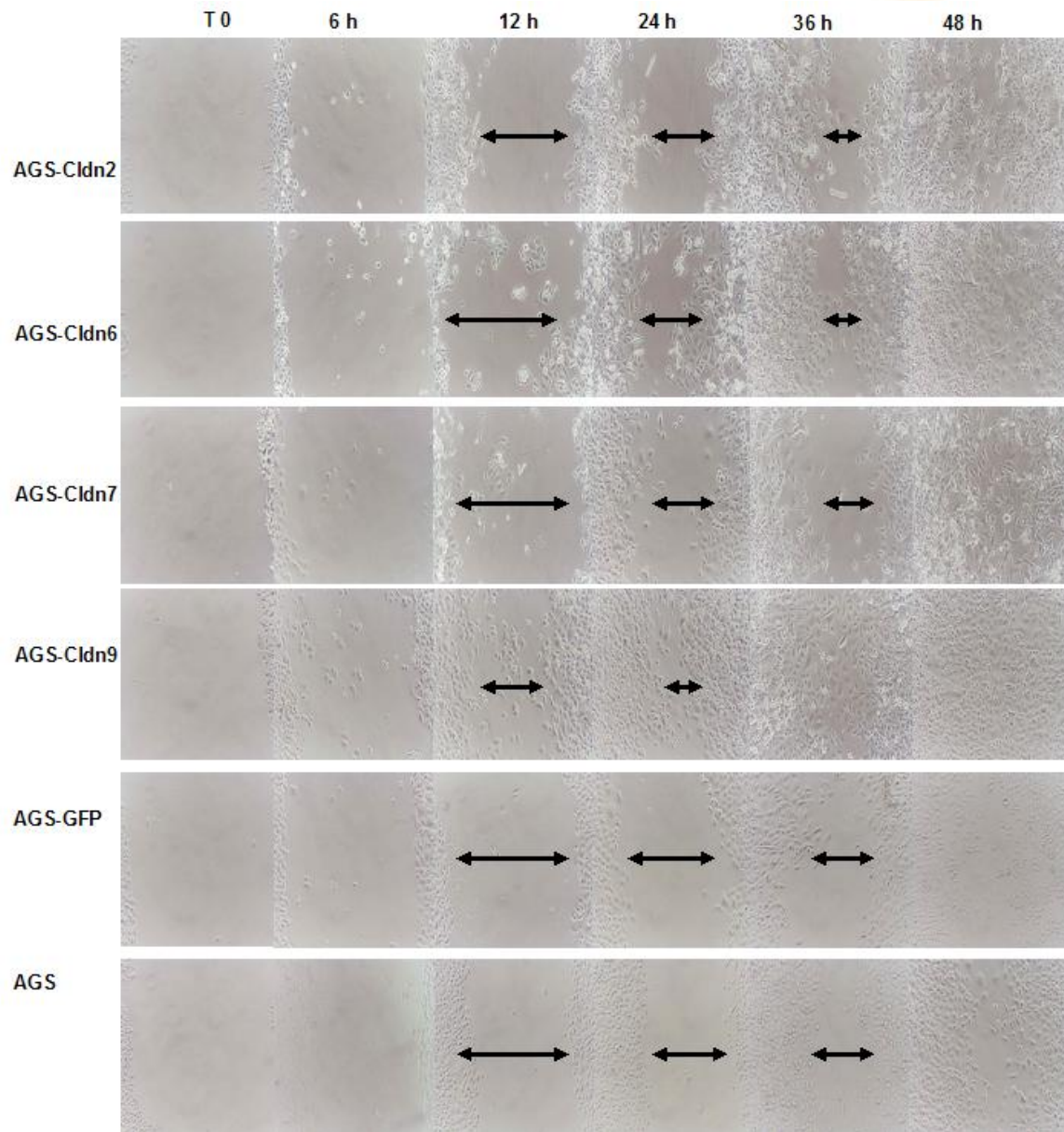


Figura 18. Migración de las células AGS transfectadas con diferentes claudinas. La velocidad de regeneración de la herida en las células AGS que sobreexpresan a las diferentes claudinas fue mayor que en las células control. Las células transfectadas con claudina 9 migraron a mayor velocidad, y regeneraron la herida completamente a las 36 h.

La capacidad de invasión de las células se evaluó en insertos cubiertos de Matrigel. Ésta es una matriz rica en factores de crecimiento, proteínas de matriz extracelular, enzimas e inhibidores de la degradación de la matriz extracelular (Figura 19). La sobreexpresión de las claudinas 2, 7 y 9 incrementó significativamente la capacidad de migración de las células AGS. Los resultados cuantitativos de estos ensayos se muestran en la Figura 20. Se observa que las células AGS transfectadas con la claudina 2 muestran un incremento de 4.4 veces en la invasión en comparación con las células control. La sobreexpresión de la claudina 7 en las células AGS incrementa 3.4 veces la capacidad de invasión de estas células, mientras que la sobreexpresión de las claudinas 6 y 9 incrementa solamente en 1.6 y 2 veces respectivamente esta capacidad de invasión.

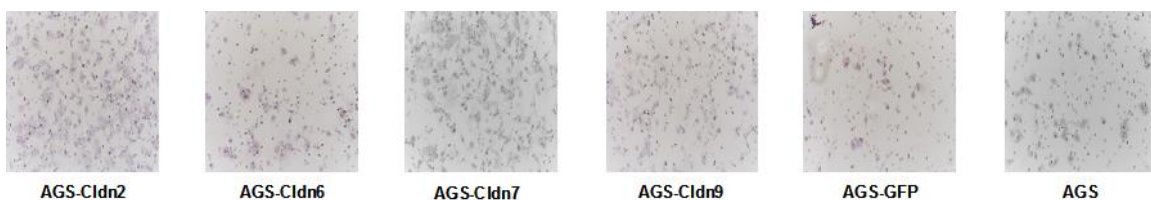
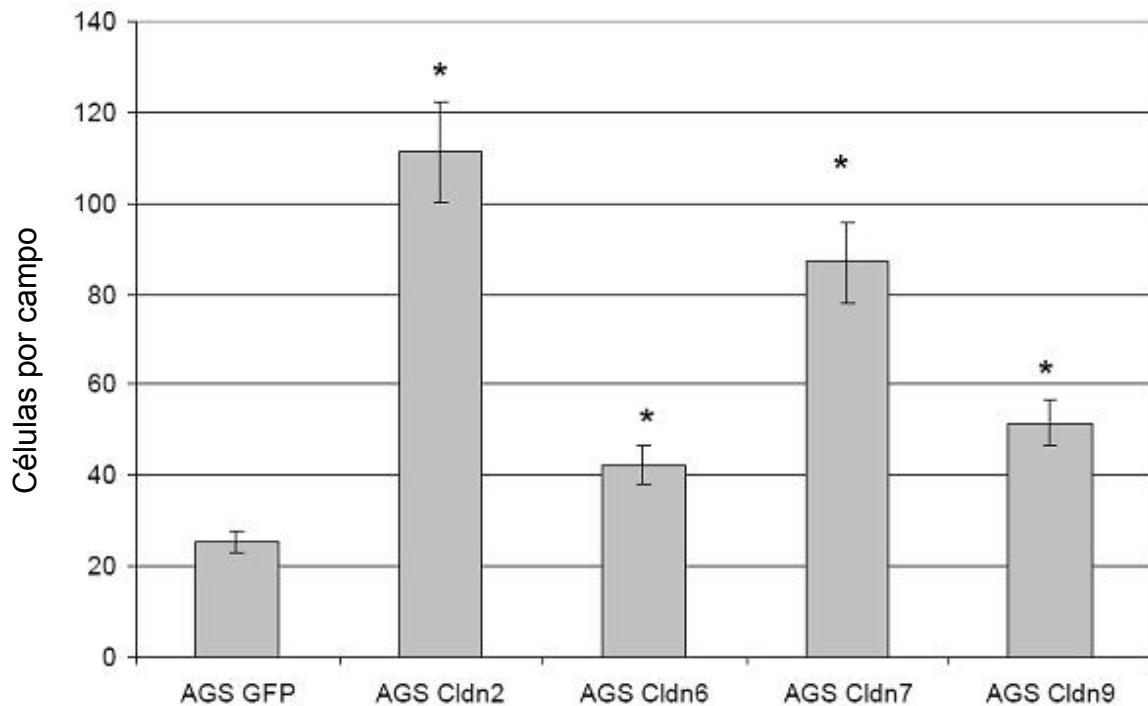


Figura 19. Invasión de Matrigel por las células AGS que sobreexpresan diferentes claudinas. La capacidad de invasión de las células que sobreexpresan a las diferentes claudinas fue mayor que en las células control.

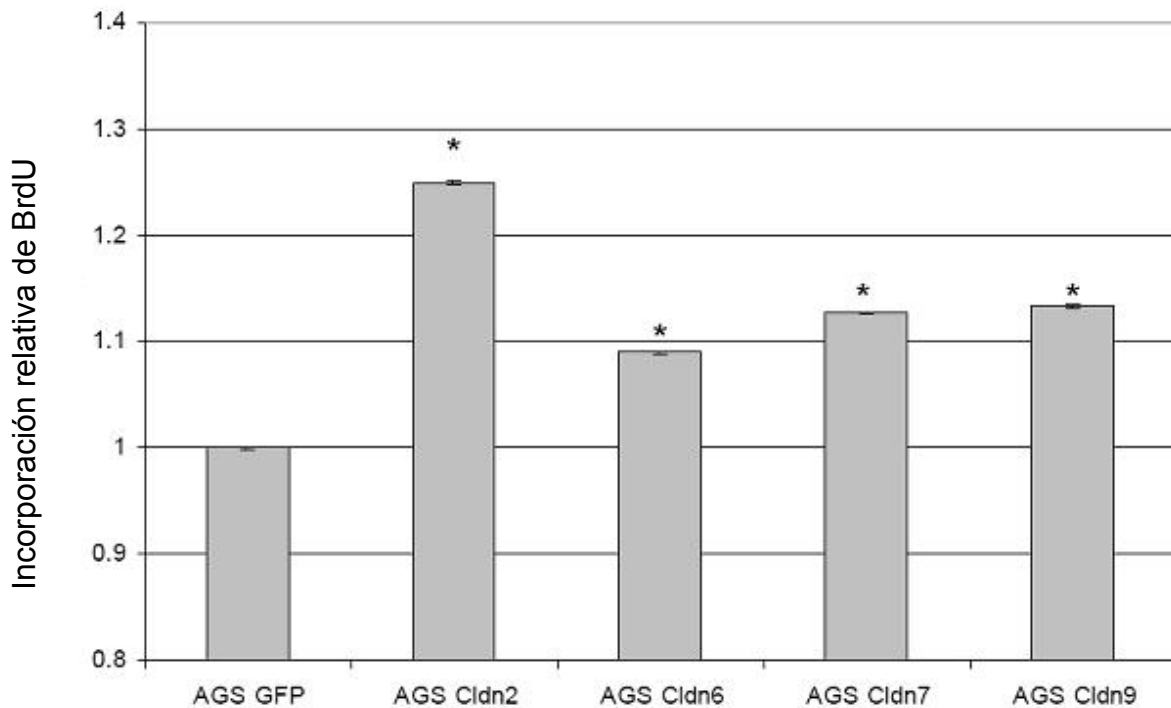


*P<0.01

Figura 20. Representación gráfica de la invasión de Matrigel por las células AGS que sobreexpresan a las diferentes claudinas. La invasividad de las células AGS que sobreexpresaban a la claudina 2 fue 4.4 veces mayor en comparación con las células control. Las células que sobreexpresan a la claudina 6 muestran un menor incremento en la capacidad de invasión, pero este efecto aún es significativo.

Debido a que en el proceso de regeneración de una herida está involucrada tanto la velocidad de proliferación de las células como la capacidad de migración de las mismas, se evaluó la proliferación celular mediante la

incorporación de BrdU y se registró el crecimiento de las mismas a partir de una misma densidad celular (Figura 21). La sobreexpresión de las claudinas 2, 6, 7 y 9 incrementa la proliferación de las células AGS. Este incremento se asocia con el aumento en la capacidad de migración e invasión de las células transfectadas. Las células AGS que sobreexpresan a la claudina 2 muestran un incremento de 24.9% en la proliferación, mientras que las células AGS que sobreexpresan a las claudinas 6, 7 y 9 incrementaron su velocidad de proliferación en un 9, 12.7 y 13.3% respectivamente. En todos los casos el incremento en la proliferación fue estadísticamente significativo ($p < 0.01$).



*P<0.01

Figura 21. Proliferación de las células AGS transfectadas con las diferentes claudinas. La sobreexpresión de las diferentes claudinas en las células AGS incrementa la proliferación de esta línea celular.

Los cambios en la capacidad de migración e invasión de las células AGS podría asociarse a cambios en la polimerización de los filamentos de actina, por lo que se estudió por inmunofluorescencia la presencia de fibras de estrés en las células AGS que sobreexpresan las diferentes claudinas (Figura 22). Las células que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9 forman una mayor cantidad de fibras de estrés que las células control. La sobreexpresión de las claudinas 6 y 9 indujo la formación de pseudopodia y filipodia en las células AGS.

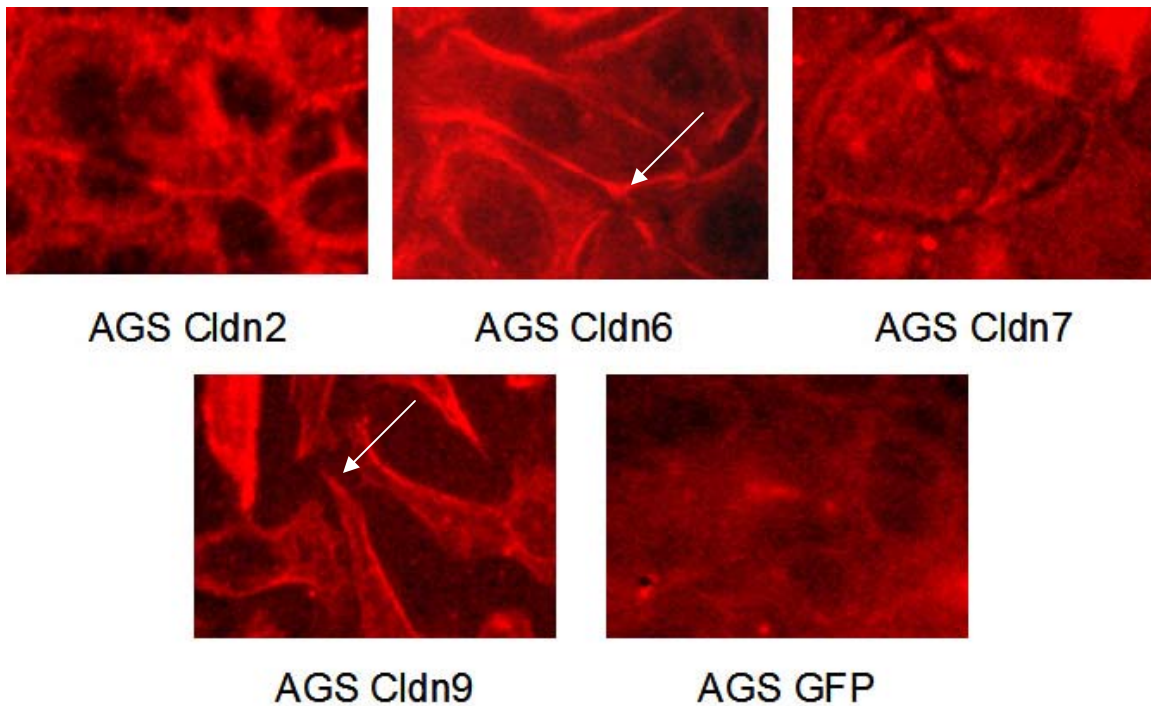


Figura 22. Polimerización de los filamentos de actina en las células AGS que sobreexpresan a las diferentes claudinas. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal muestran en rojo a los filamentos de actina. La sobreexpresión de las claudinas 6 y 9 indujo la formación de pseudopodia y filipodia, indicadas con una flecha.

La activación de pro-metaloproteinasas por las claudinas 1 y 5 ha sido previamente descrita^{60,70,83,92}. Por ello pensamos que la sobreexpresión de estas claudinas podría dar lugar a la activación de metaloproteinasas (MMP), y en consecuencia, al incremento en la capacidad de invasión de las células. Se realizó un zimograma con gelatina para determinar si la sobreexpresión de las

claudinas 2, 6, 7 o 9 afecta a los niveles de expresión de Pro-MMP2 o Pro-MMP9. La sobreexpresión de las claudinas 2, 6 y 9 incrementó significativamente la expresión de Pro-MMP9 (Figura 23.)

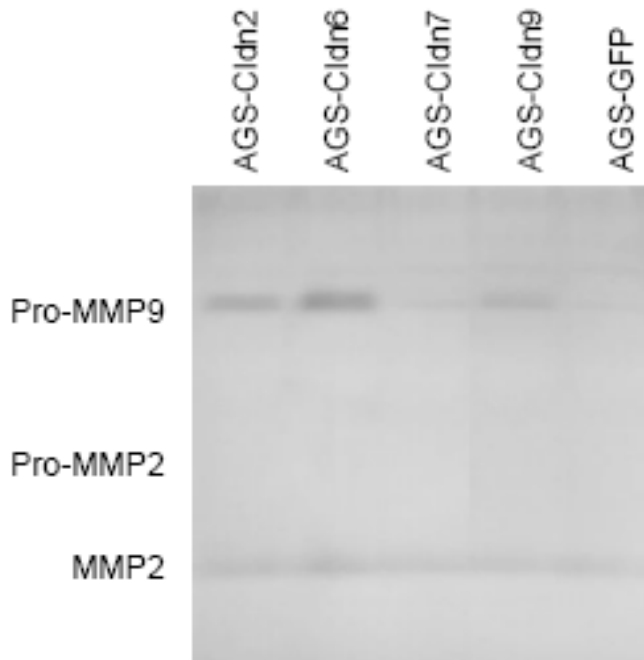


Figura 23. Zimograma de los sobrenadantes de las células AGS transfectadas con las diferentes claudinas. Se incrementó la expresión de Pro-MMP9 en las células AGS que sobreexpresan a las claudinas 2, 6 y 9.

b. Expresión y localización de ZO-1, ocludina y claudina-1 en células AGS transfectadas. La sobreexpresión de ciertas proteínas de la UE afecta el nivel de expresión y localización de otras proteínas de este mismo complejo. Por ello se evaluó el nivel de mRNA de la claudina 1 en las células transfectadas (Figura 24). La sobreexpresión de las claudinas 2, 6, 7 y 9 indujo un aumento en el nivel de expresión de mRNA de la claudina 1.

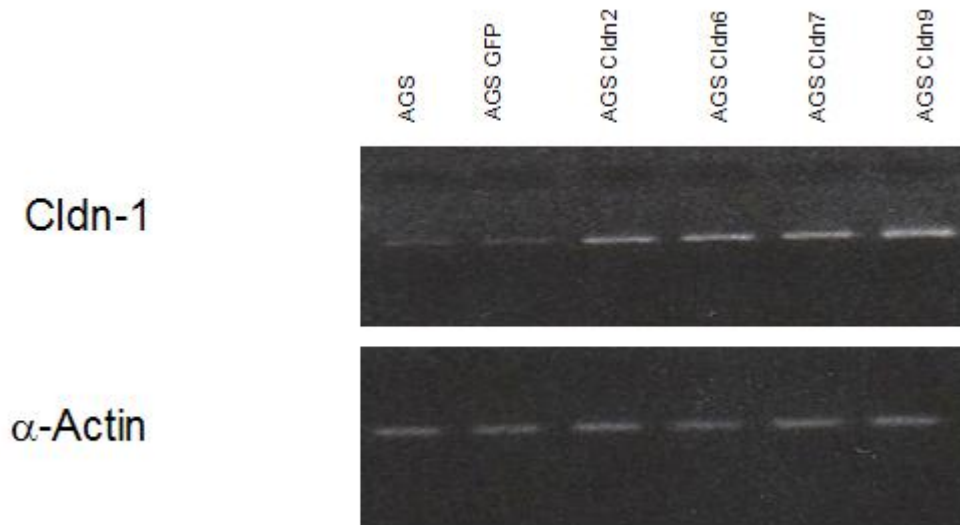


Figura 24. RT-PCR para determinar la expresión de mRNA de la claudina 1 en las células AGS transfectadas con las diferentes claudinas. Se realizó RT-PCR para analizar si las células AGS transfectadas presentan niveles elevados de mRNA de la claudina 1. Se empleó el RNA total extraído de las células control sin transfectar (AGS), de las células control transfectadas con el vector vacío (AGS GFP) y de las células transfectadas con el vector específico de cada claudina. Se empleó a la α -actina como control de carga. La sobreexpresión de todas las claudinas estudiadas incrementó el nivel de mRNA de la claudina 1 en las células AGS.

Se analizaron también los niveles de expresión de las proteínas claudina 1, ocludina y ZO-1 (Figura 25). La sobreexpresión de las claudinas 2, 6, 7 y 9 indujo un claro aumento en la expresión de la claudina 1 y un ligero incremento de ocludina. La sobreexpresión de las claudinas 2 y 6 incrementó considerablemente la expresión de ZO-1.

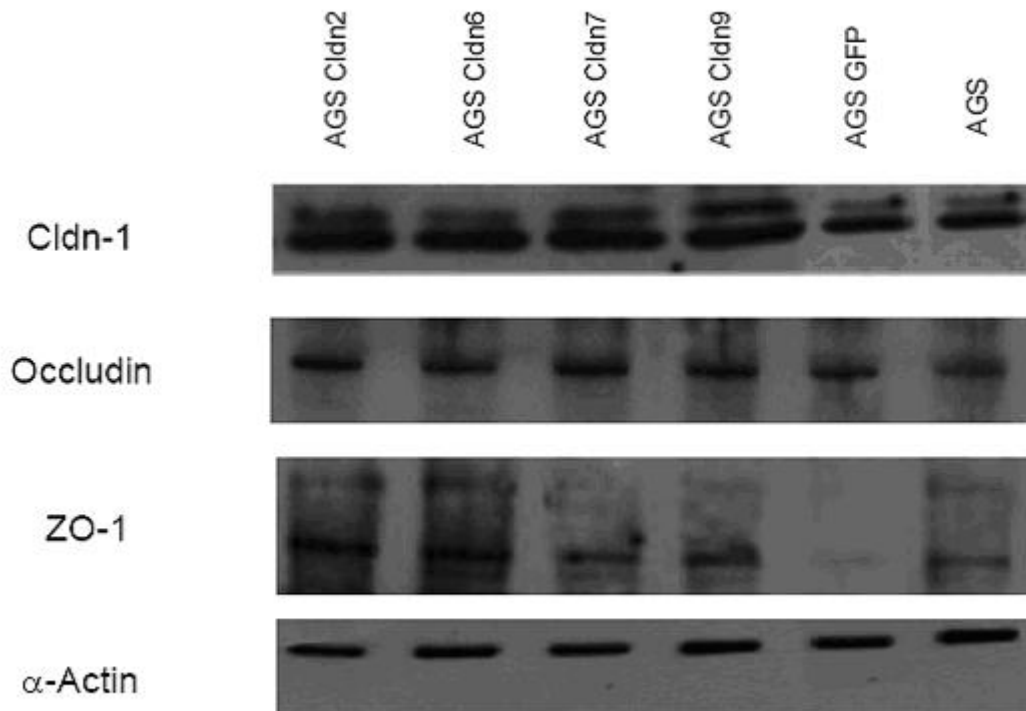


Figura 25. Análisis por Western Blot de la expresión de la claudina 1, ocludina y ZO-1 en las células AGS que sobreexpresan a diferentes claudinas. Con los extractos totales de las células transfectadas, se analizaron los niveles de expresión de la claudina 1, ocludina, ZO-1 y como control de carga se empleó a la α -actina. El nivel de expresión de la claudina 1 es mayor en las células AGS transfectadas para la sobreexpresión de las claudinas en estudio. El nivel de expresión de ocludina incrementa ligeramente, mientras que la expresión de ZO-1 aumentó únicamente al sobreexpresar a las claudinas 2 y 6 en esta línea celular.

La localización subcelular de la claudina 1 se determinó por microscopía confocal (Figura 26). Los niveles de expresión de esta proteína son mayores en

las células transfectadas con las claudinas 2, 6, 7 y 9. Además se pierde la localización nuclear de la claudina 1 observada en las células control.

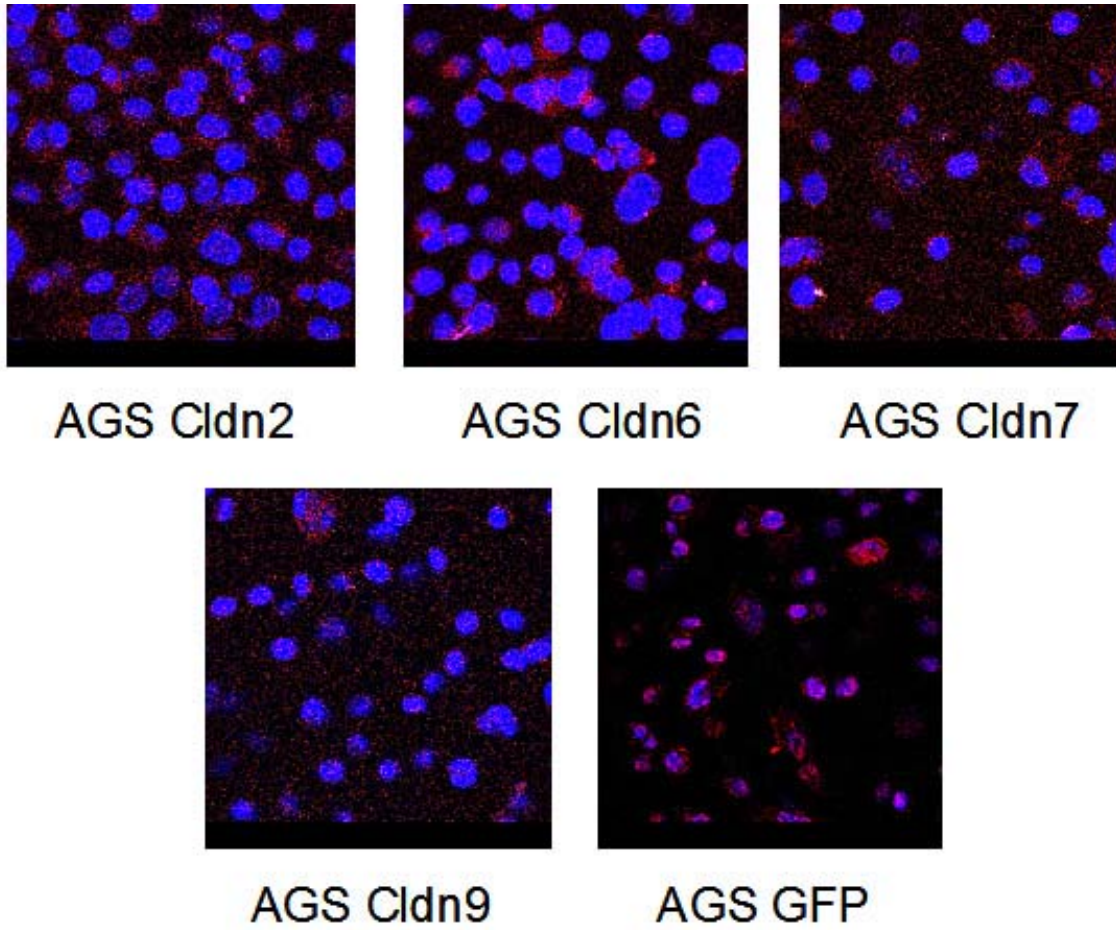


Figura 26. Localización de la claudina 1 en las células AGS control y que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9. Se realizó una inmunofluorescencia para la detección de la claudina 1 en las células transfectadas (rojo). Se empleó DAPI para la tinción nuclear (azul).

En las células que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9, la localización de ZO-1 se modifica al integrarse en mayor medida a la membrana plasmática que en las células control. Este efecto es más evidente en las células que sobreexpresan a las claudinas 7 y 9 (Figura 27).

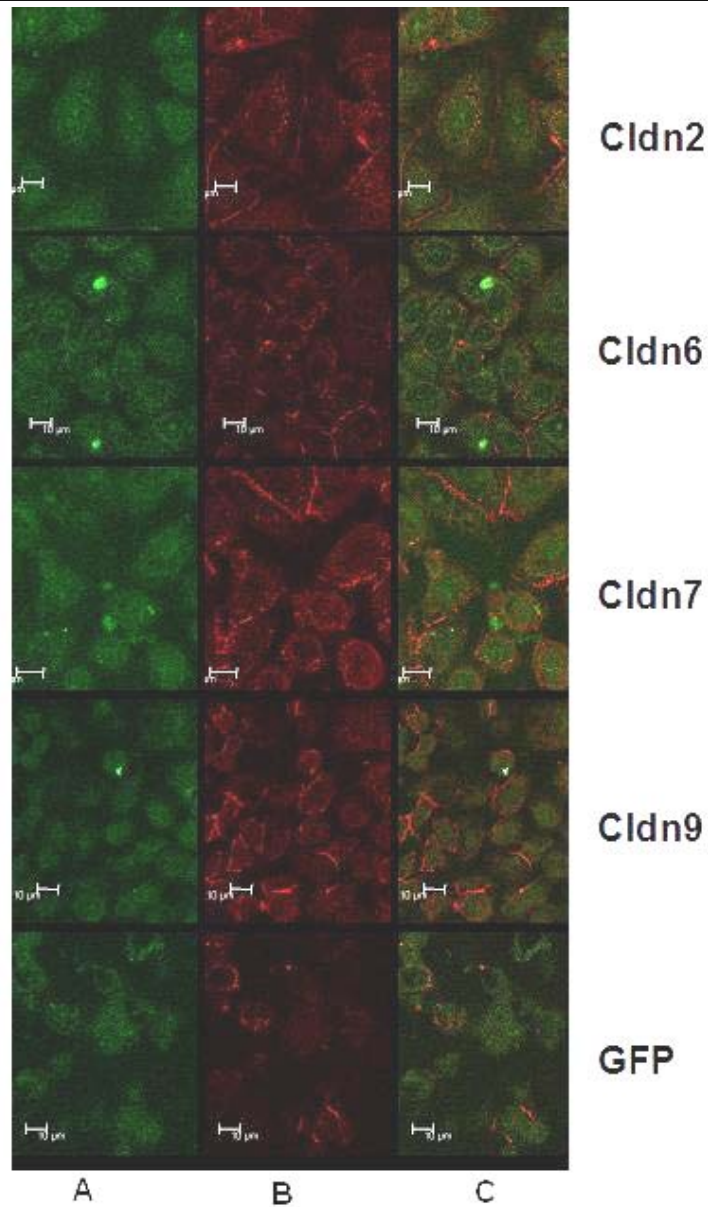


Figura 27. Localización de ZO-1 (rojo) en células AGS control y que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9 (verde). Mediante microscopía confocal, se detectó la localización de la claudina transfectada acoplada a la proteína verde fluorescente, como se muestra en el panel A (verde). Para la detección de la proteína ZO-1 se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpo acoplado a rhodamina, panel B (rojo). La superposición de ambos canales se muestra en el panel C.

El nivel de expresión de ocludina no se afecta por la sobreexpresión de las distintas claudinas. Sin embargo, la sobreexpresión de la claudina 2 impide la localización en la membrana de la ocludina (Figura 28).

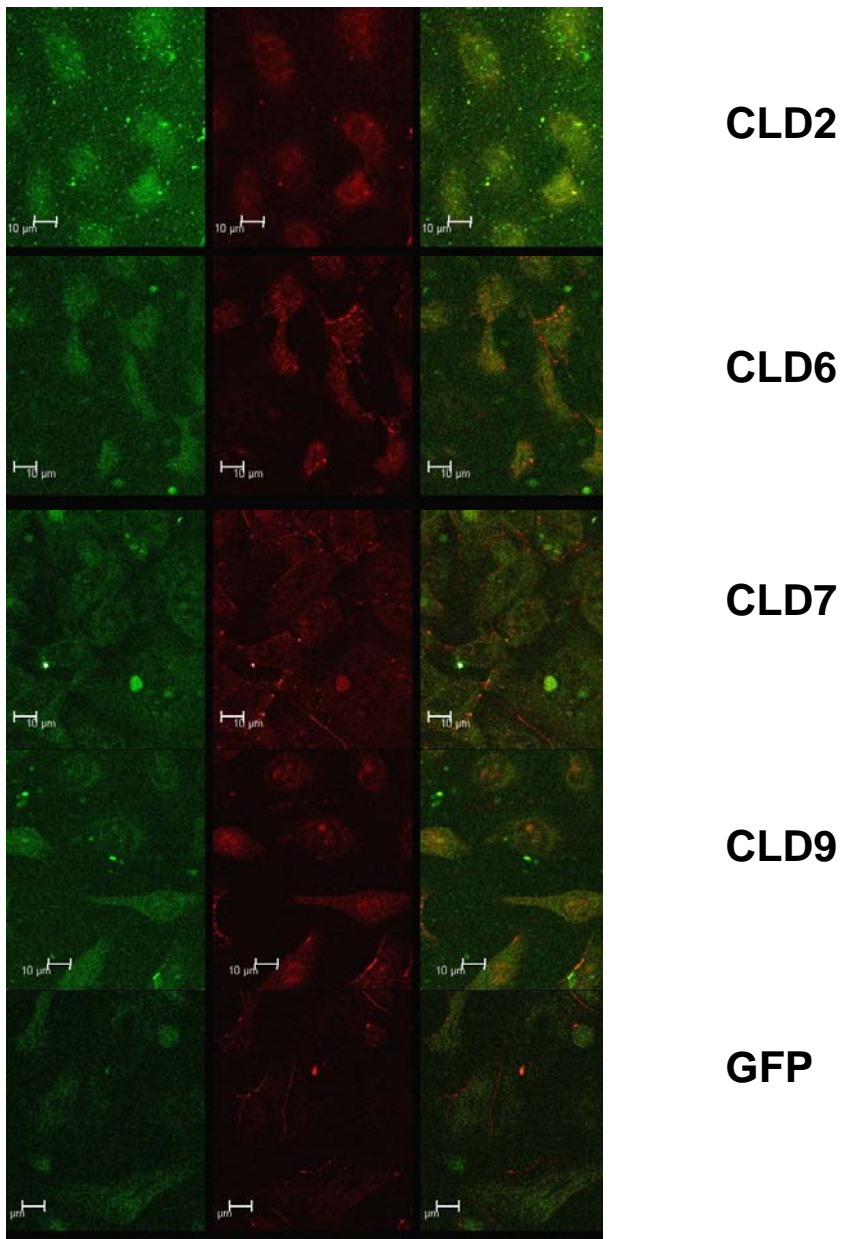


Figura 28. Localización de Ocludina (rojo) en las células AGS control y que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9 (verde). Mediante microscopía confocal, se detectó la localización de la claudina transfectada acoplada a la proteína verde fluorescente, como se muestra en el panel A (verde). Para la detección de la ocludina se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpo acoplado a rodamina, panel B (rojo). La superposición de ambos canales se muestra en el panel C.

III. Función de las claudinas 2, 6, 7 y 9 en las células MCF-7

a. Efecto de la sobreexpresión de las claudinas en la proliferación e invasión de las células MCF-7. En la línea celular MCF-7, el ensayo de regeneración de una herida no pudo llevarse a cabo, porque las células crecen en acúmulos, por ello se evaluó únicamente la capacidad de proliferación e invasión de las células. Como se puede observar en la figura 29, la capacidad de invasión de las células MCF-7 es mucho menor que la de las células AGS (Figura 19). Los resultados obtenidos muestran una disminución en la invasión del Matrigel del 46% y 54%, en las células que sobreexpresan a las claudinas 2 y 6 respectivamente; y un aumento en la capacidad de invasión en un 75% y 164% para aquellas que sobreexpresan a las claudinas 7 y 9 respectivamente (Figura 30).

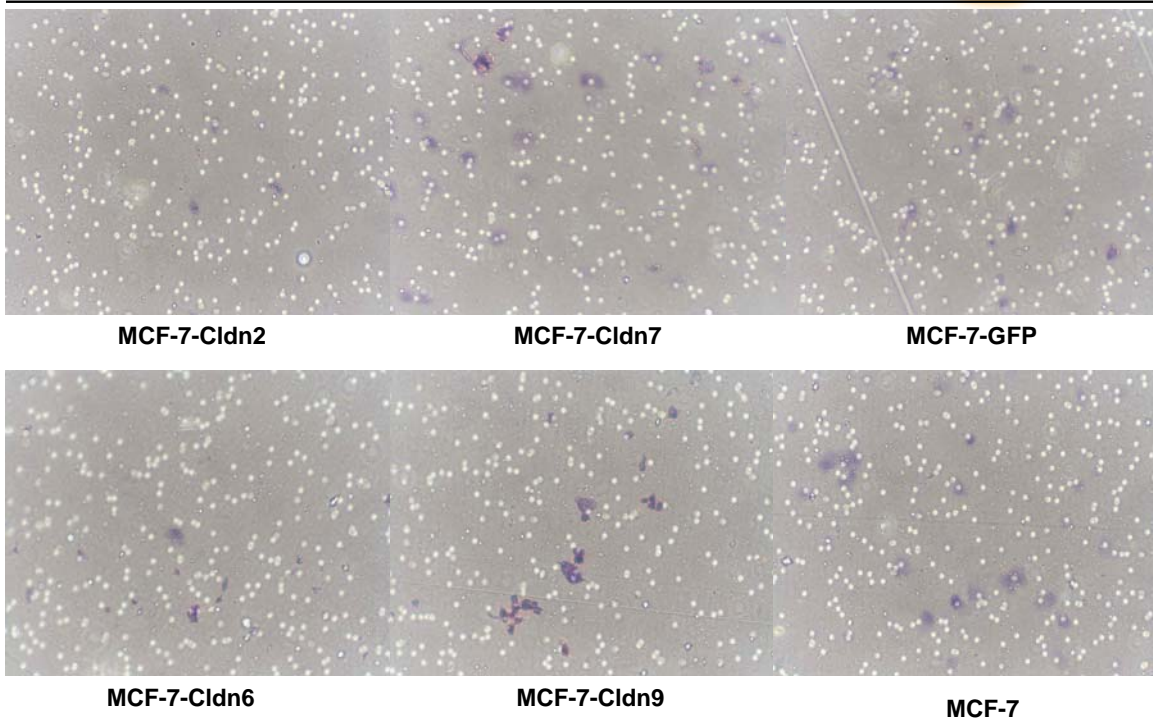


Figura 29. Invasión de Matrigel por las células MCF-7 transfectadas con distintas claudinas. La capacidad de invasión de las células que sobreexpresan a las claudinas 7 y 9 fue mayor que en las células control.

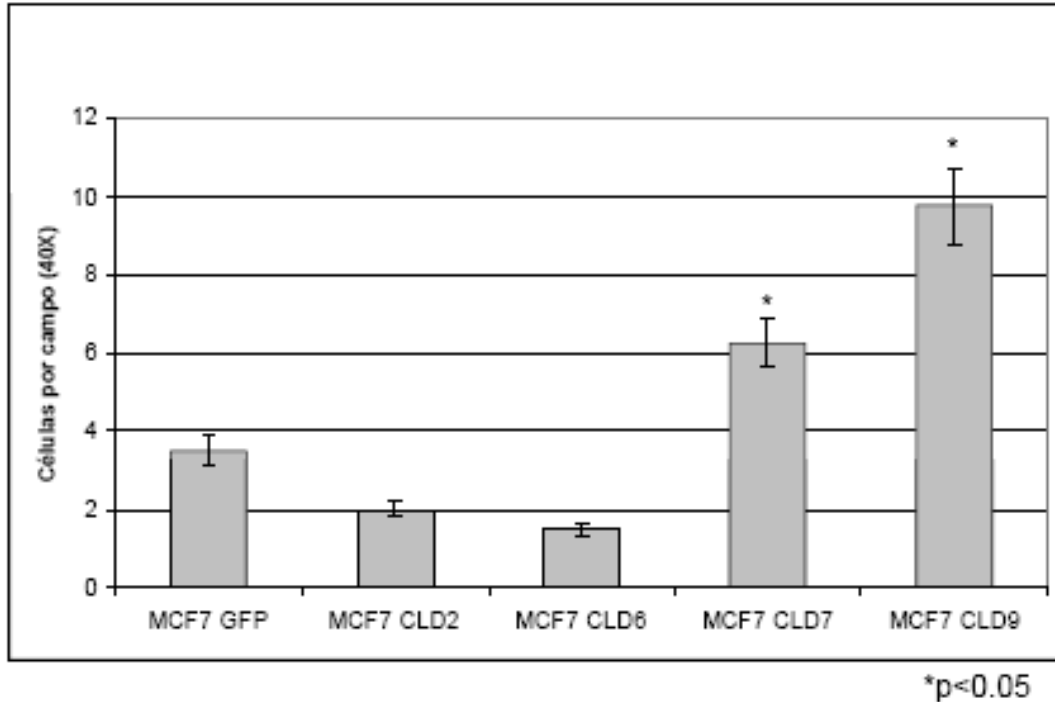


Figura 30. Representación gráfica de la invasión del Matrigel por las células MCF-7 que sobreexpresan a distintas claudinas. La invasividad de las células MCF-7 que sobreexpresan a las claudinas 2 y 6 disminuyó, mientras que la sobreexpresión de las claudinas 7 y 9 incrementó la capacidad de invasión. La disminución en la capacidad de invasión no es estadísticamente significativa.

La sobreexpresión de las claudinas 6, 7 y 9 incrementa la proliferación de las células MCF-7 en un 40, 25 y 15% respectivamente (Figura 31). Éste incremento en la proliferación se asocia con un aumento en la capacidad de invasión en las células transfectadas con las claudinas 7 y 9. Las células MCF-7 que sobreexpresan a claudina 2 disminuyeron su capacidad de proliferación en

un 20% de manera estadísticamente significativa, lo que también correlaciona con una disminución en su capacidad invasiva.

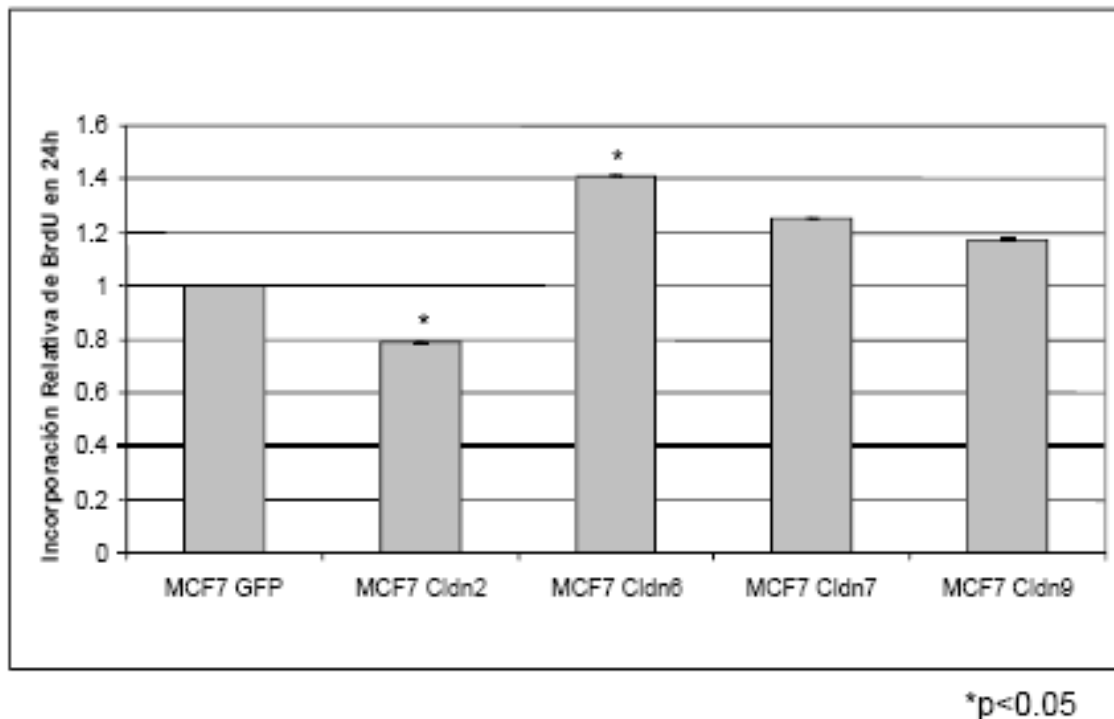


Figura 31. Proliferación de las células MCF-7 que sobreexpresan a las diferentes claudinas. La sobreexpresión de las claudinas 6, 7 y 9 en las células MCF-7 incrementó la proliferación, mientras que la sobreexpresión de la claudina 2 la disminuyó.

En seguida se determinó mediante un zimograma con gelatina si la sobreexpresión de las claudinas 2, 6, 7 o 9 altera la expresión de Pro-MMP2 o Pro-MMP9 (Figura 32). La sobreexpresión de las diferentes claudinas en las células MCF-7 tuvo un efecto inverso al observado con las células AGS. En este

caso, disminuyeron los niveles de expresión de Pro-MMP2 y Pro-MMP9, siendo esta disminución más significativa para el caso de las células que sobreexpresaban a las claudinas 7 y 9.

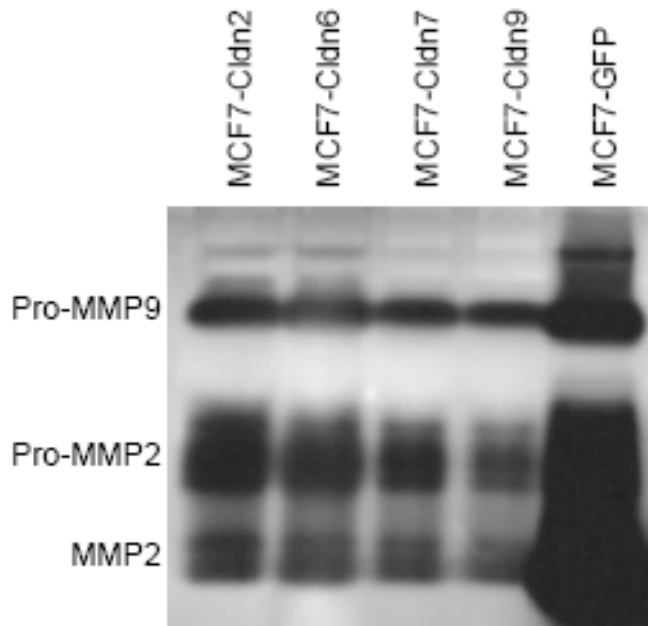


Figura 32. Zimograma de sobrenadantes de células MCF-7 que sobreexpresan a las distintas claudinas. La expresión de Pro-MMP2 y Pro-MMP9 disminuyó en las células MCF-7 que sobreexpresaban a las claudinas 2, 6, 7 y 9.

b. Expresión y localización de ZO-1, ocludina y claudina-1 en las células MCF-7 transfectadas. Para determinar si los cambios en las propiedades de migración, invasión y proliferación podían ser consecuencia de cambios en los niveles de expresión de otras proteínas de la UE, se evaluó el nivel de mRNA de la claudina 1 en las células transfectadas (Figura 33). La sobreexpresión de las claudinas 2, 6, 7 y 9 indujo una disminución en el nivel de expresión de mRNA de la claudina 1.

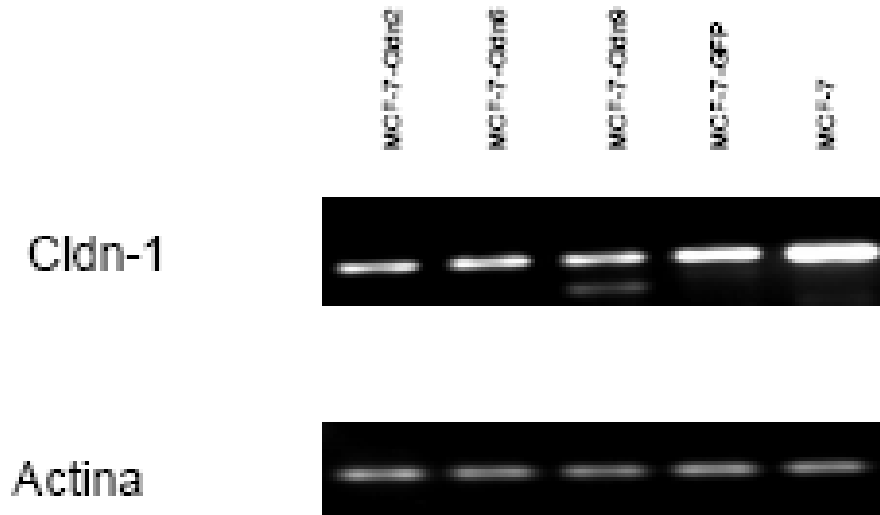


Figura 33. RT-PCR para determinar la expresión de mRNA de Claudina 1 en las células MCF-7 transfectadas con las diferentes claudinas. Se realizó RT-PCR para analizar si las células MCF-7 transfectadas presentan niveles elevados de mRNA de la claudina 1. Se empleó el RNA total extraído de las células control sin transfectar (MCF-7), de las células control transfectadas con el vector vacío (MCF-7 GFP) y de las células transfectadas con el vector específico de cada claudina. Se empleó a la α -actina como control de carga. La sobreexpresión de todas las claudinas estudiadas disminuyó el nivel de mRNA de la claudina 1 en las células MCF-7.

Se analizaron también los niveles de proteína de la claudina 1, ocludina y ZO-1 (Figura 34). La sobreexpresión de las claudinas 2, 6, 7 y 9 indujo una disminución en la expresión de claudina 1. La expresión de ocludina disminuyó ligeramente en las células MCF-7 transfectadas con las claudinas 2 y 7. Los niveles de ZO-1 no se modificaron.

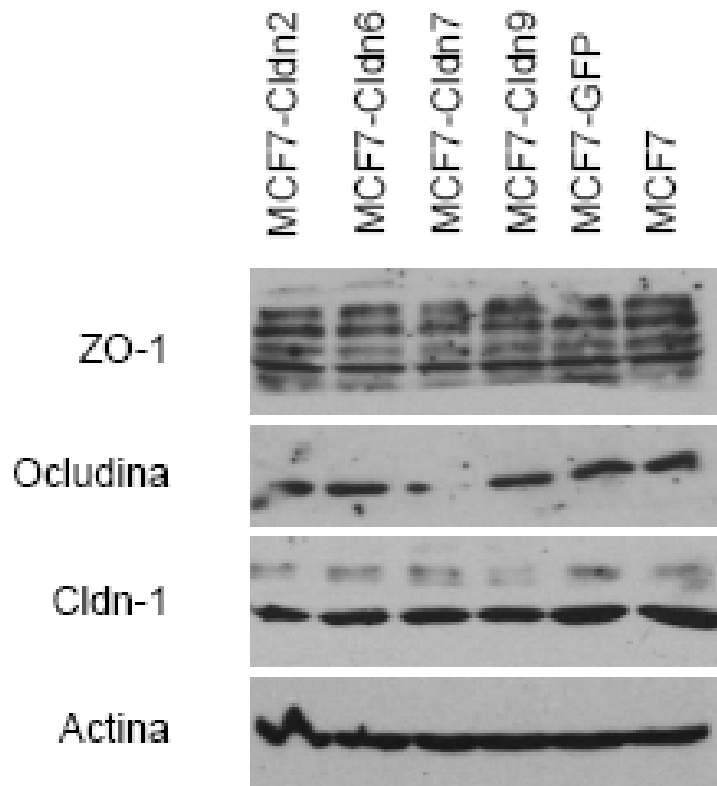


Figura 34. Análisis por Western Blot de la expresión de la Claudina 1, Occludina y ZO-1 en células MCF-7 que sobreexpresan a diferentes claudinas. En los extractos totales de las células transfectadas, se analizaron los niveles de expresión de la claudina 1, occludina, ZO-1 y como control de carga se empleó a la α -actina. La expresión de la claudina 1 es menor en las células MCF-7 transfectadas con las claudinas en estudio. El nivel de expresión de occludina disminuyó ligeramente, mientras que la expresión de ZO-1 no se alteró en esta línea celular.

La localización subcelular de la claudina 1 se determinó por análisis de microscopía confocal (Figura 35). La localización nuclear de la claudina 1, presente en las células control, se pierde en las células que sobreexpresan a las diferentes claudinas.

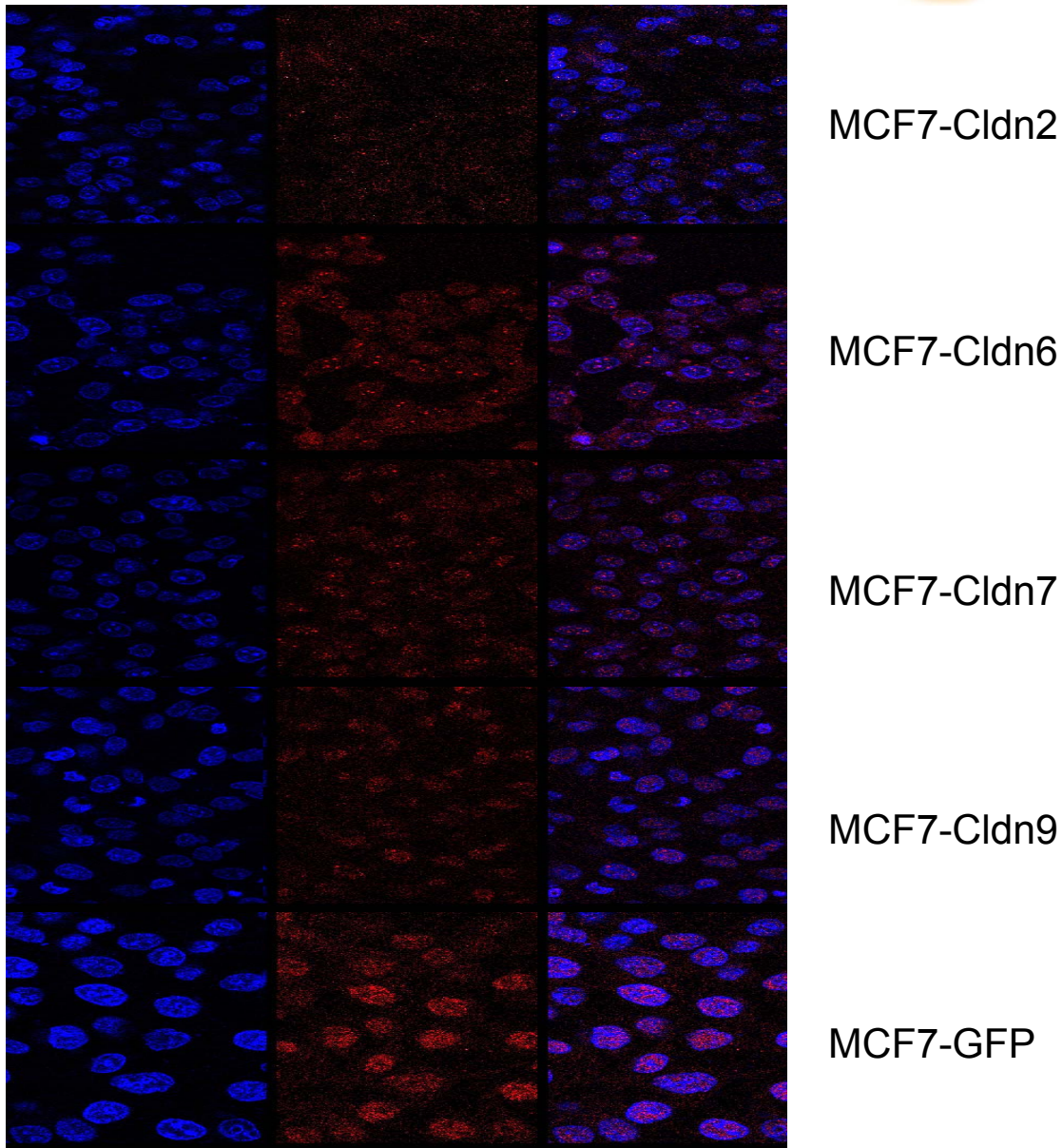


Figura 35. Localización de la claudina 1 en células MCF-7 control y que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9. Se realizó una inmunofluorescencia para la detección de la claudina 1 en las células transfectadas (rojo). Se empleó DAPI para la tinción nuclear (azul). El último panel muestra la superposición de las imágenes obtenidas por ambos canales, donde se observa menor presencia nuclear de la claudina 1 en las células que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9 respectivamente.

La localización de ZO-1 se modifica en las células que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9, mostrando una mayor integración de la proteína a la membrana plasmática en las células que sobreexpresan a las claudinas 6 y 7 (Figura 36).

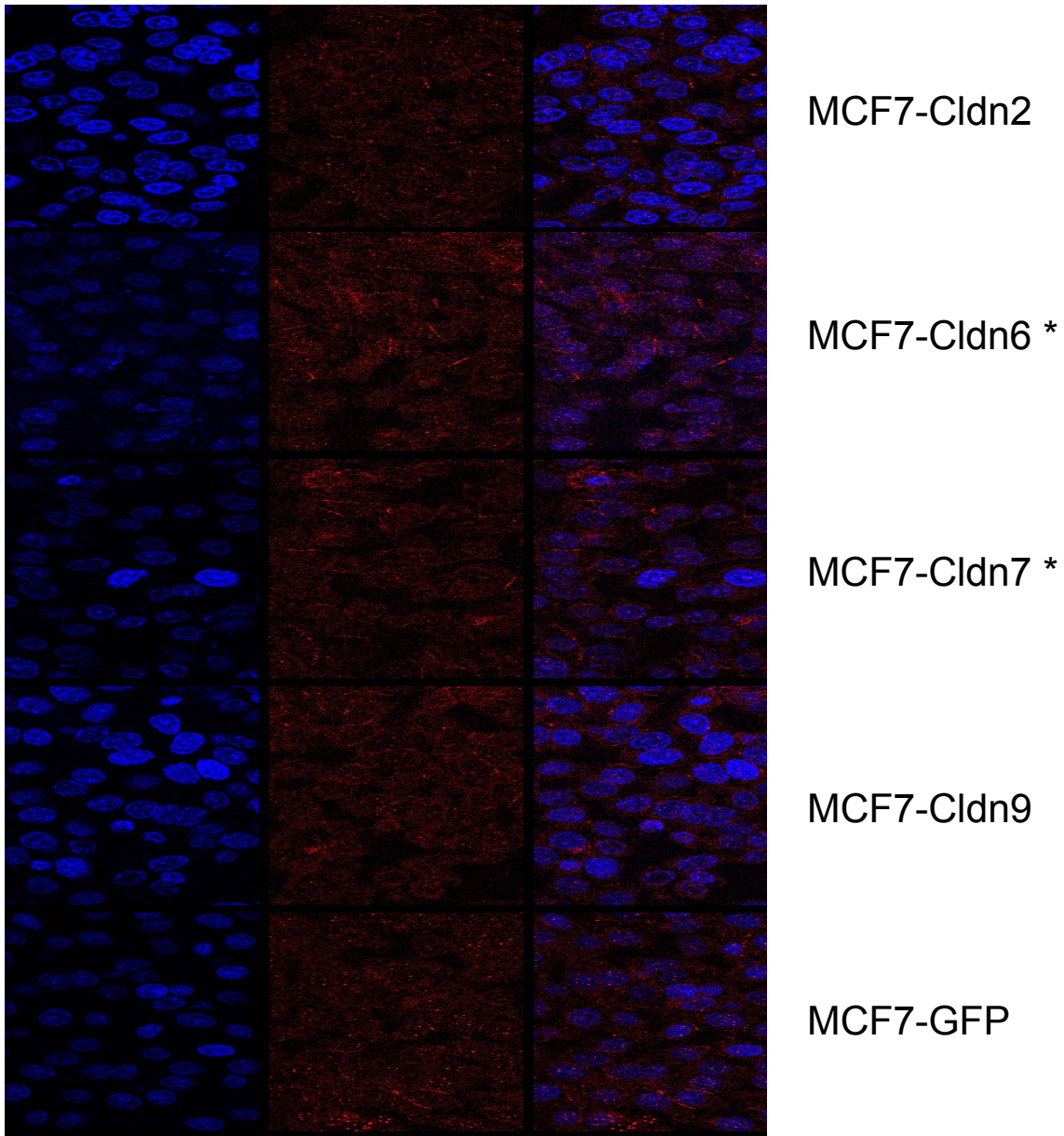


Figura 36. Localización de ZO-1 (rojo) en células MCF-7 control y que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9. Se realizó una inmunofluorescencia para la detección de la proteína ZO-1 en las células transfectadas (rojo). Se empleó DAPI para la tinción nuclear (azul). El último panel muestra la superposición de las imágenes obtenidas por ambos canales, donde se observa mayor presencia en membrana plasmática de ZO-1 en las células que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9 respectivamente.

Ni los niveles de expresión de ocludina ni su localización se afectan por la sobreexpresión de las claudinas 2, 6, 7 o 9 en células MCF-7 (Figura 37).

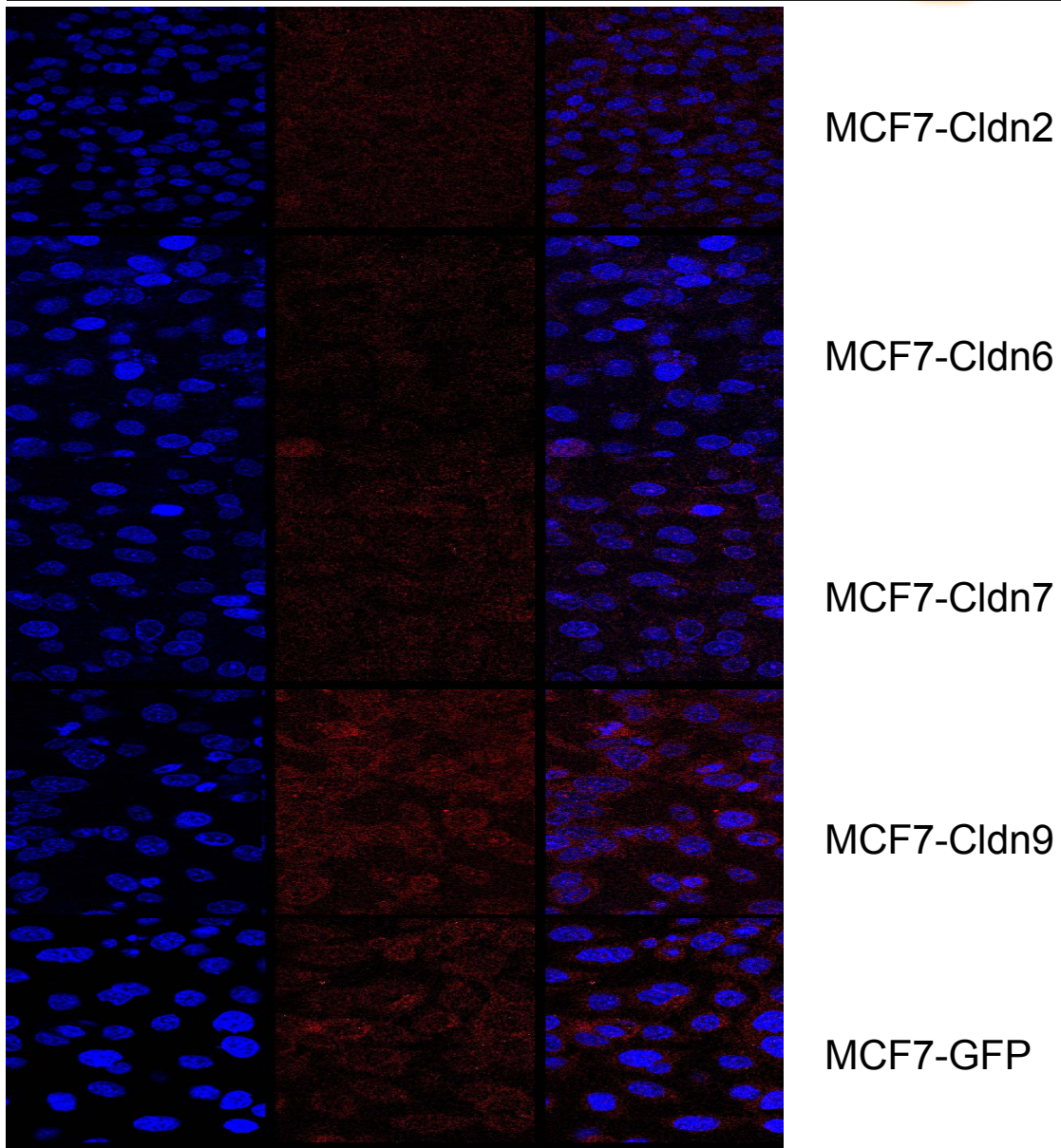


Figura 37. Localización de ocludina (rojo) en células MCF-7 control y que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9. Se realizó una inmunofluorescencia para la detección de la ocludina en las células transfectadas (rojo). Se empleó DAPI para la tinción nuclear (azul). El último panel muestra la superposición de las imágenes obtenidas por ambos canales. No se muestran cambios en la localización de la ocludina en las células que sobreexpresan a las claudinas 2, 6, 7 y 9 respectivamente.

Discusión:

En los últimos años ha habido gran interés por el estudio de la función y distribución de las claudinas en los tejidos normales y transformados^{73,93-95}. El hecho de que los tejidos neoplásicos expresen diferentes patrones y cantidades de claudinas con respecto a los tejidos normales y desde fases tempranas de transformación, hace a estas proteínas posibles marcadores en el diagnóstico y/o pronóstico de las neoplasias⁶⁷

La pérdida de la expresión de algunas claudinas y otras proteínas de las UE en el cáncer constituye un mecanismo de pérdida de la adhesión y por lo tanto, un paso importante en la progresión del cáncer para dar lugar a la metástasis y la sobrevivencia de las células⁵⁷. En contraste, el aumento de la expresión de otras claudinas, como las 3 y 4, resulta más difícil de interpretar, sobre todo al notar que este cambio produce un aumento en la invasividad, motilidad y sobrevivencia celular, características importantes de la metástasis^{83,96-98}.

En esta tesis encontramos que la sobreexpresión de la claudina 7 en la línea celular LLC-PK₁ induce el aumento de la TER y la disminución de la permeabilidad a Cl⁻, en acuerdo con lo observado anteriormente⁹⁹. La claudina 6 únicamente disminuye la permeabilidad a Cl⁻ y la claudina 9 no modifica las propiedades de compuerta de esta línea celular. Esta observación difiere de lo reportado por Sas et. Al, que indica que la sobreexpresión tanto de la claudina 6 como de la claudina 9 en la línea celular MDCK II incrementa la TER y

disminuye la permeabilidad a Cl^{-100} . Esta diferencia probablemente se debe a que el patrón de expresión de las claudinas endógenas difiere de una línea celular a otra.

En la tumorigénesis las células normales se transforman a células altamente invasivas y proliferativas. Al respecto se ha observado que la expresión de diversas claudinas cambia conforme se desarrolla la capacidad de invasión y migración de las células tumorales^{61,63,83,101}. Así por ejemplo, en el cáncer de ovario, la sobreexpresión de las claudinas 3 y 4 se relaciona con el desarrollo de la capacidad de migración de las células^{70,83}.

Nuestras observaciones muestran que en las células AGS la sobreexpresión de las claudinas 2, 6, 7 y 9 incrementa la migración celular, siendo mayor el efecto con las claudinas 6 y 9.

En las células AGS, la sobreexpresión de la claudina 2, una proteína que forma poros catiónicos paracelulares y está presente en los epitelios laxos⁹⁵, y de las claudinas 6, 7 y 9, que aumentan la TER y disminuyen el flujo paracelular de aniones^{94,100}, incrementa la proliferación y la migración celular, lo que indica que la selectividad iónica de la claudina en cuestión no es relevante para promover estas últimas propiedades. Por otro lado, cabe resaltar que la sobreexpresión de estas claudinas en las células MCF-7 tiene efectos distintos. Así, mientras que la sobreexpresión de las claudinas 2 y 6 disminuye la invasión del Matrigel, la sobreexpresión de las claudinas 7 y 9 incrementa significativamente la capacidad de invasión. Las diferencias observadas entre

ambas líneas celulares pueden deberse en parte al patrón de expresión de las claudinas endógenas.

Nuestro resultado con la claudina 2 en las células AGS coincide con el de Mima y colaboradores que demostraron que la sobreexpresión de esta claudina en las células AGS incrementa la capacidad de invasión de esta línea celular^{102,103}.

Aunque la claudina-1 es un potencial supresor tumoral en el adenocarcinoma de pulmón y en células de adenocarcinoma gástrico^{104,105}, varios reportes han mostrado que esta proteína activa a las metaloproteinasas y, en consecuencia, aumenta la capacidad de migración y supervivencia celular¹⁰⁶⁻¹¹⁰. En las células AGS, la sobreexpresión de las claudinas 2, 6, 7 y 9 se asocia con la sobreexpresión de la claudina 1 endógena, que se localiza principalmente en el núcleo. En cambio, en las células MCF-7, la expresión de la claudina 1 endógena se abatió incluso a nivel nuclear. Estas observaciones sugieren que las células tratan compensar la sobreexpresión de unas claudinas modificando el nivel de expresión de otras.

En esta tesis se demostró también, que la localización, y no el nivel de expresión, de otras proteínas de UE, como ZO-1, se modifica por la sobreexpresión de las claudinas. Se sabe que los factores de transcripción encargados de la regulación de la expresión de ocludina y ZO-1 son diferentes de aquellos que regulan la expresión de las claudinas^{111,112}, aunque la misma vía de señalización puede regular la expresión de estas proteínas¹¹³. ZO-1 interactúa con la región C-terminal de las claudinas, por lo cual es posible que el

incremento de las claudinas reclute una mayor cantidad de ZO-1 a la membrana.

La reorganización del citoesqueleto de actina en las células AGS ocurre por estímulos externos, tales como la infección con la toxina CagA de *H. pylori*^{114,115}. En esta tesis, dicha reorganización en las células AGS transfectadas ocurrió en ausencia de estímulo externo alguno. Los cambios en el citoesqueleto incluyen la formación de fibras de estrés, necesarias para la migración celular y de filipodia y pseudopodia cuando se sobreexpresaron a las claudinas 6 y 9. Estos cambios pueden ser responsables del incremento en la velocidad de migración observada¹¹⁶. A la fecha no se ha reportado que las claudinas puedan regular directamente al citoesqueleto de actina, pero podrían hacerlo mediante su interacción directa o indirecta con factores involucrados en su regulación, como proteínas G de la familia Rho, cofilina y el complejo Arp2/3.

La fosforilación de los residuos de Ser-, Thr- o Tyr- en la región C-terminal de las claudinas disminuye la asociación de estas proteínas con proteínas de anclaje, como ZO-1. Esto impide su integración a los sitios de contacto celular y altera la función de compuerta de la UE^{5,117}.

Los ésteres de forbol, como el PDBu provocan la pérdida de la funcionalidad de las UE¹¹⁸. Esto se refleja en la caída de la TER y el aumento en el flujo paracelular de moléculas no cargadas. Antes se pensaba que los cambios en la función de las UE se debían a una disminución en el nivel de expresión de las moléculas que componen estos complejos. Sin embargo, el

presente estudio demuestra que estos cambios se deben a cambios en la localización subcelular de éstas moléculas.

El tratamiento con PDBu ocasiona la pérdida de las claudina 6 y 7 de la membrana plasmática de las células LLC-PK₁, e induce la integración a la membrana de la claudina 9. Este efecto se bloquea al inhibir a las vías de ERK1/2 y JNK, y se potencia al inhibir a p38 y PKC. Se esperaba que la inhibición de PKC previa al tratamiento con ésteres de forbol bloqueara por completo el efecto de estos compuestos ya que se acepta que la principal vía de acción de estos compuestos es mediante la activación de PKC. Sin embargo, se sabe que los ésteres de forbol pueden actuar directamente sobre las tirosincinasas y otras vías de señalización que son inhibidas por la dexametasona^{119,120}, por lo que estas vías podrían estar involucradas en la regulación de la localización subcelular de estas claudinas. También es importante destacar que la estaurosporina, un inhibidor no competitivo de PKC convencionales, nuevas y atípicas y de PKA¹²¹, puede en algunos casos tener un efecto agonista y/o actuar sobre otras vías de señalización, de PKC^{122,123}.

El tratamiento con hEGF, cuya vía de señalización se encuentra desregulada en una gran cantidad de tumores¹²⁴, induce la integración de la claudina 6 a la membrana plasmática, mientras que promueve la pérdida de las claudinas 7 y 9 de la UE. La inhibición de ERK1/2 previa al tratamiento con hEGF permite que la claudina 6 se incorpore a membrana, lo que indica que hEGF actúa a través de otras vías, como puede ser la vía de la PKC. En el caso de la claudina 7, la inhibición de ERK1/2 no revierte el efecto del hEGF, mientras

que la inhibición de JNK, p38 y PKC permite que la claudina 7 se integre nuevamente a la membrana de las células LLC-PK₁. La claudina 9 se remueve de la membrana plasmática por el tratamiento con hEGF, y este fenómeno se revierte parcialmente por la inhibición de la PKC. Este resultado nos comprueba que la PKC se activa por el tratamiento con hEGF, y juega un papel importante en la regulación de las claudinas, pero también otras vías están involucradas en la regulación de la localización de estas proteínas en la UE. Estos resultados también nos demuestran que la vía de MAPK está involucrada en la regulación de estas proteínas¹²⁵.

Estudios realizados por otros grupos demuestran que el tratamiento de las células caninas de riñón MDCK, con EGF produce la redistribución de ZO-1 e integración en regiones de contacto celular de las claudinas 1, 3 y 4⁴¹. En las células humanas de adenocarcinoma gástrico TMK-1, el mismo tratamiento provocó la translocación de ZO-1 y ocludina del citosol a regiones de contacto celular,. Esta translocación se bloquea al emplear inhibidores de PKC convencionales y nuevas, como la calfoestina C. El uso de Gö6976, un inhibidor de PKC convencionales, o la bisindolilmaleimida I, que inhibe a PKC convencionales, nuevas y atípicas, inhibió poco o nada la translocación de estas proteínas¹²⁶. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, ya que muestra que la PKC ejerce un efecto dual sobre la localización de proteínas de la UE. Mientras que las PKC atípicas¹²⁷ eliminan a las claudinas de la membrana, las PKC convencionales y nuevas promueven la integración de las claudinas a la UE.

Conclusiones:

- Los efectos que la sobreexpresión de las diferentes claudinas ocasionan sobre la función barrera de las células LLC-PK₁ pueden resumirse en la siguiente Tabla 3.:

Claudina	Efecto sobre la TER	Efecto sobre el PCF	Efecto sobre la permeabilidad a Na ⁺	Efecto sobre la permeabilidad a Cl ⁻
6	S. C.	S. C.	S. C.	↓
7	↑	S. C.	↓	↓
9	S. C.	S. C.	S. C.	S. C.

↓: Disminución, ↑: Aumento, S. C.: Sin cambios

- El efecto de la sobreexpresión de claudinas 2, 6, 7 y 9 en las células AGS y MCF-7 se puede resumir en la Tabla 4.

Claudina	Células	Proliferación	Migración	Invasión	Expresión de Cldn-1
2	AGS	↑	↑	↑	↑
	MCF-7	↓	N.D.	S. C.	↓
6	AGS	S. C.	S. C.	S. C.	↑
	MCF-7	↑	N.D.	↑	↓
7	AGS	↑	↑	↑	↑
	MCF-7	S. C.	N.D.	S. C.	↓
9	AGS	↑	↑	↑	↑
	MCF-7	↑	N.D.	↑	↓

↓: Disminución, ↑: Aumento, S. C.: Sin cambios, N.D.: No Determinado

Referencias

1. Miyoshi, J. & Takai, Y. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 815-855 (2005).
2. Glick, A.B. & Yuspa, S.H. Tissue homeostasis and the control of the neoplastic phenotype in epithelial cancers. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 75-83 (2005).
3. Qu, Y. & Dahl, G. Function of the voltage gate of gap junction channels: selective exclusion of molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 697-702 (2002).
4. Swisshelm, K., Macek, R. & Kubbies, M. Role of claudins in tumorigenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 919-928 (2005).
5. Van Itallie, C.M. & Anderson, J.M. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol* **68**, 403-429 (2006).
6. Al Moustafa, A.E. *et al.* Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* **21**, 2634-2640 (2002).
7. Denker, B.M. & Nigam, S.K. Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am. J. Physiol* **274**, F1-F9 (1998).
8. Reichert, M., Muller, T. & Hunziker, W. The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 9492-9500 (2000).
9. Sasaki, H. *et al.* Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 3971-3976 (2003).
10. Balda, M.S. & Matter, K. Tight junctions at a glance. *J. Cell Sci.* **121**, 3677-3682 (2008).
11. Balda, M.S. & Matter, K. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 761-767 (2009).
12. Gonzalez-Mariscal, L., Tapia, R. & Chamorro, D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 729-756 (2008).
13. Tsukita, S., Yamazaki, Y., Katsuno, T., Tamura, A. & Tsukita, S. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* **27**, 6930-6938 (2008).
14. Anderson, J.M. & Van Itallie, C.M. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a002584 (2009).
15. Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. & Jaramillo, B.E. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **81**, 1-44 (2003).
16. Ikenouchi, J. *et al.* Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **171**, 939-945 (2005).
17. Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A. & Balda, M.S. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 453-458 (2005).
18. Balda, M.S. *et al.* Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell Biol.* **134**, 1031-1049 (1996).
19. Saitou, M. *et al.* Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell Biol.* **141**, 397-408 (1998).
20. Gonzalez-Mariscal, L., Lechuga, S. & Garay, E. Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Prog. Histochem. Cytochem.* **42**, 1-57 (2007).
21. Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K. & Tsukita, S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **143**, 391-401 (1998).
22. Evans, M.J. *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801-805 (2007).
23. Zheng, A. *et al.* Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J. Virol.* **81**, 12465-12471 (2007).

24. Chiba,H., Osanai,M., Murata,M., Kojima,T. & Sawada,N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 588-600 (2008).
25. Van Itallie,C.M., Colegio,O.R. & Anderson,J.M. The cytoplasmic tails of claudins can influence tight junction barrier properties through effects on protein stability. *J. Membr. Biol.* **199**, 29-38 (2004).
26. Schneeberger,E.E. & Lynch,R.D. The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **286**, C1213-C1228 (2004).
27. Piontek,J. *et al.* Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* **22**, 146-158 (2008).
28. Coyne,C.B., Gambling,T.M., Boucher,R.C., Carson,J.L. & Johnson,L.G. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **285**, L1166-L1178 (2003).
29. Furuse,M., Sasaki,H. & Tsukita,S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell Biol.* **147**, 891-903 (1999).
30. Daugherty,B.L., Ward,C., Smith,T., Ritzenthaler,J.D. & Koval,M. Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J. Biol. Chem.* **282**, 30005-30013 (2007).
31. Salama,N.N., Eddington,N.D. & Fasano,A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 15-28 (2006).
32. Hou,J. *et al.* Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 15350-15355 (2009).
33. Fanning,A.S. *et al.* The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. *Mol. Biol. Cell* **18**, 721-731 (2007).
34. Umeda,K. *et al.* ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* **126**, 741-754 (2006).
35. Nunes,F.D. *et al.* Distinct subdomain organization and molecular composition of a tight junction with adherens junction features. *J. Cell Sci.* **119**, 4819-4827 (2006).
36. Chen,Y., Lu,Q., Schneeberger,E.E. & Goodenough,D.A. Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* **11**, 849-862 (2000).
37. Furuse,M. & Tsukita,S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* **16**, 181-188 (2006).
38. Nusrat,A., Turner,J.R. & Madara,J.L. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **279**, G851-G857 (2000).
39. Flores-Benitez,D. *et al.* Control of tight junctional sealing: role of epidermal growth factor. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **292**, F828-F836 (2007).
40. Ikenouchi,J., Matsuda,M., Furuse,M. & Tsukita,S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J. Cell Sci.* **116**, 1959-1967 (2003).
41. Singh,A.B. & Harris,R.C. Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 3543-3552 (2004).
42. Lipschutz,J.H., Li,S., Arisco,A. & Balkovetz,D.F. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 control claudin-2 expression in Madin-Darby canine kidney strain I and II cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 3780-3788 (2005).
43. Kominsky,S.L. *et al.* Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* **22**, 2021-2033 (2003).
44. Escaffit,F., Boudreau,F. & Beaulieu,J.F. Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J. Cell Physiol* **203**, 15-26 (2005).
45. Sakaguchi,T. *et al.* Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related

- homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. *J. Biol. Chem.* **277**, 21361-21370 (2002).
46. Chiba, H. *et al.* Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **286**, 288-297 (2003).
 47. Carrozzino, F. *et al.* Inducible expression of Snail selectively increases paracellular ion permeability and differentially modulates tight junction proteins. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **289**, C1002-C1014 (2005).
 48. Martinez-Estrada, O.M. *et al.* The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem. J.* **394**, 449-457 (2006).
 49. Ohkubo, T. & Ozawa, M. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J. Cell Sci.* **117**, 1675-1685 (2004).
 50. Yamamoto, T. *et al.* IL-1beta regulates expression of Cx32, occludin, and claudin-2 of rat hepatocytes via distinct signal transduction pathways. *Exp. Cell Res.* **299**, 427-441 (2004).
 51. Scheurer, S.B., Rybak, J.N., Rosli, C., Neri, D. & Elia, G. Modulation of gene expression by hypoxia in human umbilical cord vein endothelial cells: A transcriptomic and proteomic study. *Proteomics*. **4**, 1737-1760 (2004).
 52. Han, X., Fink, M.P. & Delude, R.L. Proinflammatory cytokines cause NO*-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock* **19**, 229-237 (2003).
 53. Patrick, D.M., Leone, A.K., Shellenberger, J.J., Dudowicz, K.A. & King, J.M. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma modulate epithelial barrier function in Madin-Darby canine kidney cells through mitogen activated protein kinase signaling. *BMC. Physiol* **6**, 2 (2006).
 54. Bruewer, M. *et al.* Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J. Immunol.* **171**, 6164-6172 (2003).
 55. Ishizaki, T. *et al.* Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Exp. Cell Res.* **290**, 275-288 (2003).
 56. Medici, D., Hay, E.D. & Goodenough, D.A. Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1871-1879 (2006).
 57. Mullin, J.M. Epithelial barriers, compartmentation, and cancer. *Sci. STKE*. **2004**, e2 (2004).
 58. Cheung, S.T. *et al.* Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **11**, 551-556 (2005).
 59. Cohn, M.L. *et al.* Loss of claudin-1 expression in tumor-associated vessels correlates with acquisition of metastatic phenotype in melanocytic neoplasms. *J. Cutan. Pathol.* **32**, 533-536 (2005).
 60. Dhawan, P. *et al.* Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J. Clin. Invest* **115**, 1765-1776 (2005).
 61. Michl, P. *et al.* Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res.* **63**, 6265-6271 (2003).
 62. Morin, P.J. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* **65**, 9603-9606 (2005).
 63. Oku, N., Sasabe, E., Ueta, E., Yamamoto, T. & Osaki, T. Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 gamma2 chain via matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane-type MMP-1. *Cancer Res.* **66**, 5251-5257 (2006).
 64. Sauer, T., Pedersen, M.K., Ebeltoft, K. & Naess, O. Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. *Cytopathology* **16**, 193-198 (2005).

65. Lee, J.W. *et al.* Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. *Gynecol. Oncol.* **97**, 53-59 (2005).
66. Usami, Y. *et al.* Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum. Pathol.* **37**, 569-577 (2006).
67. Johnson, A.H. *et al.* Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis. *Am. J. Pathol.* **167**, 577-584 (2005).
68. Turksen, K. & Troy, T.C. Barriers built on claudins. *J. Cell Sci.* **117**, 2435-2447 (2004).
69. Oliveira, S.S. & Morgado-Diaz, J.A. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 17-28 (2007).
70. Takehara, M., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T. & Mizushima, T. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 825-831 (2009).
71. Choi, Y.H. *et al.* Anti-invasive activity of sanguinarine through modulation of tight junctions and matrix metalloproteinase activities in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells. *Chem. Biol. Interact.* **179**, 185-191 (2009).
72. Matsuda, M., Kubo, A., Furuse, M. & Tsukita, S. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J. Cell Sci.* **117**, 1247-1257 (2004).
73. Hewitt, K.J., Agarwal, R. & Morin, P.J. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC. Cancer* **6**, 186 (2006).
74. McClane, B.A. Clostridium perfringens enterotoxin and intestinal tight junctions. *Trends Microbiol.* **8**, 145-146 (2000).
75. Smedley, J.G., III, Fisher, D.J., Sayeed, S., Chakrabarti, G. & McClane, B.A. The enteric toxins of Clostridium perfringens. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* **152**, 183-204 (2004).
76. McClane, B.A. & Chakrabarti, G. New insights into the cytotoxic mechanisms of Clostridium perfringens enterotoxin. *Anaerobe.* **10**, 107-114 (2004).
77. Ebihara, C. *et al.* Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**, 255-260 (2006).
78. Efrati, E., Arsentiev-Rozenfeld, J. & Zelikovic, I. The human paracellin-1 gene (hPCLN-1): renal epithelial cell-specific expression and regulation. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **288**, F272-F283 (2005).
79. Dickman, K.G. *et al.* Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **279**, G757-G766 (2000).
80. Fasano, A. Toxins and the gut: role in human disease. *Gut* **50 Suppl 3**, III9-14 (2002).
81. Fedwick, J.P., Lapointe, T.K., Meddings, J.B., Sherman, P.M. & Buret, A.G. Helicobacter pylori activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability. *Infect. Immun.* **73**, 7844-7852 (2005).
82. Zheng, J. *et al.* Involvement of claudin-7 in HIV infection of CD4(-) cells. *Retrovirology.* **2**, 79 (2005).
83. Agarwal, R., D'Souza, T. & Morin, P.J. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res.* **65**, 7378-7385 (2005).
84. Rendon-Huerta, E. *et al.* Distribution and expression pattern of claudins 6, 7, and 9 in diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinomas. *J. Gastrointest. Cancer* **41**, 52-59 (2010).
85. Aung, P.P. *et al.* Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas. *Virchows Arch.* **448**, 428-434 (2006).
86. Matsuda, Y. *et al.* Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma. *Cancer Sci.* **98**, 1014-1019 (2007).
87. Park, J.Y. *et al.* Up-regulated claudin 7 expression in intestinal-type gastric carcinoma. *Oncol. Rep.* **18**, 377-382 (2007).
88. Turksen, K. & Troy, T.C. Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev. Dyn.* **222**, 292-300 (2001).

89. Hou, J., Paul, D.L. & Goodenough, D.A. Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J. Cell Sci.* **118**, 5109-5118 (2005).
90. Amieva, M.R. *et al.* Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **300**, 1430-1434 (2003).
91. Sahar, H., Mueller, A., Tompkins, L.S., Falkow, S. & Merrell, D.S. Phosphorylation-Independent Effects of CagA during Interaction between *Helicobacter pylori* and T84 Polarized Monolayers. *Journal of Infectious Diseases* **190**, 1516-1523 (2004).
92. Miyamori, H. *et al.* Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **276**, 28204-28211 (2001).
93. Abuazza, G. *et al.* Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **291**, F1132-F1141 (2006).
94. Alexandre, M.D., Lu, Q. & Chen, Y.H. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *J. Cell Sci.* **118**, 2683-2693 (2005).
95. Amasheh, S. *et al.* Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* **115**, 4969-4976 (2002).
96. Cunningham, S.C. *et al.* Claudin-4, mitogen-activated protein kinase 4, and stratifin are markers of gastric adenocarcinoma precursor lesions. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **15**, 281-287 (2006).
97. Long, H., Crean, C.D., Lee, W.H., Cummings, O.W. & Gabig, T.G. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res.* **61**, 7878-7881 (2001).
98. Nichols, L.S., Ashfaq, R. & Iacobuzio-Donahue, C.A. Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target. *Am. J. Clin. Pathol.* **121**, 226-230 (2004).
99. Alexandre, M.D., Jeansonne, B.G., Renegar, R.H., Tatum, R. & Chen, Y.H. The first extracellular domain of claudin-7 affects paracellular Cl⁻ permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 87-91 (2007).
100. Sas, D., Hu, M., Moe, O.W. & Baum, M. Effect of claudins 6 and 9 on paracellular permeability in MDCK II cells. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **295**, R1713-R1719 (2008).
101. Ip, Y.C., Cheung, S.T., Lee, Y.T., Ho, J.C. & Fan, S.T. Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 2858-2867 (2007).
102. Mima, S. *et al.* Induction of claudin-4 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. *Cancer Res.* **65**, 1868-1876 (2005).
103. Mima, S. *et al.* NSAIDs suppress the expression of claudin-2 to promote invasion activity of cancer cells. *Carcinogenesis* **29**, 1994-2000 (2008).
104. Chang, T.L. *et al.* Claudin-1 has tumor suppressive activity and is a direct target of RUNX3 in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **138**, 255-265 (2010).
105. Chao, Y.C. *et al.* Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **179**, 123-133 (2009).
106. Agarwal, R., D'Souza, T. & Morin, P.J. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res.* **65**, 7378-7385 (2005).
107. Dhawan, P. *et al.* Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J. Clin. Invest* **115**, 1765-1776 (2005).
108. Miyamori, H. *et al.* Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **276**, 28204-28211 (2001).
109. Roelle, S. *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* **278**, 47307-47318 (2003).

110. Takehara, M., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T. & Mizushima, T. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 825-831 (2009).
111. Chen, J. *et al.* JunD represses transcription and translation of the tight junction protein zona occludens-1 modulating intestinal epithelial barrier function. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3701-3712 (2008).
112. Sade, H., Holloway, K., Romero, I.A. & Male, D. Transcriptional control of occludin expression in vascular endothelia: regulation by Sp3 and YY1. *Biochim. Biophys. Acta* **1789**, 175-184 (2009).
113. Harada, M. *et al.* Effect of forskolin on the expression of claudin-5 in human trophoblast BeWo cells. *Pharmazie* **62**, 291-294 (2007).
114. Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V. & Meyer, T.F. Phosphorylation of tyrosine 972 of the Helicobacter pylori CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Molecular Microbiology* **42**, 631-644 (2001).
115. Bourzac, K.M., Botham, C.M. & Guillermin, K. Helicobacter pylori CagA Induces AGS Cell Elongation through a Cell Retraction Defect That Is Independent of Cdc42, Rac1, and Arp2/3. *Infect. Immun.* **75**, 1203-1213 (2007).
116. Olson MF. & Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin. Exp. Metastasis* **26**, 273-287 (2009).
117. Tanaka, M., Kamata, R. & Sakai, R. EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J. Biol. Chem.* **280**, 42375-42382 (2005).
118. Mullin, J.M. *et al.* Effects of acute vs. chronic phorbol ester exposure on transepithelial permeability and epithelial morphology. *J. Cell Physiol* **152**, 35-47 (1992).
119. Hitomi, T. *et al.* Requirement of Syk-phospholipase C-gamma2 pathway for phorbol ester-induced phospholipase D activation in DT40 cells. *Genes Cells* **6**, 475-485 (2001).
120. Li, Q., Vaingankar, S.M., Green, H.M. & Martins-Green, M. Activation of the 9E3/cCAF chemokine by phorbol esters occurs via multiple signal transduction pathways that converge to MEK1/ERK2 and activate the Elk1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **274**, 15454-15465 (1999).
121. Ward, N.E. & O'Brian, C.A. Kinetic analysis of protein kinase C inhibition by staurosporine: evidence that inhibition entails inhibitor binding at a conserved region of the catalytic domain but not competition with substrates. *Mol. Pharmacol.* **41**, 387-392 (1992).
122. Liu, W. *et al.* PMA and staurosporine affect expression of the PCK gene in LLC-PK1-F+ cells. *Am. J. Physiol* **275**, F361-F369 (1998).
123. Dlugosz, A.A. & Yuspa, S.H. Staurosporine induces protein kinase C agonist effects and maturation of normal and neoplastic mouse keratinocytes in vitro. *Cancer Res.* **51**, 4677-4684 (1991).
124. Fischer, O.M., Hart, S., Gschwind, A. & Ullrich, A. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1203-1208 (2003).
125. Fujibe, M. *et al.* Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp. Cell Res.* **295**, 36-47 (2004).
126. Yoshida, K. *et al.* EGF rapidly translocates tight junction proteins from the cytoplasm to the cell-cell contact via protein kinase C activation in TMK-1 gastric cancer cells. *Exp. Cell Res.* **309**, 397-409 (2005).
127. D'Souza, T., Indig, F.E. & Morin, P.J. Phosphorylation of claudin-4 by PKCepsilon regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *Exp. Cell Res.* **313**, 3364-3375 (2007).

ANEXO 1.

REGULACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE CLAUDINAS 2, 6, 7 Y 9 EN CÉLULAS LLC-PK₁.

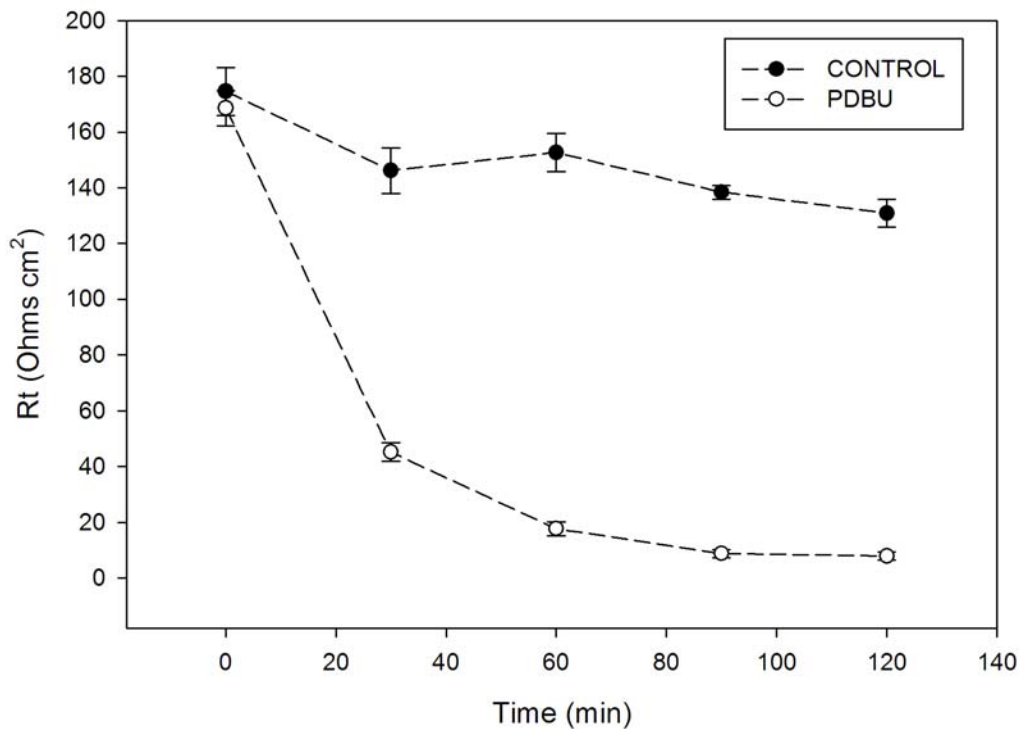


Figura 38. Efecto del tratamiento con ésteres de forbol sobre la resistencia transepitelial de la línea celular LLC-PK₁ transfectada con la claudina 6. La caída de la resistencia transepitelial observada por el tratamiento con PDBu es un efecto observado desde tiempos cortos de exposición a dicho compuesto. Este fenómeno fue observado en con las diferentes claudinas sobreexpresadas en esta línea celular.

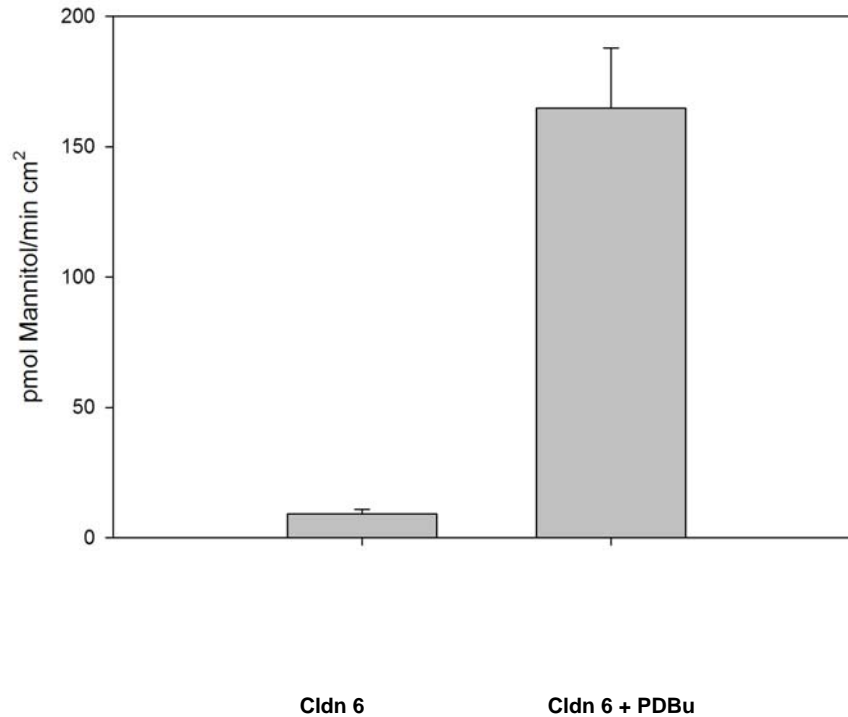


Figura 39. Efecto del tratamiento con ésteres de forbol sobre el flujo paracelular de ¹⁴C-manitol. La pérdida de la funcionalidad de las UE por el tratamiento con PDBu en las células LLC-PK₁ transfectadas con claudina 6, se ve también reflejada en el aumento del flujo paracelular de ¹⁴C-manitol, por lo que no solamente se pierde la capacidad de regular el flujo de iones, sino también de moléculas no cargadas. Al igual que con la TER, este fenómeno se repitió en las células que sobreexpresaban a claudina 7 y 9.

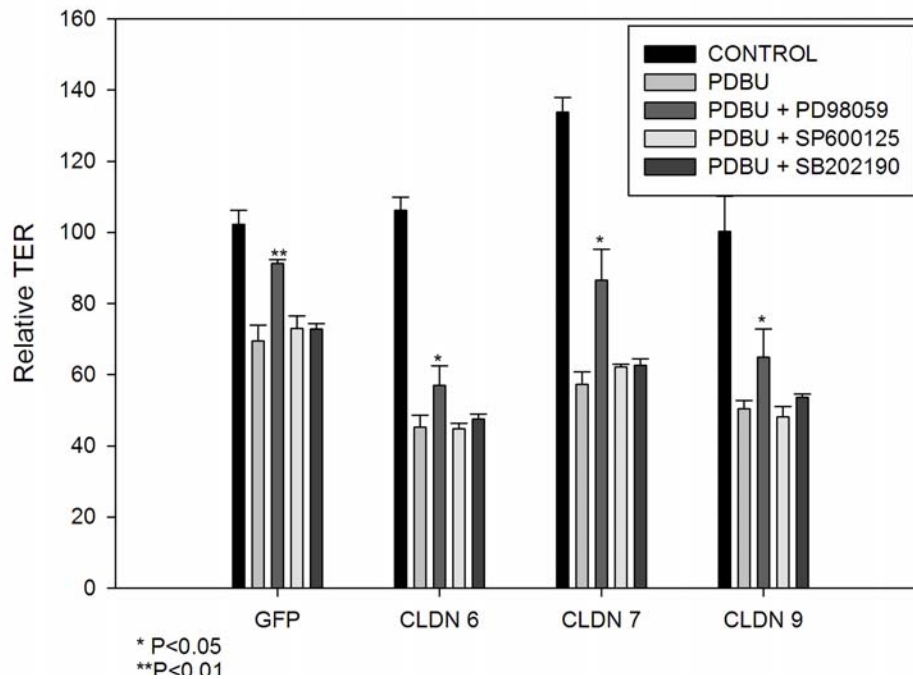


Figura 40. Efecto de los inhibidores de MAPK sobre la resistencia transepitelial de células LLC-PK₁ transfectadas tratadas con ésteres de forbol. La inhibición de la vía de ERK1/2 (PD98059) mas no la de JNK (SP600125) o p38 (SB202190) previa al tratamiento con PDBu, inhibe parcialmente la disminución de la resistencia transepitelial causada por este último.

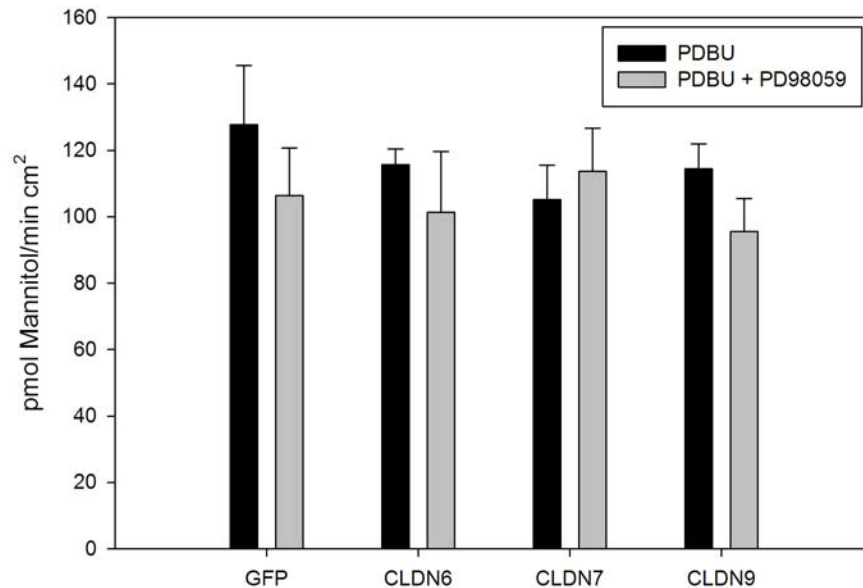


Figura 41. Efecto de la inhibición de ERK1/2, previa al tratamiento con ésteres de forbol, sobre el flujo paracelular de ¹⁴C-manitol a través de las células LLC-PK₁ transfectadas. Dado que la inhibición de ERK1/2 por PD98059 no tuvo ningún efecto sobre el flujo paracelular, a diferencia de la resistencia transepitelial, se sugiere que la vía de ERK1/2 podría estar involucrada en la regulación de la localización únicamente de algunas proteínas de UE. Aún cuando el PD98059 es capaz de inhibir parcialmente el efecto del PDBu sobre la resistencia transepitelial de estos cultivos celulares, esto no pudo ser observado sobre el flujo de moléculas no cargadas, por lo que la vía de ERK1/2 podría estar involucrada en la regulación de la localización únicamente de algunas proteínas de UE.

Estaurosporina	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
SB202190	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
SP600125	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
PD98059	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PDBu	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

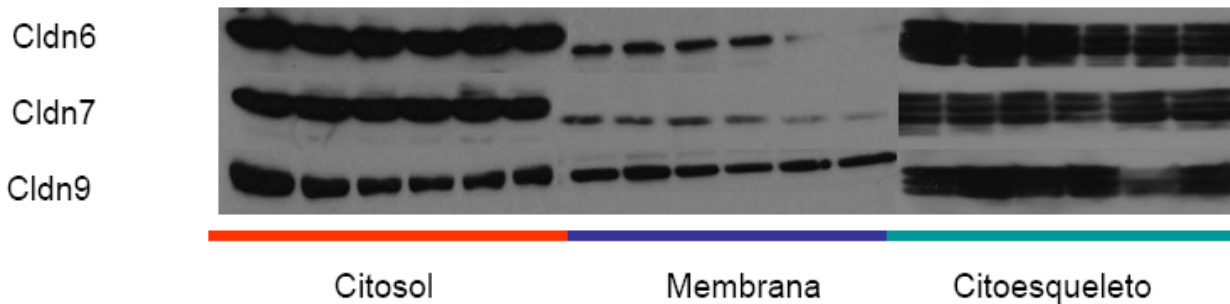


Figura 42. Participación de las vías de MAPK y PKC en la redistribución subcelular de claudinas 6, 7 y 9 en las células LLC-PK₁ transfectadas. El tratamiento con PDBu afectó de manera diferente a la localización subcelular de claudina 6, 7 y 9. El uso de estaurosporina en las células transfectadas con claudina 6 y 7 no inhibió el efecto causado por el PDBu.

Efecto del hEGF sobre la TER de las células LLC-PK₁

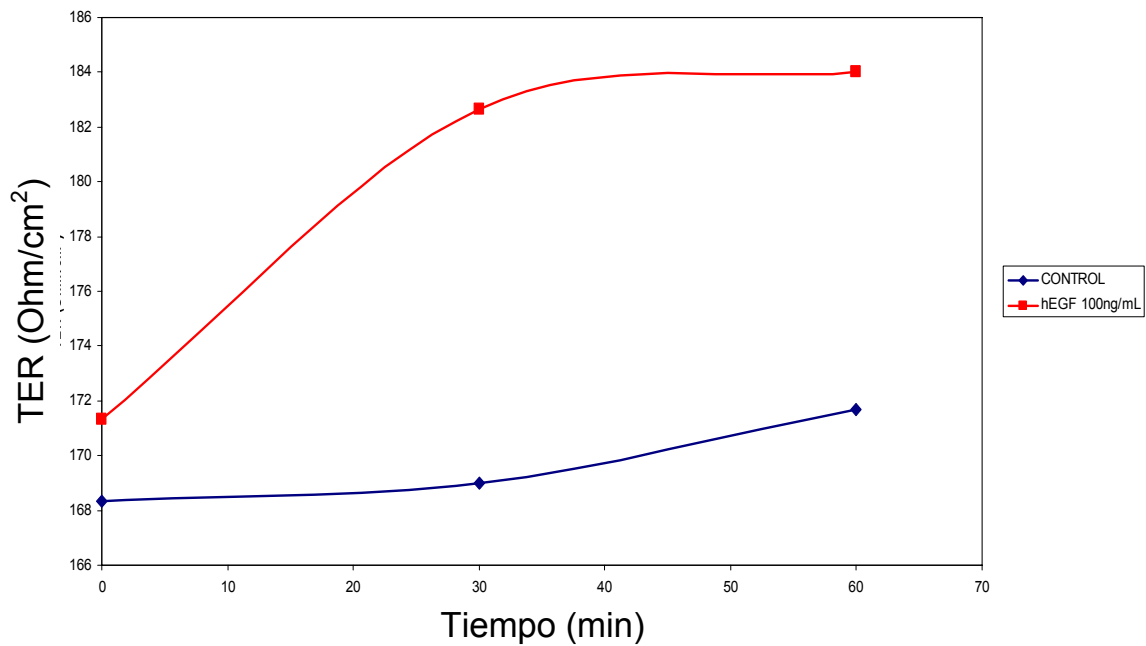


Figura 43. Efecto del tratamiento con hEGF sobre la resistencia eléctrica transepitelial de la línea celular LLC-PK₁. El hEGF induce un aumento en la resistencia transepitelial. Este fenómeno fue observado con las tres claudinas sobreexpresadas en esta línea celular.

Efecto del hEGF sobre el PCF de las células LLC-PK₁

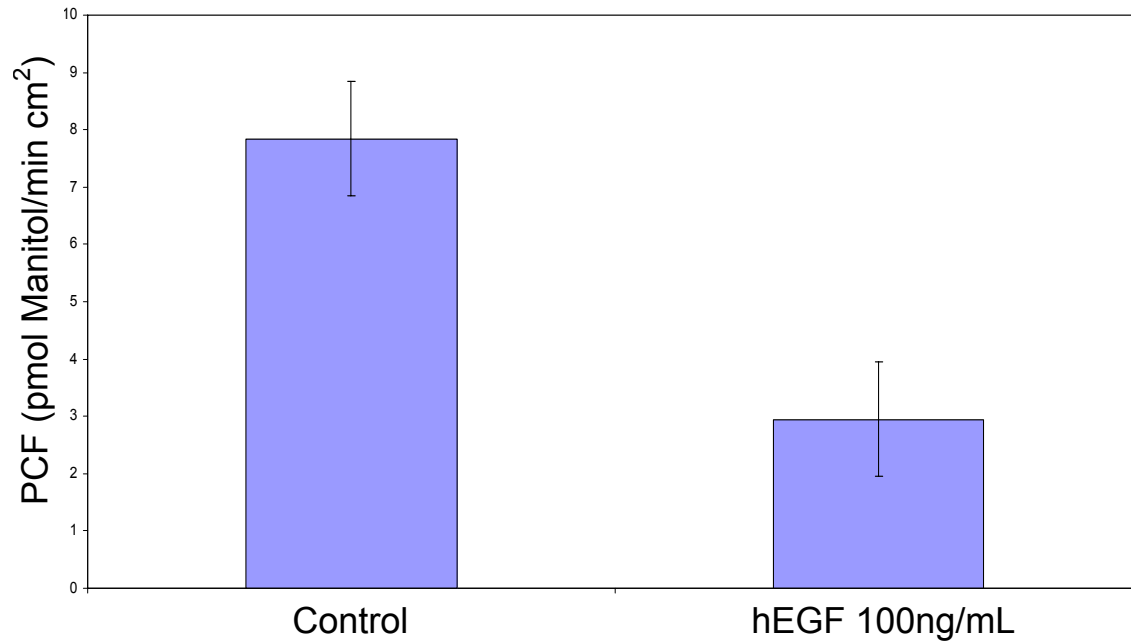


Figura 44. Efecto del tratamiento con hEGF sobre el flujo paracelular de Manitol en la línea celular LLC-PK₁. El hEGF cierra las UE, disminuyendo el flujo paracelular de manitol. Este fenómeno fue observado con las tres claudinas sobreexpresadas en esta línea celular.

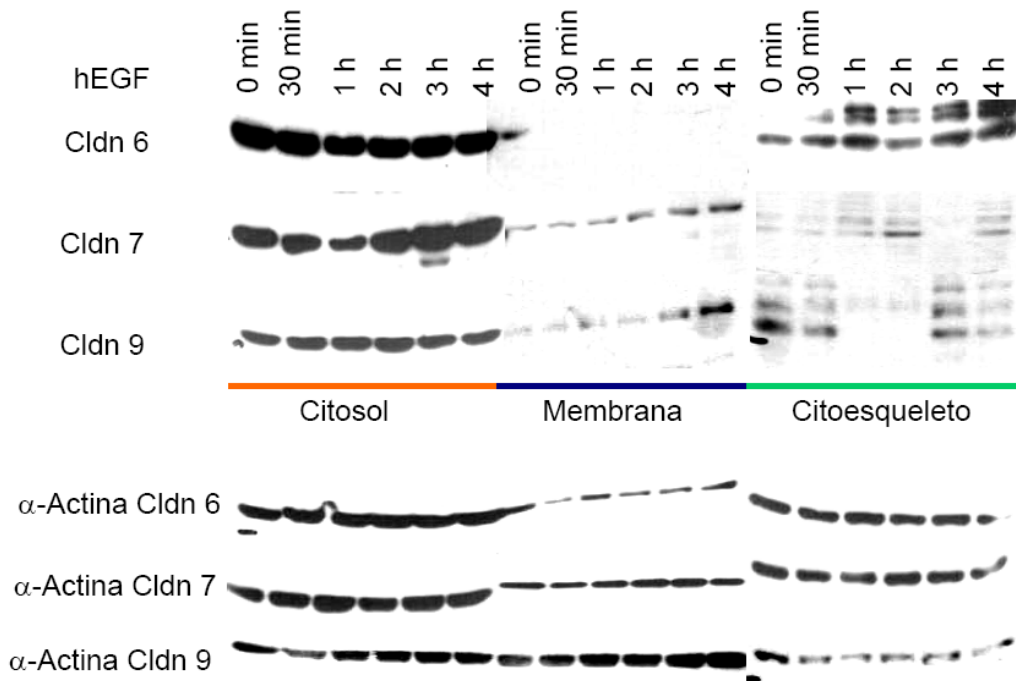


Figura 45. Efecto del hEGF sobre la localización subcelular de las claudinas 6, 7 y 9 en las células LLC-PK₁ transfectadas. El tratamiento con hEGF de las células transfectadas, mostró diferencias en la regulación de la integración a membrana de cada una de las claudinas.

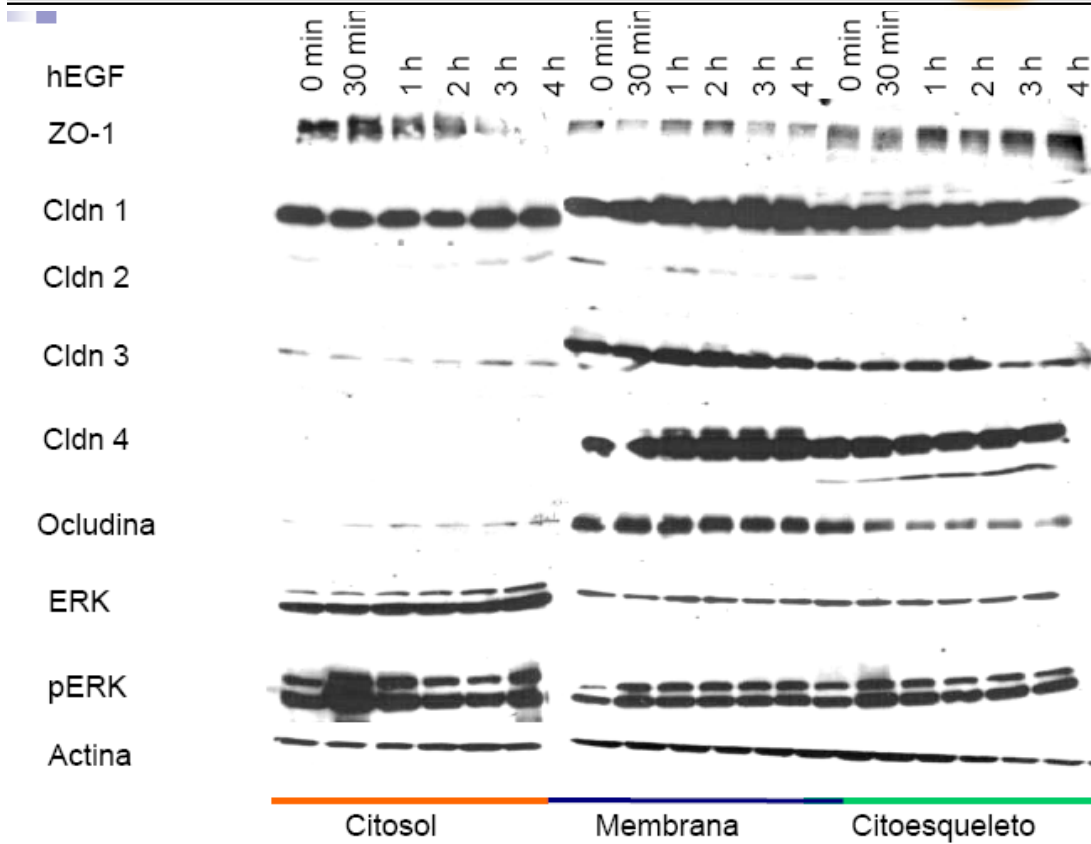


Figura 46. Efecto del hEGF sobre la localización subcelular de proteínas endógenas de la UE. El tratamiento con hEGF de las células LLC-PK₁, mostró diferencias en la regulación de la integración a membrana de cada una de las claudinas y otras proteínas de UE analizadas.

PCF ¹⁴C Mannitol

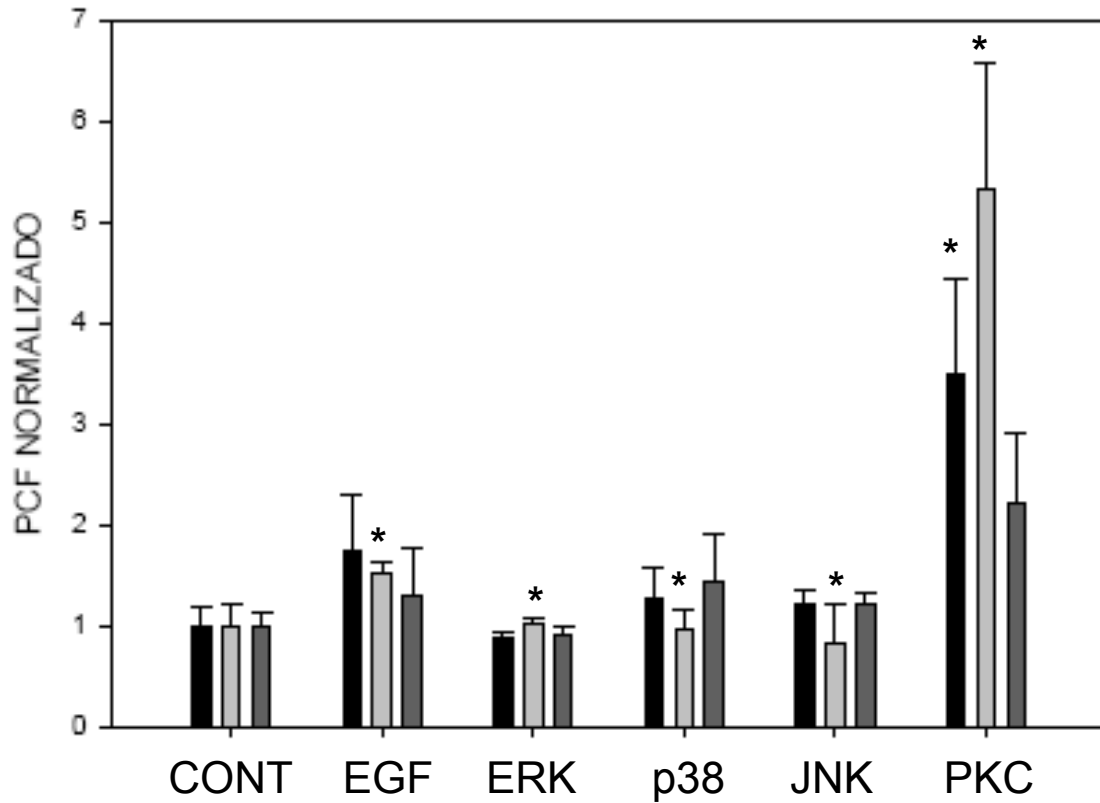


Figura 47. Efecto de los inhibidores de MAPK y PKC sobre el flujo paracelular de manitol en células LLC-PK₁ transfectadas y tratadas con hEGF. Se muestra el efecto del hEGF y los inhibidores de MAPK y PKC sobre las células LLC-PK1 que sobreexpresaban claudina 6 (negro), claudina 7 (gris claro) y claudina 9 (gris oscuro).

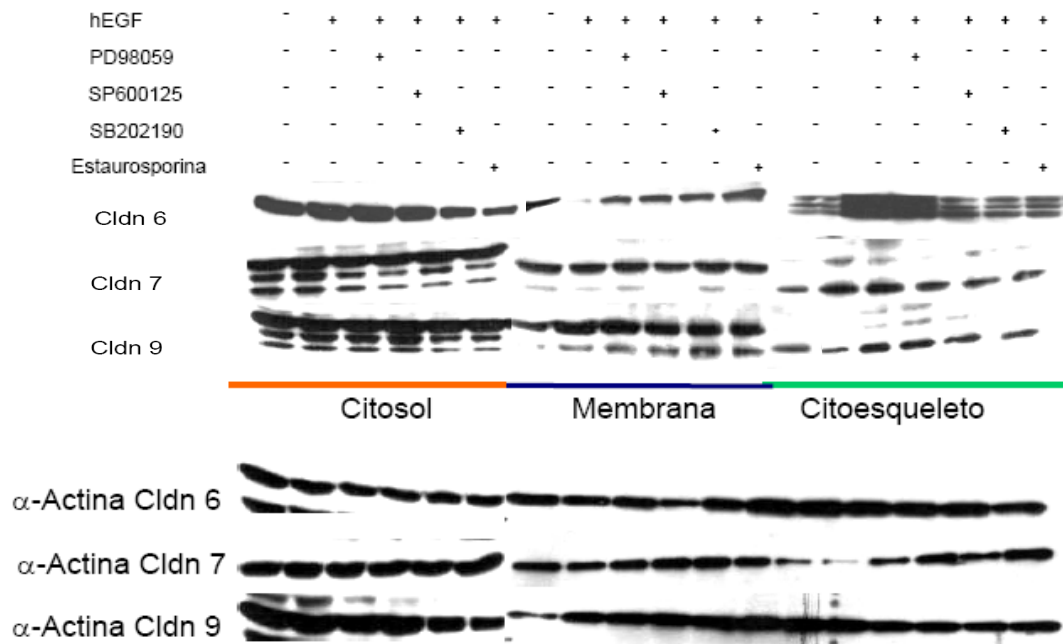


Figura 48. Efecto de los inhibidores de MAPK y PKC sobre la localización subcelular de las claudinas transfectadas en células LLC-PK₁ tratadas con hEGF. Diferencias en la regulación de las claudinas transfectadas en células LLC-PK₁ por el efecto del hEGF.

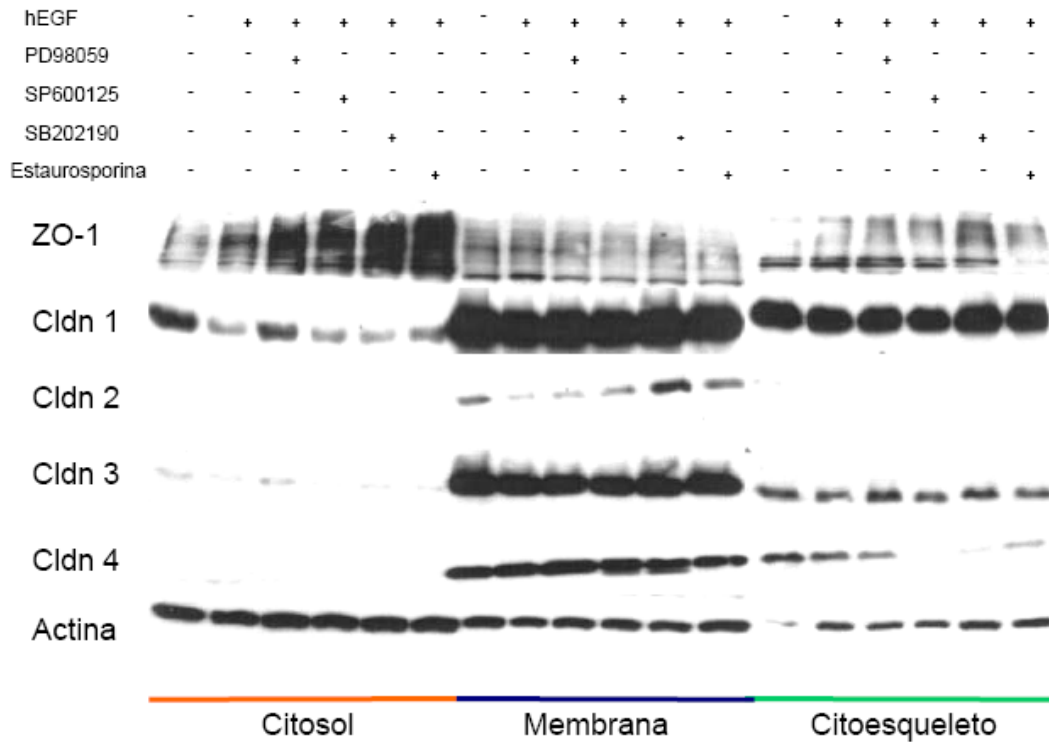


Figura 49. Efecto de los inhibidores de MAPK y PKC sobre la localización subcelular de proteínas de UE endógenas de células LLC-PK₁ tratadas con hEGF. Diferencias en la regulación de las proteínas de UE en células LLC-PK₁ por el efecto del hEGF.



ANEXO 2.

PUBLICACIONES

ORIGINAL ARTICLE

Claudin-6, 7, or 9 Overexpression in the Human Gastric Adenocarcinoma Cell Line AGS Increases Its Invasiveness, Migration, and Proliferation Rate

Veronica Elizabeth Zavala-Zendejas,¹ Ana Cristina Torres-Martinez,¹ Berenice Salas-Morales,¹ Teresa Imelda Fortoul,² Luis Felipe Montaña² and Erika Patricia Rendon-Huerta¹

¹Depto. Bioquímica y ²Depto. Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, México

ABSTRACT

Altered claudin expression is related to metastatic potential, poor prognosis, or tumor recurrence. We analyzed if the overexpression of claudin-6, claudin-7, or claudin-9 in AGS cells altered cell motility, invasiveness, or proliferation rate. Claudin-7, claudin-9, and claudin-6 enhanced their invasive potential by 3.4-fold, 1.6-fold, and 2.0-fold, respectively. Claudin-6 and claudin-9 enhanced cell migration, while the proliferation rate of claudin-6-, claudin-7-, and claudin-9-transfected cells increased by 12.7%, 9.0%, and 13.3%, respectively. Claudin-7 and claudin-9 overexpression increased claudin-1 and zonula occludens-1 levels. In summary, individual increased expression of claudin-6, claudin-7, or claudin-9 is sufficient to enhance tumorigenic properties of a gastric adenocarcinoma cell line.

INTRODUCTION

Tight junctions (TJs) are located in the apical end of the lateral membrane surface and play an important role in epithelial cell–cell adhesion, sealing the intercellular space between adjacent cells and maintaining the cell polarity (1). TJs have a barrier function, regulating the passage of ions, water, and various macromolecules through paracellular spaces and a fence function, preventing the intermixing of molecules in the apical membrane with those in the lateral membrane. TJs are dynamic multimolecular complexes composed of integral membrane proteins, such as claudins, occludin, adherent molecules, and plaque proteins (2).

Claudins belong to a family of 24 members identified in mammals and their expression is tissue-specific. Their C-terminal regions are connected to the actin cytoskeleton through zonula

occluden (ZO) proteins (3). Claudins are responsible for paracellular permeability and barrier selectivity in epithelia (3, 4). Changes in claudin expression lead to loss of TJ structure and function.

Abnormal expression of claudins has been reported in different human epithelial cancers. Claudin-3 and claudin-4 are frequently upregulated in ovarian, breast, prostate, cervix, gastric, and pancreatic tumors (5–10), while claudin-2 is downregulated in breast and prostate cancers (11). The claudin-7 upregulation has been reported as an early event in gastric cancer and cervical neoplasia (12, 13). Changes of claudin expression in tissues can allow for the passage of nutrients and growth factors and promote cancer cell proliferation (14, 15). Similarly, altered claudin expression in early and late stages of several cancers has been related to increased invasiveness and metastatic potential and poor prognosis or tumor recurrence (16–18). A modification in the expression pattern of tissue-specific claudins may serve as a marker and have a prognostic value in certain tumors. It has been established that the loss of claudin-3, claudin-4, and claudin-18 is associated with poor survival in gastric carcinoma (19). Regardless of all the above, the role of claudin modification in cancer progression has not been fully elucidated (20–22).

We have detected that the expression of claudin-6, claudin-7, or claudin-9 in human gastric adenocarcinomas has a role as a prognostic marker of poor survival (23). To assess the role of

Keywords: Claudins, Gastric adenocarcinoma, Cancer cell migration, ZO-1

Correspondence to:

Erika P. Rendon-Huerta, PhD

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

UNAM, 04510, Mexico City, México

email: erendon@bq.unam.mx

claudins in gastric adenocarcinoma, we analyzed if the transfected claudin-6, claudin-7, or claudin-9 in AGS cells promoted changes in cell motility, invasion, and proliferation rate. Our results showed that the proliferation rate, migration, invasive potential, and expression of some endogenous TJ proteins, such as occludin, zonula occludens-1 (ZO-1), and claudin-1, in transfected AGS cells depended on the claudin overexpression.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and media

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, sodium pyruvate, streptomycin–penicillin, and G418 were purchased from Gibco. Trizol, Lipofectamine 2000, pcDNA3.1 NT-GFP, single-step reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and primers were bought from Invitrogen. Antibodies against claudin-1, claudin-2, claudin-7, occludin, ZO-1, green fluorescent protein (GFP), and HRP-conjugated secondary antibodies were bought from Zymed; those against claudin-6 and claudin-9 were bought from Santa Cruz Biotechnology; and rhodamine-labeled secondary antibodies were purchased from Abcam. The actin antibody was kindly provided by Dr. José Manuel Hernández, CINVESTAV, México. The SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate was obtained from Pierce Biotechnology. The 24-well matrigel-coated transwells were purchased from BD Biosciences. The Bromodeoxyuridine (BrdU) proliferation kit was purchased from Calbiochem.

Cell culture, plasmid construction, and transfection

The human gastric adenocarcinoma cell line AGS was maintained in DMEM supplemented with 5% FBS, 1% streptomycin–penicillin solution, 1-mmol/L L-glutamine, insulin, and sodium pyruvate solution at 37°C in a humid environment containing 5% CO₂.

Full-length human claudin-2, claudin-6, claudin-7, and claudin-9 cDNAs were RT-PCR amplified using the primers shown in Table 1 and RNA from AGS cells. cDNAs were cloned into the mammalian expression vector pcDNA3.1 NT-GFP. AGS cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Polyclonal stable transfectants were selected and maintained in 400 µg/ml G-418 in DMEM culture media.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted using Trizol according to the manufacturer's protocol. Samples (0.1-µg RNA) were reverse transcribed with the single-step RT-PCR kit. The RT-PCR cycle conditions were 30 min at 55°C, 2 min at 94°C, then 40 cycles at 44°C for 20 s, 59°C for 30 s, 72°C for 40 s, and for 7 min at 72°C. Reaction products were resolved by electrophoresis. The

Table 1. Primer Sequences

hACTIN forward	5'-TGAAGGTGACAGCAGTCGGTTG-3'
hACTIN reverse	5'-GGCTTTTAGGATGGCAAGGGAC-3'
hCLD1 forward	5'-TGCCACCTGCAAACCTC-3'
hCLD1 reverse	5'-GCCTCTGTGTACACGTAGTC-3'
hCLD2 forward	5'-GAAGACGCTTCTACTGAGAG-3'
hCLD2 reverse	5'-CACGATCCAGTGGTAGTG-3'
hCLD6 forward	5'-CAGTGCAGCTCCTTCAACC-3'
hCLD6 reverse	5'-CTGTTGGGCACTGCCACTTC-3'
hCLD7 forward	5'-TTTCTGAGGGCGGAAATGGC-3'
hCLD7 reverse	5'-GGCATCTAGACACTCCCATAGC-3'
hCLD9 forward	5'-ATGGCTTCGACCGGCTTAG-3'
hCLD9 reverse	5'-CAGGGCATCTGGTCATCAGG-3'

actin cDNA was used as internal standard to normalize RNA amounts.

Protein extraction and Western blot analysis

Cells were scrapped from the plates with lysis buffer (50-mM Tris-HCl, pH 7.6, 150-mM NaCl, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, phosphatase cocktail 1 and phosphatase cocktail 2 (SIGMA), 1-mg/ml trypsin inhibitor, 2-µg/ml leupeptin, and 2-µg/ml aprotinin). The cells were sonicated for 1 min. Protein concentration was determined with a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories). For Western blot analysis 20 µg of protein was resolved on SDS/PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in tris-buffered saline (TBS) and incubated with primary antibodies in Tween 20/TBS (TTBS) overnight at 4°C. Membranes were then washed with TTBS and incubated with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase. Antibody binding was detected by chemiluminescence.

Cell migration assay (scratch-wound assay)

The transfected AGS cells were grown to confluence on 6-well plates and wounded by scraping with a pipette tip. The cells were incubated at 37°C in a humid environment with 5% CO₂, and wound closure was observed and photographed for 36 hr. The experiment was performed twice and assayed in triplicate.

In vitro invasiveness assay (transwell invasion assay)

The 24-well invasion chambers were prepared using matrigel basement membrane matrix (Becton Dickinson Labware) following the manufacturer's protocol. Cells were suspended in DMEM and added to the upper chamber at 1 × 10⁵ cells/transwell. The lower chamber was filled with 5% FBS DMEM as a chemoattractant. After 24 hr of culture, the upper surfaces of the transwells were wiped with cotton swabs, and the inserts were stained with a 1% toluidine blue in 1% borax solution. The invading cells were counted under a light microscope in five fields per insert, and the mean for each chamber was determined. The experiment was performed twice with each sample in triplicate.

Cell proliferation assay

The BrdU cell proliferation assay (Calbiochem) was employed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1×10^4 cells were seeded on a 96-well culture plate and allowed to attach. BrdU label was added and incubated with cells for 24 hr at 37°C in a humid environment with 5% CO₂. The cells were fixed and denatured and mouse anti-BrdU antibody was added and incubated for 1 hr at room temperature. Secondary goat anti-mouse IgG HRP antibody was added and incubated for 30 min at room temperature. HRP substrate was added and after 15 min the reaction was stopped. Absorbance at 490 nm was read in a plate spectrophotometer. Changes in the proliferation rate were assessed considering mock cells proliferation as 100%. Each experiment was performed twice with triplicate samples.

Immunofluorescence microscopy

AGS cells were grown to confluence on coverslips and fixed in ice-cold methanol for 10 min. The samples were permeabilized with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Triton X-100 at room temperature for 5 min and blocked in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA) for 30 min. The samples were then incubated with each primary antibody overnight at 4°C. After washing, the samples were incubated with the respective secondary antibody conjugated with rhodamine. Images were captured on a confocal laser-scanning fluorescence microscope Leica TCS SP5 or an Olympus BX51 fluorescence microscope that includes special software for image capture.

Statistical analysis

All values are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The Student's *t*-test analysis was used to evaluate differences between the two groups. Differences were considered significant for $p < .05$.

RESULTS

Claudin expression

We selected claudin-6, claudin-7, and claudin-9 on the basis of our results and those of others that link gastric adenocarcinoma progression and poor prognosis with these claudins (23). Because of the recognized importance of claudin-2 in cancer progression, we used claudin-2-transfected AGS cells as a positive control throughout the experiments. To facilitate claudin detection we fused green fluorescent protein (GFP) with the N-terminal of each claudin. Figure 1(a) shows the constitutive presence of mRNA for the four claudins as well as the overexpressed claudin mRNA in the AGS cell line. Figure 1(b) confirms that all four claudins were translated in the transfected AGS cells; the figure also demonstrates the integrity of the claudin-GFP complex as determined with a specific anti-GFP monoclonal antibody and with specific anti-claudin monoclonal and polyclonal antibodies (Figure 1(c)).

Confocal microscopy showed that claudins could localize to the cytosol (Figure 2(a)). To evaluate if cytosolic localization was related to the employed cell line and not due to the GFP-fused proteins, endogenous claudins were detected in non-transfected AGS cells, and as observed in Figure 2(b), only claudin-4 could be detected in the cell membrane, while endogenous claudin-2 and claudin-7 were located in the cytosol. Interestingly, claudin-1 was detected within the nucleus as well as in the cytosol; the cytosolic expression of claudins is abnormal and is representative of tumor cells (11). Cytosolic detection was also observed for occludin and ZO-1. We found discontinuous distribution of ZO-1 in regions of cell-cell contacts, an observation that corroborates the results of other authors that indicate, AGS cells do not form adherens or TJs between adjacent cells (24–26). The control untransformed renal epithelial LLC-PK₁ cells were also transfected with the same GFP-fused proteins (Figure 2(c)) and claudins localized in cell membrane regions, thus reinforcing the result obtained with the transfected AGS cells.

Claudin overexpression increases cell migration

The claudin-6 and claudin-9 overexpression increased the motility of transfected AGS cells (Figure 3). Interestingly, claudin-9-overexpressing cells initiated the repair process at 12 hr versus 24 hr in the claudin-6-overexpressing cells. Claudin-2- and claudin-7-transfected cells showed a similar behavior, but opposed to the other two claudins, the repair process was evident after 36 hr. The nontransfected AGS cells needed 48 hr to repair the wound.

Invasive potential of transfected AGS cells

Figure 4(a) illustrates how transfected AGS cells, dependent on the overexpressed claudin, showed differences in their invasive potential. The most invasive were claudin-2-transfected AGS cells, followed by claudin-7-, claudin-9-, and finally claudin-6-transfected AGS cells. The quantitative results of all the experiments are shown in Figure 4(b). The claudin-2 overexpression showed a 4.4-fold invasive increase compared with mock cells; claudin-7 also showed a high invasive potential (3.4-fold), but, interestingly, claudin-9 and claudin-6 were significantly less efficient invading matrigel chambers (2- and 1.6-fold, respectively).

AGS cell growth and claudin overexpression

The AGS-transfected cells showed an increase in the proliferation rate. This increase was associated with the invasive potential; the AGS cells overexpressing claudin-2 showed a marked increase in cell growth, determined by BrdU incorporation, in comparison with claudin-7-, claudin-9-, and claudin-6-overexpressing AGS cells (Figure 5). Claudin-2 overexpression increased cell proliferation by 24.9%, whereas claudin-6, claudin-7, and claudin-9 increased cell proliferation by 9%, 12.7%, and 13.3% ($p < .05$), respectively.

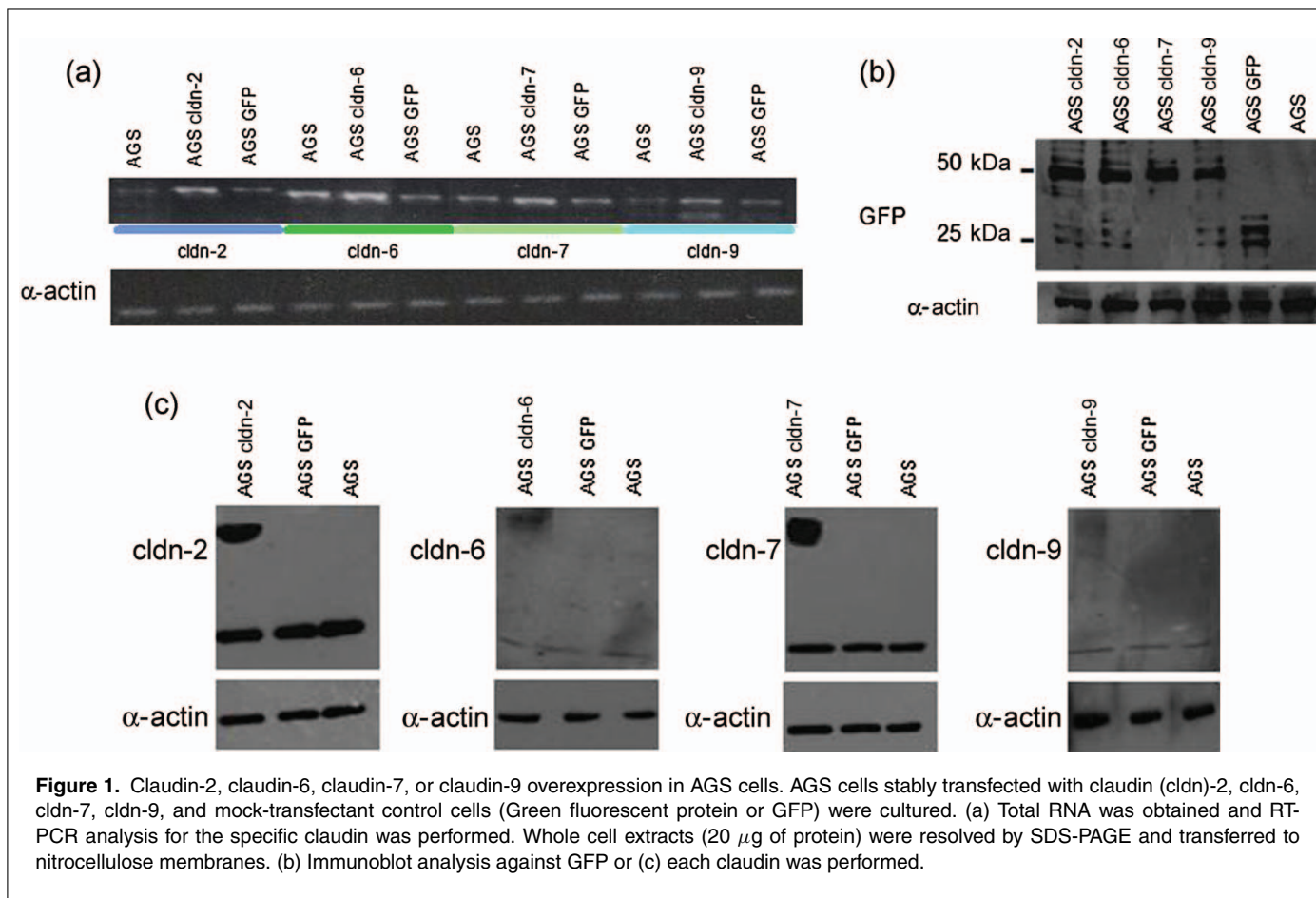


Figure 1. Claudin-2, claudin-6, claudin-7, or claudin-9 overexpression in AGS cells. AGS cells stably transfected with claudin (cldn)-2, cldn-6, cldn-7, cldn-9, and mock-transfectant control cells (Green fluorescent protein or GFP) were cultured. (a) Total RNA was obtained and RT-PCR analysis for the specific claudin was performed. Whole cell extracts (20 μ g of protein) were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. (b) Immunoblot analysis against GFP or (c) each claudin was performed.

Claudin overexpression and actin reorganization

Changes in actin polymerization are shown in Figure 6. More stress fibers were evident in claudin-2-, claudin-6-, and claudin-9-overexpressing cells. Although claudin-7-transfected cells showed less stress fibers, they were more evident than mock cells. Interestingly, AGS cells overexpressing claudin-6 and claudin-9 exhibited the formation of pseudopodia and filopodia.

Effect of claudin overexpression on other TJ proteins

The constitutive expression of claudin-1 was similarly enhanced in all claudin-transfected AGS cells. Figures 7 and 8 show increased mRNA and protein expression of claudin-1, respectively, in all four transfected cells. The presence of a double band could represent post-translational modifications of claudin-1. The intensity of the double band was more intense in claudin-9 than in claudin-6-overexpressing cells. Claudin-1 nuclear localization, observed in mock and untransfected cells, was lost in claudin-overexpressing cells (Figure 9). The expression of occludin was slightly enhanced in all claudin-overexpressing AGS cells in comparison with control cells. In-

terestingly, although ZO-1 protein expression was apparently higher in claudin-2- and claudin-6-overexpressing cells, results of confocal microscopy showed an enhanced membrane-associated expression of ZO-1 in the AGS cells overexpressing claudin-9 and claudin-7 (Figure 10).

DISCUSSION

One of the main changes in cancer cells is the loss of cell-to-cell adhesion, which is regulated to some extent by TJ proteins. However, the role of TJ proteins, such as occludin, claudins, junctional adhesion molecule, and others, has not been clarified. Our aim was to determine if the overexpression of certain gastric adenocarcinoma-related claudins in AGS cells had any effect on events related to cancer progression, such as migration, invasive potential, and proliferation rate. It has recently been recognized that TJs are part of a multifunctional apparatus involved in gene transcription, tumor suppression, and cell proliferation (1, 17, 27, 28).

Neoplastic tissues express a different claudin pattern compared with the normal tissue, this change being considered as an early event in tumorigenesis (12, 29). Tumorigenesis implies a multistep process that drives the transformation of normal cells into highly invasive and migrating cells. It has been shown that

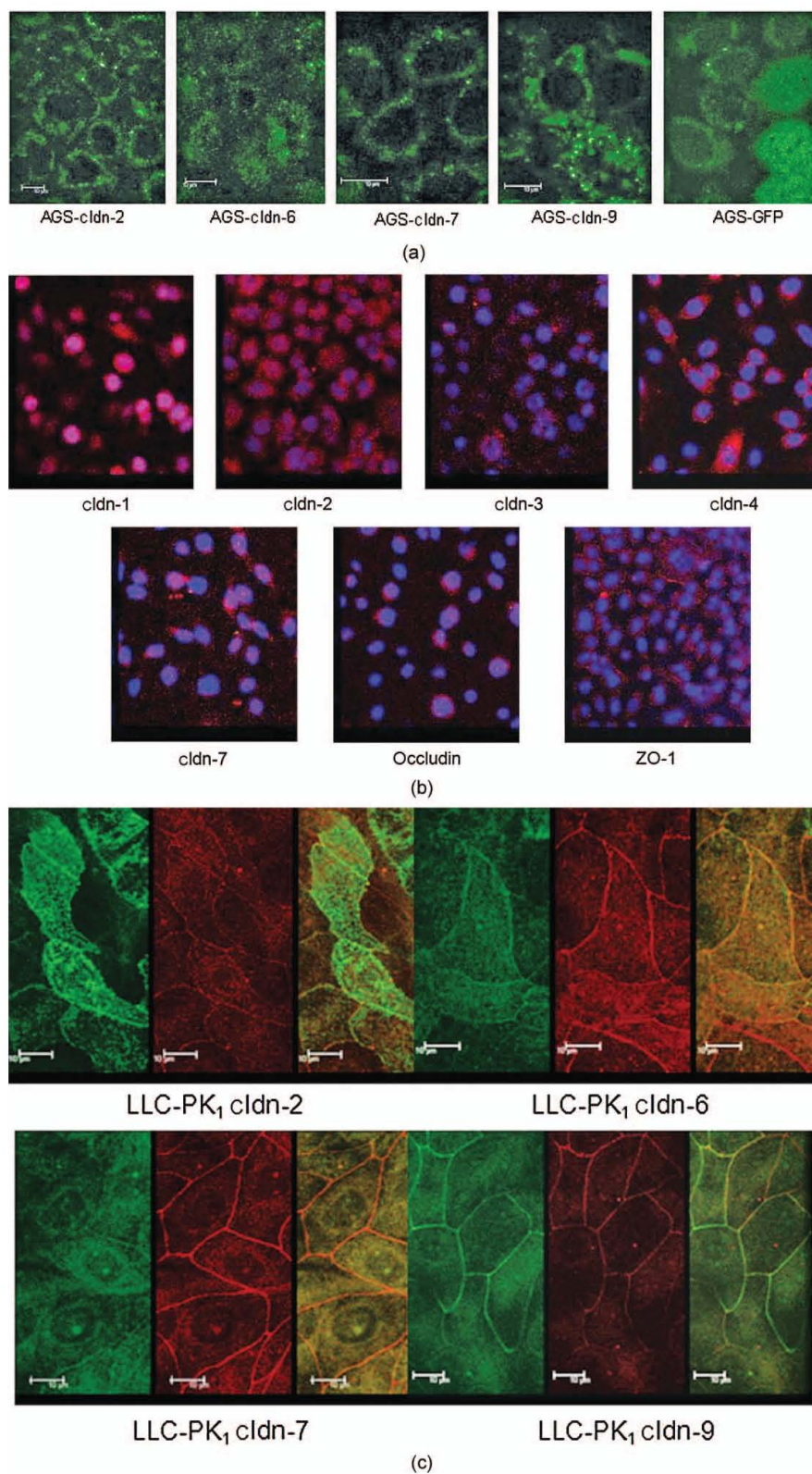
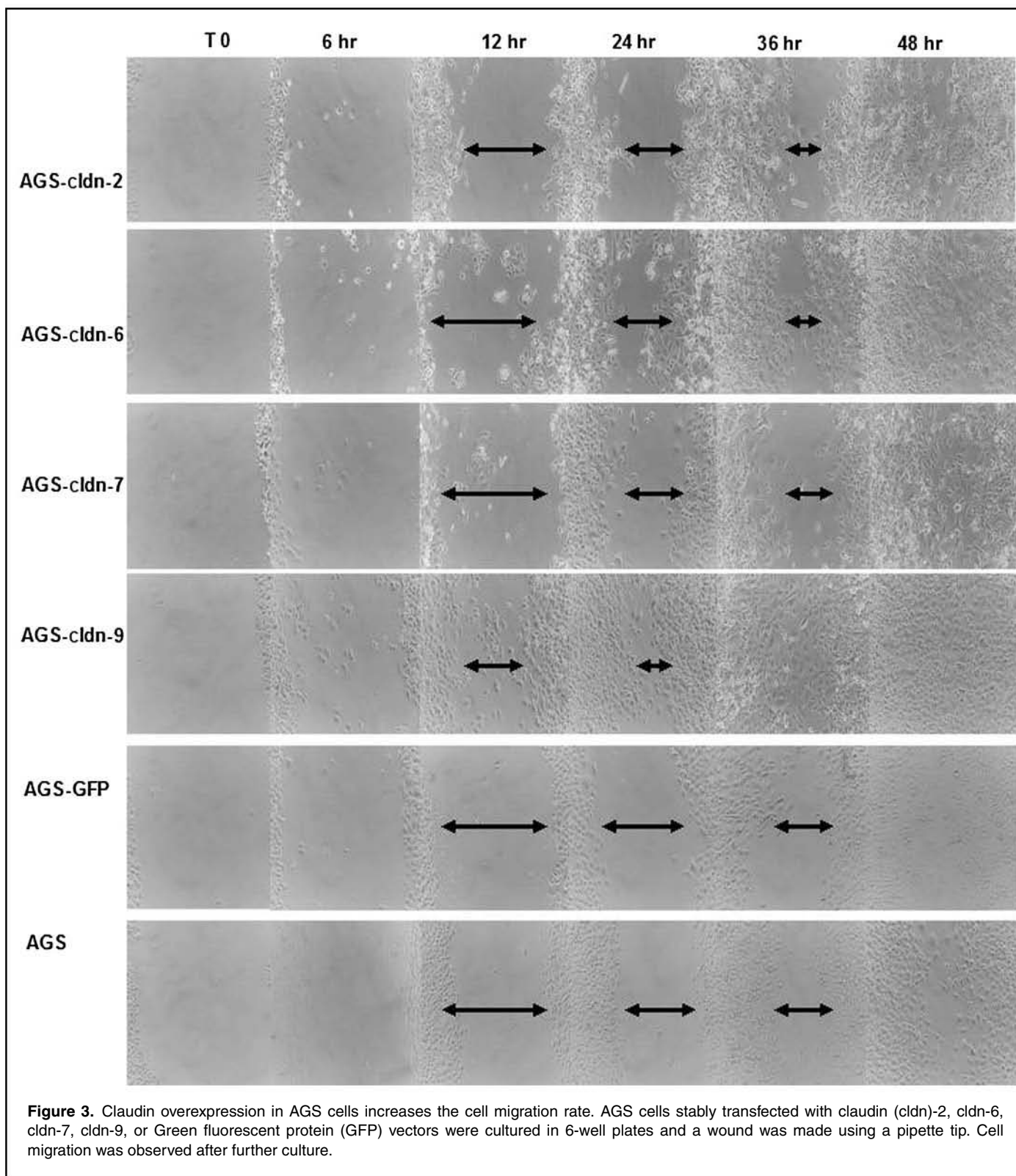


Figure 2. Overexpressed claudins in AGS cells are localized in the cytosol. (a) Confocal microscopy of transfected AGS cells overexpressing claudin (cldn)-2, cldn-6, cldn-7, cldn-9, or Green fluorescent protein (GFP), respectively. (b) Immunofluorescence for endogenous cldn-1, cldn-2, cldn-3, cldn-4, cldn-7, occludin, and ZO-1 (red) in nontransfected AGS cells, DAPI stain was added for nucleus detection (blue). (c) Membrane localization of cldn-2, cldn-6, cldn-7, or cldn-9 (green) in LLC-PK₁ transfectants. Endogenous cldn-1 (red) can also be observed.



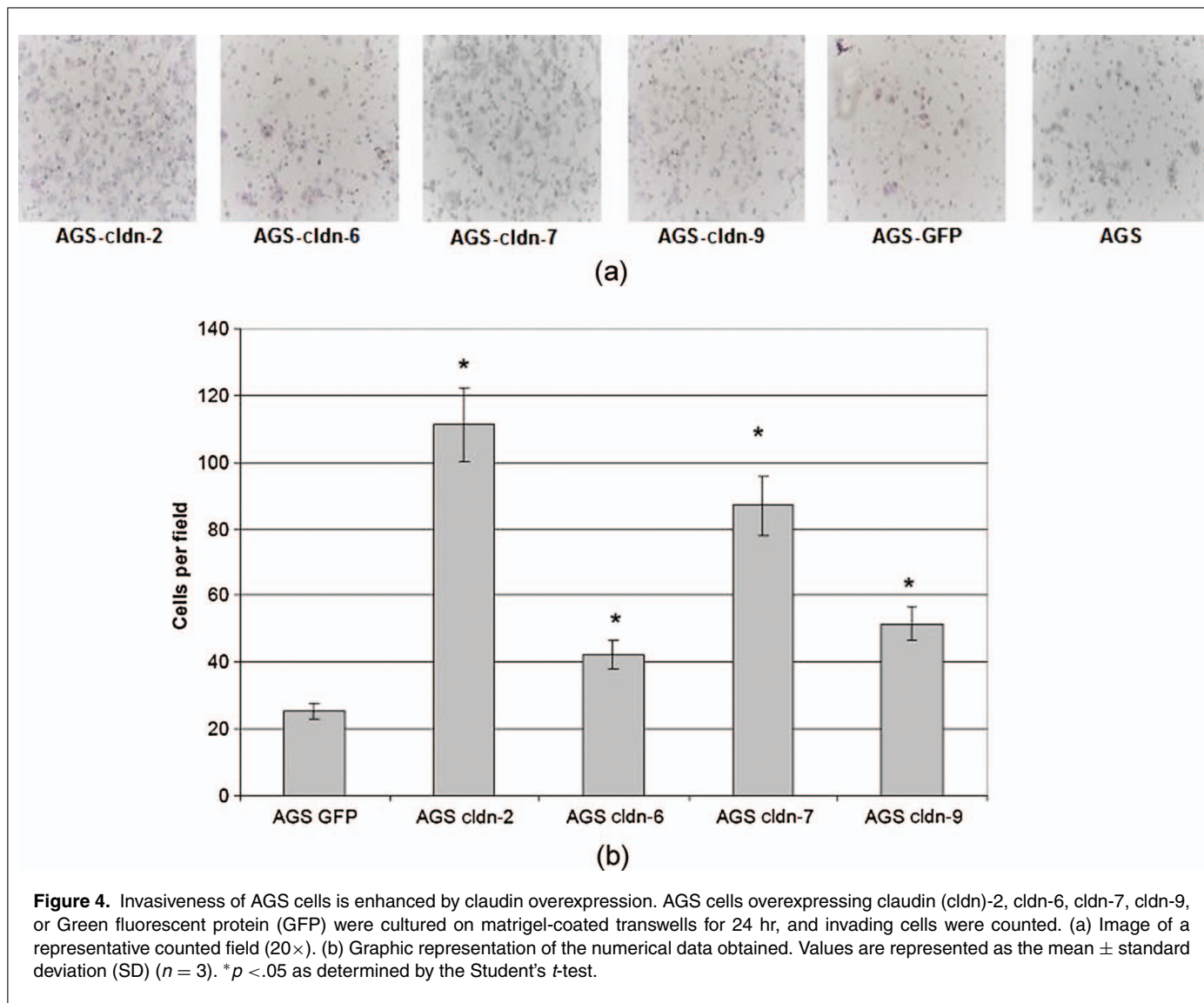


Figure 4. Invasiveness of AGS cells is enhanced by claudin overexpression. AGS cells overexpressing claudin (cldn)-2, cldn-6, cldn-7, cldn-9, or Green fluorescent protein (GFP) were cultured on matrigel-coated transwells for 24 hr, and invading cells were counted. (a) Image of a representative counted field (20 \times). (b) Graphic representation of the numerical data obtained. Values are represented as the mean \pm standard deviation (SD) ($n = 3$). * $p < .05$ as determined by the Student's t -test.

overexpression of some claudins can stimulate or inhibit the migration of colon cancer cells (22); an identical observation was made in ovarian and oral squamous carcinomas (5, 27). Several reports have shown alteration in the invasion and migration activities of tumoral cells because of differential claudin expression (5, 30–32); however, the effect of claudin-6 and claudin-9 are still unknown.

We observed that AGS cells overexpressing claudin-6 and claudin-9 significantly enhanced cell migration; claudin-2 and claudin-7 also had an enhancing effect but it was lower than the claudin-6- and claudin-9-overexpressing cells. The mechanism is still unknown; however, recent reports suggest that increased proliferation and migration of tumor cells may be the result of changes in ionic microenvironments in the apical and lateral membranes, and altered distribution of ionic channels or transporters, hence changing the intracellular pH and cell proliferation (33). It was previously reported that claudin-2 overexpression in AGS cells increased their inva-

sive potential, whereas the induction of claudin-4 expression had an opposite effect (20, 21); while claudin localization was not assessed, membrane expression of claudin-4 could be important for the decreased invasiveness. However, the mechanisms that could explain how cytosolic claudins regulate cell migration, invasiveness, and proliferation rate remain to be elucidated.

The actin cytoskeleton reorganization is related to pseudopodia and filopodia formation; in AGS cells, it is only observed when external stimuli such as infection with CagA *Helicobacter pylori* occurs (34, 35). Interestingly, in our AGS cells the transfection of claudin-6 and claudin-9 induced the formation of pseudopodia and filopodia. These structures could be responsible for the increased migration observed in such cells (36). While direct regulation of actin cytoskeleton has not been reported, it could be possible that claudin overexpression is directly or indirectly altering the function or even the expression of regulatory factors for actin polymerization, such as small G

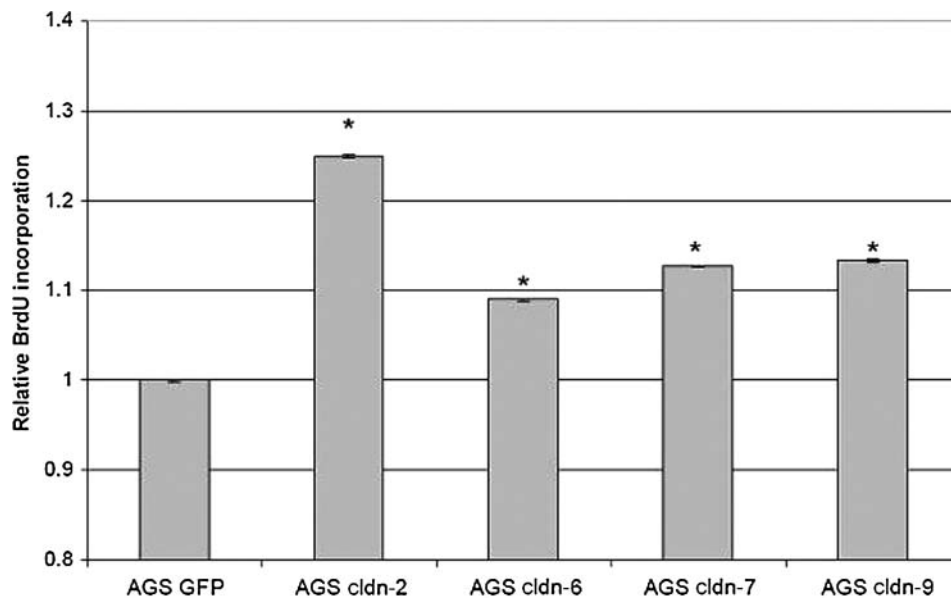


Figure 5. Overexpression of claudins in AGS cells increases their proliferation rate. Transfected AGS cells overexpressing claudin (cldn)-2, cldn-6, cldn-7, or cldn-9 and mock (GFP) cells were cultured on 96-well plates, and BrdU incorporation was assessed 24 hr after seeding to assess the proliferation rate. The results are expressed relative to the control (GFP). Values are represented as the mean \pm standard deviation (SD) ($n = 3$). $p < .05$ as determined by the Student's *t*-test.

proteins of the Rho family, cofilin, and Arp2/3 complex. Further studies are needed to corroborate this hypothesis.

It has been suggested that claudin-1 has a potential metastatic suppressor function in lung adenocarcinoma (37) and a tumorigenic role in gastric epithelial cells (38). However, several reports have shown a role for claudin-1 in metastatic processes through activation of metalloproteinases, increasing cell migra-

tion, enhancing survival, and reducing apoptotic rate (5, 17, 22, 39). It was interesting to observe that overexpression of claudin-2, claudin-6, claudin-7, and claudin-9 was associated with a uniform overexpression of endogenous claudin-1. This observation suggests that there might be a claudin-1 expression pathway that is commonly affected by any of the overexpressed claudins. This might be related to the activation of different

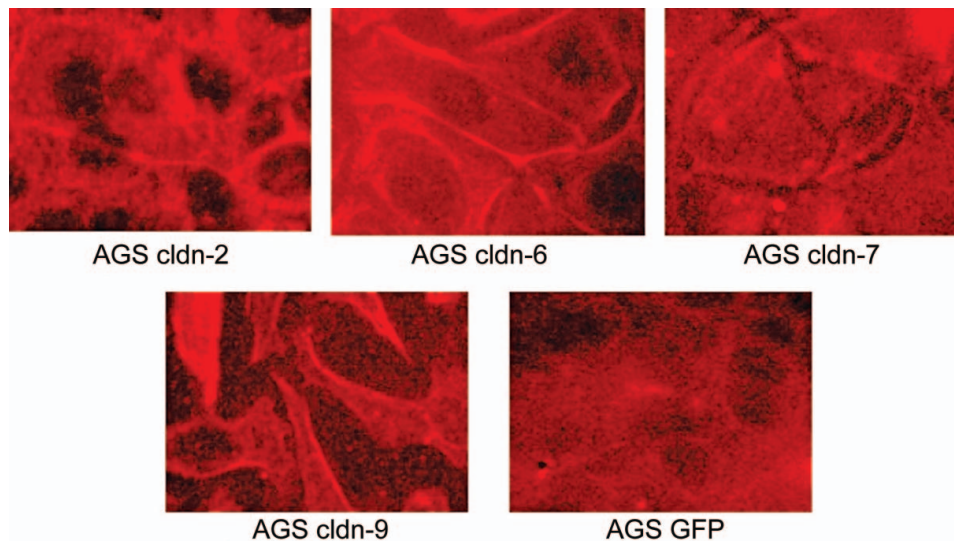
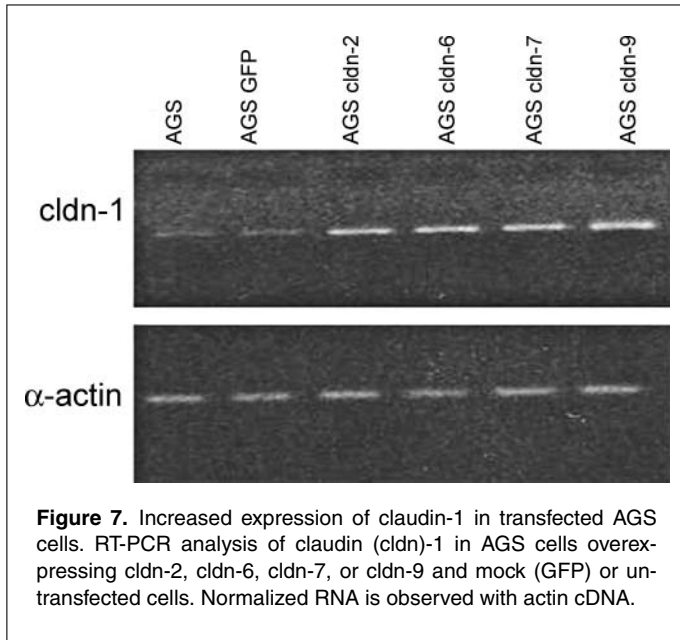
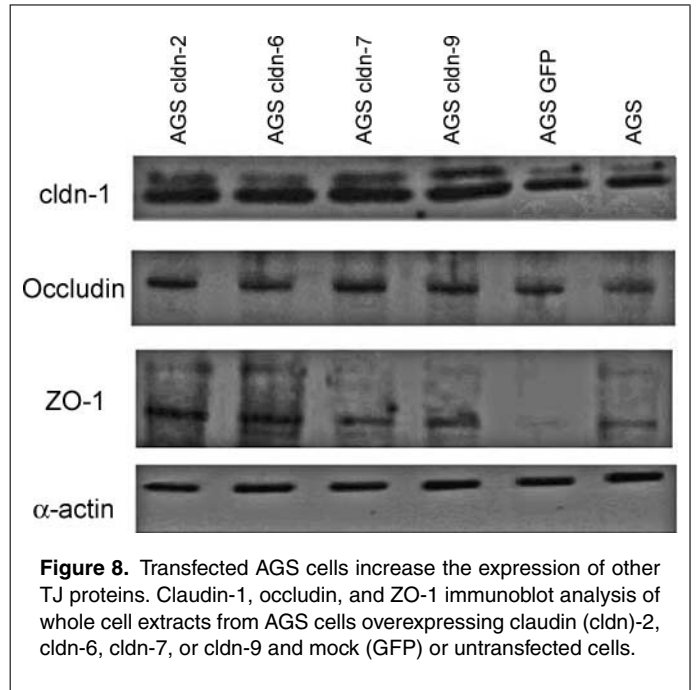


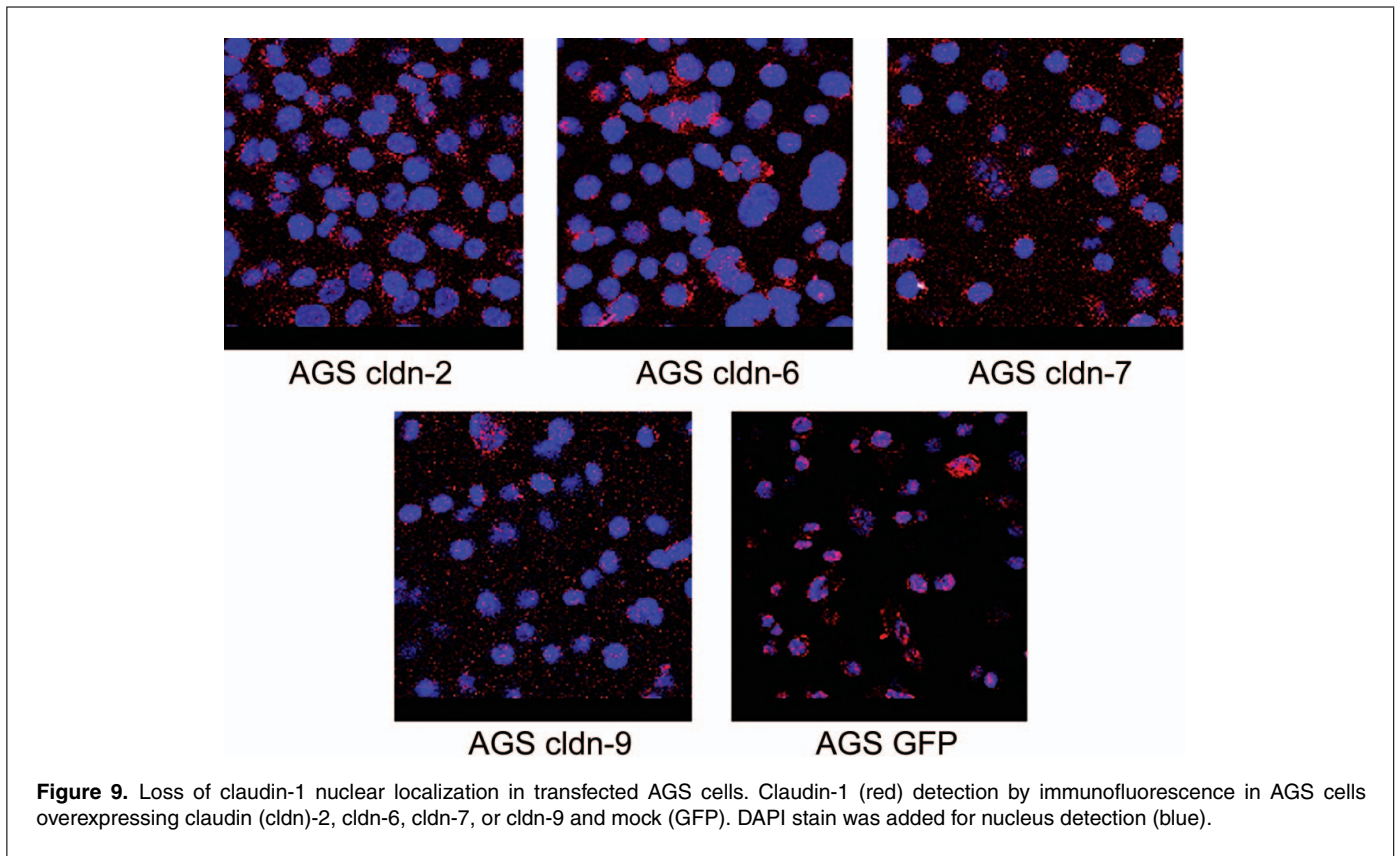
Figure 6. Claudin overexpression induces changes of actin polymerization in AGS cells. Fluorescence microscopy images of immunofluorescence for actin cytoskeleton detection in transfected AGS cells.



transcription factors or repressors, as it has been reported in esophageal squamous cell carcinoma, colorectal cancer cells, Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, and mouse epithelial cells (40–43). It was also interesting to observe that endogenous claudin-1 expression was primarily localized in the nucleus, while cytosolic localization was mainly observed in



claudin-overexpressing cells. This could indicate that claudin-1 plays a regulatory role within the nucleus that could be involved in the regulation of cell proliferation, migration, and invasiveness. It would be interesting to further pursue this possibility.



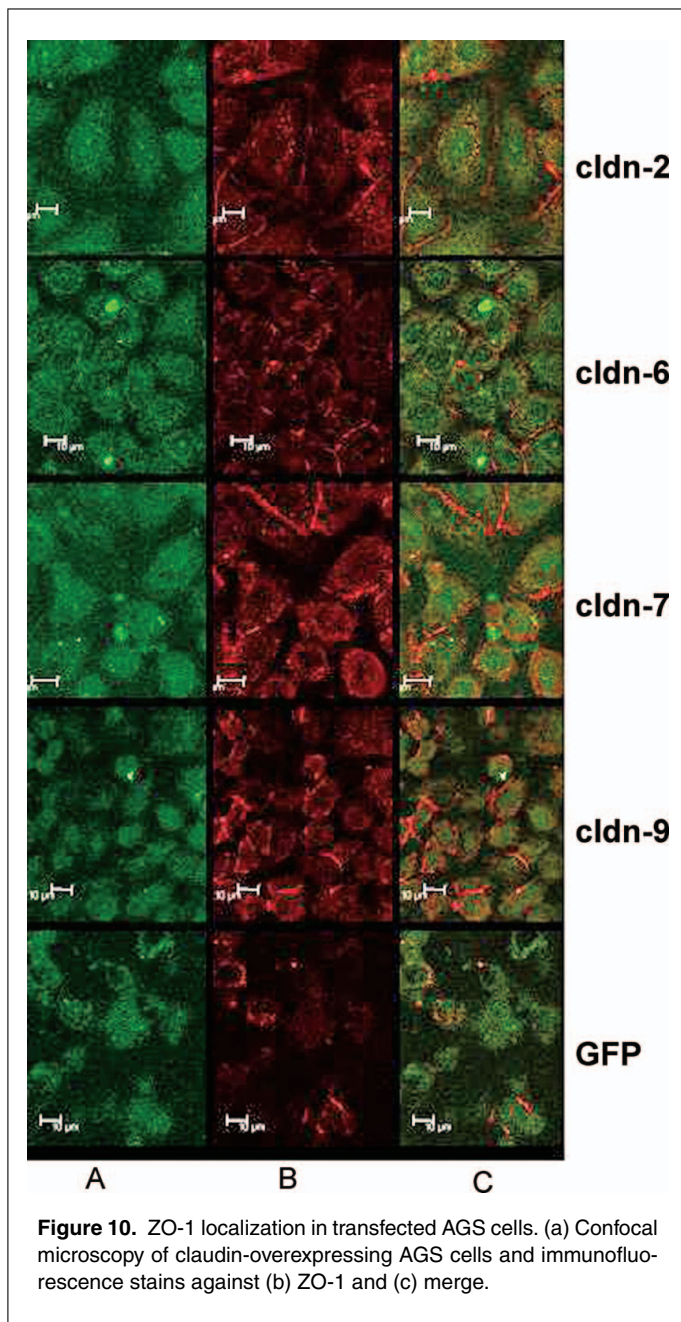


Figure 10. ZO-1 localization in transfected AGS cells. (a) Confocal microscopy of claudin-overexpressing AGS cells and immunofluorescence stains against (b) ZO-1 and (c) merge.

We also found that the occludin expression was not severely modified. The ZO-1 expression was apparently higher in claudin-2- and claudin-6-overexpressing cells, whereas confocal microscopy results showed an enhanced membrane-associated expression of ZO-1 in the AGS cells overexpressing claudin-9 and claudin-7. It is well known that the transcription factors regulating the occludin and ZO-1 expression are different from those that regulate claudin expression (44, 45). Nevertheless, it has been recently shown that the activation of the oncogenic Raf-1 protein, which regulates occludin expression, confers an oncogenic phenotype in Pa-4 epithelial cells (46). The inhibition of Raf-1 protein also regulates claudin expression (47). The enhanced ZO-1 expression could be related

to an alteration in the suppressor activity of JunD transcription factor (44), induced by claudins.

In summary, our results emphasize the important role that claudin-2, claudin-6, claudin-7, and claudin-9 have in tumorigenic behavior of gastric adenocarcinomas, which so far have been associated with poor prognosis (48, 49), as well as enhanced cell proliferation and invasion (20–22).

ACKNOWLEDGMENTS

V. E. Zavala-Zendejas is a graduate student at the PhD program, “Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas,” UNAM, México, and was the recipient of a CONACyT grant. This work was partially supported by IN207108–2, IN-202508–3, and IN-210409–3 grants from PAPIIT, UNAM, and SALUD-13970 grant from CONACyT, México.

DECLARATION OF INTEREST

The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- Schneeberger, E.E.; Lynch, R.D. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* **2004**, *286*, C1213–C1228.
- Gonzalez-Mariscal, L.; Betanzos, A.; Nava, P.; Jaramillo, B.E. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* **2003**, *81*, 1–44.
- Furuse, M.; Hata, M.; Furuse, K.; Yoshida, Y.; Haratake, A.; Sugitani, Y.; Noda, T.; Kubo, A.; Tsukita, S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* **2002**, *156*, 1099–1111.
- Turksen, K.; Troy, T.C. Barriers built on claudins. *J Cell Sci* **2004**, *117*, 2435–2447.
- Agarwal, R.; D’Souza, T.; Morin, P.J. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res* **2005**, *65*, 7378–7385.
- Cunningham, S.C.; Kamangar, F.; Kim, M.P.; Hammoud, S.; Haque, R.; Iacobuzio-Donahue, C.A.; Maitra, A.; Ashfaq, R.; Hustinx, S.; Heitmiller, R.E.; Choti, M.A.; Lillemoe, K.D.; Cameron, J.L.; Yeo, C.J.; Schulick, R.D.; Montgomery, E. Claudin-4, mitogen-activated protein kinase kinase 4, and stratifin are markers of gastric adenocarcinoma precursor lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2006**, *15*, 281–287.
- Long, H.; Crean, C.D.; Lee, W.H.; Cummings, O.W.; Gabig, T.G. Expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res* **2001**, *61*, 7878–7881.
- Nichols, L.S.; Ashfaq, R.; Iacobuzio-Donahue, C.A. Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target. *Am J Clin Pathol* **2004**, *121*, 226–230.
- Santin, A.D.; Bellone, S.; Siegel, E.R.; McKenney, J.K.; Thomas, M.; Roman, J.J.; Burnett, A.; Tognon, G.; Bandiera, E.; Pecorelli, S. Overexpression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in uterine carcinosarcomas. *Clin Cancer Res* **2007**, *13*, 3339–3346.
- Tokes, A.M.; Kulka, J.; Paku, S.; Szik, A.; Páska, C.; Novák, P.K.; Szilák, L.; Kiss, A.; Bögi, K.; Schaff, Z. Claudin-1, -3 and -4 proteins

- and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* **2005**, *7*, R296–R305.
11. Soini, Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology* **2005**, *46*, 551–560.
 12. Johnson, A.H.; Frierson, H.F.; Zaika, A.; Powell, S.M.; Roche, J.; Crowe, S.; Moskaluk, C.A.; El-Rifai, W. Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis. *Am J Pathol* **2005**, *167*, 577–584.
 13. Lee, J.W.; Lee, S.J.; Seo, J.; Song, S.Y.; Ahn, G.; Park, C.S.; Lee, J.H.; Kim, B.G.; Bae, D.S. Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* **2005**, *97*, 53–59.
 14. Morin, P.J. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* **2005**, *65*, 9603–9606.
 15. Mullin, J.M. Epithelial barriers, compartmentation, and cancer. *Sci STKE* **2004**, *2004*, e2.
 16. Cohn, M.L.; Goncharuk, V.N.; Diwan, A.H.; Zhang, P.S.; Shen, S.S.; Prieto, V.G. Loss of claudin-1 expression in tumor-associated vessels correlates with acquisition of metastatic phenotype in melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol* **2005**, *32*, 533–536.
 17. Dhawan, P.; Singh, A.B.; Deane, N.G.; No, Y.; Shiou, S.R.; Schmidt, C.; Neff, J.; Washington, M.K.; Beauchamp, R.D. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* **2005**, *115*, 1765–1776.
 18. Kominsky, S.L.; Argani, P.; Korz, D.; Evron, E.; Raman, V.; Garrett, E.; Rein, A.; Sauter, G.; Kallioniemi, O.P.; Sukumar, S. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* **2003**, *22*, 2021–2033.
 19. Satake, S.; Semba, S.; Matsuda, Y.; Usami, Y.; Chiba, H.; Sawada, N.; Kasuga, M.; Yokozaki, H. Cdx2 transcription factor regulates claudin-3 and claudin-4 expression during intestinal differentiation of gastric carcinoma. *Pathol Int* **2008**, *58*, 156–163.
 20. Mima, S.; Tsutsumi, S.; Ushijima, H.; Takeda, M.; Fukuda, I.; Yokomizo, K.; Suzuki, K.; Sano, K.; Nakanishi, T.; Tomisato, W.; Tsuchiya, T.; Mizushima, T. Induction of claudin-4 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. *Cancer Res* **2005**, *65*, 1868–1876.
 21. Mima, S.; Takehara, M.; Takada, H.; Nishimura, T.; Hoshino, T.; Mizushima, T. NSAIDs suppress the expression of claudin-2 to promote invasion activity of cancer cells. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 1994–2000.
 22. Takehara, M.; Nishimura, T.; Mima, S.; Hoshino, T.; Mizushima, T. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol Pharm Bull* **2009**, *32*, 825–831.
 23. Rendon-Huerta, E.; Teresa, F.; Teresa, G.M.; Xochitl, G.S.; Georgina, A.F.; Veronica, Z.Z.; Montaña, L.F. Distribution and expression pattern of claudins 6, 7, and 9 in diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinomas. *J Gastrointest Cancer* **2010**, *41*, 52–59.
 24. Amieva, M.R.; Vogelmann, R.; Covacci, A.; Tompkins, L.S.; Nelson, W.J.; Falkow, S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **2003**, *300*, 1430–1434.
 25. Sahar, H.; Mueller, A.; Tompkins, L.S.; Falkow, S.; Merrell, D.S. Phosphorylation-independent effects of CagA during interaction between *Helicobacter pylori* and T84 polarized monolayers. *J Infect Dis* **2004**, *190*, 1516–1523.
 26. Fedwick, J.P.; Lapointe, T.K.; Meddings, J.B.; Sherman, P.M.; Buret, A.G. *Helicobacter pylori* activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability. *Infect Immun* **2005**, *73*, 7844–7852.
 27. Dos Reis, P.P.; Bharadwaj, R.R.; Machado, J.; Macmillan, C.; Pintilie, M.; Sukhai, M.A.; Perez-Ordóñez, B.; Gullane, P.; Irish, J.; Kamel-Reid, S. Claudin 1 overexpression increases invasion and is associated with aggressive histological features in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* **2008**, *113*, 3169–3180.
 28. Behrens, J. The role of cell adhesion molecules in cancer invasiveness and metastasis. *Breast Cancer Res Treat* **1993**, *24*, 175–184.
 29. Peralta, S.A.; Miller, R.D.; Laughlin, K.V.; Carp, N.Z.; Klurfeld, D.M.; Mullin, J.M. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 1425–1431.
 30. Ip, Y.C.; Cheung, S.T.; Lee, Y.T.; Ho, J.C.; Fan, S.T. Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells. *Mol Cancer Ther* **2007**, *6*, 2858–2867.
 31. Michl, P.; Barth, C.; Buchholz, M.; Lerch, M.M.; Rolke, M.; Holzmann, K.H.; Menke, A.; Fensterer, H.; Giehl, K.; Löhr, M.; Leder, G.; Iwamura, T.; Adler, G.; Gress, T.M. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res* **2003**, *63*, 6265–6271.
 32. Oku, N.; Sasabe, E.; Ueta, E.; Yamamoto, T.; Osaki, T. Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 gamma 2 chain via matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane-type MMP-1. *Cancer Res* **2006**, *66*, 5251–5257.
 33. Tsukita, S.; Yamazaki, Y.; Katsuno, T.; Tamura, A.; Tsukita, S. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* **2008**, *27*, 6930–6938.
 34. Backert, S.; Moese, S.; Selbach, M.; Brinkmann, V.; Meyer, T.F. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* **2001**, *42*, 631–644.
 35. Bourzac, K.M.; Botham, C.M.; Guillermin, K. *Helicobacter pylori* CagA induces AGS cell elongation through a cell retraction defect that is independent of Cdc42, Rac1, and Arp2/3. *Infect Immun* **2007**, *75*, 1203–1213.
 36. Olson, M.F.; Sahai, E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* **2009**, *26*, 273–287.
 37. Chao, Y.C.; Pan, S.H.; Yang, S.C.; Yu, S.L.; Che, T.F.; Lin, C.W.; Tsai, M.S.; Chang, G.C.; Wu, C.H.; Wu, Y.Y.; Lee, Y.C.; Hong, T.M.; Yang, P.C. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* **2009**, *179*, 123–133.
 38. Chang, T.L.; Ito, K.; Ko, T.K.; Liu, Q.; Salto-Tellez, M.; Yeoh, K.G.; Fukamachi, H.; Ito, Y. Claudin-1 has tumor suppressive activity and is a direct target of RUNX3 in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **2010**, *138*, 255–265.
 39. Miyamori, H.; Takino, T.; Kobayashi, Y.; Tokai, H.; Itoh, Y.; Seiki, M.; Sato, H. Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 28204–28211.
 40. Carrozzino, F.; Soulie, P.; Huber, D.; Mensi, N.; Orci, L.; Cano, A.; Féraille, E.; Montesano, R. Inducible expression of Snail selectively increases paracellular ion permeability and differentially modulates tight junction proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* **2005**, *289*, C1002–C1014.
 41. Darido, C.; Buchert, M.; Pannequin, J.; Bastide, P.; Zalzal, H.; Mantamadiotis, T.; Bourgaux, J.F.; Garambois, V.; Jay, P.; Blache, P.; Joubert, D.; Hollande, F. Defective claudin-7 regulation by Tcf-4 and Sox-9 disrupts the polarity and increases the tumorigenicity of colorectal cancer cells. *Cancer Res* **2008**, *68*, 4258–4268.
 42. Ikenouchi, J.; Matsuda, M.; Furuse, M.; Tsukita, S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* **2003**, *116*, 1959–1967.
 43. Usami, Y.; Satake, S.; Nakayama, F.; Matsumoto, M.; Ohnuma, K.; Komori, T.; Semba, S.; Ito, A.; Yokozaki, H. Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *J Pathol* **2008**, *215*, 330–339.

44. Chen, J.; Xiao, L.; Rao, J.N.; Zou, T.; Liu, L.; Bellavance, E.; Gorospe, M.; Wang, J.Y. JunD represses transcription and translation of the tight junction protein zona occludens-1 modulating intestinal epithelial barrier function. *Mol Biol Cell* **2008**, *19*, 3701–3712.
45. Sade, H.; Holloway, K.; Romero, I.A.; Male, D. Transcriptional control of occludin expression in vascular endothelia: regulation by Sp3 and YY1. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1789*, 175–184.
46. Wang, Z.; Wade, P.; Mandell, K.J.; Akyildiz, A.; Parkos, C.A.; Mrsny, R.J.; Nusrat, A. Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor slug. *Oncogene* **2007**, *26*, 1222–1230.
47. Harada, M.; Kondoh, M.; Masuyama, A.; Fujii, M.; Nakanishi, T.; Utoguchi, N.; Yagi, K.; Watanabe, Y. Effect of forskolin on the expression of claudin-5 in human trophoblast BeWo cells. *Pharmazie* **2007**, *62*, 291–294.
48. Aung, P.P.; Mitani, Y.; Sanada, Y.; Nakayama, H.; Matsusaki, K.; Yasui, W. Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas. *Virchows Arch* **2006**, *448*, 428–434.
49. Park, J.Y.; Park, K.H.; Oh, T.Y.; Hong, S.P.; Jeon, T.J.; Kim, C.H.; Park, S.W.; Chung, J.B.; Song, S.Y.; Bang, S. Up-regulated claudin 7 expression in intestinal-type gastric carcinoma. *Oncol Rep* **2007**, *18*, 377–382.

Revista: Bioquímica

Uniones Estrechas y Microorganismos Patógenos

Tight Junctions and Microbial Pathogens

Verónica Elizabeth Zavala Zendejas, Erika Patricia Rendón Huerta

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México, D. F., México,
erendon@bq.unam.mx

Título corto: UE y Microorganismos Patógenos

Abreviaturas:

BHE: barrera hemato-encefálica, CAR: *Coxsakiavirus*, *Adenovirus* Receptor, Cldn: claudina, CPE: enterotoxina de *Clostridium perfringens*, CVB: grupo B de *Coxsakiavirus*, DAG: diacil glicerol, EHEC: *Escherichia coli* entero hemorrágica, EPEC: *Escherichia coli* entero patógena, ERM: erzina-radixina-moesina, HA/P: hemaglutinina proteasa, JAM: junction adhesion molecule, LDL: lipoproteínas de baja densidad, LPS: lipopolisacárido, MLC: cadena ligera de miosina, MLCK: cinasa de MLC, PAR: partitioning defective proteins, PKC: proteína cinasa C, SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SNC: sistema nervioso central, SPI: isla de patogenicidad, TER: resistencia transepitelial, UA: uniones adherentes, UC: uniones comunicantes, UE: uniones estrechas, VIH: virus de inmunodeficiencia humana, VHC: virus de hepatitis C, ZO: zonula occludens

TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA 2010

IMPORTANCIA DE LAS UNIONES ESTRECHAS EN LOS EPITELIOS:

EL PAPEL DE LAS CLAUDINAS.

Verónica E. Zavala Zendejas y Erika P. Rendón Huerta

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria,
CP 04510, México D.F., México.

erendon@bq.unam.mx

Resumen

Las uniones estrechas (UE), localizadas en la región más apical de las células endoteliales y epiteliales, regulan la difusión paracelular de iones y moléculas. La función de las UE se ve comprometida debido a cambios en la expresión y/o localización de las claudinas, proteínas transmembranales cuya función principal es regular la permeabilidad paracelular y mantener la polaridad celular. Las UE tienen un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad célula-célula, por lo que las alteraciones en las claudinas influyen en la pérdida de cohesión entre las células y puede favorecer los procesos de invasión y metástasis en las células cancerosas. El presente trabajo describe las características estructurales y funcionales de las UE, los mecanismos que la regulan y la participación de las claudinas en procesos como el cáncer.

Palabras clave: : uniones estrechas, claudinas, progresión tumoral, cáncer

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

**CHANGES IN THE DISTRIBUTION AND EXPRESSION PATTERN OF
CLAUDINS-6, -7 AND -9 TIGHT JUNCTION PROTEINS IN DIFFUSE- AND
INTESTINAL-TYPE GASTRIC ADENOCARCINOMAS ARE RELATED TO
PATIENT OUTCOME.**

13
14
15
16
17
18
19

Erika P. Rendón-Huerta, PhD*, Teresa I. Fortoul, MD, PhD†, María T. Gorráez,
MD‡, Xochitl Garcia-Samper, MD**, Georgina Alvarez-Fernández, PhD*, Veronica
Zavala-Zendejas, MSc*, Luis F. Montaña, MD, PhD†.

20
21
22

* Depto de Bioquímica and † Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

23
24

‡ Depto de Patología, Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE,
México, D.F.

25
26
27

** Servicio de Gastroenterología, HR “Lic. Adolfo López Mateos”, ISSSTE, México,
D.F.

28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

Correspondance: Erika Rendón-Huerta, PhD
Depto. Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Ciudad Universitaria
México
tel 55-5623-2261
fax 55-5616-2419
e-mail: erendon@bq.unam.mx

39
40
41
42

This work was partially supported by grants IN-207108 and IN- 202508/3 from
DGAPA, UNAM, México and CONACYT-Salud-2006-13970.

43
44

Brief title: Claudins and gastric adenocarcinoma

45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Key words: gastric adenocarcinoma, tight junction proteins, claudins

Alteración de la integridad de las uniones estrechas en el desarrollo del cáncer. El papel de las claudinas

Verónica E Zavala-Zendejas,* Erika P Rendón-Huerta*

RESUMEN

Las uniones estrechas (UE) restringen la difusión de solutos por el espacio paracelular confiriendo la propiedad de barrera a los epitelios y endotelios. La pérdida de la función normal de las UE es un paso importante en la progresión del cáncer, ya que se compromete la compartimentalización creada por los epitelios, modificando el microambiente de dichos tejidos. La función de las UE se encuentra comprometida por cambios en la expresión y/o localización de las claudinas, las proteínas transmembranales que constituyen los principales elementos estructurales de dichas uniones. Sin embargo, las alteraciones en la expresión de las claudinas en el cáncer parecen influir en otros procesos importantes para la progresión tumoral y no sólo en la modificación de la homeostasis en los tejidos. El presente trabajo da una idea general del papel que juegan estas proteínas en algunas de las etapas de dicha progresión, los mecanismos involucrados en la regulación de su expresión y localización y su posible uso para el diagnóstico y terapia en diferentes tipos de cáncer.

Palabras clave: Uniones estrechas, claudinas, progresión tumoral, cáncer.

ABSTRACT

Tight junctions (TJ) are important elements of the cell junctional complexes that restrict solute diffusion along the paracellular space conferring barrier properties to epithelia and endothelia. Loss of normal TJ function is an important step for cancer progression, since epithelial compartmentalization is compromised and tissue microenvironment is modified. Changes in the expression and/or localization of the transmembrane proteins that are the backbone of TJ, the claudins, alter the function of these junctions. The abnormal expression of claudins in several human cancers seem to have an important role in several steps of cancer progression and not only in the tissue homeostasis disruption. The current work gives a general idea of the role of these proteins in some steps of tumor progression, the mechanisms responsible for the regulation of their expression and localization and their use as promising targets for cancer diagnosis and therapy.

Key words: Tight junctions, claudins, tumor progression, cancer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades crónico-degenerativas que más afecta a los seres humanos. Debido a las diferencias que dan origen a cada tipo de cáncer y a la variación de los pasos que dan lugar a las alteraciones celulares durante la transformación progresi-

va de los tumores, es que el diagnóstico y el tratamiento de estos padecimientos es hasta la fecha un reto para los investigadores en esta área.

Aproximadamente el 90% de los tumores son de origen epitelial, y son precisamente los epitelios los responsables de la compartimentalización de los fluidos y del mantenimiento de la polaridad en los orga-

* Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.

Abreviaturas:

Cldn: claudina, ECM: matriz extracelular, ECP: enterotoxina de *Clostridium perfringens*, EMT: transición epitelio-mesénquima, GF: Factores de crecimiento, CFR: Receptores de factores de crecimiento, TJ: Tight junctions, UA: Uniones adherentes, UC: Uniones comunicantes UE: Uniones estrechas, ZO: Zonula occludens

Correspondencia:

Dra. Erika P. Rendón-Huerta. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad Núm. 3000, Copilco Universidad, 04510, México, D.F. Fax: 56 16 24 19, E-mail: erendon@bq.unam.mx

Recibido: 07-06-2007

Aceptado: 21-12-2007