



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CLONACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DE
CLAUDINA 6 Y CLAUDINA 9 DE CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO HUMANO**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ELIZABETH MICHEL ORTEGA ROCHA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por la labor de ofrecer educación gratuita de alta calidad. Es un privilegio haberme formado como profesional en la Máxima Casa de Estudios.

A todos mis profesores de la Facultad de Ciencias, porque cumplieron con la maravillosa labor de transmitir su conocimiento. Gracias por todo lo que aprendí de ustedes. Me inspiraron a ser una gran bióloga.

A mi mamá, por su apoyo incondicional durante toda mi vida. Gracias por haberme inculcado desde pequeña el amor al estudio. Te agradezco infinitamente todo el apoyo que me has ofrecido en las buenas y en las malas, sin restricciones y a pesar de todo. Siempre que te necesito ahí estás, al pie del cañón, y eso es algo que te agradeceré toda la vida. Te amo mamá.

A mi hermana Karla, por enseñarme desde niña a soñar y pensar en grande. Muchas gracias porque siempre has creído en mí y en mis sueños. Gracias también por todo el apoyo y amor que me has dado. Te amo hermanita.

A mi novio Atzin, por motivarme a siempre dar lo mejor de mí y no conformarme. Muchas gracias por todo el apoyo y los consejos que me has dado, he aprendido muchísimas cosas de ti. Gracias por ser parte de mi vida y alentarme en mis más grandes sueños. Te amo con todo mi corazón.

A la Dra. Erika y al Doc. Montaña, por todo el conocimiento y los valores que me han transmitido desde que ingresé a su laboratorio. Los admiro muchísimo como personas y como investigadores. Muchas gracias porque siempre me han dado su apoyo. Muchas gracias por su orientación y por contribuir a formarme como profesionista responsable y con valores. Los quiero mucho.

A mis compañeros del laboratorio, muchas gracias por ser como son, aprendí algo de todos y cada uno de ustedes. Gracias por todas las risas, por su orientación, por sus enseñanzas y por su cariño. A todos les deseo que cumplan sus metas y que tengan éxito en la vida. Los quiero mucho: Pris Anhel, Gaby, Anita, Pris, Christian, Francisco, Arturo, Martín, Naresh, Franklin, y todos los que alguna vez compartieron este camino conmigo y ya no están en el laboratorio.

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción.....	2
1.1 Cáncer gástrico.....	2
1.1.1 Clasificación histológica.....	2
1.1.2 Factores que participan en el desarrollo del cáncer gástrico....	4
1.2 Las claudinas.....	6
1.2.1 Las uniones estrechas.....	6
1.2.2 Las claudinas.....	7
1.2.3 Regulación transcripcional de las claudinas.....	10
2. Hipótesis.....	15
3. Objetivo general.....	15
3.1 Objetivos específicos.....	15
4. Material y metodología.....	16
4.1 Materiales.....	16
4.1.1 Reactivos.....	16
4.1.2 Material biológico.....	17
4.2 Métodos.....	17
4.2.1 Obtención de la secuencia promotora de los genes de interés...17	
4.2.2 Búsqueda de probables elementos reguladores transcripcionales en las secuencias promotoras de <i>cldn6</i> y <i>cldn9</i>	17
4.2.3 Diseño de los <i>primers</i>	18
4.2.4 Extracción de ADN genómico.....	18
4.2.5 Amplificación por PCR de la región promotora.....	19
4.2.6 Purificación del producto de PCR.....	20
4.2.7 Clonación del producto en el plásmido pmetluc2-vector.....	20

4.2.8 Funcionalidad del promotor clonado.....	23
5. Resultados.....	25
5.1 Secuencia promotora de los genes de claudina 6 y claudina 9.....	25
5.2 Análisis de la región promotora de los genes <i>cldn6</i> y <i>cldn9</i>	28
5.3 Secuencia de los primers y enzimas de restricción para la clonación.....	31
5.4 Extracción de ADN genómico.....	36
5.5 Amplificación de la región promotora de <i>cldn6</i> y <i>cldn9</i>	37
5.6 Digestión de los insertos y del plásmido pmetluc2-vector.....	38
5.7 Obtención de colonias recombinantes con el plásmido pmetluc2-vector.....	40
5.8 Colonias de bacterias recombinantes positivas para el vector.....	42
5.9 Correcta orientación del vector pmetluc2-promcldn6.....	44
5.10 Funcionalidad del vector recombinante.....	45
6. Discusión.....	53
7. Conclusión.....	57
8. Perspectivas.....	58
9. Bibliografía.....	59
10. Anexo 1	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (A) Adenocarcinoma de tipo intestinal y (B) adenocarcinoma de tipo difuso.	3
Tabla 1. Sistemas de clasificación de adenocarcinomas del estómago.	4
Figura 2. Esquema general de las claudinas.....	8
Tabla 2. Participación de las claudinas en la progresión tumoral.....	9
Tabla 3. Reguladores transcripcionales de las claudinas.....	13
Figura 3. Localización de los genes de <i>cldn6</i> y <i>cldn9</i>	26
Figura 4. Alineamiento del par de <i>primers</i> para la región promotora de <i>cldn6</i> en el genoma humano.....	32
Figura 5. Alineamiento del par de <i>primers</i> para la región promotora de <i>cldn9</i> en el genoma humano.....	34
Figura 5. Mapa del vector pmetluc2-reporter.....	35
Figura 6. Sitio múltiple de clonación del vector pmetluc2-reporter con las enzimas de restricción usadas para la clonación del promotor de <i>cldn6</i>	35
Figura 8. Sitio múltiple de clonación del vector pmetluc2-reporter con las enzimas de restricción usadas para la clonación del promotor de <i>cldn9</i>	35
Figura 7. Integridad del ADN genómico de células AGS.....	36
Figura 8. PCR para optimizar la Tm para obtener el promotor de <i>cldn6</i> (1996 p.b.) y de <i>cldn9</i> (2999 p.b.).....	37
Figura 9. PCR para amplificar los promotores de <i>cldn6</i> y <i>cldn9</i> utilizando Tm de 66.6°C para la amplificación del promotor de <i>cldn6</i> y una Tm de 64.1°C para la amplificación del promotor de <i>cldn9</i> . ..	38
Figura 10. Gel de ensayo de restricción del plásmido pmetluc2-vector.....	39
Figura 13. Placas con colonias de los vectores recombinantes.....	40
Figura 14. Placas con colonias del vector recombinante pmetluc2-prom <i>cldn9</i> con distintas relaciones molares inserto:vector.	42
Figura 15. PCR de colonias para pmetluc2-prom <i>cldn6</i>	43
Figura 16. PCR de colonias para pmetluc2-prom <i>cldn9</i>	44
Figura 11. Ensayo de restricción para corroborar correcta orientación del inserto-prom <i>cldn6</i>	45

Figura 18. Funcionalidad del promotor de <i>cldn6</i> en el pmetluc2 por ensayos de luciferasa.	46
Figura 19. Funcionalidad del promotor de <i>cldn6</i> estimulando con LPS de <i>H. pilory</i>	47
Figura 20. Ensayo de luciferasa para las células AGS transfectadas con el vector prom <i>cldn6</i> y estimuladas con 10ng/ml de LPS.	48
Figura 21. Incremento de la actividad de luciferasa con respecto a la basal (<i>fold-change</i>) en células AGS transfectadas con el vector prom <i>cldn6</i>	49
Figura 22. Incremento de la actividad de luciferasa con respecto a la basal (<i>fold-change</i>) en células AGS transfectadas con el vector prom <i>cldn6</i> (duplicado).	50
Figura 23. Actividad de luciferasa obtenida con el vector pmetluc2 vacío con respecto a la obtenida con el vector prom <i>cldn6</i> en células AGS estimuladas con 10ng/ml de LPS.	51
Figura 24. Ensayo de luciferasa para comparar la actividad entre el vector pmetluc2-control y el vector prom <i>cldn6</i> en células AGS estimuladas con 10ng/ml de LPS.	52
Figura 25. Esquema de los elementos reguladores en <i>-cis</i> presentes en la región promotora de <i>cldn6</i> y <i>cldn9</i>	58

Clonación de la región promotora de claudina 6 y claudina 9 de células de adenocarcinoma gástrico humano.

Resumen

El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte a nivel mundial y la tercera causa de muerte por cáncer en México. El proceso pre-cancerígeno conlleva una serie de cambios a nivel morfológico y a nivel molecular y, en consecuencia, los niveles de expresión de varias proteínas se encuentran desregulados.

Las claudinas son proteínas integrales de membrana cuya expresión se encuentra alterada en distintos tipos de cáncer. En el cáncer gástrico, la expresión de claudina 6 y claudina 9 correlaciona con un mal pronóstico en los pacientes, no obstante, los mecanismos moleculares responsables de la expresión anormal de estas claudinas no se tienen claros. La inestabilidad genómica es un distintivo de las células cancerígenas, por lo que lo más probable es que los factores involucrados en la expresión anormal de estas proteínas se encuentren a nivel transcripcional.

Los vectores reporteros son herramientas esenciales en el estudio de la regulación transcripcional. En este proyecto de tesis se clonó la región promotora del gen *cldn6* en el vector pmetluc2-reporter con el objetivo de crear una herramienta para estudiar distintos elementos reguladores involucrados en la transcripción de este gen. Mediante distintos ensayos de funcionalidad, el vector recombinante resultó tener los elementos reguladores necesarios para la transcripción de *cldn6*.

Los estudios enfocados en la regulación transcripcional de las claudinas 6 y 9 son importantes para poder comprender los procesos moleculares involucrados en el cáncer gástrico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER GÁSTRICO

Cáncer es el término que se utiliza para referirse a un conjunto de enfermedades que comparten características distintivas o “*hallmarks*” en inglés. Estas características comprenden capacidades biológicas adquiridas que promueven el crecimiento del tumor y la posterior diseminación de éste a otros órganos (metástasis). El cáncer es la segunda causa de mortalidad en el mundo. Dentro de los principales tipos de cáncer que afectan a la humanidad se encuentran el cáncer pulmonar, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de hígado y cáncer gástrico.

El cáncer gástrico es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo en ambos sexos. En México representa la neoplasia intestinal más frecuente, ocupando el sexto lugar en incidencia y el tercer lugar en mortalidad por neoplasias en ambos sexos. A nivel de género, los hombres presentan mayor incidencia de este tipo de cáncer.¹

1.1.1 Clasificación histológica

El 95% de las malignidades originadas en el estómago son de tipo adenocarcinoma, el otro 5% corresponde a formas de cáncer gástrico poco comunes como lo son los tumores neuroendocrinos, los tumores mesenquimales y los tumores linfoproliferativos. El cáncer gástrico de tipo adenocarcinoma se divide principalmente en dos tipos morfohistológicos de acuerdo a la clasificación de Lauren (1965): el tipo intestinal y el tipo difuso² (Fig. 1, Tabla 1). Los tumores que presentan características histológicas de ambos subtipos se consideran de tipo mixto, mientras que los tumores indiferenciados, que no pueden ser clasificados en alguna de las categorías anteriores entran en el grupo de indeterminado.

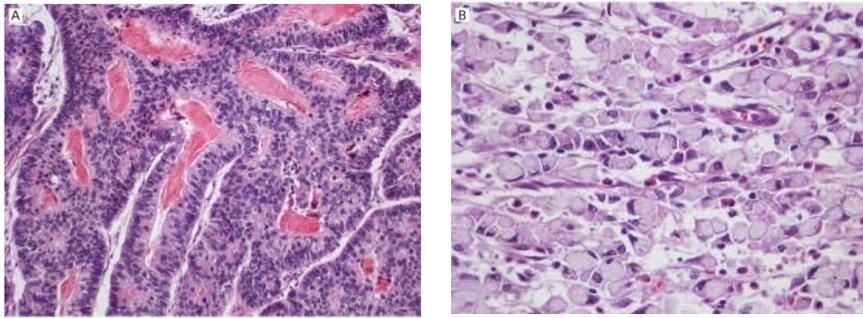


Figura 12. (A) Adenocarcinoma de tipo intestinal y (B) adenocarcinoma de tipo difuso.³

El cáncer gástrico de tipo intestinal se caracteriza por la formación de glándulas, característica similar que se presenta en el cáncer de colon, de donde se deriva su denominación. Este tipo de cáncer se presenta de manera esporádica, secundario a factores ambientales propios de las regiones de alta incidencia, principalmente debido a la infección por *Helicobacter pylori*; se presenta principalmente en adultos mayores con mayor incidencia en hombres que en mujeres y tiende a la metástasis hematogena.

Por su parte, el cáncer gástrico de tipo difuso crece en forma de células aisladas con muy poca o nula formación de glándulas, se asocia con mayor frecuencia a la pérdida de la expresión de E-caderina y en menor medida se asocia a factores hereditarios; se presenta principalmente en adultos sin distinción de género y tiende a la metástasis peritoneal. Este tipo de cáncer es más agresivo y tiene peor pronóstico.⁴

La clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud⁵ divide al cáncer gástrico en cuatro tipos histológicos: adenocarcinoma papilar, adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma mucinoso y carcinoma poco cohesivo, donde entra el carcinoma de células en anillo de sello⁶ (Tabla 1). El adenocarcinoma papilar es una variante histológica común que se desarrolla en el estómago proximal y se caracteriza por la presencia de proyecciones epiteliales con un centro fibrovascular.

El adenocarcinoma tubular es el tipo histológico más común dentro del cáncer gástrico que se caracteriza por la formación de pólipos gruesos.

El adenocarcinoma mucinoso es el tipo histológico menos común dentro de los adenocarcinomas y se caracteriza por la presencia de abundante mucina extracelular, que conforma el 50% del volumen del tumor, con células tumorales esparcidas entre la mucina.

El carcinoma de células en anillo de sello se caracteriza por la presencia de células tumorales con mucina intracelular, con el núcleo desplazado hacia la membrana celular creando la apariencia de un anillo donde el citoplasma se observa translúcido y con forma globoide. En la siguiente tabla se hace una comparación entre las clasificaciones descritas anteriormente.

Tabla 4. Sistemas de clasificación de adenocarcinomas del estómago.

Sistema de clasificación de adenocarcinomas del estómago	
OMS (2010)	Lauren (1965)
Adenocarcinoma papilar Adenocarcinoma tubular Adenocarcinoma mucinoso	Tipo intestinal
Carcinoma de células de anillo Carcinomas poco cohesivos	Tipo difuso
Carcinomas mixtos	Tipo indeterminado

1.1.2 Factores que participan en el desarrollo del cáncer gástrico

El cáncer gástrico, al igual que otros tipos de cáncer, se origina a través de una serie de eventos progresivos influenciados por factores genéticos y por factores ambientales. El principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico de tipo intestinal es la infección por *Helicobacter pylori*. Como consecuencia de la infección se genera un estado de inflamación crónica que desencadena una secuencia de procesos pre-cancerígenos, caracterizados histológicamente como gastritis crónica no atrófica, gastritis crónica multifocal, metaplasia intestinal, displasia y finalmente carcinoma invasivo.⁷

Gastritis no atrófica: Se caracteriza por presentar infiltrado de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas predominantemente en el antro del estómago.

Gastritis atrófica: Se caracteriza por la pérdida multifocal de las glándulas gástricas originales secretoras de moco.

Metaplasia intestinal: Se caracteriza por la aparición de glándulas con fenotipo intestinal que reemplazan a las glándulas gástricas originales, así como la disminución de las secreciones normales gástricas, lo que provoca hipoclorhidria.

Displasia: Se caracteriza por la aparición de células con fenotipo neoplásico (núcleo hiper cromático) que se encuentran confinadas a las estructuras glandulares sin penetrar en la membrana basal.

Adenocarcinoma de tipo intestinal.

Se ha reconocido de manera general que el proceso pre-cancerígeno comienza con la infección por *H. pylori* en etapas tempranas de la vida (infancia), va progresando través del tiempo (durante varios años) y eventualmente culmina en el desarrollo de cáncer gástrico en unos cuantos pacientes.³ La progresión de la infección por *H. pylori* dependerá principalmente de los factores asociados al agente infeccioso (factores de virulencia), la susceptibilidad genética del paciente (polimorfismos en genes de la respuesta inmune) y de los factores relacionados con el ambiente exterior (consumo excesivo de sal, infecciones parasitarias y consumo de antioxidantes).⁸ La infección por *H. pylori* también puede ocasionar el desarrollo de cáncer gástrico de tipo difuso. A diferencia de lo que ocurre en el cáncer gástrico de tipo intestinal, en el tipo difuso no es posible observar las etapas pre-cancerígenas descritas anteriormente.

El proceso pre-cancerígeno del cáncer gástrico de tipo difuso está asociado a defectos en las adhesiones celulares y a factores hereditarios. El principal factor involucrado en el proceso pre-cancerígeno es la pérdida de la expresión de la proteína de adhesión E-cadherina. Distintas mutaciones a nivel germinal encontradas en el gen CDH1 (E-cadherina) han sido asociadas al desarrollo de cáncer gástrico hereditario de tipo difuso, estas mutaciones derivan en la pérdida de la función de la proteína E-cadherina.

Otro tipo de anomalías genéticas encontradas en este tipo de cáncer son alteraciones a nivel epigenético, como por ejemplo la hipermetilación del promotor de CDH1 en el alelo no mutado. La susceptibilidad a desarrollar cáncer gástrico de tipo difuso también se ha asociado a polimorfismos en el gen PSCA (antígeno de células troncales de próstata), el cual presuntamente está implicado en la regulación de la proliferación del epitelio gastrointestinal.⁹

El proceso pre-cancerígeno en cualquiera de los dos tipos de cáncer gástrico (difuso e intestinal) conlleva una serie de cambios a nivel morfológico y a nivel molecular en las células del tejido. Dentro de estos cambios se encuentran desregulaciones en los niveles de expresión de distintas proteínas. Se ha reportado que la expresión de las uniones estrechas se encuentra desregulada en muchos tipos de cáncer, en el caso específico de cáncer gástrico, las proteínas claudinas tienen un patrón anormal de expresión que se relaciona con la agresividad del tumor.¹⁰ En un estudio realizado por Rendón-Huerta et al., se observó que la expresión de claudina 6 y claudina 9 en biopsias de cáncer gástrico correlaciona con un mal pronóstico en los pacientes.¹¹ Mediante estudios *in vitro*, se logró demostrar que la sobre-expresión de estas claudinas en células AGS aumenta la invasividad, migración y tasa de proliferación.¹²

1.2 LAS CLAUDINAS

1.2.1 Las uniones estrechas

Las uniones estrechas son un tipo de contacto célula-célula localizado en la zona apical de la membrana lateral de las células polarizadas, como lo son las células epiteliales y endoteliales. Estas uniones forman una barrera que impide la libre difusión de agua y solutos a través del espacio paracelular. Las uniones estrechas están formadas por un complejo grupo de proteínas integrales de membrana y proteínas adaptadoras. Dentro de las proteínas integrales de membrana se encuentran las *TAMPs* (*Tight Junction-*

Associated Marvel domain-containing proteins), las *JAMs* (*Junctional Adhesion Molecules*) y las claudinas. Las principales proteínas adaptadoras son las ZO-1,2 y 3 (*Zona Occludens*), la cingulina y la paracingulina.¹³

1.2.2 Las claudinas

Las claudinas son una familia de proteínas integrales de membrana formada por 27 miembros reportados en mamíferos, de los cuales algunos son generados mediante el proceso de *splicing* alternativo. En los humanos se han reportado 26 tipos de claudinas, siendo la claudina 13 la proteína no conservada.

Las claudinas están formadas por 4 dominios transmembranales, 2 asas extracelulares y dos dominios intracelulares (Figura 2). Las asas extracelulares se encuentran implicadas en procesos biológicos de alta relevancia. En condiciones fisiológicas normales, las asas permiten el paso selectivo de iones y la interacción con otras claudinas (de las células adyacentes) lo que es importante para el mantenimiento y la homeostasis del epitelio. El asa extracelular 1 es la región de la claudina que confiere la selectividad para el paso de iones mientras que el asa extracelular 2 está implicada en las interacciones entre claudinas, que pueden ser de tipo homotípicas o heterotípicas.¹⁴

En condiciones patológicas el asa número 1 de claudina 1 sirve como co-factor en la entrada del virus de la hepatitis C a las células de hígado, mientras que el asa número 2 de claudina 3 y 4 sirve como receptor de toxinas bacterianas (tetradotoxina de *Clostridium perfringens*). Los dominios intracelulares de las claudinas incluyen sitios de palmitoilación, sitios de fosforilación y sitios de unión PDZ, los cuales participan en la localización de la proteína y en la interacción con diversas proteínas de las uniones estrechas.

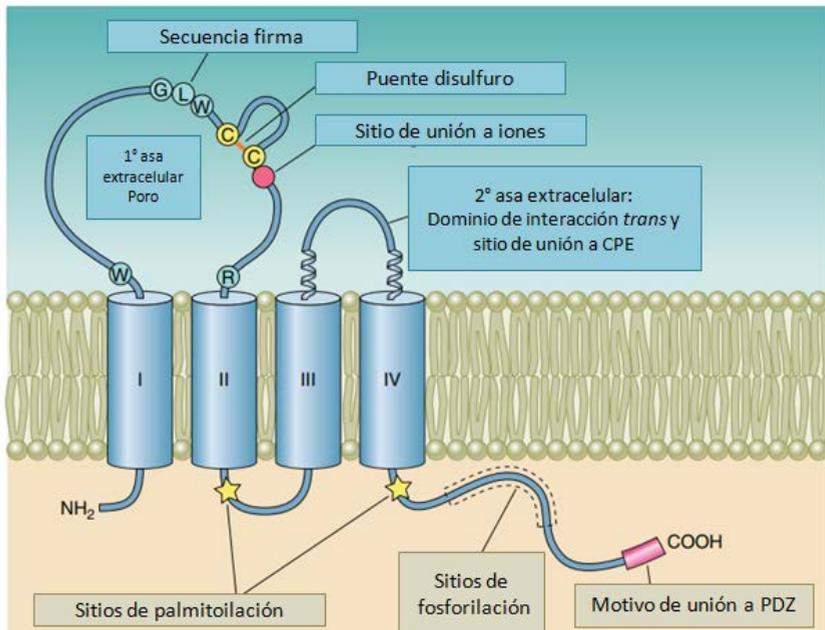


Figura 13. Esquema general de las claudinas

Las claudinas están divididas funcionalmente en cuatro grupos: claudinas con función de barrera, con función de poro, con función inconsistente y con función desconocida. Las claudinas con función de barrera reducen la permeabilidad en el flujo paracelular. A este grupo pertenecen las claudinas 1, 3, 5, 11, 14 y 19. Las claudinas con función de poro aumentan la permeabilidad en el flujo paracelular. Este grupo se subdivide en las claudinas selectivas de cationes, como la claudina 2, 10b y 15, y en claudinas selectivas de aniones, como la claudina 10a y 17. Dentro del grupo de las claudinas con función inconsistente están la claudina 4, 7, 8 y 16, mientras que las claudinas con función desconocida son la claudina 6, 9, 12, 13, 18, 20-27,¹⁵ aunque en estudios recientes se ha logrado comprender la función de la claudina 6 y la claudina 9 en ciertos tipos celulares.

La claudina 6 se encuentra principalmente expresada durante el desarrollo embrionario y su expresión en tejidos adultos es muy poco común. En células MDCK (riñón de perro) regula la permeabilidad de los iones de sodio y cloro.¹⁶ La claudina 9 también se encuentra expresada en etapas tempranas del desarrollo embrionario mientras que en tejidos adultos se encuentra expresada en la cóclea, donde su función es la regulación del flujo paracelular del ión potasio. Los defectos de la claudina 9 en este órgano causan sordera.¹⁷ Al igual que claudina 1, la claudina 6 y la claudina 9 funcionan como co-factores de entrada para el virus de la hepatitis C.¹⁸

La expresión anormal de claudinas en los distintos tipos de cáncer no se encuentra del todo comprendida, pero al igual que sucede en los distintos tejidos del cuerpo, la expresión de claudinas en el cáncer es tumor específica. El incremento o la disminución en los niveles de expresión de las claudinas en distintos tipos de tumores se encuentran estrechamente relacionados con la progresión tumoral.¹⁹

En la tabla 2 se muestra el rol que desempeñan distintas claudinas en la progresión tumoral.

Tabla 5. Participación de las claudinas en la progresión tumoral.

Claudina	Cáncer	Función	Experimento	Rol
Claudina 1	Mama	Aumento de la migración celular	<i>In vitro</i>	Promotor de cáncer
	Hígado	Inducción de transición epitelio mesénquima	<i>In vitro</i>	Promotor de cáncer
	Estómago	Inhibición de la tumorigénesis	<i>In vivo</i>	Supresor de tumores
Claudina 3	Ovario	Promueve el crecimiento tumoral y la metástasis	<i>In vivo</i>	Promotor de cáncer

Claudina 4	Ovario	Estimulación de angiogénesis	<i>In vivo</i>	Promotor de cáncer
	Páncreas	Supresión de metástasis	<i>In vivo</i>	Supresor de tumores
Claudina 6	Gástrico	Aumento de la proliferación. Migración e invasión	<i>In vitro</i>	Promotor de cáncer
	Mama	Inhibición de migración e invasión	<i>In vitro</i>	Supresor de tumores
Claudina 7	Pulmón	Inhibición de la migración y crecimiento tumoral	<i>In vivo</i>	Supresor de tumores
	Colorrectal	Aumento de la proliferación y tumorigenicidad	<i>In vitro e in vivo</i>	Promotor de cáncer

Dado que una de las características de las células cancerígenas es la inestabilidad genómica, es muy probable que el principal factor encargado de la expresión anormal de las claudinas se encuentre a nivel transcripcional.

1.2.3 Regulación transcripcional de las claudinas

Existen dos grandes niveles en los cuales la expresión de una proteína es regulada: la regulación a nivel transcripcional y la regulación a nivel post-transcripcional. La regulación a nivel transcripcional está a cargo de distintos elementos reguladores del ADN, los cuales se dividen en dos clases: elementos reguladores en *-cis* y elementos reguladores en *-trans*. Los elementos reguladores en *-cis* forman dos familias de secuencias de ADN reguladoras, las cuales son el promotor y los elementos reguladores distantes.

PROMOTOR	ELEMENTOS REGULADORES DISTANTES
Promotor central	<i>Enhancers</i>
Elementos reguladores próximos	<i>Silencers</i> <i>Insulators</i> Regiones control de locus

El promotor central es una región río arriba (algunas veces río abajo) del sitio de inicio de la transcripción de un gen, el cual funciona como sitio de unión para los factores de transcripción generales y para la ARN polimerasa II. Los promotores centrales más comunes son la caja TATA, la caja CAAT y la caja GC. Los elementos reguladores próximos se encuentran río arriba del promotor central y contienen sitios de unión para los elementos de regulación en *-trans*, es decir, para los factores de transcripción específicos. Uno de los elementos reguladores próximos mejor estudiados son las islas CpG. Las islas CpG son secuencias de ADN de aproximadamente 100 a 1000 p.b. cuya composición de nucleótidos G (guanina) y C (citosina) es >50%. La mayoría de los dinucleótidos CpG en el genoma humano se encuentran metilados en el carbono cinco de la citosina (5-metilcitosina) pero los dinucleótidos CpG de estos elementos reguladores normalmente no se encuentran metilados. El grado de metilación del ADN es también un mecanismo por el cual se regula la transcripción de los genes. Los genes con promotores metilados tienen poca o ninguna actividad transcripcional, mientras que los promotores no metilados tienen gran actividad transcripcional. Las secuencias de ADN metiladas tienen efecto en la conformación de la cromatina, ya que a estos sitios son reclutadas proteínas involucradas en la desacetilación de histonas, lo que tiene como consecuencia un estado más compacto de la cromatina y por ende la represión de la transcripción. En su conjunto, el promotor puede llegar a medir de 100 a 3000 p.b., ya que los elementos reguladores próximos pueden encontrarse lejos del sitio de inicio de la transcripción.

Los elementos reguladores distantes son secuencias de ADN localizadas río arriba (en algunos casos río abajo) del sitio de inicio de la transcripción de un gen (a más de 10 k.b. de distancia) o, en algunos casos, localizadas en las regiones UTR de un gen. La interacción entre estos

elementos reguladores y la maquinaria de transcripción ocurre por cercanía física, la cual es conseguida mediante la formación de bucles en el ADN. Dependiendo del efecto que ejerzan sobre la maquinaria de transcripción, los elementos reguladores a distancia se clasifican en:

Enhancers → Activan la transcripción.

Silencers → Reprimen la transcripción.

Insulators → Bloquean y separan la actividad transcripcional de distintos genes.

Regiones control de locus → Regiones compuestas por *enhancers*, *silencers* e *insulators* que regulan la actividad transcripcional de un locus entero.²⁰

El grupo de los elementos reguladores en *-trans* se encuentra formado por los factores de transcripción específicos, los cuales son proteínas con dominios de unión a ADN que promueven o reprimen la transcripción. A continuación se describen los principales motivos de unión a ADN:²¹

Hélice-bucle-hélice → es un motivo conservado evolutivamente formado por una región de aminoácidos básicos y dos hélices alfa separadas por un bucle. Los factores de transcripción con este motivo están encargados de regular el desarrollo de células musculares, nerviosas, sanguíneas y pancreáticas.

Hélice-giro-hélice → está compuesto por dos hélices alfa unidas por una pequeña secuencia de aminoácidos (forman el giro). Los factores de transcripción con este motivo están involucrados en la supresión de distintos genes durante la diferenciación celular.

Dedo de zinc → está compuesto por una horquilla beta coordinada con una hélice alfa mediante un ión de zinc. Los factores de transcripción con este motivo tienen la capacidad de remodelar la cromatina y la estructura del ADN.

Cierre de leucina → está compuesto por una región básica de aminoácidos que se une al ADN y por una hélice alfa con residuos de leucina cada siete aminoácidos, esta estructura forma dímeros unidos a través de las leucinas (lo que da el aspecto de un cierre). Los factores de transcripción con este motivo están involucrados en la regulación de la división celular.

Existen diversas investigaciones donde se analiza la regulación a nivel transcripcional de las claudinas, tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas. En la siguiente tabla se muestran algunos de los factores de transcripción involucrados en la regulación de estas proteínas en distintas condiciones.²²

Tabla 6. Reguladores transcripcionales de las claudinas.

Proteína	Regulador transcripcional	Sitio de unión en la región promotora	Actividad transcripcional	Condición
Claudina 1	Sp-1	-138 a -76 p.b.	Activación	Epitelio intestinal
	Cdx-2	-1160 a 850 p.b.		Cáncer de colon
Claudina 2	Cdx-2	-1067 a -1 p.b.	Activación	Epitelio intestinal
Claudina 3	Sp-1	-112 a -74 p.b.	Activación	Cáncer de ovario
Claudina 4	Sp-1	-105 a -49 p.b.	Activación	Cáncer de ovario
Claudina 5	FoxO1	-2906 a -2871 p.b.	Represión	Células endoteliales
Claudina 7	ELF-3	-150 p.b.	Activación	Sarcoma sinovial
Claudina 15	Hnf4 α	-693 a -47 p.b.	Aumenta	Inflamación crónica epitelio intestinal
Claudina 19	Sp-1	-139 a -75 p.b.	Aumenta	Células de riñón

En el caso del cáncer de ovario, claudina 3 y claudina 4 se encuentran sobre-expresadas y este aumento tiene correlación con un mayor potencial de invasividad de los tumores. Se ha demostrado que un sitio de unión para el factor de transcripción Sp-1 en el promotor de los genes *cldn3* y *cldn4* es

indispensable para su actividad transcripcional. Adicionalmente, la actividad transcripcional de estas claudinas está regulada por metilaciones en los dinucleótidos CpG que se encuentran alrededor del sitio de unión para Sp-1.

Las líneas celulares de ovario cuya expresión de claudina 3 y 4 esta aumentada no presentan metilaciones en la región promotora, mientras que en las líneas celulares de ovario que no expresan estas claudinas se observan patrones de metilación en el promotor.^{23,24} Estas mismas claudinas se encuentran sobre-expresadas en cáncer gástrico de tipo intestinal, pero en este caso su regulación a nivel de transcripción se da a través del factor de transcripción Cdx2.

En la actualidad no hay estudios en los que se reporte con detalle cuáles son los elementos de regulación transcripcional presentes en los promotores de claudina 6 y claudina 9. Como se mencionó anteriormente, la expresión de estas claudinas correlaciona con un mal pronóstico en los pacientes con cáncer gástrico, por lo cual es importante el desarrollo de una metodología que permita estudiar la dinámica en la regulación de estos genes con el objetivo de comprender de una mejor manera los procesos moleculares que ocurren en el cáncer gástrico.

El uso de genes reporteros es una herramienta útil para el estudio de la regulación genética de las proteínas bajo un estímulo en específico. El objetivo de este proyecto de tesis es clonar la región promotora de los genes de claudina 6 y claudina 9 en un vector acoplado a la proteína luciferasa, para obtener una herramienta que pueda ser utilizada en estudios de genes reporteros y, de esta manera, se puedan estudiar los distintos elementos de regulación transcripcional de estos genes. Con el fin de evaluar la correcta actividad transcripcional de los promotores clonados, se decidió utilizar el modelo de estimulación de células AGS con LPS de la bacteria *Helicobacter pylori*. En este modelo ya se ha demostrado que la vía de señalización activada a través del receptor TLR2 promueve un aumento en los niveles de proteína de claudina 6 y claudina 9 simultáneo a un aumento en los niveles del factor de transcripción Cdx2, lo cual sugiere que se está promoviendo la transcripción.²⁵ Este modelo es ideal para probar, mediante

ensayos de luciferasa, que las secuencias clonadas funcionan como promotor de sus respectivos genes.

2. Hipótesis

Al clonar el promotor de los genes *cldn6* y *cldn9* se podrán identificar los principales elementos de regulación transcripcional.

3. Objetivo general

Clonar la región promotora de los genes *cldn6* y *cldn9* de humano.

3.1 Objetivos específicos

1. Obtener la secuencia del promotor de los genes *cldn6* y *cldn9*.
2. Analizar la secuencia del promotor para buscar elementos putativos de regulación transcripcional.
3. Diseñar *primers* para amplificar los promotores.
4. Clonar los promotores en el plásmido pmetluc2-vector.
5. Evaluar la funcionalidad del promotor clonado.

4. MATERIAL Y METODOLOGÍA

4.1 MATERIALES

4.1.1 Reactivos

Los reactivos y medios utilizados para el cultivo celular fueron: D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), suero fetal bovino (SFB), piruvato de sodio, L-glutamina, penicilina-streptomicina y geneticina (G418). Estos reactivos se adquirieron de la compañía Gibco. La transfección de las líneas celulares se realizó con el reactivo Lipofectamina 2000 de Thermofisher.

Los reactivos utilizados en la extracción de ADN genómico como acetato de potasio, isopropanol grado molecular, etanol grado molecular y los reactivos que componen el buffer de lisis (SDS, Tris-Cl y EDTA) se adquirieron de la compañía Biorad. Las enzimas utilizadas, como Proteinasa-K y RNasa A, se adquirieron de Thermofisher.

La extracción de ADN plasmídico se realizó con el kit comercial Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System de la compañía Promega.

Los reactivos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron: High Fidelity Hot Start Polymerase y High Fidelity Buffer de Jena Bioscience, dNTP mix de Promega y los primers utilizados fueron sintetizados por la compañía IDT a través de UNIPARTS.

Las enzimas de restricción utilizadas se adquirieron de las compañías New England Biolabs (Acc65I, Eco53kI y HindIII) y de Thermofisher (BamHI y EcoRI).

Los reactivos utilizados en la preparación de geles, como agarosa y bromuro de etidio, se adquirieron de la compañía Merck.

4.1.2 Material biológico

Las líneas celulares AGS (células de adenocarcinoma gástrico humano) utilizadas en este trabajo pertenecen al laboratorio de Inmunobiología del departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. Disponibles en ATCC con el número de catalogo CRL-1739.

La cepa de bacterias DH5 α de *Escherichia coli* utilizada para la clonación pertenece al laboratorio de Inmunobiología del departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM.

Los plásmidos pmetluc2-vector y pmetluc2-control se adquirieron de la compañía Clontech.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtención de la secuencia promotora de los genes de interés

La secuencia de la región promotora de los genes de claudina 6 y claudina 9 se obtuvo a partir de la base de datos UCSC Genome Browser (disponible en <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

Se consideraron 2500 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción para la región promotora de claudina 9, mientras que, para la región promotora de claudina 6 se consideraron 2000 pares de bases. También se consideró la región 5' UTR de cada gen.

4.2.2 Búsqueda de probables elementos reguladores transcripcionales en las secuencias promotoras de *cldn6* y *cldn9*.

Los probables elementos de regulación de la secuencia promotora de *cldn6* y *cldn9* se obtuvieron mediante el programa en línea EMBOSS CpG island searcher (disponible en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>),

también se buscó en la secuencia promotora de *cldn6* y *cldn9* los motivos TATAWAW (la W representa A o T), GGGCGG y CCAAT.

Con base en los probables elementos de regulación se diseñaron los *primers*, con el fin de no omitir ningún putativo elemento regulador en la clonación.

4.2.3 Diseño de los *primers*.

Para el diseño de los *primers* se utilizó el programa PRIMER-BLAST del NCBI (disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Los parámetros para la búsqueda de *primers* fueron los siguientes:

- Tamaño de 18 a 24 pares de bases.
- T_m (temperatura de alineamiento) entre 55°C-58°C y similar entre pares.
- Contenido de los nucleótidos G/C alrededor del 50%.

Se seleccionaron los pares de *primers* que cumplieran con las siguientes condiciones:

- Generaran un producto amplificado de un tamaño entre 2000 y 3000 pares de bases.
- El producto amplificado abarcara parte de la región 5' UTR.
- Los pares fueran específicos para la región de interés y no amplificaran otras regiones del genoma.

A los pares de *primers* seleccionados se les agregó la secuencia de la enzima de restricción correspondiente para la posterior clonación en el plásmido pmetuc2-vector. Se eligieron las enzimas de restricción sin sitio de unión en la secuencia promotora delimitada.

4.2.4 Extracción de ADN genómico

A partir de un cultivo de células AGS en una caja petri P100, en confluencia, se obtuvo el ADN genómico como se describe a continuación:

se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células 2 veces con 3 ml de PBS, se retiró el PBS y se agregó 2 ml de PBS para levantar las células de la caja con un gendarme. La suspensión celular se transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml y se centrifugó a 1500 rpm x 2 min. Se retiró el sobrenadante, se agregaron 600 µl de buffer de lisis frío, se homogenizó la mezcla y se le agregaron 3 µl de proteinasa-K. La muestra se incubó por 3 horas a 55°C. Transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 0.6 µl de RNAsa-A y se incubó por 30 min a 37°C.

Transcurrido el tiempo se agregaron 200 µl de solución de acetato de potasio y se mezcló por inversión. Posteriormente se centrifugó la muestra a 12,000 rpm x 5 min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y se añadieron 1.5 ml de isopropanol. La muestra se volvió a centrifugar como fue descrito anteriormente y se procedieron a hacer dos lavados con etanol al 80%. Se decantó el etanol y se dejó secar el pellet por 20 min. Finalmente el pellet se resuspendió en 50 µl de agua libre de DNAsas y se solubilizó mediante incubación por 30 min a 65°C.

La cuantificación y la determinación de la calidad del ADN se determinaron mediante la medición de la densidad óptica a 260nm y 280nm.

4.2.5 Amplificación por PCR de la región promotora.

Mediante la técnica de PCR se amplificaron los promotores de los genes de claudina 6 y claudina 9 a partir de ADN genómico.

El programa que se utilizó en el termociclador fue el siguiente:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	3 minutos	1
95 °C	30 segundos	30
66.6 °C para cldn-6 64.1 °C para cldn-9	30 segundos	
72 °C	3 minutos	
72 °C	3 minutos	1

Para verificar el tamaño y la calidad del producto se corrió un gel de agarosa al 0.8% a 35 V (voltaje constante). Se utilizó el marcador de peso molecular de 1kb para corroborar el peso molecular del fragmento amplificado.

4.2.6 Purificación del producto de PCR

El producto de PCR fue purificado utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó el ADN purificado en un Nanodrop 2000 (Thermofisher).

4.2.7 Clonación del producto en el plásmido pmetluc2-vector.

Digestión de los productos de PCR y de los plásmidos con las enzimas de restricción seleccionadas.

Para la clonación de la región promotora de cldn-6 (inserto-cldn6) se utilizaron las enzimas de restricción EcoRI y BamHI Thermo FastDigest de Thermofisher. La reacción de doble digestión del inserto-cldn6 fue a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente se procedió a la purificación del inserto-cldn6 digerido mediante la técnica de fenol/cloroformo y se precipitó el ADN en etanol toda la noche a -20 °C.

El plásmido pmetluc2-vector fue digerido utilizando las enzimas de restricción EcoRI y BamHI Thermo FastDigest a 37°C por 15 minutos. Posteriormente se procedió a la purificación del pmetluc2-vector digerido mediante la técnica de fenol/cloroformo y se precipitó el ADN en etanol toda la noche a -20 °C.

Al día siguiente se procedió a la desfosforilización del inserto-cldn6 con la fosfatasa CIP por 1 hora a 37 °C. Al final se realizó de nuevo la

purificación por fenol/cloroformo y se precipitó el ADN en etanol a -20 °C toda la noche.

Para la clonación de la región promotora de *cldn-9* (inserto-*cldn9*) se utilizaron las enzimas de restricción *HindIII* y *Acc65I* de Thermofisher y New England Biolabs respectivamente. La reacción de digestión del inserto-*cldn9* fue a 37 °C por 5 horas con la enzima de restricción *HindIII*. Posteriormente se procedió a la purificación del ADN digerido mediante la técnica de fenol/cloroformo y se precipitó el ADN digerido en etanol a -20°C toda la noche. Al día siguiente se realizó la digestión con la enzima de restricción *Acc65I* a 37 °C por 3 horas y se procedió a purificar nuevamente por fenol/cloroformo y se precipitó el ADN digerido en etanol a -20°C toda la noche.

El plásmido *pmetluc2-vector* fue digerido utilizando la enzima de restricción *HindIII* a 37°C por 5 horas. Posteriormente se procedió a la purificación del *pmetluc2-vector* digerido mediante la técnica de fenol/cloroformo y se precipitó el ADN en etanol toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se realizó la digestión con la enzima de restricción *Acc65I* a 37 °C por 3 horas, en la última hora se le agregó a la reacción la fosfatasa CIP. Al final se realizó de nuevo la purificación por fenol/cloroformo y se precipitó el ADN en etanol a -20 °C toda la noche.

Una vez realizadas las reacciones de digestión y de desfosforilación, los insertos y el vector fueron analizados en el Nanodrop para verificar su calidad al igual que su concentración.

Reacción de ligación de los insertos en el plásmido *pmetluc2-vector*.

La reacción de ligación se realizó con una relación molar de 3:1 inserto-vector. Para la ligación se utilizó la T3 ADN ligasa de Promega. La reacción se dejó incubar 2 horas a 25°C.

Transformación de las bacterias.

Para la transformación se utilizaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α competentes generadas químicamente. El método de transformación utilizado fue el de choque térmico. Las bacterias competentes más el producto ligado se incubaron en hielo por 40 minutos. El choque término fue de 90 segundos a 42 °C seguido de 4 minutos en hielo. Las bacterias transformadas se recuperaron en medio LB a 37 °C por una hora. Posteriormente las bacterias se plaquearon en cajas petri con medio agar-LB más el antibiótico de selección kanamicina a 50 μ g/ml a 37 °C.

Obtención de las bacterias transformadas con el plásmido ligado a las secuencias promotoras.

La obtención de las bacterias positivas a las secuencias de interés se realizó mediante el método de selección por resistencia a kanamicina. La inserción de las regiones promotoras de cldn-6 y de cldn-9 en el vector se confirmó por PCR de colonias y por ensayo de restricción.

Para el PCR de colonias se utilizaron las mismas condiciones descritas anteriormente (en la sección amplificación por PCR de la región promotora). Mediante un ensayo de restricción se confirmó la correcta orientación del inserto respecto al marco de lectura del vector. La enzima utilizada para el vector pmetluc2-promcldn6 fue Eco53KI. La enzima para el vector pmetluc2-promcldn9 fue BamHI.

Una vez identificadas las colonias recombinantes, se realizó un cultivo de bacterias para extraer el ADN plasmídico recombinante utilizando el kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.2.8 Funcionalidad del promotor clonado.

Para verificar que la clonación del promotor de *cldn6* y *cldn9* en el plásmido pmetluc2-vector es funcional, se realizaron ensayos de luciferasa en células AGS transfectadas con los vectores recombinantes.

Transfección transitoria de las células AGS con el vector recombinante pmetluc2-promcldn6

La transfección de las células AGS se realizó con el reactivo Lipofectamina 2000 siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para placas de 6 pozos.

Se realizaron tres distintas preparaciones de lipofectamina+vectores en una relación 1:1.

Los tres vectores utilizados fueron:

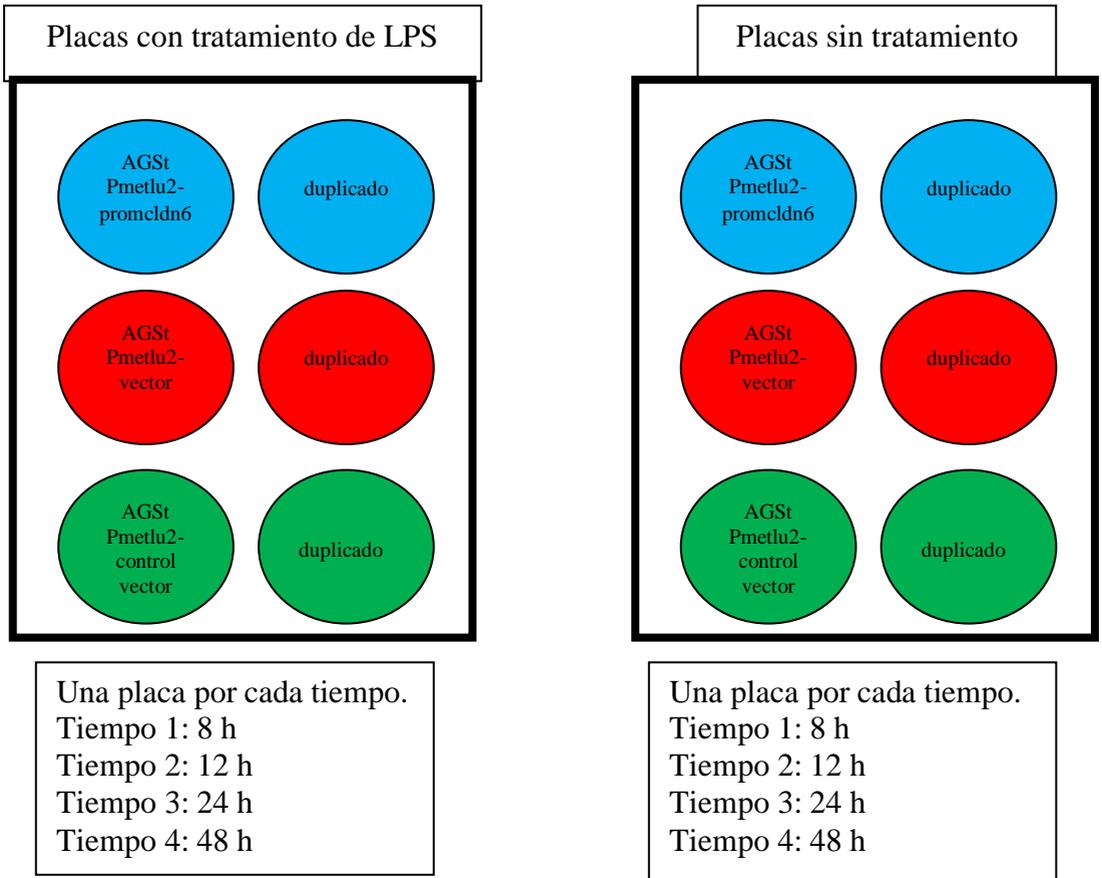
- Pmetluc2-promcldn6
- Pmetluc2-vector
- Pmetluc2-control vector

La regulación transcripcional del vector pmetluc2-control esta bajo el control del promotor inmediato de citomegalovirus (Pcmv), el cual es un elemento regulador constitutivamente activo.

Los complejos lipofectamina+vectores se incubaron durante 5 horas y media con las células AGS en medio de cultivo Opti-MEM y en condiciones estándar de cultivo (37 °C, 5% CO₂). Se utilizaron placas de 6 pozos a aproximadamente 70% de confluencia. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se retiró todo el medio de cultivo y se agregó medio DMEM al 10% de SBF.

Tratamiento con LPS en las células AGS transfectadas

La siguiente figura muestra el diseño experimental utilizado para los tratamientos con LPS:



Los tratamientos se realizaron 12 horas después de que finalizó la incubación con los complejos lipofectamina+vectores. Antes del tratamiento se realizaron dos lavados en las células AGSt con 1ml de PBS 1X. Posteriormente se agregó 1 ml de medio de cultivo DMEM al 5% de SBF preparado con la suspensión de LPS para las placas de los tiempos 1 y 2, y 1.5 ml de medio de cultivo DMEM al 5% de SBF preparado con la

suspensión de LPS para las placas de los tiempos 3 y 4. La concentración final utilizada de LPS fue de 10ng/ml. A las células AGSt control se les agregó 1 ml medio de cultivo DMEM al 5% de SBF sin LPS para las placas de los tiempos 1 y 2, y 1.5 ml de medio de cultivo DMEM al 5% de SBF sin LPS para las placas de los tiempos 3 y 4.

Para poder realizar los ensayos de luciferasa, se retiró el sobrenadante de cada condición experimental con sus respectivos controles transcurridas 8, 12, 24 y 48 h después del inicio del tratamiento con LPS. El sobrenadante se guardó en un tubo eppendorf a -20 °C.

Ensayos de luciferasa

Los ensayos de luciferasa se realizaron con el kit Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Systems de Clontech siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante.

Se colocaron 50 µl de cada sobrenadante recolectado en una placa de 96 pozos blanca por triplicado y se le agregó a cada pozo 5 µl de la preparación 1X sustrato/buffer de reacción.

La placa se leyó inmediatamente en un luminómetro.

5. RESULTADOS

5.1 Secuencia promotora de los genes de claudina 6 y claudina 9.

Los genes que codifican para las proteínas claudina 6 (Cldn-6) y claudina 9 (Cldn-9) se encuentran ubicados en la posición 13.3 del brazo corto del cromosoma 16 (16p13.3). Los genes se encuentran distribuidos de manera contigua en hebras opuestas de la cadena de ADN, separados por 205 pares de bases. Debido a que se encuentran en hebras distintas, la transcripción de los genes no ocurre en la misma dirección, por lo cual la

región promotora río arriba del sitio de inicio de la transcripción no es la misma.

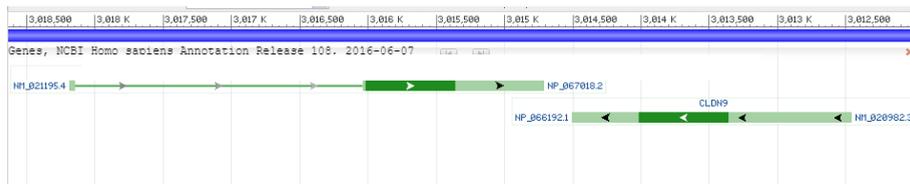


Figura 14. Localización de los genes de *cldn6* y *cldn9*.

La regulación a nivel transcripcional de los genes *cldn6* y *cldn9* no ha sido estudiada a detalle. Debido a la falta de estudios sobre los elementos reguladores de estos genes, se decidió clonar una región de 2000-2500 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción, con el fin de abarcar el mayor número de regiones reguladoras que putativamente se encuentren implicadas en la regulación transcripcional de estos genes. En el caso del gen de *cldn6*, existe un estudio bioinformático en el cual se predice que las principales regiones reguladoras de este gen se encuentran de 200 a 2000 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción²⁶, por lo cual se consideró adecuado el número de pares de bases a clonar.

A continuación se muestra la secuencia correspondiente a la región promotora río arriba del sitio de inicio de la transcripción de los genes *cldn6* y *cldn9*.

Región promotora del gen *cldn6* (2000 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción, región 5' UTR y codón de inicio de la traducción)

```
>hg38_ncbiRefSeqCurated_NM_021195.4 range=chr16:3018188-3020187 5'pad=0
3'pad=0 strand=- repeatMasking=none
AGGGACGCAGACCCCTTCTTCCAGCCGGTGATCTAGTCCAGCGTGCCTGGTGTGGGGAAATCAAAAATTAGA
CACGAGTGCTCGCTTCGGCAGCACATATAGAAATCAGACACGAACGGCCGGACCGCGTGGCTCACGCCCTTTAATCC
CATCAGTTTGGGAGTCTGAGGCAGGCGGATTACGAGGTCAGGAGTTCGAGAGCAGCCTGACCAACGTGGTGAAACG
CCGTCTCTACTCGAAATACAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGCGCGCCTGCAATCCGAGCTACTCAGGAGGCTGA
GGCAGGAGAATCTCTTGAACCCGGGAGGCAGAAGTTGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCACTACACTCCAGCCTGGGC
GACAGAGTGAGAGTCCGTCTCAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AGAAATCAGACACAGACCAATCCATGCAGAGATCACTGCAGCTTCCTTCCCCACCTCCCCTTGAGATTGCGTC
TCACTCTTGCTCAGCCTGGAGTGCAGTGGTACGATCACGGCTCTCTGGGCTCAGGTGAGCCTCCACCTCAGCCTC
CCAAGTAGCTGGGACCACAGGCCCTGCCACCACGCTCCGGCTAATTTTGTATTTTTGTAGAGACCAGGCTCTT
```

ACTATGTTGCCAGGTTAGCCTGGCCACTACAGCTTTGTTAAGGGCCCGGGGGTATAACAATTAACCTGAGGTC
 AGGAGCTCGAGACCAGCCTGGCCAACCTTGGTGAACCCCGTCTTTACTAAAAATAAAAAAAGAAAGAAGTTAGCC
 GGGCGTGTAGTGGGCGCTGTAATCTCAGCTACTCGGAGACTGAGGCAGGAGAATTTCTGGAACCTGGGAGACG
 GAGGTTGCAGTCAGTCGAGATAGCGCCATTGCACTCCAGACTGGGCGACAGAGAGGGCCTCCATCTCAAAAAACAA
 AACAGGCCGGGCGCGGTGCTCACGCCCTGTAATCCAGCACATTTGGGAGGCCGAGGCGGGCAGATCACGAGGTCAG
 GAAATCGAGGCCATCCTGGCTAACACGGTGAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATAGTCGGGGGTGGT
 GGGGGCACCTGTAGTAGTCCAGCTACTCTGGAGGCTGAGGCAGGTGAATGGCGTGAACCCGGAAGGCAGAGCTT
 GCAGTGAGCCAAGATCGGCCACCACACTCCAGCCTTGGCGAGAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAAACAAACAA
 CAACAACAAAAACCAGCAACATAAAAAATAATATTATCTGGCCGGGCGCGGTGGCTTAAGCCGGTAATCCAGCGC
 AGTGCGAGGCCAAGGCGGGCGGATCGCTTGAGTCCGGGAGTTCGAGACGCCTGGGCAATATAACAAGACCCCTGTCT
 ATACAAAAACAAAACATAAATTAGCTGGGCACGGTGGCGTGTGCTGCCTGTAGTCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGG
 CGGAGGATCGCTTGAGCCAGAAAGGTCGAGACTGCAGTGAGCCGTGATCGCACCACTGCCTCCAGCCTGGGTGA
 CACAGTAAAAATAATTTCTTAAATAATACCAATAGTATGCCCTTTAATTTGTACCTTAGGAGCTAGTTACATAAT
 AAAATGCAGACTTGTATCTCCATTTTCAGAGTAGGAAACGAAGGCTCGGGAAGGTTAGGTGAGTTCCTCCATGTC
 ACCGCGCTTAAAGTGGTGAAGCGGAGTCTCAAGCTCTGTTCTACCCCTAAGCCTGGCGCCCTCACCCTGGGTGAG
 TCTGGACGCTGCCAGCCGAGGCGGGCCAGCGACCCAGCCTCCAGCGCCCCCTCTGACAAGCCTGGGATTCG
 CACGCCGCTGCCGTGAGGACAGGGTCTCTGCCCTCCTCCGGGCGGTGGTCCAGTGACGTCACCGCTTCTTTA
 AGACCCCGCCTCCGCCCTGTCCGACTCGGCCTAGGAATTTCCCTTATCTCCTTCGAGTGACGCTCCTTCA
 ACCTCGCCATG

- El **T** indica el sitio de inicio de la transcripción.
- El **ATG** indica el sitio de inicio de la traducción.

Región promotora del gen *cln9* (2500 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción, región 5' UTR y codón de inicio de la traducción)

```
>hg19_knownGene_uc010uwo.1 range=chr16:3059457-3062456 5'pad=0 3'pad=0
strand=+ repeatMasking=none
GGGTGGGGGACTTCCAGGGAGGCAGGCTGTGCTGCCTCCTGACAGCTGCCAAACCTGTGTGGCTGGATTCTCT
GGAGGCCCTGGAAGGCTGCGAGGGAGCCCGCTGACCGGCTTGCTCCGTCTGCAATCTCTGCTCTCCCCACCCCA
ACCTGTGAAATCTGAGCCCCAGGGGCTGGGTGAGCTGGACAACCTGCCACAAGATTCCCTGAGTCCACTGATGG
CCATTTCCAGCCTCTGTATCACCCCCCATCTTCCAGACTCTGTGGGGCCACCAGGTCAGCCCCCTCGTACCGG
AGGACCCCTCAGTGGAGAGGCCAGGGGTGGTGAAGAGGAGGCCAGGCTTCTGTTTACCTTACAGACCAGT
GATTGGCGCTGGCCTGTCTGTGTTTGCAGGGGAGGATCTTAAGCTGTTTTGGGTCAAGGCCCTTTGCAAACTC
GAAGGAAAGTATAAATCTCTCTCCAAAAGTATCATTTTTTTTTAAGAGACAGGGTCTCACCTAGGATGGAGTGCGG
TGGCATAATCATAGCTCACTGCAGACTTAACCTCCTAGGCTCAAGAGATCCTCCTACCTCAGCCTCCCCAGTAGCT
GGACTACAGACAGGAACCCTAAGTCAAGTAAATTTTGTGTATATATATATATATATATATTTTTTTTTTATTTA
GAAATGGGGTCTCACTGTGTGCCCAGGTGGGTCTCAAGCTCCTGGCCTTAAGCAATCCTCCCACCTTGGCCTCTT
AAGCGCTGGGATTACAGCGGTGAGCCTCAGTGCCCGGACCCAAAAGATGCTAAAACCTTTTCGAGAGCGATGCT
CATACCCCTAGGTTTGAACCTGACCGCTCCTTGAGGTTAGAGCCCTTTATACACAATGTCCCACCCACTAGGTGA
GGGCACTGAGCAGGGGTGTGCCCTGGCCACTGGCTCCCCGAAGGCAATGCCGTGAAGTGGTGCAGCCACCAGATGT
GTGTGGTGGGCACCTCCAGCCCTGCCCGCACTGGCCAGTGGGCTCCAGCACACCCAGCCCTCCAGCACCAGGCA
GGTGAGAGGCAGTCCCAGGTGAGGGCCACTCTGAGGATCCTCTGTACCTCCTGAAAGTGTATGAATGGAGACA
```

ATGTTCTCACATCCCTTTTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACAGAGTCTCCCACTGTCACCCAGGCTGGA
 ATGCAGTGGTGCGATCTCGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCGGTTCAGAGCGATTCTTCTGCCTCAGCCTCCCAAGT
 AGCTGGGATACAGGGACCCGCCACCCAGCTAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGGAGTCTCTCTGTCTGTC
 GCCAGGCTGGAGTGGAGTGGAGTGGTACGATCTTGGCTCACTGCAACCTCTACCTCCCGGTTTCAAGTGATTCTCT
 TGCCTCAGCTCCAGAGTGGCGAGTGGCTGGGACTAGAGGCTTGTGCCACCACGCCAGCTAAATTTTTTGTATTTTT
 AGTAGAGACGGGGTTTACCATGTTGGCCAGGATGGTCTCGATCTCTTAACCTTCCGATTTACCTGCTTCGGCCCTC
 CCAAAGTGTGGGATATCTAAATTTTTTGTATTTTTTAGTAGAGACGGGGTTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCG
 AACTCCTGACCTCGTGAATCGCCACCTTGGCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCCGACCTGGC
 CGTACACCCCTTTTTTTCAGACAACAATCCTCAGAGGTTCTTAGACCCAGGCAGGGGCTTGAAGGAGTTCATGAAC
 CCTCCCCACAATGAGGGGACATGTTTGTGGGTGCATGTTCTGTGAGTCCCACGGGGTTTCTCAAGTGGGTCTT
 TGACCAAAGGAGGTTAAGGACCTCGACCTTCCATGACCTGTCCAGGTAGGGGTGAGATTGAGCTTTGGTCAAGT
 GGGACTCCAGGCTGTCCCATGAGTGAATCACAGGCTCTGAGGGGGTTTTTCCGGAGGTAAGGCTTTCTGCAA
 ACTGGAAGGCAGTCTTGGGGACACTGAGTCCCTGGACTTAACCCCGTGCACCTCTGGGGTGTTTTGGCCCG
 GGAGGCTGACTGGCCACTCACTCACCCACCATGGAACATAACCGGGTCTGGGGCTGTGCCACCTGGGTTC
 AGCCCCAGCCGTCGCCCTCAATCCCTTCCCTGAGTGCSCCCCAACCTCCACAACAGGCCCTCACTCTGGC
 CTCTGGAGATCTTAGGCAGCTCAGCTCAGCCTCGGTTTTTTCAGCAGCAGGGGTGGCAAGAGCGCACCTGAGCTGAGGT
 TGAAGTGGGGGTAGTTTTCTAGCCGTGTCAGGGCGATGCCACCTGAGCTGGGCGCAGGACCTGTCTGTGG
 GGAACAGTGCAGGCGGGGACCTTCCCCGGGAGCTAGCGGGGCCACTGGGCTGAGACGGGGATGGATCAGATTCC
 AGAAGTCCCGGGGGGGGAGTGTGCGATACTCGGGGAGCTGGGGCATGTTTGCATCACGAACTCGGCTGGGG
 GAGAGCAGAGGCAGCTGGGGAGGGCTGCGGAAGGAGGAGGCTCAGGAAGGCAAGCCGACGCCCTGTGTGTGTT
 TCTGTCTGAGCCTGTTACTTTTTTGTACCCCGATCCGTCTCTTCTTCTCAGCTTGTCTCCATCTTCCCTCCT
 TTACCTTTGGTTCCACATGCACAGATGCTACGGACGCTTTTTCTCCCTGTCCCCACTCAGCCGAGCATCCCC
 GCTGGCCCCAGGCCCTCATCCATCCGCTGCCACGAACCCAGCCCGCACCTCCCCGGCTCAGTCTGCTCC
 CCTATCCCGGCTCCCTGCACTTCACTCTGCTCTCCCTGCTGGGCTTAAACCCCGCCTGACAGCCGAGAGCC
 CGCAGAGTCCCCAGGTGGCACTGTCAGAGTTCGCTCAGTGGGAACCTGCGCCAGCCGGCAGGAGACGTGGCTGTCT
 CAGCTGGCAGTGCCTGTGGAGGGCCTGTGCGAGCTCAGCCAGGTGTGACAGCGGGGTGGTAAGAGCAGCAGCAC
 CCTCAGGTCATCCGATGGGGCGAGGCCCTCGAGGTGACACCACCACTCAGCCGAGCGGGACTACGAGTCTGCTT
 TGTCTCCGCGAGGACCAAGAACCTGCAAGAGGCAGGAGAGGAGGCGCTTCAAGAGGCGCTTTTCAAGAGGCGCTTTCATGGAA
 CTGAGGACTGGCCTGGCTTGGGGACACCAACAAGCCTTCCCCCTCTGCTGGACACAGAGACACCCACCCAGCACA
 CCAGACACACCTCTGAGTACCTTAGGCCGCTGGGGCTGAGAAGACCTAACCGAGGGGCCAGATC

El ■ indica el sitio de inicio de la transcripción.

El ATG indica el sitio de inicio de la traducción.

5.2 Análisis de la región promotora de los genes *cldn6* y *cldn9*.

En el análisis realizado se buscaron motivos de unión a los factores de transcripción generales más comunes, los cuales son la caja TATA (secuencia TATAWAW, W=T o A), la caja GC (secuencia GGGCGG) y la caja CAAT (secuencia CCAAT). En la secuencia promotora de *cldn6* (2000 p.b. río arriba del sitio de inicio de la transcripción) no se encontraron cajas TATA ni cajas CAAT, pero si se encontraron dos cajas GC, lo cual indica que este gen podría estar regulado por elementos como las islas CpG. El análisis con el programa EMBOSS CpG Island Searcher indica que la secuencia promotora tiene dos putativas islas CpG:

Secuencia promotora de *cln9* con putativos elementos de regulación.

CTGAGCCCCAGGGGCTGGGTGAGCTGGACAAACCTGCCACAAGATTCCCTGAGTCCACTGATGGCCATTTTCCAGC
 CTCTGTATACCCCCCACTTCCAGACTCTGTGGGGCCACCAGGTCAGCCCCCTCTGACCGGAGGAGCCCCCT
 CAGTGGAGAGGCCAGGGGGTGGTGAAGAGGAGGCCAGGCTTCTGTTTACCTTACAGACCAGCTGATTGGCGCTGG
 CCTGTCTCTGTGTTGACAGGGGAGGATCTTAAGCTGTTTTGGGTCAAGGCCCTTTGCAAATCTGAAGGAAAGTAT
 AATCTCTCTTCCAAAAGTATCATTTTTTTTAAAGAGACAGGGTCTCACCTAGGATGGAGTGCCGTGGCATAATCAT
 AGCTCACTGCAGACTCTAACTCTAGGCTCAAGAGATCTCTACCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGAC
 AGGAACCACCTAACTCAGCTAATTTTTGTGTATATATATATATATATATTTTTTTTTTATTTTAGAAATGGGGTCT
 CACTGTGTGCCAGGTGGTCTCAAGCTCCTGGCCTTAAGCAATCCTCCACCTTGGCCTTTAAGCGCTGGGAT
 TACAGGCGTAGCCCTCAGTGCCCGGACCCAAAAGATGCTAAAACCTTTTCGACAGAAGCGATGCTCATACCCCTAGG
 TTTGAACCTGACCGCTCTTGGAGTTAGAGCCCTTTATACACAATGTCCACCCACTAGGTGAGGGGCAGT
 AGGGGTGTGCTGGCCACTGGCTCCCCGAAGGCAATGCCGTGAAGTGGTGCAGCCACCAGATGTGTGTGGTGGGCA
 CCTCCAGCCCTGCCCGCAGTGGCTCCAGCACACCCAGCCCTCCAGCACCAGGACAGGTGAGAGCCAG
 TCCAGGTGAGGGCCACTCTGAGGATCCTCTGTACCTCCCTGGAAAGTGTATGAATGGAGACAATGTTCTTCCACA
 TCCCTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACAGAGTCTCCACTGTCACCCAGGCTGGAATGCAGTGGTGC
 GATCTCGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCGGTTCAAGCGATTCTTCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTAC
 AGGACCCGCCACCACGCCAGCTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGGAGTCTCTCTGTCGCCAGGCTGGAG
 TGGATGGAGTGGTACGATCTAGGCTCACTGCAACCTTACCTCCCGTTTCAAGTATTTCTTGCCTCAGCCTC
 CAGAGTGGCGAGTGGCTGGGACTAGAGGCTTGTGCCACCACGCCAGCTAATTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGG
 GTTTCACCATGTTGGCCAGGATGGTCTCGATCTTTAACCTCCGATTACCTGCTTCCGCCCTCCCAAAGTGTCTGG
 GATACTAATTTTTTGTATTTTTTAGTAGAGACGGGTTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCTGACCT
 CGTGAATCGCCACCTTGGCCTCCCAAAGTGTGGGATTTACAGGCGTGAGCCACCCAGCTGGCCCTGCAACCCCT
 TTTTCAGACAACAATCCTCAGAGGTTCTTAGCACCCAGGCAGGGGCTTGAAGGAGTTCATGAACCCCTCCCCACAA
 ATGAGGGGCACATGTTTGTGGGTGCATGTTCTGTGAGTCCACGGGGTTTCTCAAGTGGGTCTTTGACCAAAGGAG
 GTTAAGGACCTCGACCTCCATGACCTGTCCAGGTAGGGGTGAGATTGAGCTTTGGTCACTGGGACTCCAGG
 CTGTCCCATGTTGGAATCAGGCTCTGAGGGGGTTTTTTCGGAGGTAAGGCTTTCTGCAAACTGGAAGGCAG
 GTCTTGGGGACACTTGTGTCCTGGACTTAACCCCGTGGCCACTCTGGGGTGTTTTTGGCCCGGAGGCCTGACT
 GGCCACTCACTCACCACCCATGGAACATAACCGGGTCTGGGCTGTGCCCAACCCTGGGTTCCAGCCCCAGCCCG
 TCCCGCTCCATCCCCCTTCTGAGTGCCCCCAACCTCCACAACAGGCCCTCATCTTGGCCTCTGGAGATCT
 TAGCAGCTCAGCTCAGCTCGGTTTTACGAGCAGGGGTGGCAAGAGCGCACCTGAGCTGAGGTTGAAGTGGGGG
 TAGTTTTCTAGGCCGTTGCCAGGGCGATGCCACCTGAGCTGGGCGCCAGGCACCTGTCTGTTGGGAAACAGTGCAG
 GCGGGACCTTCCCGCGGAGCTAGCGGGCCACTGGGCTGAGACGGGGATGGATAGATTCCAGAGAGTCCAG
 GC**GGCGG**GAGTGTGCGATACTCGGGGAGCTGGGGCATGTTTGATACAGAACTCCGGTGGGGGAGAGCAGAGGC
 AGCTGGGGAAACACCTGCAAGAGGCACGGAGAGGAGGCGCTTAAACCCCGCTGACCCGAGAGCCCGCAGAGTCCC
 CTGTTACTTTTTTGAACCCCGATCCGCTCTTCTTCTCAGCTGTGCTCCATCTTCCCCTCTTTACCCCTGGTT
 CCCACATGCACAGATGCTACGGACGCTTTTCTCCCTGTCCCACTCAGCCGACGATCCCCCGCTGGCCCCAG
 GCCCTCATCCATCCGCTGCCACGAACCCCGAGCCCGCACCTCCCGTGGCTCAGGTCTCCCCTATCCCGGCC
 TCCCTGCACCTTCACTCTGCTCCTCCCCTGCCTGGGCCTTAAACCCCGCTGACCCGAGAGCCCGCAGAGTCCC
 AGGTGGCACTGTGAGTGTGCTCAGTGGGAACCTGCGCACCCGCGAGGAGACGTGGTGTCTCAGCCTGGCAGT
 GCTCTGGAGGGCTGTGCGAGCTCAGCCAGGTGTGACAGCGGGGTGGTAAGAGCAGCAGACCCCTCAGGGCATC
 CGAT**GGCGG**AGGCCCTCGAGGTGACACCCACCCTCAGCCGAGCGGGACTACGAGTCTGCTTTGTGCTCCGCGA
 GGACCAAGAACCTGCAAGAGGCACGGAGAGGAGGCGCCTTTCAAGAGGCGCCTTTATGGAAGTGGAGCTGGC
 CTGGCTTGGGGACACCAACAAGCCTTCCCCTCTGCTGGACACAGAGACCCACCCAGCACACCAGACACACC
 TCTGAGTCACTAGGCCGCTGGGGCTGAGAAGACCTAACCGAGGGGCCAGATG

- El indica las cajas TATA.
- El indica las cajas GC.
- El indica el sitio de inicio de la transcripción.
- El indica el sitio de inicio de la traducción.

5.3 Secuencia de los *primers* y enzimas de restricción para la clonación

Región promotora *cldn6* más *primers* con sitios de enzimas de restricción.

AGGGACGCAGACCCCTTCCTTGC **CCAGCCGGTGTATCTAGTCC** AGCGTGCGTGGTGTGGGAAATCAAAAATTAGA
CACGAGTGCCTCGCTTCGGCAGCACATATAGAAATCAGACACGAACGGCCGGACGCGGTGGCTCACGCCTTAATCC
CATCAGTTTGGGAGTCTGAGGCAGGCGGATTACGAGGTCAGGAGTTTCGAGAGCAGCCTGACCAACGTGGTGAACG
CCGTCTCTACTCGAAATACAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGCGCGCCTGCAATCCGAGCTACTCAGGAGGTGA
GGCAGGAGAATCTCTTGAACCCGGGAGGCAGAAAGTTGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCACTACACTCCAGCCTGGGC
GACAGAGTGAGAGTCCGTCTCAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AGAAATCAGACACACGACCAATCCATGCAGAGATCACTGCAGCTTCCTTCCCCCACCTCCCCTTGAGATTGCGTC
TCACTCTTGCTCAGCCTGGAGTGCAGTGGTACGATCACGGCTCTCTGGGCTCAGGTGAGCCTCCACCTCAGCCTC
CCAAGTAGCTGGGACCACAGGCCTGCCCCACCACGTCCGGCTAATTTTGTATTTTTGTAGAGACCAGGGTCTT
ACTATGTTGCCAGGTTAGCTTGGCCACTACAGCTTTGTTAAGGGCCCGGGGGTATAACAATTAACCTGAGGTC
AGGAGCTCGAGACCAGCCTGGCCAACTTGGTGAACCCCGTCTTACTAAAAATAAAAAAAGAAAGATTAGCC
GGGCGTGGTAGTGGGCGCTGTAATCTCAGCTACTCGGGAGACTGAGGCAGGAGAATTTCTGGAACCTGGGAGACG
GAGTTGCAGTCAGTCGAGATAGCGCAATTGCACTCCAGACTGGGCGACAGAGAGGGCTCCATCTCAAAAAACAA
AACAGGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACATTGGGAGGCCGAGGCGGGCAGATCACGAGGTCAG
GAAATCGAGCCCATCCTGGCTAACACGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATAAAAAAATAGTCGGGGGTGGT
GGCGGGCACCTGTAGTAGTCCCAGCTACTCTGGAGGCTGAGGCAGGTGAATGGCGTGAACCCGGAAGGCAGAGCTT
GCAGTGAGCCAAGATCGCGCCACCACACTCCAGCCTTGGCGAGAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAAACAACAACAA
CAACAACAAAAACCAGCAACATAAAAAATAATATTATCTGGCCGGGCGCGGTGGCTTAAGCCGGTAATCCCAGCGC
AGTCCGAGGCCAAGGCGGGCGGATCGCTTGAGTCCGGGAGTTTCGAGACGCCTGGGCAATATAACAAGACCCTGTCT
ATACAAAAACAACATAAATAGCTGGGCACGGTGGCGTGTGCTGCCGTAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGG
CGGGAGGATCGCTTGAGCCAGAAAGGTGAGACTGCAGTGAGCCGTGATCGCACCACTGCCTCCAGCCTGGGTGA
CACAGTAAAAATATTTCTCTAAAAATAATACCAATAGTATGCCCTTTAATTTGTACCTTAGGACGTAGTTACATAAT
AAAAATGCAGACTTGTATCTCCATTTTGCAGAGTAGGAAACGAAGGCTCGGGAAAGGTTAGGTGAGTTCCCCATGTC
ACCCGCTGTCTTAAGTGGTGAAGCGGAGTCTCAAGCTCTGTTTACCCTAAGCCTGGCGCCCTCACCTGGGTGAG
TCTGGACGTCTGCCAGCCGAGGCGGGCCAGCGACCCAGCCTCCAGCGCCCCCTCTGACAAGCCTGGGATTCG
CAGCCCGCTGCCGTGAGGACAGGCTCTGCCCCCTCCGGGGCGGTGGTCCAGTGACGTCACCGCTTCTTTA
AGACCCCGCCTCCGCCCTGTCC **CGACACTCGCCTAGGAAT** TCCCTTATCTCCTTCGACGTGCAGCTCCTTCA
ACCTCGCC **ATC**

Las características del par de *primers* elegidos son las siguientes:

	Secuencia 5' > 3'	Longitud	Tm (°C)	GC%
<i>Forward primer</i>	CCAGCCGGTGTATCTAGTCC	19 p.b.	59.26	63.16
<i>Reverse primer</i>	AATTCCTAGGCCGAGTGTCTG	20 p.b.	59.54	55.00
Tamaño del producto			1996 p.b.	

A cada par de primer se le agregó la secuencia de la enzima de restricción correspondiente para la posterior clonación en el plásmido pmetluc2-vector. Adicionalmente se agregó al extremo 5' la secuencia GCGC para facilitar la digestión de los extremos.

Forward 5' GCGC **GAATTC** **CCAGCCGGTGATCTAGTCC** 3'

Reverse 5' GCGC **GGATCC** **AATTCTAGGCCGAGTGTCCG** 3'

Forward enzima **EcoRI** secuencia: **GAATTC**

Reverse enzima **BamHI** secuencia: **GGATCC**

Para verificar que el par de *primers* diseñado fuera específico, se realizó un alineamiento entre los *primers* y la secuencia del genoma humano. El par de *primers* resultó específico para la secuencia de interés.

```
>NC_000016.10 Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p7 Primary Assembly
product length = 1996
Features flanking this product:
  2148 bp at 5' side: claudin-6 precursor
  234 bp at 3' side: tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A pre...
Forward primer 1 CCAGCCGGTGATCTAGTCC 19
Template 3020163 ..... 3020145
Reverse primer 1 AATTCTAGGCCGAGTGTCCG 20
Template 3018168 ..... 3018187
```

Figura 15. Alineamiento del par de *primers* para la región promotora de *cldn6* en el genoma humano.

Región promotora *cldn9* más *primers* con sitios de enzimas de restricción

CAGTGAGCCGAGATCACATCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAGCGAGATTCCGTCTCAAAAAACAAAACAAA
 AAAAAACAAAACAAAACCTGGGGTCCCGAGCAAGTGCGGGTGGCGCTTGCCGTGAATCCAGCACCTTGGAAGGC
 TGAGGCAGGCGGATCACCTGAGATCAGGAGTTCGCAGACCAGCCAGACCAACATGGTGAAACCCCGTCTCTGCTAA
 ATACAAAAAAGAAAAAATAGCCGGTGTGGTGGCGCATGCTGTAATCTCAGCTACTTGAGAGGCTGAGGCAG
 GAGAACAGCTTGAACCCAGGAGGCAGAGGTTGCAGTAAGCCGAGATTGTGCCATTGCACTCCAGCCTGGGCAACAA
 GCGCAAAACTCCGTCTCAAAACACAAAACAAAAAACCCCTGGGGTCCCTTATGCCCTTCCGGGCACAGCGCTCA
 CTGGATGTGTGCAGCCCGCCACTGGGCTACAACGTAGGGGTTTAGAGCTGAATGTGGAACCGGTGAGTCAACGAGG
 CAGGGCCCGACAGCAAGTGGACCAGCCGTCCCGGTTTCCCTGGAGGACCCAATATCAAGCTGGGAATGTCCCTCA
 AAAAGTGGGATGAGCCGATCACCTTAGGCCCTAGGACAAGGAGGACTTGTCCGGCCAGGGAAGAGAATAGCCC
 CTGGGTTGGGGCTGCTGGGTGGGGGACTTCCAGGGAGGCAGGCTTGCTGCTCCTGACAGCTGCCAAACCT
 GTGTGGCTGGATTCTGGAGGCCCTGGAAGGCTGCGAGGGAGCCCGTGACCGGCTTGCCCTCGTCTGCAATCTC

TGCTCTCCCACCCCAACCTGTGAAATCTGAGCCCCAGGGGCTGGGTGAGCTGGACAAACCTGC **CACAAGATTCC**
CTGAGTCCACTGATGGCCATTTTCCAGCCTCTGTATCACCCCCCATCTTCCAGACTCTGTGGGGCCACCAGGTCA
GCCCCCTCGTACCGGAGGAGCCCCCTCAGTGGAGAGGCCCCAGGGGTGGTGAAGAGGAGCCAGGCTTCTGTTT
ACCTTACAGACCAGCTGATTGGCGCTGGCCTGTCTCTGTGTTTGCAGGGGAGGATCTTAAAGCTGTTTTGGGTCAAG
GCCCTTTGCAAATCTGAAGGAAAGTATAAATCTCTCTTCCAAAAGTATCATTTTTTTTTTAAAGAGACAGGGTCTCAC
CTAGGATGGAGTGCGGTGGCATAATCATAGCTCACTGCAGACTCTAACTCCTAGGCTCAAGAGATCCTCTACCTC
AGCTCCCGAGTAGCTGGACTACAGACAGGAACCACCTAACTCAGCTAATTTTTTGTGTATATATATATATATATA
TTTTTTTTTTATTTTAGAAATGGGGTCTCACTGTGTTGCCAGGTGGGTCTCAAGCTCCTGGCCTTAAAGCAATCCT
CCCACCTTGGCCTTTAAGCGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCTCAGTGCCCGGACCCAAAAGATGCTAAAACCTT
TCGCAGAAGCGATGCTCATAACCCTAGGTTTGAACCCCTGACCCTCCTTGAGGTTAGAGCCCTTTATACACAATGT
CCCACCCACTAGGTGAGGGGCACTGAGCAGGGGTGTGCTTGGCCACTGGCTCCCCAAGGCAATGCCGTGAAGTGG
TGCAGCCACCAGATGTGTGTGGTGGGCACCTCCAGCCCTGCCCGCACTGGCCAGTGGGCTCCAGCACACCCAGCC
CTCCAGCACCCAGGAGGTGAGAGGCAGTCCCAGGTGAGGGCCCACTCTGAGGATCCTCTGTACCTCCTGGAAG
TGTATGAATGGAGACAATGTTCCCTCACATCCCTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACAGAGTCTCCAC
TGTACCCAGGCTGGAATGAGCTGGTGCAGTCTCGGCTCACTGCACACTCTGGCTCCGGTTCAAGCGATTCTCTG
CCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTACAGGCACCCGCCACCACGCCAGCTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGA
GGAGTCTCTCTCTGTGCGCAGGCTGGAGTGGAGTGGAGTGGTACGATCTTGGTCACTGCAACCTCTACCTCCCGG
TTTTCAAGTATTCTCTTGGCTCAGCCTCCAGAGTGGCAGTGGCTGGGACTAGAGGCTTGTGCCACCAAGCCAGC
TAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCAACATTTGGCCAGGATGGTCTCGATCTCTAACCTTCCAGT
TACCTGCTTCGGCCTCCCAAAGTGTGGGATATCTAATTTTTTGTATTTTTTAGTAGAGACGGGGTTTACCATGTT
GGCAGGCTGGTCTGAACTCCTGACCTCGTGAATCGCCACCTTGGCCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGCGTG
AGCCACCGCACCTGGCCGTACACCCCTTTTTCAGACAACAATCTCAGAGGTTCTTAGCACCAGGCAAGGGGCTT
GAAGGATTCATGAACCTCCCCACAAATGAGGGGCACATGTTGTGGTGCATGTTCTGTGAGTCCCACGGGT
TTCTCAAGTGGGTCTTTGACCAAAGGAGGTTAAGGACCTCGACCTTCCATGACCTGTCCAGGTAGGGGTCAAGGAT
TTGAGCTTTGGTCACTGGGACTCCAGGCTGTCCCATGAGTGAATCACAGGCTCTGAGGGGTTTTTCCGGAGG
TAAGGCTTTCCCTGCAAATGGAAGGCAGGTCTTGGGGACACTTGAGTCCCTGGACTTAACCCCGTGGCCACCTCT
GGGTGTTTTGGCCCGGAGCCCTGACTGGCCACTACTACCACCCATGGAACATAACCCGGTCTGGGCTGTG
CCCCACCTGGGTTCCAGCCCCAGCCCTCCCGCTCCATCCCCCTTCTGAGTGACCCCAACCTCCACAACAGG
CCCCTCATCTCTGGCCTCTGGAGATCTTAGGCAGCTCAGCTCAGCCTCGGTTTTCAGCAGCAGGGGTGGCAAGAGC
GCACCTGAGCTGAGGTTGAAGTGGGGGTAGTTTTCTAGGCCGTTGCCAGGGGATGCCACCTGAGCTGGGGCCCA
GGCACCTGTCTGTGGGAAACAGTGCAGGCGGGGACCTTCCCCGGGAGCTAGCGGGGCCACTGGGCTGAGACGGG
GGATGGAT **G**AGATTCCAGAGAGTCCAGGCGGGGAGGTGTGCGATACTCGGGGAGCTGGGGATGTTTGCATCA
CGAAACTCGGCTGGGGGAGAGCAGAGGCAGCTGGGAGGGGCTGCGGAAGGAGGAGGCTCAGGAAGGCAAGCCGAC
GCCCTGTGTGTTTTCTGTCTGAGCCTGTTACTTTTTTGACCCCGATCCGTCTCTTCTCTCAGCTTGTTC
TCCATCTTCCCCTCTTTACCCTTGGTTCCCACATGCACAGATGCTACGGACGCTTTTTCTCCCCTGTCCCCACTC
AGCCACGATCCCCCGTGGCCCCAGGCCCTCATCCATCCGCTGCCACGAACCCCGAGCCCGCACCTCCC
CGTGGCTCAGGTCTCCCCTATCCCGCCTCCCTGCACCTCACCTCTGCTCCTCCCCTGCCTGGGCCTTAAACCCCG
CCTGCAGCCGAGAGCCCGCAGAGTCCCAGGTGGCACTGTGAGAGTGCCTCAGTGGGAACCTGCGCCAGCCGCGAG
GAGACGTGGCTGTCTCAGCCTGGCAGTGCCTTGGAGGGCTGTGCGAGCTCAGCCAGGTGTGACAGCGGGGTG
GTAAGAGCAGCAGCACCCTCAGGGCATCCGATGGGCGGAGGCCCTCGAGGTGACACCCACCCTCAGCCGAGCGG
GAC **CTACGAGTCTGCTTTGTGCTCC**GCGAGGACCAGAAACCTGCAAGAGGCACGGAGAGGAGGGCCTTTCAAGA
GGCGCCTTTCATGGAAGTGGGACTGGCCTGGCTTGGGACACCAACAAGCCTTCCCCTCCTGCTGGACACAGAG
ACACCCACCCAGCACACCAGACACCCCTCTGAGTCACCTAGGCCCTGGGGCTGAGAAGACCTAACCGAGGGGC
CAG **ATC**

Las características del par de *primers* elegidos son las siguientes:

	Secuencia 5' > 3'	Longitud	Tm (°C)	GC%
<i>Forward primer</i>	CACAAGATTCCCTGAGTCCACTG	23 p.b.	60.87	52.17
<i>Reverse primer</i>	GGAGCACAAAGCAGACTCGTAG	22 p.b.	61.24	54.55
Tamaño del producto			2999 p.b.	

A cada par de primer se le agregó la secuencia de la enzima de restricción correspondiente para la posterior clonación en el plásmido pmetluc2-vector. Adicionalmente se agregó al extremo 5' la secuencia GCGC para facilitar la digestión de los extremos.

Forward 5' GCGC **AAGCTT** CACAAGATTCCCTGAGTCCACTG 3'

Reverse 5' GCGC **GGTACC** GGAGCACAAAGCAGACTCGTAG 3'

Forward enzima **HindIII** secuencia: **AAGCTT**

Reverse enzima **Acc65I** secuencia: **GGTACC**

Para verificar que el par de *primers* diseñado fuera específico, se realizó un alineamiento entre los *primers* y la secuencia del genoma humano. El par de *primers* resultó específico para la secuencia de interés.

```
>NC_000016.10 Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p7 Primary Assembly
product length = 2999
Features flanking this product:
  30501 bp at 5' side: membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2...
  207 bp at 3' side: claudin-9
Forward primer 1 CACAAGATTCCCTGAGTCCACTG 23
Template 3010157 ..... 3010179
Reverse primer 1 GGAGCACAAAGCAGACTCGTAG 22
Template 3013155 ..... 3013134
```

Figura 16. Alineamiento del par de *primers* para la región promotora de *cldn9* en el genoma humano.

Las características del vector utilizado se muestran en la figura 5, al igual que la secuencia del sitio múltiple de clonación y las enzimas de restricción usadas en la clonación. Es importante mencionar que la

luciferasa del vector pmetluc2-reporter tiene una secuencia señal de secreción, por lo tanto, la enzima es secretada al medio extracelular.

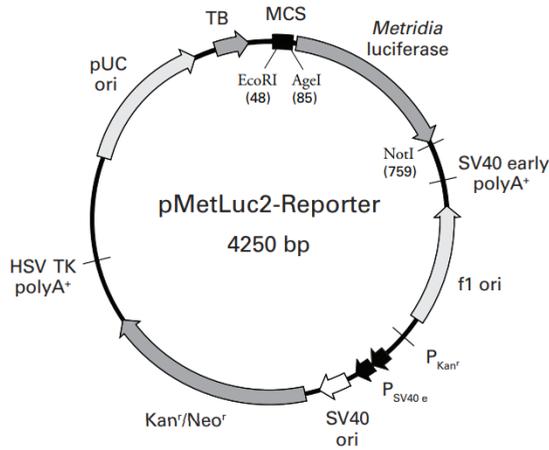


Figura 17. Mapa del vector pmetluc2-reporter.

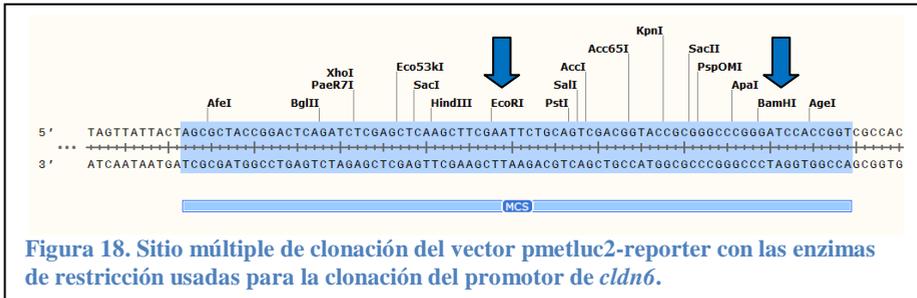


Figura 18. Sitio múltiple de clonación del vector pmetluc2-reporter con las enzimas de restricción usadas para la clonación del promotor de *cldn6*.

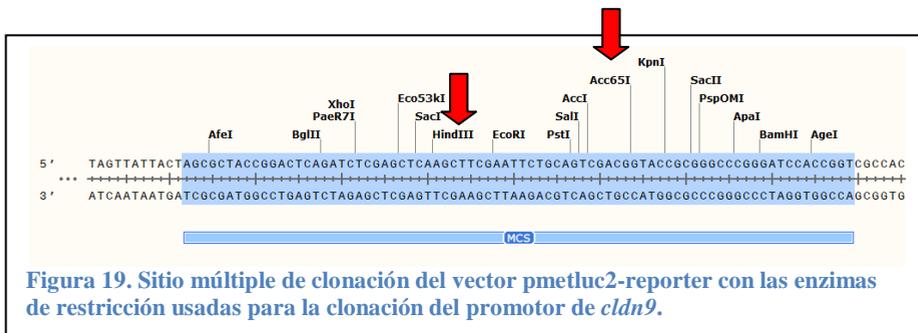


Figura 19. Sitio múltiple de clonación del vector pmetluc2-reporter con las enzimas de restricción usadas para la clonación del promotor de *cldn9*.

El tamaño de los vectores recombinantes, con la secuencia promotora de *cldn6* y la de *cldn9*, es de 6246 p.b. y de 7249 p.b. respectivamente. El vector con la secuencia promotora de *cldn6* se nombró pmetluc2-promcldn6 mientras que el vector con la secuencia promotora de *cldn9* se nombró pmetluc2-promcldn9. Los vectores recombinantes conservan las características del vector original pmetlu2-reporter.

5.4 Extracción de ADN genómico.

A partir de un cultivo a confluencia de células AGS se extrajo ADN genómico. El ADN obtenido se corrió en un gel de agarosa al 0.8% para verificar su integridad. Como podemos observar el ADN genómico tiene un peso molecular alto y se encuentra íntegro. El ADN control fue obtenido de células de sangre periférica humana y se utilizó para comparar el peso molecular y la integridad con el ADN extraído de las células AGS.

El ADN que se utilizó en los experimentos posteriores fue el del tubo 1, debido a que fue el tubo con mayor concentración de ADN.

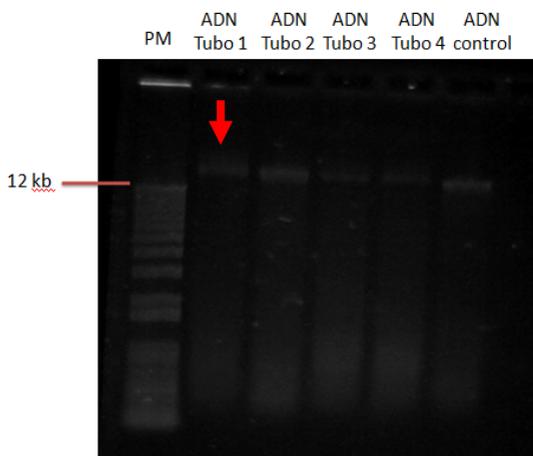


Figura 20. Integridad del ADN genómico de células AGS.

5.5 Amplificación de la región promotora de *cldn6* y *cldn9*.

La región promotora de *cldn6* y *cldn9* se amplificó mediante la técnica de PCR a partir del ADN genómico extraído de células AGS. El programa de PCR utilizado se estandarizó para optimizar la temperatura de alineamiento (Tm).

Las Tms utilizadas en el programa de PCR fueron las siguientes:

Tm1	62.1 °C
Tm2	64.1 °C
Tm3	66.6 °C
Tm4	67.7 °C

En la figura 10 se muestra el producto amplificado de la estandarización del PCR. Las bandas corresponden al peso molecular esperado.

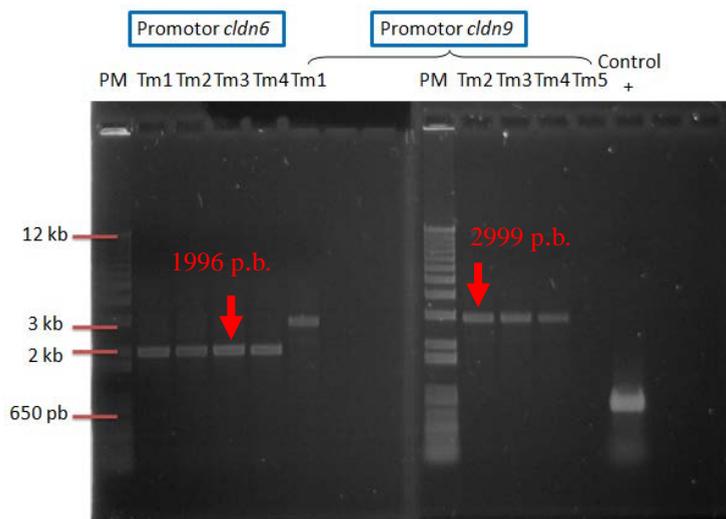


Figura 21. PCR para optimizar la Tm para obtener el promotor de *cldn6* (1996 p.b.) y de *cldn9* (2999 p.b.). El control positivo es ADN genómico humano de células de sangre periférica.

Después de la estandarización se procedió a realizar otro PCR para obtener la mayor cantidad de producto posible. Para las reacciones posteriores de PCR se eligieron las Tms cuyo producto amplificado resultó en la banda con mejor definición. Para amplificar el promotor de *cldn6* se decidió utilizar la Tm3 de 66.6 °C mientras que para amplificar el promotor de *cldn9* se eligió la Tm2 de 64.1 °C, los cuales están señalados con una flecha roja en la figura 10. En la figura 11 se muestran los productos de dicha amplificación.

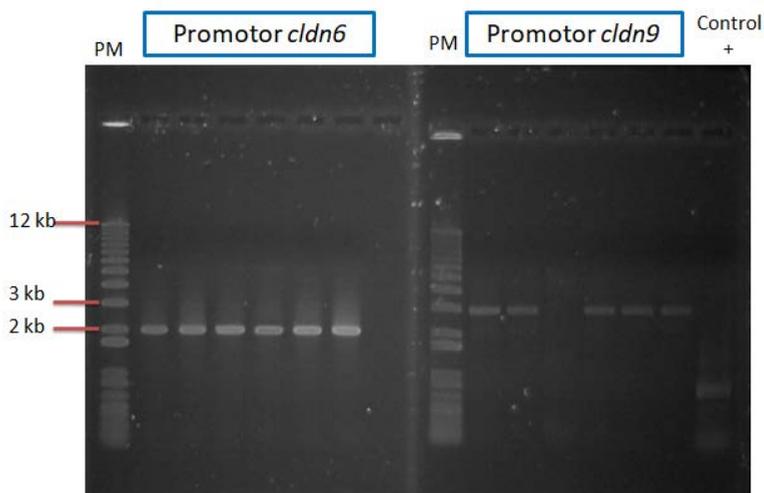


Figura 22. PCR para amplificar los promotores de *cldn6* y *cldn9* utilizando Tm de 66.6°C para la amplificación del promotor de *cldn6* y una Tm de 64.1°C para la amplificación del promotor de *cldn9*. El control positivo es la secuencia de ADN codificante para claudina 6.

5.6 Digestión de los insertos y del plásmido pmetluc2-vector.

El plásmido pmetluc2-vector se digirió con las enzimas de restricción correspondientes para la clonación de los insertos.

Para la clonación del inserto-promcldn6 se utilizaron las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, mientras que para la clonación del inserto-

promcln9 se utilizaron las enzimas de restricción HindIII y Acc65I. Al finalizar las digestiones, el vector se sometió a una reacción de desfosforilación con el objetivo de disminuir o incluso eliminar la probabilidad de re-ligación. En la figura 12 se muestra el gel de corrimiento del vector digerido, con el fin de corroborar una digestión total. Como se observa, en los carriles de las digestiones solo se observa una banda gruesa, lo cual indica que la totalidad del ADN está digerido. En el carril del vector sin digerir se observan varias bandas, las cuales representan las distintas conformaciones de un plásmido. La conformación nativa (super-enrollada) es la banda más gruesa de 3 kb y las conformaciones no nativas (relajadas) son las bandas de entre 5 y 12 kb.

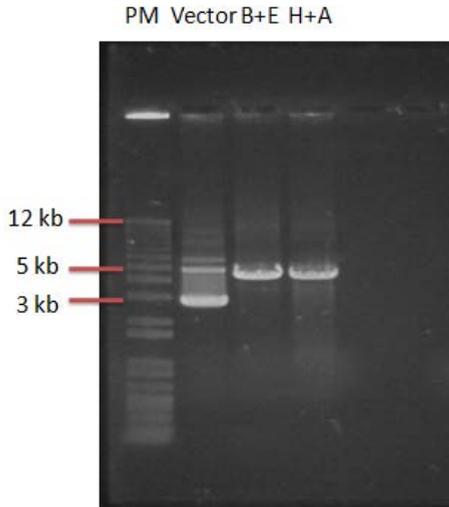


Figura 23. Gel de ensayo de restricción del plásmido pmetluc2-vector. B+E son las enzimas BamHI y EcoRI, H+A son las enzimas HindIII y Acc65I.

Los insertos fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes y, al contrario del pmetluc2-vector, no se realizó la reacción de desfosforilación.

Una vez concluidas todas las reacciones descritas anteriormente, los insertos y el pmetluc2-vector se purificaron como se describió en la metodología, y posteriormente se procedió a la ligación.

5.7 Obtención de colonias recombinantes con el plásmido pmetluc2-vector.

Al día siguiente de la transformación se revisaron las placas de LB-agar + kanamicina. En la placa de las bacterias transformadas con el vector recombinante pmetluc2-promcldn6 se obtuvieron 22 colonias, mientras que en la placa del vector recombinante pmetluc2-promcldn9 no se obtuvo ninguna colonia.

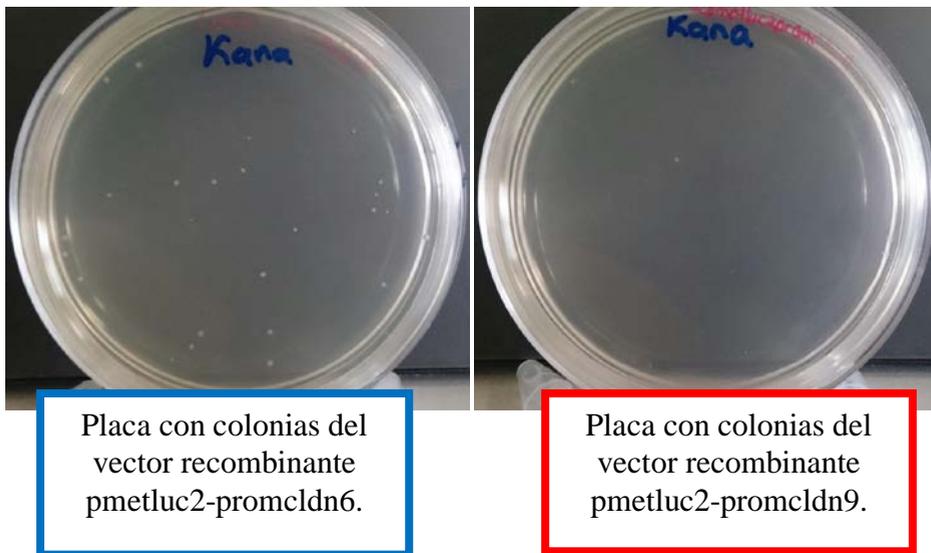


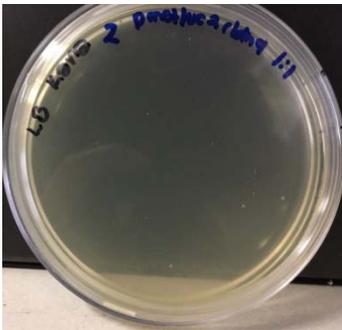
Figura 13. Placas con colonias de los vectores recombinantes.

De las 22 colonias que crecieron, se eligieron al azar 5 para realizar un PCR de colonias para buscar el inserto-promcldn6 del vector recombinante, lo cual indicaría una ligación exitosa.

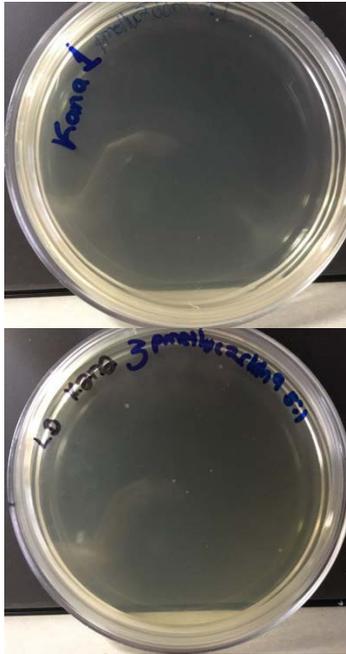
Después de que no se obtuvieron colonias para el vector recombinante *promcldn9*, se procedió a realizar una nueva ligación utilizando menor cantidad de inserto, ya que se ha descrito que concentraciones muy altas de ADN en la reacción de ligación pueden inhibir la transformación. El inserto de *cldn9* fue 1000 p.b. más largo que el inserto de *cldn6*, por lo que muy probablemente la transformación pudo haberse inhibido. Para la nueva reacción de ligación se utilizaron distintas relaciones molares inserto:vector, con el propósito de encontrar la relación molar óptima para este inserto. Las relaciones molares utilizadas fueron 1:1, 3:1 y 5:1.

Al cambiar las condiciones mencionadas se lograron obtener las siguientes colonias:

Relación molar	Número de colonias
1:1	4
3:1	2
5:1	6



Placa con colonias del vector recombinante *pmetluc2-promcldn9*.
Relación molar 1:1



Placa con colonias del
vector recombinante
pmetluc2-promcldn9.
Relación molar 3:1

Placa con colonias del
vector recombinante
pmetluc2-promcldn9.
Relación molar 5:1

Figura 14. Placas con colonias del vector recombinante pmetluc2-promcldn9 con distintas relaciones molares inserto:vector.

La placa con mayor número de colonias se eligió para realizar el análisis de PCR de colonias, de la cual se eligieron 5 de las 6 colonias.

5.8 Colonias de bacterias recombinantes positivas para el vector recombinante pmetluc2-promcldn6

La colonia #2 y la colonia #4 resultaron positivas para el inserto-promcldn6 (figura 15) ya que del ADN de las bacterias se amplificó una banda de 1996 p.b., la cual corresponde al peso molecular esperado para el inserto-promcldn6.

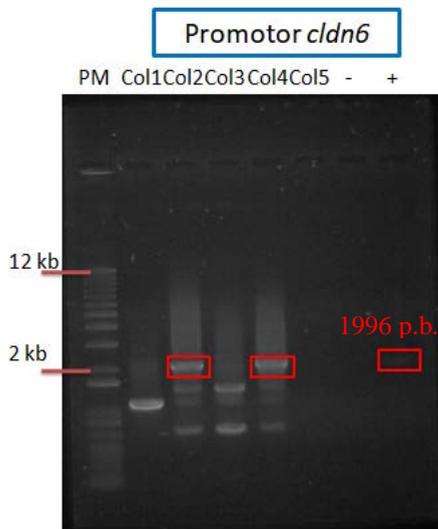


Figura 15. PCR de colonias para pmetluc2-promcldn6. Las colonias 2 y 4 contienen el inserto-promcldn6. Como control negativo se utilizaron los *primers* para promcldn6 en el plásmido pmetluc2-vector y como control positivo se utilizó el ADN genómico de células AGS.

En el caso del PCR de colonias para pmetluc2-promcldn9, ninguna de las 5 colonias utilizadas contenía el vector recombinante (figura 16) ya que del ADN de las bacterias no se amplificó una banda de 2999 p.b., el cual es el peso molecular esperado para la banda correspondiente al inserto-promcldn9. Las placas en donde aún había colonias por probar se contaminaron.

Las colonias que crecieron en la placa con medio selectivo portaban el vector pmetluc2 vacío. A pesar de que el vector fue desfosforilado, este se religó, lo cual puede llegar a ocurrir si la calidad del inserto utilizado es baja. El inserto promcld9 fue purificado dos veces mediante el método de fenol/cloroformo, ya que no se podía realizar una reacción de doble digestión con las enzimas seleccionadas. La doble purificación pudo haber disminuido la calidad del inserto y, como consecuencia, la eficiencia en la reacción de ligación pudo haberse afectado.

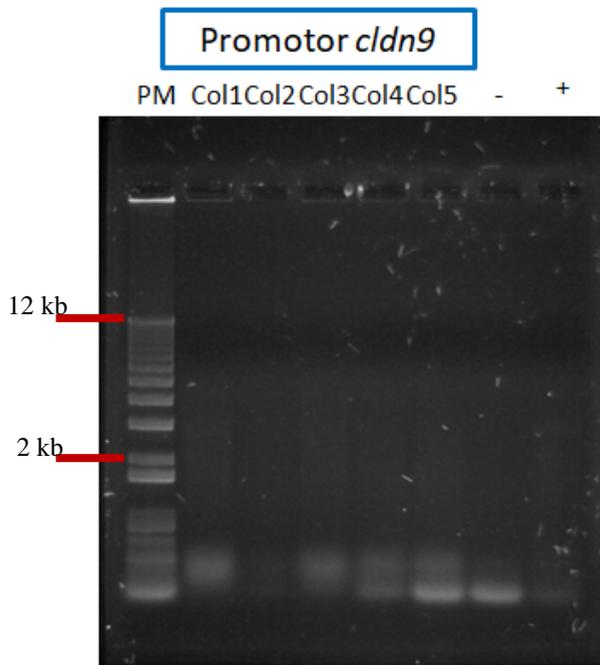


Figura 16. PCR de colonias para pmetluc2-promcldn9.

5.9 Correcta orientación del vector pmetluc2-promcldn6

Las colonias #2 y #4 se amplificaron en un cultivo de medio LB+kanamicina y posteriormente se extrajo el ADN plasmídico recombinante.

Posteriormente, se realizó un ensayo de restricción con el objetivo de verificar la orientación correcta del inserto-promcldn6 respecto al marco de lectura del vector pmetluc2. En el ensayo se utilizó la enzima de restricción Eco53kI. El vector pmetluc2-promcldn6 con orientación correcta deberá liberar un fragmento de 752 p.b., mientras que si el fragmento se clonó en sentido opuesto, el tamaño del fragmento deberá ser de 1266 p.b. En la figura 17 se muestra que las dos colonias contienen el inserto-promcldn6 en

la orientación correcta, ya que se observa una banda de aproximadamente 752 p.b. y otra banda de aproximadamente 5494 p.b. Si el inserto se encontrará clonado en la dirección opuesta se esperaría una banda de 1266 p.b. y otra banda de 4980 p.b.

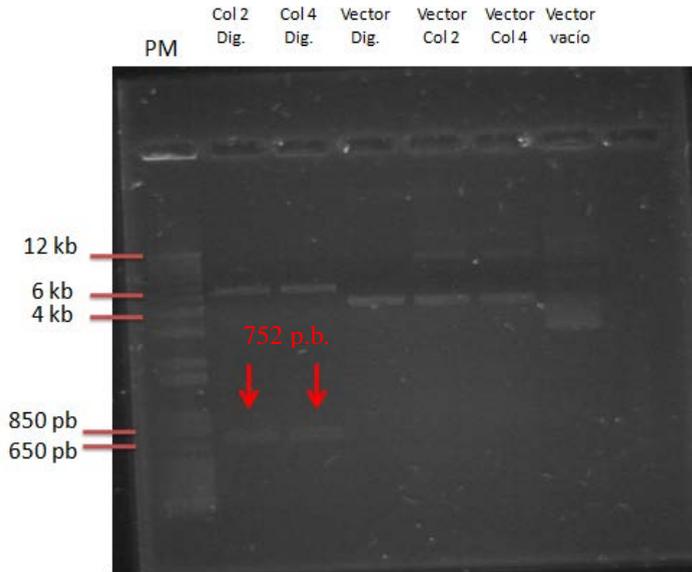


Figura 24. Ensayo de restricción para corroborar correcta orientación del inserto-promcldn6.

5.10 Funcionalidad del vector recombinante.

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad del promotor clonado, las células AGS se transfectaron de manera transitoria con el vector recombinante ptmetluc2-promcldn6 y con el vector pmetluc2 sin promotor y la actividad de luciferasa se midió a las 8, 12, 24 y 48 h.

En la figura 18 se observa que el vector recombinante tiene mayor actividad de luciferasa que el vector sin promotor, lo que demuestra que el promotor clonado es funcional e induce la transcripción de la enzima luciferasa en las células AGS.

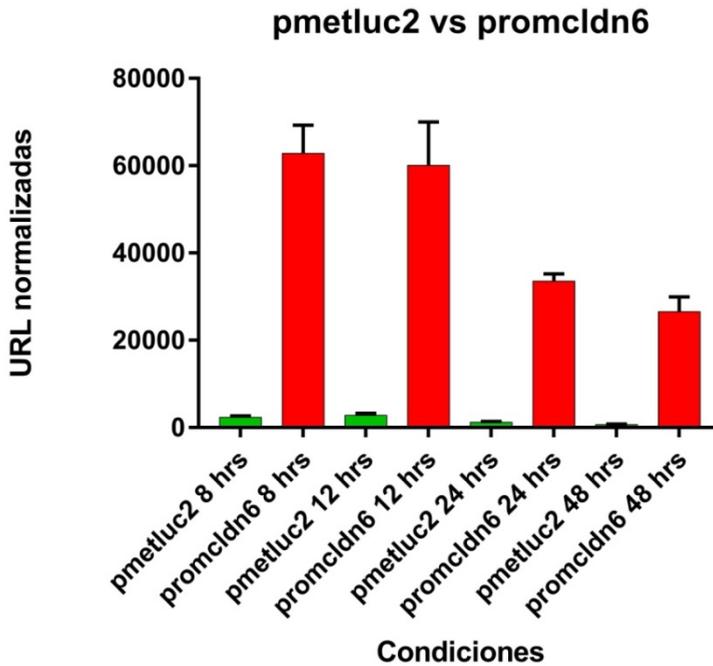


Figura 18. Funcionalidad del promotor de *cldn6* en el *pmetluc2* por ensayos de luciferasa. El vector recombinante que contiene al promotor de *cldn6* (*promcldn6*) tiene mayor actividad de luciferasa que el vector sin promotor a todos los tiempos evaluados. La medición se representa en unidades relativas de luciferasa por mg de proteína.

Posteriormente, se prosiguió a evaluar la función del promotor clonado como elemento de regulación transcripcional del gen *cldn6*. Para la evaluación se decidió utilizar el modelo de estimulación con LPS en las células AGS, en el cuál ya ha sido demostrado que la estimulación con 10ng/ml de LPS induce un aumento en los niveles de expresión de distintas claudinas, incluida la *cldn-6*. Como ya se explicó en la introducción, este modelo será de utilidad para la evaluación de la actividad transcripcional del promotor clonado.

En la figura 19 se muestran los resultados del ensayo de luciferasa para las células AGS transfectadas con el vector promcldn6. Estas células transfectadas fueron tratadas con LPS y la actividad de luciferasa se comparó con el basal de cada condición (AGS transfectadas sin tratamiento). Como se puede observar, a las 8 y 12 h después del tratamiento con LPS no hay diferencias significativas entre cada condición y su respectiva basal. A las 24 y 48 h después del tratamiento con LPS se observa un aumento significativo en la actividad de luciferasa respecto a la basal (** $P < 0.01$ y * $P = 0.01$).

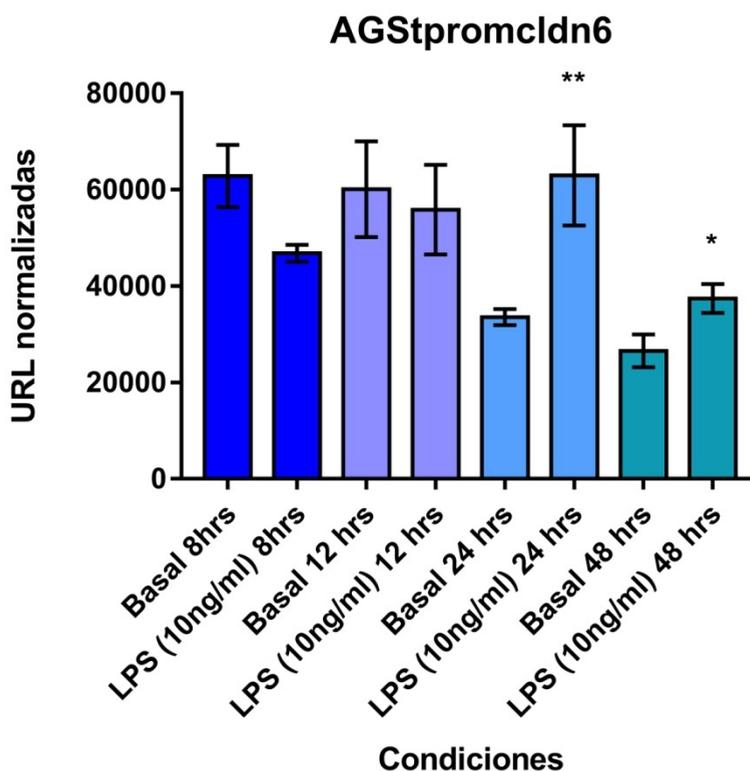


Figura 19. Funcionalidad del promotor de *cldn6* estimulando con LPS de *H. pilory*. La actividad de luciferasa aumenta a las 24 y 48 h después del tratamiento con LPS con respecto a la basal (* $P = 0.01$, ** $P < 0.01$). La medición es en unidades relativas de luciferasa por mg de proteína.

Del experimento anterior se realizó un duplicado (figura 20) y se observó el mismo comportamiento a las 24 h (* $P=0.02$); a las 48 h no se observaron diferencias significativas.

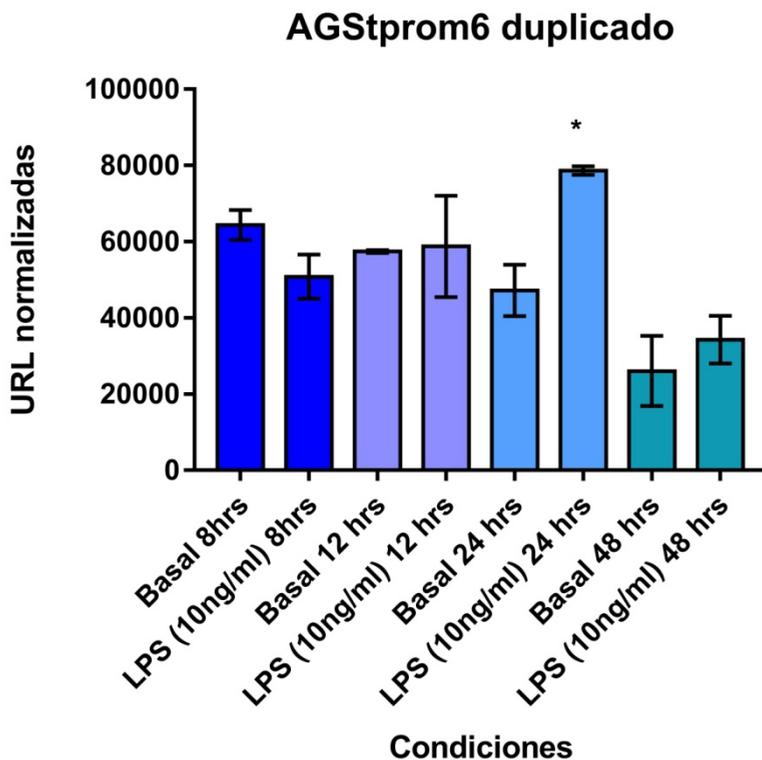


Figura 20. Ensayo de luciferasa para las células AGS transfectadas con el vector prom6 y estimuladas con 10ng/ml de LPS. La actividad de luciferasa aumenta con respecto a la basal (* $P=0.02$.) a las 24 h después del tratamiento con LPS. La medición es en unidades relativas de luciferasa normalizadas por mg de proteína.

Los datos de los resultados anteriores (figuras 19 y 20) se utilizaron para conocer el incremento de la actividad de luciferasa con respecto a la basal (*fold-change*). En la figura 21 se observa que existe un aumento con respecto a la basal a las 24 y 48 h. El incremento observado a las 24 h fue de

1.88 veces, el doble, mientras que el incremento a las 48 h fue de 1.41 veces.

En la figura 22 se observan los resultados para los datos del duplicado, en los cuales también se observa un aumento respecto a la basal a las 24 y 48 h. Se puede observar que el incremento a las 24 h fue de 1.45, mientras que el incremento a las 48 h fue de 1.3.

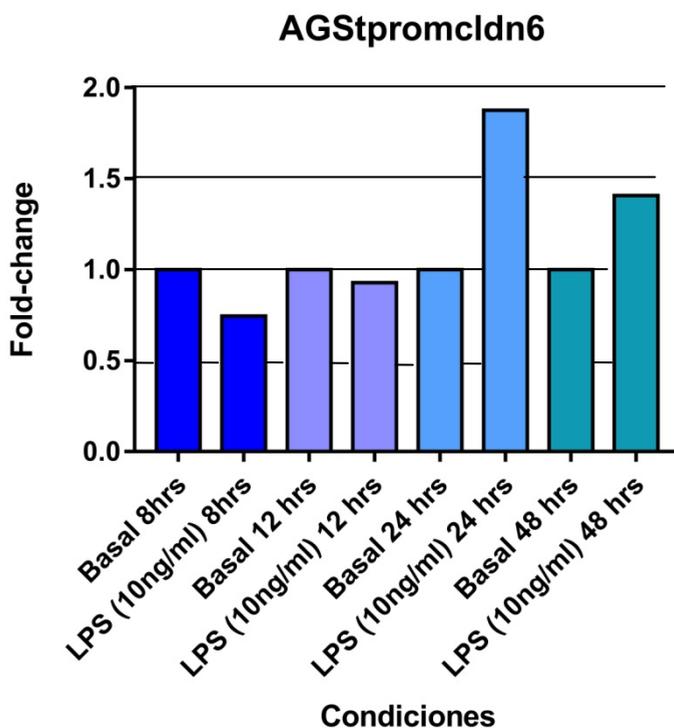


Figura 21. Incremento de la actividad de luciferasa con respecto a la basal (*fold-change*) en células AGS transfectadas con el vector promcln6. Se utilizaron datos normalizados por mg de proteína.

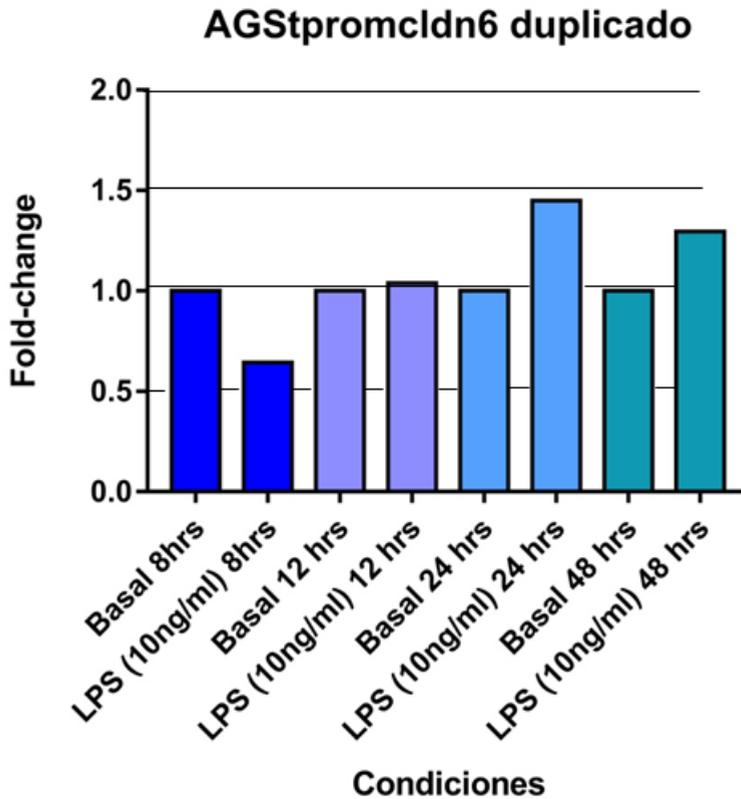


Figura 22. Incremento de la actividad de luciferasa con respecto a la basal (*fold-change*) en células AGS transfectadas con el vector promcln6 (duplicado). Se utilizaron datos normalizados por mg de proteína.

Con el fin de evaluar la especificidad del promotor clonado ante el tratamiento con LPS, se realizaron tratamientos con LPS en células AGS transfectadas con el vector pmetluc2 vacío. Esto se confirmó en los resultados mostrados en la figura 23. El duplicado del experimento tuvo el mismo comportamiento (datos no mostrados).

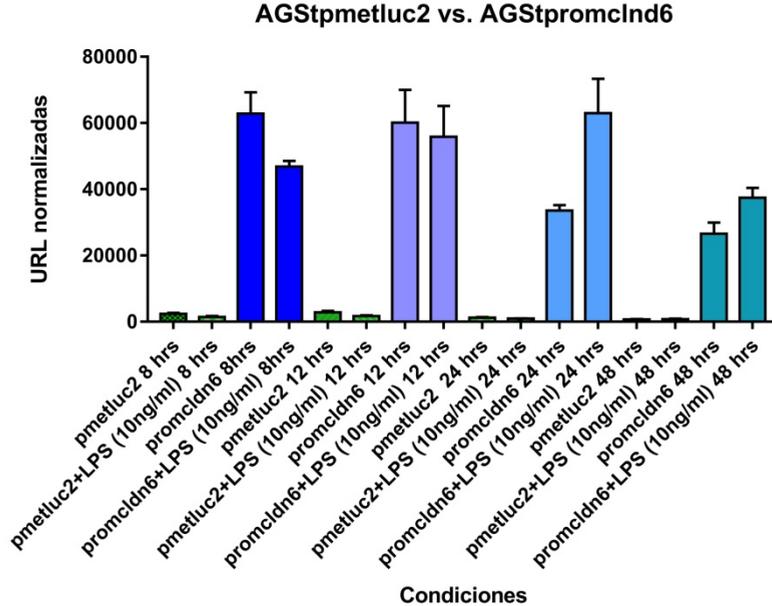


Figura 23. Actividad de luciferasa obtenida con el vector pmetluc2 vacío con respecto a la obtenida con el vector promclnd6 en células AGS estimuladas con 10ng/ml de LPS. La actividad de luciferasa aumenta con respecto a la basal (* $P=0.01$, ** $P<0.01$) a las 24 y 48 h después del tratamiento con LPS en las AGS transfectadas con el vector promclnd6. No hubo diferencias significativas en las AGS transfectadas con el vector pmetluc2 vacío. La medición es en unidades relativas de luciferasa normalizadas por mg de proteína.

Para conocer el comportamiento en la expresión de la luciferasa bajo un promotor constitutivo y así utilizarlo como control de la transfección transitoria, los tratamientos con LPS se realizaron en células AGS trasfectadas con el vector pmetluc2-control, el cuál es un vector que expresa constitutivamente la proteína luciferasa por acción del promotor del citomegalovirus humano. En la figura 24 se muestra que en las células AGS transfectadas con el vector pmetluc2-control, la expresión de la luciferasa tiende a disminuir conforme pasa el tiempo y no hay diferencias significativas entre las células tratadas con LPS y sus respectivos basales.

Estos resultados al igual que los observados en la figura 23 demuestran que el aumento observado en la actividad de la luciferasa es específico para el vector recombinante. El experimento realizado como duplicado mostró un comportamiento parecido (datos no mostrados).

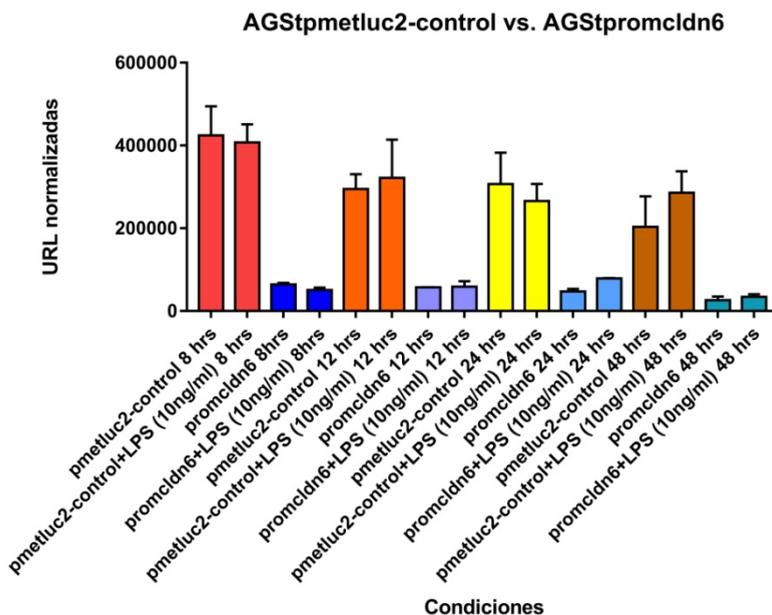


Figura 24. Ensayo de luciferasa para comparar la actividad entre el vector pmetluc2-control y el vector promcln6 en células AGS estimuladas con 10ng/ml de LPS. En la gráfica se observa que a las 24 h después del tratamiento con LPS, la actividad de luciferasa aumenta con respecto a la basal (* $P=0.02$) en las AGS transfectadas con el vector promcln6, mientras que no hubo diferencias significativas en las AGS transfectadas con el vector pmetluc2-control. La medición es en unidades relativas de luciferasa normalizadas por mg de proteína.

6 DISCUSIÓN

El proceso carcinogénico de distintos tipos de cáncer conlleva una serie de cambios tanto a nivel morfológico como a nivel molecular. Las claudinas son proteínas integrales de membrana cuyos patrones normales de expresión se encuentran alterados en distintos tipos de cáncer. En el cáncer gástrico, la expresión de claudina 6 y claudina 9 correlaciona con un mal pronóstico de los pacientes, sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de estas proteínas se desconocen.

Para estudiar la regulación transcripcional de estos genes se clonó y se analizó la región promotora con el fin de encontrar elementos putativos reguladores. Debido a que no existen estudios previos donde se haya investigado los elementos reguladores de estos genes, se decidió clonar una región promotora larga de aproximadamente 2500 p.b., con la finalidad de incluir la mayor cantidad de elementos reguladores. Con base en un estudio bioinformático,²⁶ se decidió clonar 2000 p.b. río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *cldn6*. La región promotora no puede medir más pares de bases debido a que en esa región se localiza el gen *TNFRSF12A* (proteína miembro de la superfamilia de receptores para el factor de necrosis tumoral 12A). En el caso del gen *cldn9*, se decidió clonar 2500 p.b. río arriba del sitio de inicio de la transcripción.

Una vez que se obtuvieron las secuencias de las regiones promotoras, se procedió a realizar la búsqueda de secuencias de promotores centrales (caja TATA, caja CAAT y caja GC). En la región promotora de *cldn6* se encontraron únicamente dos cajas GC mientras que en la región promotora de *cldn9* se encontraron dos cajas GC y dos cajas TATA. Las cajas TATA encontradas se localizan a más de 1500 p.b. de distancia del sitio de inicio de la transcripción, lo cual indica que solo se trata de una región con la secuencia consenso, puesto que ningún promotor central real se encuentra tan lejos del sitio de inicio de la transcripción. En el genoma humano es común la existencia de promotores que no contengan cajas TATA (el promotor central mejor estudiado), en vez de cajas TATA, la mayoría de estos promotores se encuentran regulados por islas CpG.²⁷ Con el programa

bioinformático EMBOSS CpG Island Searcher se encontraron dos probables islas CpG en la secuencia promotora de *cldn6*, mientras que en la secuencia promotora de *cldn9* no se encontró ninguna isla CpG. Las islas CpG son elementos de regulación que normalmente se encuentran desmetilados, lo cual los vuelve sitios accesibles para la maquinaria de transcripción. La presencia de islas CpG y de cajas GC en el promotor de *cldn6* sugiere que probablemente la transcripción de este gen sea regulada por el grado de metilación del ADN, como sucede en el caso de *cldn3* y *cldn4* en cáncer de ovario.^{23,24} La metilación del ADN está asociada a la represión de la transcripción.

Las células AGS tienen una expresión basal de claudina 6 y claudina 9 baja en comparación con otras claudinas, como claudina 1.¹² Sería muy interesante investigar si las islas CpG de *cldn6* presentan patrones de metilación que correlacionen con la expresión basal baja de la proteína. También sería muy interesante obtener cultivos primarios de cáncer gástrico con expresión de claudina 6 para poder comparar los patrones de metilación de las islas CpG contra los de cultivos primarios de células de epitelio gástrico sanas. Lo que probablemente se encontraría sería que en las células de tejido gástrico sano, las islas CpG de *cldn6* se encuentren metiladas, lo cual inhibiría su expresión y así corresponder con la ausencia de esta claudina en el epitelio gástrico; mientras que en los cultivos primarios de cáncer gástrico con expresión de claudina 6, se esperaría que las islas CpG se encontraran desmetiladas, lo cual estaría promoviendo su transcripción y su expresión anormal en este tejido.

La secuencia promotora de *cldn9* tiene dos cajas GC y no tiene ninguna isla CpG, lo cual sugiere que su regulación transcripcional puede ocurrir mediante el factor de transcripción Sp-1. Sp-1 promueve la transcripción de promotores con una o más cajas GC.²⁸ La ausencia de islas CpG no descarta la posibilidad de que *cldn9* pueda ser regulado por el grado de metilación del ADN, ya que las cajas GC pueden ser metiladas y los dinucleótidos CpG alrededor de éstas también pueden ser metilados.

En este proyecto de tesis se clonó la región promotora del gen *cldn6* en un vector acoplado a la proteína luciferasa con el objetivo de crear una herramienta para estudiar la dinámica de transcripción de este gen, sin embargo esto no se consiguió para el promotor de *cldn9*. En la literatura no hay trabajos donde se analice la regulación transcripcional de *cldn9* ni tampoco hay trabajos donde se haya clonado la región promotora. A pesar de que las funciones de claudina 6 y de claudina 9 no se encuentran completamente descritas, parece haber un mayor interés en el estudio de claudina 6 debido a que recientemente algunos grupos de investigación han propuesto esta proteína como marcador de células troncales en humanos y en ratones.^{29,30} Como consecuencia, el estudio de claudina 9 a nivel de proteína y a nivel de gen se dificulta debido a que no existen referencias en las cuales consultar metodologías y resultados. En este proyecto la principal dificultad para la clonación de la región promotora de *cldn9* fue metodológica. El proceso de digestión del inserto promcldn9 implicó una purificación más (a comparación del inserto promcldn6) por el método de fenol/cloroformo, la cual contribuyó a la disminución en la calidad y cantidad del inserto con la consecuente disminución en la eficiencia de la reacción de ligación.

Una vez probada la funcionalidad del vector recombinante, se procedió a comprobar que la secuencia clonada correspondiera al promotor de *cldn6*, en otras palabras, que ésta contenga elementos reguladores de la transcripción específicos para el gen de *cldn6*. Para evaluar esta situación, se utilizó el modelo de estimulación de células AGS con LPS de *H. pylori*, en el cual la vía de señalización promueve un aumento en los niveles de expresión de claudina 6 (al igual que de claudina 9). En el artículo de Chavarría-Velásquez et al, el aumento en la expresión de claudina 6 y claudina 9 ocurre a las 8 h de la estimulación y se mantiene hasta las 48 h.²⁵ En los ensayos de luciferasa se observa un desfase temporal debido al tiempo que le toma a la luciferasa ser secretada de la célula. A pesar del desfase temporal, es muy clara la tendencia de aumento de la actividad de luciferasa, contrario a la tendencia de disminución de los basales. La disminución observada en estos tiempos puede deberse a que la luciferasa

secretada comienza a degradarse en el medio exterior. Un resultado que demuestra que esta disminución es normal y no influye en la interpretación de los datos puede observarse en la figura 24, en donde las células AGS transfectadas con el vector pmetluc2-control (el cual transcribe constitutivamente la luciferasa) tiene el mismo patrón de disminución. Por otra parte, el aumento observado a las 24 h es específico del vector recombinante, ya que, en las células AGS transfectadas con el vector pmetluc2 vacío y el vector pmetluc2-control (figuras 23 y 24), no se observaron diferencias significativas en la actividad relativa de la luciferasa entre las células estimuladas con LPS y sus respectivos basales.

Es importante mencionar que la actividad relativa de luciferasa observada en los basales de las células AGS transfectadas con el vector recombinante, no refleja la cantidad total de claudina 6 en la célula, es decir, los valores altos no correlacionan necesariamente con grandes cantidades de claudina 6 (no son equivalentes los resultados de un Western-blot con los de un ensayo de luciferasa). La principal razón de que esto suceda es que para la transfección transitoria se utilizó una cantidad alta de vector recombinante, la cual se refleja en niveles altos de actividad relativa de luciferasa. Por otro lado, si se quisiera conocer la actividad transcripcional basal real de *cldn6*, lo más conveniente sería utilizar células con transfección estable y medir la actividad de la luciferasa a distintos tiempos sin estímulos externos (incluyendo el suero bovino fetal del medio de cultivo). Es importante mencionar que algunas de las diferencias encontradas entre los basales y las condiciones experimentales, por ejemplo en el tiempo de 8 h en la figura 19, se deben a diferencias en la eficiencia de transfección entre los pozos. Sin embargo, la normalización por extracción y cuantificación de proteína total permite que los valores de la actividad relativa de la luciferasa puedan compararse.

Los elementos reguladores de la transcripción son estímulo-específicos, por lo que lo más probable es que la región promotora mínima en el modelo de estimulación de células AGS con LPS de *H. pylori*, no sea la misma región en otro modelo. La ventaja del uso de vectores reporteros es que se pueden utilizar con cualquier modelo de trabajo, así la regulación

transcripcional de *cldn6* puede ser estudiada bajo diversos estímulos y en distintas condiciones. Otra metodología común en el estudio de la regulación transcripcional de los genes es el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP por sus siglas en inglés). Esta metodología se utiliza cuando en el modelo de estudio se conoce la vía de señalización encargada de la regulación transcripcional del gen, los factores de transcripción putativos involucrados y los probables sitios de unión de éstos en el promotor del gen. El fundamento consiste en precipitar la cromatina con un anticuerpo dirigido al factor de transcripción de interés, para posteriormente amplificar por PCR el probable sitio de unión del factor de transcripción en el promotor. Para el estudio de la regulación transcripcional de *cldn6* y *clnd9*, la clonación de la región promotora en un vector reportero es la mejor opción, ya que con esta metodología se pueden empezar a describir de manera general los distintos elementos reguladores de la transcripción. La información obtenida de los ensayos de luciferasa posteriormente será la base para metodologías más específicas como el ensayo de ChIP.

Con los resultados de los ensayos de luciferasa queda demostrado que el vector recombinante pmetluc2-promcldn6 es funcional y puede ser utilizado para estudiar la regulación transcripcional del gen *cldn6*.

7 CONCLUSIÓN

El estudio de la regulación transcripcional de las claudinas en los distintos tipos de cáncer, sobre todo en cáncer gástrico, es importante para entender los procesos moleculares que desencadenan la expresión aberrante de estas proteínas junto con su consecuente aportación al fenotipo cancerígeno. Los resultados obtenidos en este trabajo, generaron un vector recombinante, el pmetluc2-promcldn6, el cual es funcional y contiene los elementos reguladores necesarios de la región promotora para el estudio de los mecanismos que controlan la transcripción de este gen. En la figura 25 se muestra un resumen del trabajo realizado.

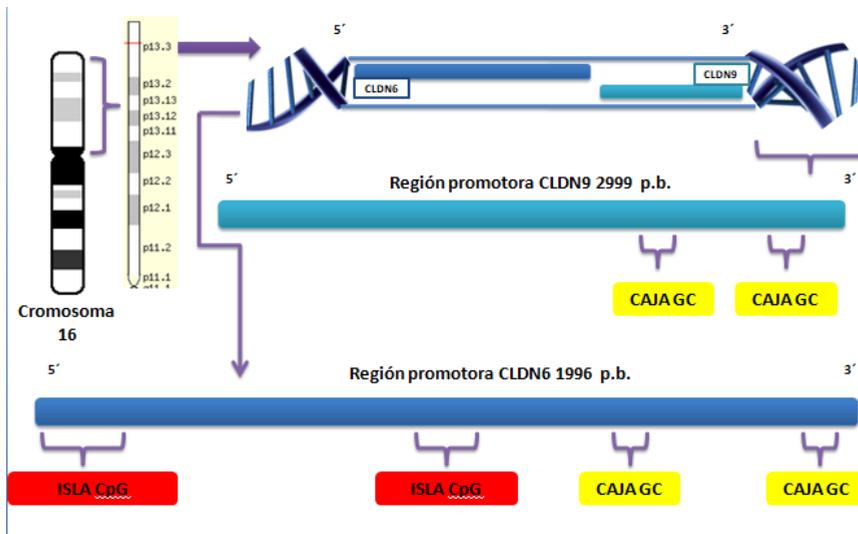


Figura 25. Esquema de los elementos reguladores en *-cis* presentes en la región promotora de *cldn6* y *cldn9*.

8 PERSPECTIVAS

El primer paso a seguir para continuar con el estudio de la regulación transcripcional de *cldn6* es crear vectores con deleciones progresivas del promotor para encontrar la región promotora mínima necesaria que regule la expresión de esta proteína. En las deleciones progresivas se deben tomar en cuenta los elementos de regulación transcripcional encontrados, como las dos islas CpG, para no interrumpirlas y por ende interferir con su actividad reguladora. En el anexo 1 se muestran los *primers* diseñados para dos deleciones progresivas en el promotor de *cldn6* y *cldn9*, las cuales separan los distintos elementos putativos de regulación.

Después de que se identifique la región promotora mínima encargada de la regulación transcripcional de *cldn6*, se puede realizar un análisis bioinformático para buscar en esa secuencia sitios de unión a factores de transcripción. Dicho análisis será la base para realizar experimentos de

ChIP, en los cuáles se buscará el factor de transcripción encargado de la regulación transcripcional de *cldn6* bajo el modelo de estudio elegido.

Por otra parte, el vector pmetluc2-promcldn6 también puede ser utilizado para estudiar los efectos que tienen las metilaciones o desmetilaciones en la transcripción de *cldn6*.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Globocan 2012 - Home. Available at: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. (Accessed: 21st February 2018)
2. Carcas, L. P. Gastric cancer review. *J. Carcinog.* **13**, 14 (2014).
3. Correa, P. & Piazuelo, M. B. Helicobacter pylori Infection and Gastric Adenocarcinoma. *US Gastroenterol. Hepatol. Rev.* **7**, 59–64 (2011).
4. Lauren, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* (1965). doi:10.1002/1097-0142(197706)39:6<2475::AID-CNCR2820390626>3.0.CO;2-L
5. Bosman, F. T., World Health Organization. & International Agency for Research on Cancer. *WHO classification of tumours of the digestive system*. (International Agency for Research on Cancer, 2010).
6. Hu, B. *et al.* Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J. Gastrointest. Oncol.* **3**, 251–61 (2012).
7. Correa, P. & Piazuelo, M. B. The gastric precancerous cascade. doi:10.1111/j.1751-2980.2011.00550.x
8. Wroblewski, L. E., Peek, R. M. & Wilson, K. T. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 713–739 (2010).
9. Oliveira, C., Seruca, R. & Carneiro, F. Genetics, Pathology, and Clinics of Familial Gastric Cancer. *Int. J. Surg. Pathol.* **14**, 21–

- 33 (2006).
10. Iravani, O., Tay, B. W.-R., Chua, P.-J., Yip, G. W.-C. & Bay, B.-H. Claudins and gastric carcinogenesis. *Exp. Biol. Med.* **238**, 344–349 (2013).
 11. Rendón-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).
 12. Zavala-Zendejas, V. E. *et al.* Claudin-6, 7, or 9 Overexpression in the Human Gastric Adenocarcinoma Cell Line AGS Increases Its Invasiveness, Migration, and Proliferation Rate. *Cancer Invest.* **29**, 1–11 (2011).
 13. Zihni, C., Mills, C., Matter, K. & Balda, M. S. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 564–580 (2016).
 14. Günzel, D. & Yu, A. S. L. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiol. Rev.* **93**, 525–569 (2013).
 15. Szaszi, K. & Amoozadeh, Y. New Insights into Functions, Regulation, and Pathological Roles of Tight Junctions in Kidney Tubular Epithelium. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **308**, 205–271 (2014).
 16. 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. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R1713–R1719 (2008).
 17. Nakano, Y. *et al.* A Claudin-9–Based Ion Permeability Barrier Is Essential for Hearing. *PLoS Genet.* **5**, e1000610 (2009).
 18. Zheng, A. *et al.* Claudin-6 and Claudin-9 Function as Additional Coreceptors for Hepatitis C Virus. *J. Virol.* **81**, 12465–12471 (2007).
 19. Kwon, M. J. Emerging roles of claudins in human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 18148–80 (2013).
 20. Maston, G. A., Evans, S. K. & Green, M. R. Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **7**, 29–59 (2006).
 21. Pabo, C. O. & Sauer, R. T. Transcription Factors: Structural Families and Principles of DNA Recognition. *Annu. Rev.*

- Biochem.* **61**, 1053–1095 (1992).
22. Khan, N. & Asif, A. R. Transcriptional regulators of claudins in epithelial tight junctions. *Mediators Inflamm.* **2015**, 219843 (2015).
 23. Honda, H., Pazin, M. J., D'Souza, T., Ji, H. & Morin, P. J. Regulation of the CLDN3 gene in ovarian cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 1733–42 (2007).
 24. Honda, H., Pazin, M. J., Ji, H., Wernyj, R. P. & Morin, P. J. Crucial roles of Sp1 and epigenetic modifications in the regulation of the CLDN4 promoter in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 21433–44 (2006).
 25. Chavarría-Velázquez, C. O., Torres-Martínez, A. C., Montaña, L. F. & Rendón-Huerta, E. P. TLR2 activation induced by *H. pylori* LPS promotes the differential expression of claudin-4, -6, -7 and -9 via either STAT3 and ERK1/2 in AGS cells. *Immunobiology* **223**, 38–48 (2018).
 26. Lin, D. *et al.* Bioinformatic analysis reveals potential properties of human Claudin-6 regulation and functions. *Oncol. Rep.* **38**, 875–885 (2017).
 27. Smale, S. T. & Kadonaga, J. T. The RNA Polymerase II Core Promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 449–479 (2003).
 28. Kadonaga, J. T., Jones, K. A. & Tjian, R. Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 20–23 (1986).
 29. Wang, L. *et al.* Claudin 6: a novel surface marker for characterizing mouse pluripotent stem cells. *Cell Res.* **22**, 1082–1085 (2012).
 30. Ben-David, U., Nudel, N. & Benvenisty, N. Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **4**, 1992 (2013).

Primer pair 2

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCCACTACAGTTTGTAAAGG	Plus	22	684	705	59.51	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	AATTCCTAGGCCGAGTGTCG	Minus	20	1996	1977	59.54	55.00	6.00	3.00
Product length	1313								

Figura 25. Características del par de primers diseñados para la primera deleción.

SEGUNDA DELECIÓN 665 pb

Primer forward 5' **GTAATCCCAGCGCAGTGC**

Primer reverse 3' **AATTCCTAGGCCGAGTGTCG**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTAATCCCAGCGCAGTGC	Plus	18	1332	1349	58.90	61.11	5.00	5.00
Reverse primer	AATTCCTAGGCCGAGTGTCG	Minus	20	1996	1977	59.54	55.00	6.00	3.00
Product length	665								

Figura 26. Características del par de primers para la segunda deleción.

PROMOTOR DE CLDN9 2.3KB RÍO ARRIBA DEL SITIO INICIO TRANSCRIPCIÓN

CTGAGCCCAGGGGCTGGGTGAGCTGGACAAACCTGC**CACAAGATTCCTGAGTCCACTG**ATGGCCATTTTCCAGC
CTCTGTATCACCCCCCACTTCCAGACTCTGTGGGGCCACCAGGTCAGCCCCCTCGTACC GGAGGAGCCCCCT
CAGTGGAGAGGCCAGGGGGTGGTGAAGAGGAGGCCAGGCTTCTGTTTACCTTACAGACCAGCTGATTGGCGCTGG
CCTGTCTCTGTGTTTGCAGGGGAGGATCTTAAGCTGTTTGGGTCAAGGCCCTTGC AAAATCTGAAGAAAGTAT
AAATCTCTTCCAAAAGTATCATTTTTTTTTAAGAGACAGGGTCTCACCTAGGATGGAGTGGGTGGCATAATCAT
AGCTCACTGCAGACTCTAACTCCTAGGCTCAAGAGATCCTCCTACCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGAC
AGGAACCACCTAACTCAGCTAATTTTTGTGTATATATATATATATATATTTTTTTTTTATTTTAGAAATGGGGTCT
CACTGTGTGCCCAGGTGGGTCTCAAGCTCCTGGCCTTAAGCAATCCTCCACCTTGCCCTCTTAAGCGCTGGGAT
TACAGGCGTGAGCCTCAGTGCCCGACCCAAAAGATGCTAAAACCCTTTCGCAGAAGCGATGCTCATACCCCTAGG
TTTGAACCTGACCGCTCCTTGAGGTTAGAGCCCTTTATACACAATGTCCACCCACTAGGTGAGGGGCAC TGAGC
AGGGGTGTGCCTGGCCACTGGCTCCCGAAGGCAATGCCGTGAAGTGGTGACGCCACCAGATGTGTGTGGTGGGCA
CCTCCAGCCTGCCCCCACTGGCCAGTGGGCTCCAGCACACCCAGCCTCCAGCACCCAGGAGGTGAGAGGCAG
TCCCAGGTGAGGGCCACTCTGAGGATCCTCTGTGA**CTCCCTGGAAAGTGTATGAATGG**AGACAATGTTCTCACA
TCCCTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGAGACAGAGTCTCCCACTGTCAACCAGGCTGGAATGCAGTGGTGC
GATCTCGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCGGTTCAAGCGATTCTTCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTAC
AGGACCCGCCACCGCCAGTCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGGATCTCTCTGTCAGCAGGCTGGAG
TGGAGTGGAGTGGTACGATCTTGGCTCACTGCAACCTCTACCTCCCGTTTCAAGTGATCTCTTGCCTCAGCCTC
CAGAGTGGCGAGTGGCTGGGACTAGAGGCTTGTGCCACCACGCCAGTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGG
GTTTACCATGTTGGCCAGGATGGTCTCGATCTCTTAACCTTCCGATTACCTGCTTCCGGCTCCCAAAGTGTCTGG
GATATCTAATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGTTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAATCCTGATC
CGTGAATCGCCCACTTGGCCCTCCAAAAGTGTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCAGCTGGCCGTACACCCCT
TTTTCAGACAACAATCCTCAGAGTCTTAGCACCCAGGCAGGGGCTTGAAGGAGTTCATGAACCTCCCCACAA
ATGAGGGGCACATGTTTGTGGTGCATGTTCTGTGAGTCCCACGGGGTTTCTCAAGTGGGTCTTTGACCAAAGGAG
GTTAAGACCTGCACCTCCATGACCTGTCCAGGTAGGGGTCAGGATTTGAGCTTTGGTTCAGTGGGATCCCAGG
CTGTCCCATGAGTGGAAATCACAGGCTTGAGGGGTTTTCGGAGGTAAGGCTTTCTGCAAACTGGAAGGCAG
GTCTTGGGACACTTGAGTCCCTGGACTTAACCCCGTGGCCACTCTGGGGTGTTTTGGCCGGGAGGCCTGACT

GGCCACTCACTCACCCACCCATGGAACATAAACCGGGTCTGGGCTGTGCCACCCTGGGTTCCAGCCCCAGCCCG
TCCCGCCTCCATCCCCCTTCCTGAGTGC CCCCCAACCTCCACAACAGGCCCTCATCTCTGGCCTCTGGAGATCT
TAGGCAGCTCAGCTCAGCTCGGTTTCAGCAGCAGGGGTGGCAAGAGCGCACCTGAGCTGAGGTTGAAGTGGGGG
TAGTTTTCTAGGCCGTTGCCAGGGCGATGCCACCTGAGCTGGGCGCCAGGCACCTGTCGTCTGGGGAACAGTGCAG
GCCGGGACCTTCCCCGGGAGCTA CCGGGCCACTGGGCTGAGACGGGGGATGGATCAGATTCCAGAGAGTCCCAG
GC GGGCGG GAGTGTGCGATACTCGGGGAGCTGGGGCATGTTTGCATCACGAAACTCGGCTGGGGGAGAGCAGAGGC
AGCTGGGAGGGGCTGCGGAAGGAGGCTCAGGAAGCAAGCCGACGCCCCCTGTGTGTGTTTCTGTCTGAGC
CTGTTACTTTTTTTGACCCCCGATCCGTCTCTTCTTCTCCTCAGCTTGTCTCCATCTTCCCCCTCCTTTACCCCTGGTT
CCCACATGCACAGATGCTACGGACGCTTTTCTCCCCCTGTCCCACCTCAGCCGAGCATCCCCCGCTGGCCCCCAG
GCCCTCATCCATCCGCTGCCACGAAACCCCCAGCCCCGACCCCTCCCCGTGGCTCAGGTCCTCCCCATCCCCGGCC
TCCCTGCACTTCACTCTGTCTCTCCCCCTGCTGGGCTTAAACCCCGCTGCAGCCGAGAGCCCGCAGAGTCCCC
AGTGGCACTGTGAGAGTGTGCTCAGTGGAACTGCGCCAGCCGCGAGGAGAGCTGGTGTCTCAGCTGGCAGT
GCGTCTGGAGGGCTGTGTGAGCTCAGCCAGTGTGACAGCGGGGTGGTAAGAGCAGCAGCACCCCTCAGGGCATC
CGATGGGCGGAGGCCCTCGAGGTGACACCCACCCTCAGCCGAGCGGGACTACGAGTCTGCTTTGTGCTCCCGCA
GGACCAGAACACCTGCAAGAGGCAGGAGAGGCGCCTTCAAGAGGCGCTTTCATGGAACCTGAGGACTGCG
CTGGCTTGGGGACACCAACAAGCCTTCCCCCTCTGTGAGACAGAGACACCCACCCAGCACACCAGACACACC
TCTGAGTCACCTAGGCCGCTGGGGCTGAGAAGACCTAACCGAGGGGCCAGATG

- El indica los *primers* propuestos.
- El indica las cajas GC.
- El indica el sitio de inicio de la transcripción.
- El indica el sitio de inicio de la traducción.

PRIMERA DELECIÓN 2089 pb

Primer forward 5' CCTCCCTGGAAAGTGTATGAATGG

Primer reverse 3' CTACGAGTCTGCTTTGTGCTCC

Primer pair 5

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTCCCTGGAAAGTGTATGAATGG	Plus	24	911	934	60.93	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	GGAGCACAAAGCAGACTCGTAG	Minus	22	2999	2978	61.24	54.55	3.00	2.00
Product length	2089								

SEGUNDA DELECIÓN 976 pb

Primer forward 5' CCATCCCCCTTCCTGAGTGC

Primer reverse 3' CTACGAGTCTGCTTTGTGCTCC

Primer pair 14

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCATCCCCCTTCCTGAGTGC	Plus	20	2024	2043	62.28	65.00	3.00	2.00
Reverse primer	GGAGCACAAAGCAGACTCGTAG	Minus	22	2999	2978	61.24	54.55	3.00	2.00
Product length	976								