



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y  
NEUROCIENCIAS.

**Papel de la acetilación de STAT3 en la modulación  
de la expresión de claudinas en respuesta al EGF.**

TESIS

Que presenta

**Q.F.I. JESSICA PAULINA CAMPOS BLÁZQUEZ**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE**

**FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Director de la tesis: Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño

Ciudad de México

Agosto, 2016

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), en el laboratorio 3 de Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional.

# Agradecimientos

*A mis papás Lorena y Luis, por haberme enseñado, con el ejemplo, el valor del trabajo, la perseverancia y la constancia para alcanzar mis metas. Y a mi hermano Luis, que siempre ha sido mi mayor ejemplo a seguir. Gracias por brindarme su apoyo, su amor y acompañarme durante cada paso de este camino. Es gracias a ustedes que he logrado llegar a donde estoy y estaré siempre agradecida con la vida por tener una familia tan increíble como ustedes. Esta tesis es de ustedes.*

*Al Dr. Gerardo Contreras por guiarme durante la elaboración de esta tesis. Por formarme intelectualmente, y sobre todo gracias por sus valiosos consejos sobre el mundo de la investigación.*

*A mis compañeros de laboratorio. A la Dra. Catalina Flores por su apoyo incondicional, por todo lo que me ha enseñado y porque ha sido una parte valiosa y esencial en mi camino a la investigación. A Odette por su ayuda constante y sus consejos, gracias por siempre estar dispuesta a apoyarme. Y a nuestro técnico Lalito.*

*A Iván, por su amor, ayuda y compañía durante este tiempo, gracias por escucharme, aconsejarme, regañarme y nunca dejarme sola en los días largos de trabajo. Por haber estado para mí en cada momento, gracias por ser esa persona con quien puedo acudir para festejar los logros y hablar sobre los malos ratos.*

*Este trabajo fue realizado con el apoyo de una Beca del CONACyT*

# Índice

---

<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>II</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>Tejido epitelial</b>	<b>1</b>
<b>Unión estrecha</b>	<b>2</b>
<b>Claudinas</b>	<b>5</b>
<b>Regulación transcripcional de claudinas.</b>	<b>9</b>
<b>Factor de crecimiento epidérmico y la modulación de las uniones estrechas</b>	<b>10</b>
<b>STAT3</b>	<b>12</b>
<b>Acetilación.</b>	<b>16</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>19</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>33</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>38</b>

# Índice de figuras

---

<b>Figura 1. Características de las células epiteliales.</b>	<b>2</b>
<b>Figura 2. Unión estrecha vista al microscopio electrónico de transmisión.</b>	<b>3</b>
<b>Figura 3. Proteínas de la unión estrecha.</b>	<b>4</b>
<b>Figura 4. Modelo de las claudinas.</b>	<b>6</b>
<b>Figura 5. Estructura cristalizada de la claudina-15.</b>	<b>7</b>
<b>Figura 6. Expresión de las claudinas a lo largo de la nefrona.</b>	<b>8</b>
<b>Figura 7. La neutralización de hEGF inhibe el incremento de la RET por liofilizados de orina.</b>	<b>11</b>
<b>Figura 8. Los liofilizados de orina (hDLU) y el EGF humano (hEGF) modifican la localización de las claudinas-2 y -4 en la unión estrecha.</b>	<b>12</b>
<b>Figura 9. El EGF disminuye el nivel de la proteína y el RNAm de la claudina-2 a través de STAT3.</b>	<b>13</b>
<b>Figura 10. El EGF induce el aumento de la proteína y el ARNm de la claudina-4 a través de Src y STAT3.</b>	<b>14</b>
<b>Figura 11. Proteínas STAT3<math>\alpha</math> y STAT3<math>\beta</math>.</b>	<b>15</b>
<b>Figura 12. Proceso de regulación de la unión estrecha por EGF y STAT3 en las células MDCK.</b>	<b>16</b>
<b>Figura 13. La inhibición de las desacetilasas induce una respuesta similar a la del EGF.</b>	<b>20</b>

<b><u>Figura 14. La inhibición de las desacetilasas induce una disminución del contenido celular y ARN mensajero de claudina-2, mucho mayor e independiente al inducido por EGF.</u></b>	<b>21</b>
<b><u>Figura 15. La inhibición de las desacetilasas induce una disminución del contenido celular y ARN mensajero de claudina-4 y previene el aumento inducido por EGF.</u></b>	<b>22</b>
<b><u>Figura 16. STAT3 se acetila en presencia de TSA.</u></b>	<b>23</b>
<b><u>Figura 17. STAT3 se desacetila después de 1 hora de exposición con EGF y se acetila entre las 15 y 20 horas de exposición.</u></b>	<b>25</b>
<b><u>Figura 18. STAT3 se acetila después de 15 horas exposición a EGF.</u></b>	<b>26</b>
<b><u>Figura 19. La RET no se modifica por la inhibición de HDAC6.</u></b>	<b>28</b>
<b><u>Figura 20. La inhibición de HDAC6 por sí sola aumenta en la cantidad de claudina-2, pero no de su mensajero.</u></b>	<b>29</b>
<b><u>Figura 21. La inhibición de HDAC6 por sí sola aumenta en la cantidad de claudina-4 que hace con EGF, mientras que su mensajero no se ve afectado.</u></b>	<b>29</b>
<b><u>Figura 22. Modelo de regulación del sellado de la unión estrecha por la acetilación de STAT3.</u></b>	<b>31</b>

# Resumen

---

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) induce un aumento de la expresión de claudina-4 y disminución de la expresión de claudina-2 a través de la activación del factor de transcripción STAT3, esto se ve reflejado en un aumento de la resistencia eléctrica transepitelial. En esta tesis se investigó qué papel tiene la acetilación de la lisina 685 de STAT3 en este proceso y se demostró en la cinética de acetilación, que una disminución de ésta, se corresponde con el aumento del ARN mensajero de claudina-4, lo que sugiere que el EGF desacetila a STAT3 para promover la expresión de dicha claudina. Un aumento de la acetilación a tiempos tardío, sugiere que la acetilación es necesaria para inactivar a STAT3. Además, un incremento de la acetilación de los microtúbulos aumenta la vida media de las claudinas, lo que sugiere la asociación entre el citoesqueleto de tubulina y la unión estrecha para estabilizar a las proteínas a la membrana. Estos resultados demuestran que la acetilación regula a las claudinas mediante distintos mecanismos.



# Abstract

---

EGF induces up-regulation of claudin-4 and down-regulation of claudin-2 through activation of the transcription factor STAT3, this is reflected in an increase of the transepithelial electrical resistance. In this thesis, it was investigated the role of the acetylation at lysine 685 in STAT3. We demonstrated that EGF induces deacetylation of STAT3 one hour after incubation, which precedes the increase of claudin-4 RNA Messenger. These results suggest that EGF induces the deacetylation of STAT3 to promote claudin-4 expression. Further increase acetylation at late times suggests that this acetylation is necessary to inactivate STAT3. Furthermore, an augment in microtubule acetylation increases the half-life of claudins, suggesting the association between tubulin cytoskeleton and tight junction to stabilize these proteins. These results show that acetylation regulates claudins through several mechanism

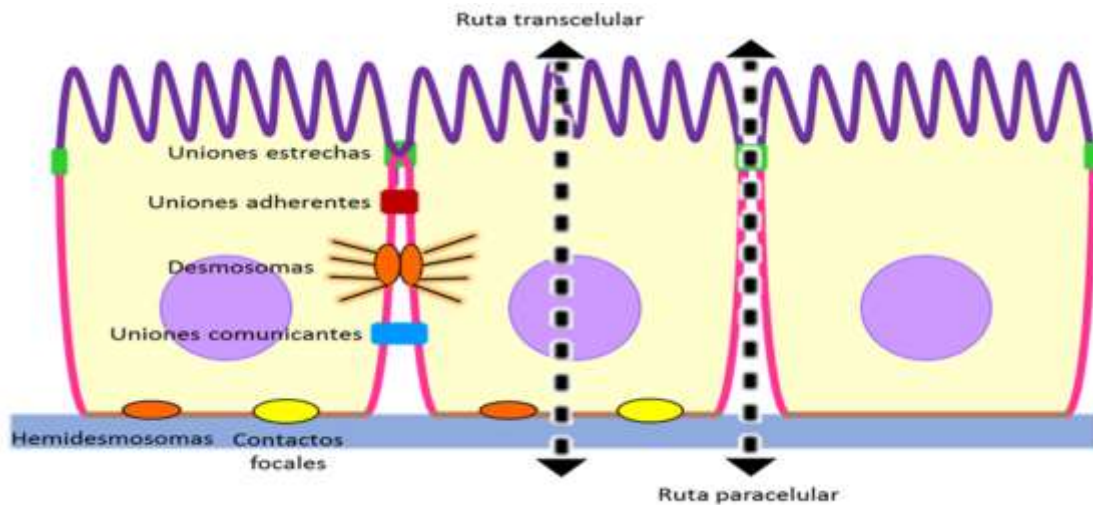


# Introducción

---

## Tejido epitelial

Los epitelios delimitan las superficies externas e internas de los metazoarios y constituyen la frontera de interacción de estos organismos con el ambiente. Estos tejidos impiden la difusión libre de sustancias entre los compartimentos biológicos que separan, también generan y mantienen las diferencias en composición de los fluidos que llenan dichos compartimentos, transportando vectorialmente a los iones y sustancias. Los epitelios se forman de una o varias capas de células epiteliales. Dichas células tienen dos propiedades fundamentales: 1) están **polarizadas**, es decir, su membrana plasmática está dividida en un dominio apical que se orienta hacia el medio externo, otro lateral que contacta a las células vecinas y otro basal que contacta a la matriz extracelular (Koefoed-Johnsen y Ussing 1958; Cereijido et al. 2004), y 2) se adhieren entre sí por medio de **uniones estrechas** que sellan el espacio intercelular (Farquhar y Palade 1963; Cereijido y Anderson, 2001) (Figura 1). El transporte vectorial transepitelial de sustancias se lleva a cabo a través de dos rutas: la *transcelular*, en la que las sustancias atraviesan la membrana plasmática usando bombas, transportadores y/o canales (Koefoed-Johnsen y Ussing 1985; Cereijido y Anderson 2001; Kapus y Szászi 2006) y la *paracelular*, en la que las moléculas pasan por los espacios intercelulares a través de la unión estrecha (Frömter y Diamond 1972; Cereijido et al. 1993). Los epitelios ajustan la selectividad y permeabilidad paracelular modificando la longitud, nanoestructura y composición molecular de la unión estrecha.

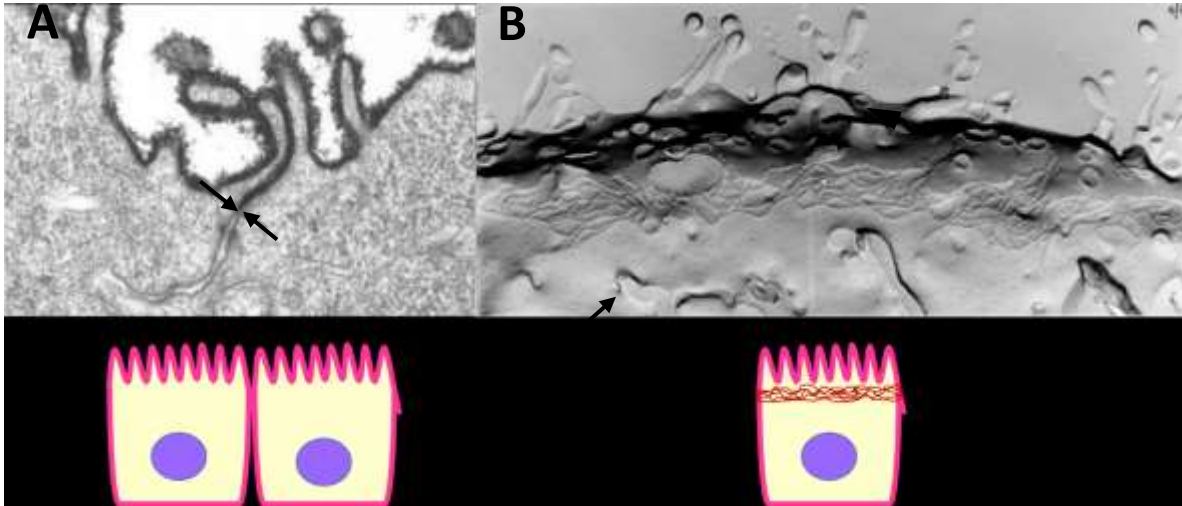


**Figura 1. Características de las células epiteliales.** Ya sean epitelios simples o de varias capas, siempre hay una capa de células epiteliales polarizadas, con los dominios apical (línea morada), lateral (línea rosa) y basal (línea café) y unidas entre sí mediante uniones intercelulares, como las uniones estrechas, las adherentes, comunicantes y los desmosomas. Estas células también se unen al substrato (línea gruesa azul) a través de hemidesmosomas y contactos focales.

### Unión estrecha

Es un complejo de proteínas integrales y periféricas que se localizan en la frontera de los dominios y lateral (Figura 2A). Por microscopía electrónica de transmisión, en un corte transversal, la unión estrecha, se observa como un punto donde se fusionan las membranas plasmáticas de las células contiguas, formando el límite de los dominios apical y lateral (Figura 2A, flechas). En cambio, mediante la técnica de criofractura, la unión estrecha se aprecia como fibras dispuestas en redes por debajo de los microvellos (Figura 2B). Si se observa la superficie celular, la unión estrecha rodea a la célula y la une con sus vecinas, obliterando el espacio extracelular (Farquhar y Palade 1973). Ésta realiza dos funciones: es una **cerca** que impide la difusión, en el plano de la membrana, de lípidos y proteínas membranales, de modo que contribuye a mantener la polaridad apical y basolateral de la misma (van Meer y Simons 1986; Diamond 1977; Dragsten et al. 1982); y es también una **compuerta** que, al abrirse, permite el paso selectivo de solutos y agua a través de los espacios

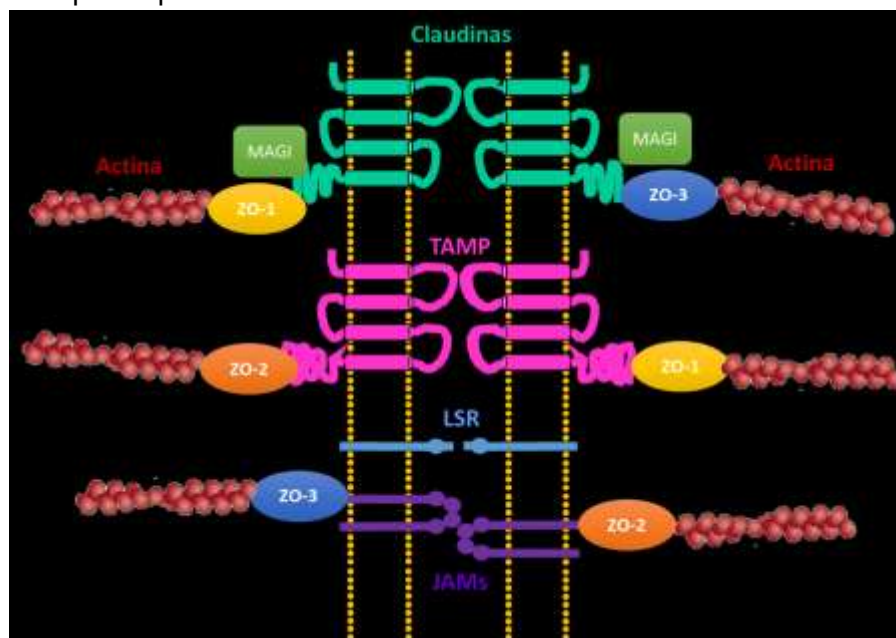
intercelulares, desde el compartimento apical al basolateral y viceversa. En la figura 2A se observa que un marcador electrodenso, agregado a la porción apical de la célula, no tiñe la membrana por debajo de la zona de la unión estrecha (flechas), poniendo de manifiesto la compuerta cerrada (Diamond 1977; Claude y Goodenough 1973). La unión estrecha constituye, en la mayoría de los casos, el componente crucial de la vía paracelular.



**Figura 2. Unión estrecha vista al microscopio electrónico de transmisión.** A) Corte lateral de las células. Se observa la unión estrecha como un punto de fusión entre las membranas de las células vecinas y se ilustra su función de compuerta. B) Unión estrecha vista en réplicas de cófractura de la unión estrecha. En este caso se observa como una red interconectada de fibras (flecha) por debajo de los microvellos (cabeza de flecha). La imagen B fue proporcionada generosamente por Flores-Maldonado C.

Las proteínas integrales de membrana que componen a la unión estrecha hacen contacto mediante sus asas extracelulares, con proteínas de la misma familia de las células vecinas y pueden tener 4 dominios transmembranales, como el caso de las claudinas y las proteínas Marvel asociadas a las uniones estrechas (TAMP, por las siglas en inglés de Tight junction–Associated MARVEL Protein), o un único pase transmembranal, como en el receptor estimulado por lipólisis, LSR, (Lipolysis-Stimulated lipoprotein Recepto) y las moléculas de adhesión de la unión, JAMs,

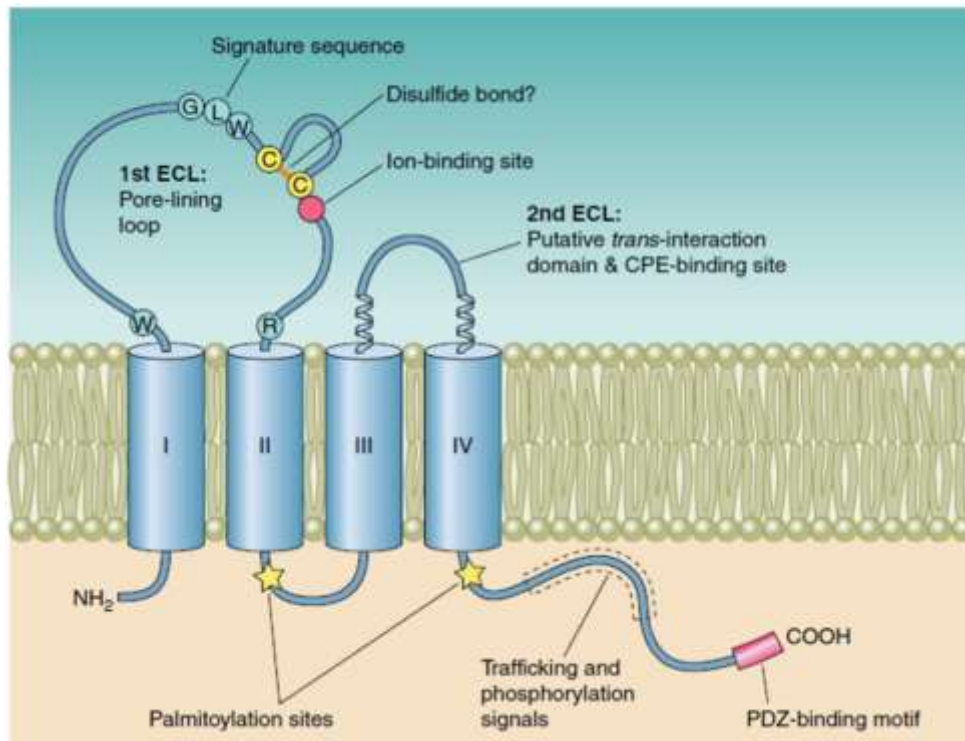
(Junctional Adhesion Molecule). Las proteínas citoplásmicas de la unión estrecha son muy variadas e incluyen a la familia de las que tienen dominios similares a la guanilato cinasa, como ZO-1, -2 y -3, que forman una plataforma entre las proteínas integrales de la unión estrecha y el citoesqueleto de actina, así como diversas proteínas de señalización, proteínas involucradas en el tráfico vesicular y factores de transcripción (Figura 3; Tsukita et al. 2001; Cereijido y Anderson 2001; González-Mariscal et al. 2003). Las claudinas son particularmente importantes porque forman poros de transporte paracelular.



**Figura 3. Proteínas de la unión estrecha.** Se ilustran las proteínas integrales de membrana con 4 pasos transmembranales (Claudinas y TAMP) y de un sólo paso transmembranal (LSR y JAMs) se unen al citoesqueleto de actina a través de las proteínas periféricas (MAGI, ZO1, ZO2 y ZO3).

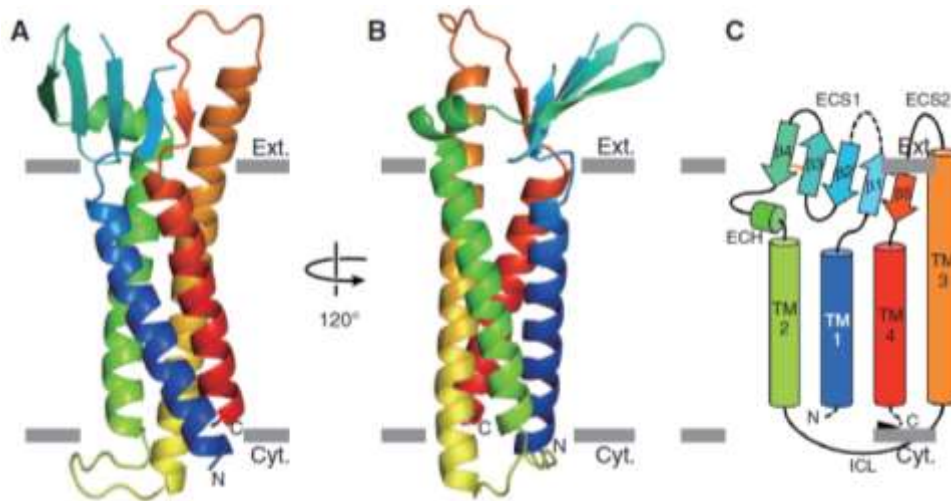
## **Claudinas**

Son proteínas de 207 a 305 aminoácidos con 4 dominios transmembranales, 2 asas extracelulares (ECL1 y ECL2, de menor tamaño) y sus extremos amino y carboxilo terminales citoplásmicos (Figura 4). En los mamíferos se han encontrado 27 claudinas codificadas en genes independientes cuyas proteínas se expresan específicamente en distintos tejidos y periodos del desarrollo (Furuse et al. 1998; Morita et al. 1999). El asa extracelular 1 (ECL1), que se encuentra entre los dominios transmembranales I y II, tiene una longitud de entre 42-56 aminoácidos, forma el poro paracelular y contiene los residuos que confieren la selectividad iónica (Van Itallie et al. 2003). Además, en esta asa se encuentra la secuencia de los aminoácidos G-L-W que es altamente conservada entre las claudinas y es necesaria para la interacción en trans de dichas proteínas. Las claudinas 1-24 también presentan un par de cisteínas cercanas a la secuencia conservada, las cuales forman un puente disulfuro que estabiliza el plegamiento funcional de la proteína. El asa extracelular 2 (ECL2), de 16-33 residuos, es importante también para estabilizar la interacción en trans con otras claudinas. Por otro lado, el carboxilo terminal citoplásmico es importante para el tráfico vesicular de la proteína a la membrana, ya que mutaciones en esta porción conllevan a la retención en el retículo endoplásmico y posterior degradación proteosomal. Las claudinas también presentan un motivo de unión a dominios PDZ por el cual interactúa con proteínas citoplásmicas como ZO1, ZO2, ZO3 y MUPP1, y diferentes sitios de fosforilación y palmitoilación (Figura 4).



**Figura 4. Modelo de las claudinas.** Se muestra la topología y la estructura secundaria, así como los dominios funcionales y los residuos conservados (Günzel y Yu 2013).

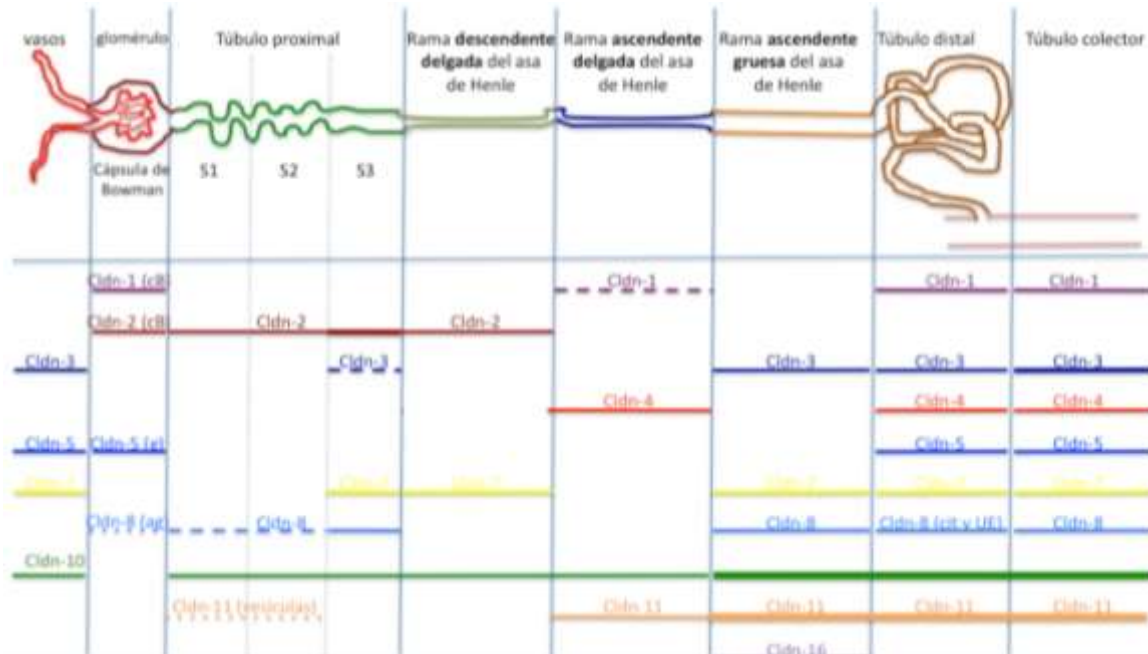
Suzuki y colaboradores (2015) cristalizaron a la claudina-15, lo que provee información sobre su arquitectura (Figura 5). Así se encontró que los segmentos transmembranales forman alfa-hélices con una longitud equivalente al grosor de una bicapa lipídica, excepto el segmento 3 (TM3) que sobresale en el espacio extracelular. Las regiones transmembranales contienen muchos residuos con cadenas laterales pequeñas como glicina y alanina, asegurando el empaquetamiento de las hélices. En cambio, que los dos segmentos extracelulares tienen una estructura  $\beta$ -plegada que se extiende desde la superficie de la membrana y está compuesta por 5 cadenas  $\beta$  ( $\beta$ 1-  $\beta$ 5), de las cuales las primeras 4 corresponden al ECL1 y la 5 a la ECL2. Esta estructura  $\beta$  plegada se estabiliza por un puente disulfuro entre la cisteína 52 de la cadena  $\beta$ 3 y la cisteína 62 de la cadena  $\beta$ 4 (Suzuki et al. 2015).



**Figura 5. Estructura cristalizada de la claudina-15.** A) y B) Estructura de la claudina-15 monomérica en representación de listones en una vista paralela a la membrana. El color cambia gradualmente desde el extremo amino terminal (azul) hasta el carboxilo terminal (rojo). Las barras grises sugieren los límites de las hojuelas externa (Ext.) e interna (Cyt.) de la bicapa lipídica. C) Diagrama de la estructura secundaria de la claudina-15. (Suzuki et al. 2015).

Las claudinas juegan un papel importante en la función de compuerta de la unión estrecha ya que, dependiendo de los tipos de claudinas que se expresen, formarán los poros paracelulares con permeabilidad y selectividad específicas (Colegio et al. 2002; Anderson 2004; Tsukita et al. 2001). La selectividad del poro depende finalmente de la carga de algunos aminoácidos en la ECL1 (Colegio et al. 2002). Así, la claudina-2 tiene un ácido aspártico en la posición 65 dentro del ECL1 que le confiere selectividad por el  $\text{Na}^+$  y se localiza en el túbulo contorneado proximal de la nefrona, donde se reabsorbe la mayoría del sodio del filtrado glomerular (Colegio 2003; Muto et al. 2010; Amasheh et al. 2002); mientras que la claudina-4 tiene cargas positivas en su ECL1, forma poros selectivos al  $\text{Cl}^-$  y se localiza en el túbulo distal que prácticamente no reabsorbe  $\text{Na}^+$  pero sí  $\text{Cl}^-$  (Colegio 2003; Kiuchi-Saishin et al. 2002; Reyes et al. 2002; González-Mariscal et al. 2006; Rosenthal et al. 2010). Es decir, a lo largo de la nefrona, en donde se llevan a cabo diferentes funciones, existe una

expresión diferencial de claudinas en las células que guarda una relación muy cercana con la fisiología del epitelio (Figura 6).



**Figura 6. Expresión de las claudinas a lo largo de la nefrona.** La unidad anatómico-funcional del riñón está dividida en las estructuras que se muestran, desde el glomérulo hasta el túbulo colector. A medida que se progresa a lo largo de la nefrona, la expresión de claudinas cambia, desde claudinas que confieren permeabilidad al epitelio, como la claudina-2 en el túbulo proximal, a claudinas que confieren baja permeabilidad como la claudina-4. Figura tomada de Rincón-Heredia 2014, tesis de doctorado.

El control de la expresión de las claudinas es fundamental para que los epitelios ajusten su selectividad y permeabilidad iónica a las condiciones del medio. Así, la claudina-2 disminuye en el túbulo contorneado proximal de ratas con una dieta rica en sal, al mismo tiempo que la claudina-4 aumenta en el distal y con esto se aumenta la secreción de sodio en la orina (Rincón-Heredia et al., resultados no publicados). En los casos en los que, a causa de mutaciones, alguna claudina deja de expresarse, se producen patologías severas. Por ejemplo, la claudina-16 se expresa en la porción gruesa ascendente del asa de Henle y se encarga de la reabsorción de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  del fluido tubular. Si el gen de la claudina-16 está mutado en humanos y la proteína no se expresa, no se reabsorben ni el  $\text{Ca}^{++}$  ni el  $\text{Mg}^{++}$ . Estos iones se concentran y



precipitan en el filtrado glomerular, formando cálculos renales que desatan una secuencia de inflamación, fibrosis e infecciones que puede conducir a la muerte del paciente (Simon et al. 1999).

Muchas proteínas se regulan mediante interacciones con proteínas de andamiaje o modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, palmitoilación, acetilación y sumoilación, entre otras (Snider y Omary 2014). Las claudinas son uno de esos casos ya que pueden ser fosforiladas (Fujibe et al. 2004; D'Souza et al. 2007; Tatum et al. 2007) y palmitoiladas (van Itallie et al. 2005) para controlar su localización y funcionamiento. Y además tienen una diversa regulación transcripcional.

### **Regulación transcripcional de claudinas.**

En padecimientos como la isquemia (Wang et al. 2010) o la inflamación intestinal (Zhou et al. 2009), se produce un aumento en la permeabilidad del epitelio, ya sea por disminución de las claudinas con poca permeabilidad como la 1, 3, 4, 5 y 7 o por aumento de las claudinas de alta permeabilidad como la 2 (Gunzel y Yu, 2013; Amasheh et al. 2010). Epple demostró que se presentan cambios similares tras la aplicación de citosinas que están elevadas en estas condiciones, como TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-12 (Epple et al. 2009). Se sabe también que NF- $\kappa$ B se activa río abajo de TNF- $\alpha$  para disminuir la expresión de la claudina-1 y aumentar la de la claudina-2 en la línea celular intestinal HT-29/B6 durante la inflamación (Zhou et al. 2009), para disminuir la expresión de claudina-5 en la barrera hematoencefálica en isquemia (Wang et al. 2010) y para aumentar la expresión de la claudina-4 en el epitelio nasal (Masaki et al. 2011). Además, NF- $\kappa$ B disminuye la expresión de la claudina-5 en los capilares pulmonares debido a una regulación a la baja de PPAR $\gamma$  inducida por VIH (Li et al. 2012). PPAR $\gamma$  también aumenta la expresión de las claudinas 1, 3 y 4 y disminuye la de la claudina-2 en las células uroteliales y en el epitelio nasal (Masaki et al. 2011; Varley et al. 2006; Varley y Southgate 2008; Gunzel y Yu, 2013). También se ha

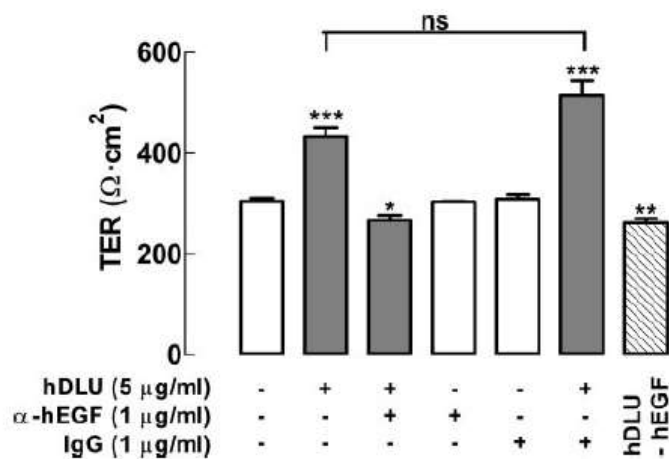
demostrado que TGF $\beta$  mediante SMAD, Snail y Slug aumentan para disminuir la expresión de ciertas claudinas como la 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 11, y esta disminución induce la transición epitelio-mesénquima (Halder et al. 2008; Shiou et al. 2007).

Se ha demostrado además que los factores de transcripción SP1, CDX1, CDX2, GATA-4 y Grhl2, modulan la transcripción de las claudinas. Por ejemplo, el aumento de la claudina-4 que induce el factor de crecimiento epidérmico (EGF), depende de un incremento de SP1 (Ikari et al. 2009), mientras que la hiperosmolaridad en las células epiteliales renales de perro MDCK, disminuye la asociación del factor de transcripción GATA-2 al promotor de la claudina-2, lo que resulta en una disminución de la proteína claudina-2 (Ikari et al. 2015). La modulación de la expresión de las claudinas en el epitelio renal por EGF es particularmente importante para este proyecto.

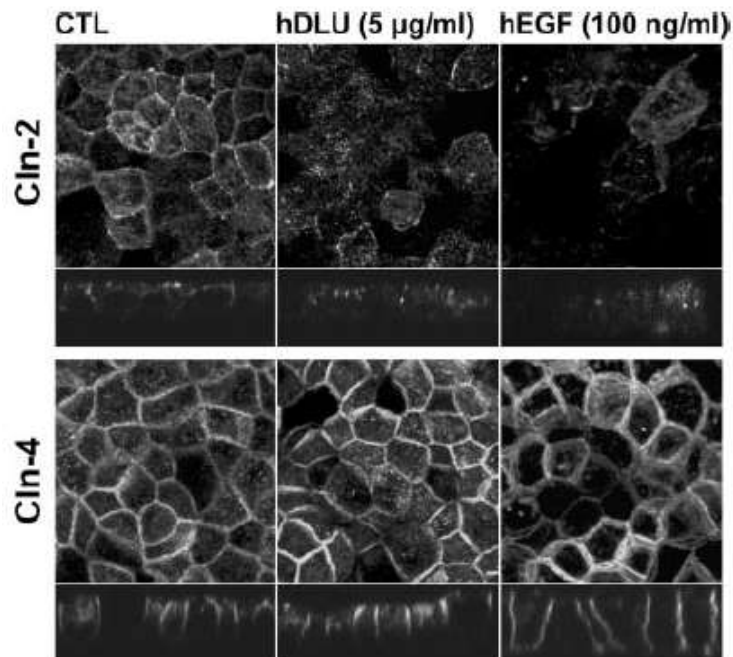
### **Factor de crecimiento epidérmico y la modulación de las uniones estrechas**

Gallardo et al. (2002) demostraron que los extractos liofilizados de orina, aumentan la resistencia eléctrica transepitelial (RET) en las células MDCK. La RET es un parámetro que refleja la permeabilidad paracelular y el grado de sellado de la unión estrecha. El epitelio de la nefrona aumenta progresivamente su RET a medida que se avanza desde el túbulo contorneado proximal, con 5-8  $\Omega\cdot\text{cm}^2$  de RET (Hegel et al. 1967), al distal con 150-600  $\Omega\cdot\text{cm}^2$  (Malnic y Giebisch 1972) y hasta el colector con 860-2000  $\Omega\cdot\text{cm}^2$  (Helman et al. 1971). Al mismo tiempo el fluido tubular se va concentrando. Gallardo et al. (2002) propusieron que un factor presente en el fluido tubular podría concentrarse progresivamente y promover un aumento de la RET y la disminución de la permeabilidad paracelular de la nefrona. Descubrieron también que dicho factor es de naturaleza proteica, de 30-60 kDa resistente a la temperatura. Flores-Benítez et al. (2006) demostraron que este factor es el EGF, pues cuando se le neutraliza con un anticuerpo específico, se bloquea el aumento de la RET que inducen los liofilizados urinarios (Figura 7). Además, el EGF induce la remodelación

de la unión estrecha, disminuyendo a la claudina-2 y aumentando a la claudina-4 (Figura 8), lo cual concuerda con el cambio en la expresión de claudinas en el túbulo contorneado distal. Este factor, conocido por sus siglas en inglés EGF (Epidermal grow factor), es una proteína de 60 kDa y 53 aminoácidos, que induce la proliferación, crecimiento, diferenciación y supervivencia celular y es el péptido más abundante en la orina (50 nM) (Skov et al. 1984). El EGF se sintetiza en las células del asa ascendente gruesa de Henle y el túbulo contorneado distal de la nefrona (Rall et al. 1985). El EGF ejerce su efecto a través del receptor EGFR, el cual pertenece a la subclase I de la superfamilia de receptores tirosín-cinasa. Tiene un dominio extracelular de unión a ligando, un sólo pase transmembranal, una porción citoplásmica con actividad de tirosina-cinasa y un extremo carboxilo terminal intracelular con múltiples sitios de fosforilación (Ogiso et al. 2002).



**Figura 7. La neutralización de hEGF inhibe el incremento de la RET por liofilizados de orina.** Las monocapas se trataron con hDLU (liofilizado de orina) solo (columna 2) o suplementado con un anticuerpo contra hEGF (EGF humano, columna 3), con el anticuerpo por sí sólo (columna 4), y un anticuerpo inespecífico (columnas 5 y 6). TER representa las siglas en inglés de RET. Flores-Benítez, 2006.



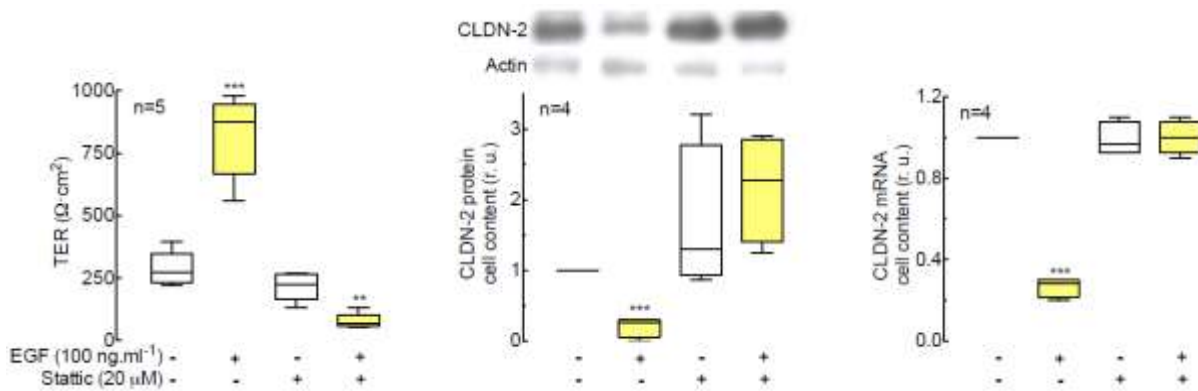
**Figura 8. Los liofilizados de orina (hDLU) y el EGF humano (hEGF) modifican la localización de las claudinas-2 y -4 en la unión estrecha.** Claudina-2 (Cln-2) y claudina-4 (Cln-4). Flores-Benítez, 2006.

El EGF además ejerce un control transcripcional, pues induce el incremento del ARNm de claudina-4, mediado por el factor de transcripción SP1 (Íkari et. al. 2009) y la disminución del mensajero de la claudina-2 (Singh y Harris 2004). En nuestro laboratorio demostramos que el EGF activa una ruta de señalización compuesta por las cinasas reguladas extracelularmente ERK 1/2 y la cinasa homóloga a la del sarcoma de Rous Src, así como por el factor de transcripción STAT3, para disminuir la expresión de la claudina-2 e incrementar la de la claudina-4 (García-Hernández et al. 2015).

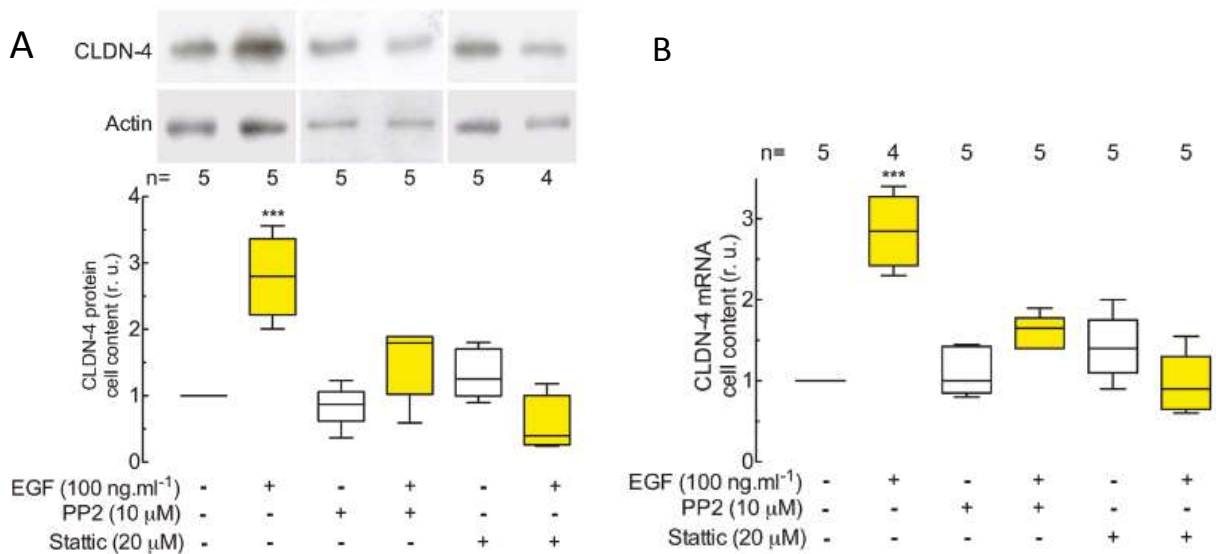
### **STAT3**

Las proteínas STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) constituyen una familia de factores de transcripción que regulan el crecimiento, la supervivencia y la proliferación celular. Se han identificado 7 miembros, STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5b y 6, que se activan por fosforilación, se dimerizan y entran al núcleo, a través de importinas (Liu et al. 2005), para regular la transcripción genética. STAT3 tiene relación con el control de la adhesión celular (Raptis 2009) y puede activarse en

respuesta a la activación de Src (Silba et al. 2004). García-Hernández et al. (2015) demostraron que el EGF induce el incremento de TER, la degradación de la claudina-2 y la disminución del ARNm que codifica a esta proteína, a través de la activación de STAT3 (Figura 9), ya que la adición de Stattic (20  $\mu$ M), una molécula que impide la fosforilación y dimerización de STAT3, estos efectos se previenen. La activación de STAT3 también es necesaria para incrementar el nivel de ARN mensajero y la expresión de claudina-4 en la unión estrecha (Figura 10).



**Figura 9. El EGF disminuye el nivel de la proteína y el RNAm de la claudina-2 a través de STAT3.** Las células MDCK se sembraron durante 15 horas en medio control y con EGF (100 ng/ml), suplementado o no con Stattic (20  $\mu$ M). Este último se agregó una hora antes del EGF. A) Medición de la TER en monocapas de células MDCK incubadas en condiciones control (cajas blancas) o con EGF (cajas amarillas), en presencia o ausencia de Stattic, como se indica. B) Se muestra un blot representativo de claudina-2 y actina, y el análisis densitométrico del nivel de claudina-2 en la monocapa en condiciones control (cajas blancas) o con EGF (cajas amarillas), en presencia o ausencia de Stattic. C) Contenido celular del ARNm de claudina-2 en la en condiciones control (cajas blancas) o con EGF (cajas grises), en presencia o ausencia de Stattic. La inhibición de STAT3 bloquea la transcripción de claudina-2. García-Hernández, 2015.



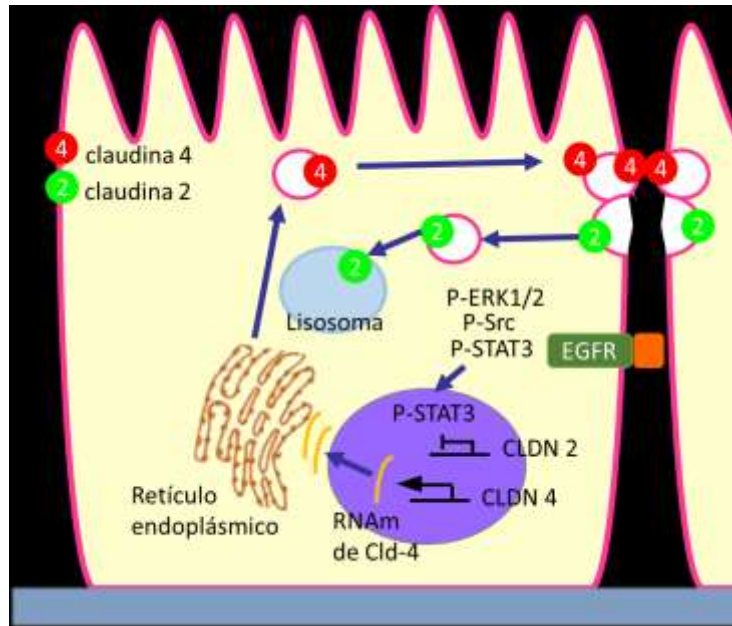
**Figura 10. El EGF induce el aumento de la proteína y el ARNm de la claudina-4 a través de Src y STAT3.** Las monocapas de las células MDCK se incubaron durante 15 h en medio control y con EGF (100 ng/ml), suplementado con o sin el inhibidor PP2, o Stattic (20 μM). Estos últimos se agregaron una hora antes del EGF. A) Inumoblots representativos de claudina-4 y actina. La gráfica corresponde al análisis estadístico de experimentos independientes de células MDCK incubadas en condiciones control (cajas blancas) o con EGF (cajas amarillas), en presencia o ausencia de Stattic, y PP2, como se indica. D) Contenido celular del ARNm de claudina-4 en condiciones control (cajas blancas) o con EGF (cajas amarillas), en presencia o ausencia de Stattic.

El gen de STAT3 codifica para una proteína de 89 kDa denominada STAT3 $\alpha$ , la cual por procesamiento alternativo del mensajero puede generar otra proteína de 80 kDa, llamada STAT3 $\beta$ . STAT3 tiene 5 dominios: el amino-terminal, un dominio superenrollado, el dominio de unión a ADN, un dominio SH2 que reconoce tirosinas fosforiladas y el carboxilo-terminal de transactivación, en el cual se encuentran los residuos fosforilables necesarios para su activación y dimerización, que en STAT3 $\alpha$  son la Ser727 y la Tyr705, y en STAT3 $\beta$  sólo la Tyr705 (Figura 11).



**Figura 11. Proteínas STAT3 $\alpha$  y STAT3 $\beta$ .** Se muestran los dominios que las conforman y los sitios de fosforilación (P) y acetilación (Ac).

El EGF induce la fosforilación de STAT3 en la tirosina 705 a través de la activación de Src (Silva 2004). El mecanismo general de regulación de la unión estrecha por el EGF puede resumirse de la siguiente manera: al unirse a su receptor, el EGF activa las vías de señalización de Src y ERK1/2, esto induce la fosforilación de STAT3 y por consiguiente su dimerización y translocación al núcleo, en donde se propone que se una al gen de la claudina-2 para disminuir su transcripción y al de la claudina-4 para aumentar su transcripción. La claudina-4 que se sintetiza, viaja a la membrana y se inserta en la unión estrecha, mientras que la claudina-2 se endocita y se envía al lisosoma para su degradación. En conjunto, esto provoca un aumento de la RET que se traduce en uniones estrechas más selladas (García-Hernández et al. 2015; Figura 12). Como se muestra en la figura 11, STAT3 se acetila y es posible que esta acetilación juegue un papel importante en la regulación de la unión estrecha ejercida por el EGF.



**Figura 12. Proceso de regulación de la unión estrecha por EGF y STAT3 en las células MDCK.**

### **Acetilación.**

La acetilación de proteínas es una modificación post-traduccional, tradicionalmente observada y estudiada en las histonas, que se relaciona con la transcripción y la dinámica de la cromatina (Cohen y Yao 2004). Sin embargo, se ha demostrado que la acetilación de otras proteínas influye en funciones tan importantes como la motilidad celular, el ensamblaje del cilio mayor, la sinaptogénesis, la apoptosis y el tráfico vesicular (Hubbert et al. 2002; Kawaguchi et al. 2003; Serrador et al. 2004; Cohen et al. 2004). El caso más estudiado es la acetilación de histonas, que se relaciona con el inicio de la transcripción genética debido a una pérdida de la afinidad del ADN por la histona. Esto conlleva a un estado menos enrollado del ADN y facilita el acceso para que el complejo de transcripción lleve a cabo su función. La acetilación se realiza sobre lisinas cercanas a los aminoácidos de cadenas laterales voluminosas como tirosina y fenilalanina (Choudhary et al. 2009). Sin embargo, no se ha encontrado una secuencia específica de acetilación. El nivel de acetilación de una proteína depende de la actividad de las acetil-transferasas (KAT, del Inglés K



(lysine) Acetyl Transferase) que transfieren al grupo acetilo desde la acetil CoA a las proteínas y desacetilasas (KDAC K De-Acetilases; Saxholm et al. 1982) que lo retiran. Las KAT se dividen en dos clases: las de tipo A que se localizan en el núcleo como Gcn5 y p300/CBP (Lee et al. 2007), aunque esta última también se encuentra en el citoplasma de las células embrionarias de *Drosophila* y en las células del notocordo de embriones de ratón (Goodman y Smolik 2000); y las B localizadas en el citoplasma, como HAT1. Por otro lado, las KDAC conforman una familia de 4 clases (KDAC I-IV). La mayor parte de las KDAC son nucleares y actúan principalmente sobre las histonas, sin embargo, las KDAC de la clase IIB, HDAC6 y 10, son citoplásmicas (Ruijter et al. 2003). HDAC6 desacetila principalmente a los microtúbulos y el EGF al inhibir, aumenta la acetilación de los microtúbulos lo que promueve la endocitosis del EGFR. Así se desarrolla un proceso básico de desensibilización (Lee et al. 2015).

La acetilación de STAT3 en la lisina 685 incrementa su interacción con secuencias específicas del ADN y por lo tanto, su actividad transcripcional y localización nuclear en las células de carcinoma hepático (Wang et al. 2005). La acetilación de dicha lisina es necesaria para que STAT3 entre al núcleo y regule la actividad transcripcional en respuesta a la IL-6 en las células de cáncer de próstata PC3 (Yuan et al. 2005). Esto pone de manifiesto el papel crucial de la acetilación en la activación de STAT3, por lo que en este proyecto nos hemos planteado investigar el papel que juega la acetilación de STAT3 en la regulación de las claudinas por el EGF, persiguiendo probar la siguiente hipótesis.

## Hipótesis:

---

**El EGF induce la acetilación de STAT3 para modular la expresión de las claudinas.**

Esta hipótesis será puesta a prueba completando los siguientes objetivos.

## Objetivos:

---

- 1) Determinar si la inhibición de las desacetilasas induce un aumento del sellado de la unión estrecha, similar al producido por el EGF.**
- 2) Demostrar si el EGF induce la acetilación de STAT3.**
- 3) Investigar si HDAC6 participa en el aumento del sellado de la unión estrecha inducido por el EGF.**

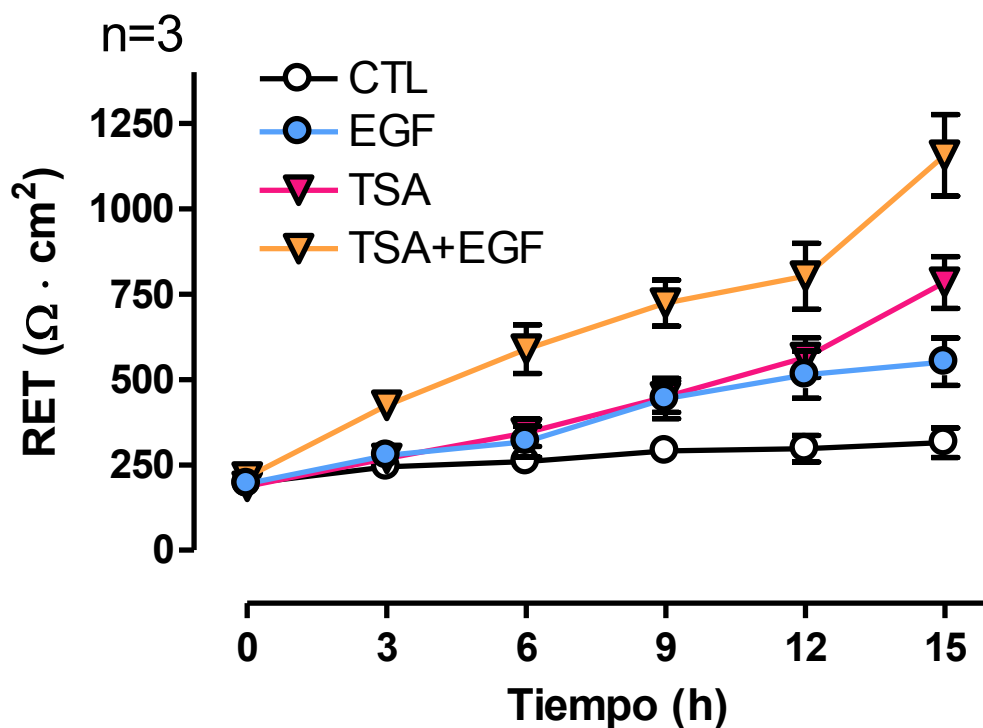
# Resultados

---

## **1) Investigar si la inhibición de las desacetilasas induce un aumento de la RET similar al producido por el EGF.**

Aún se desconoce qué papel juega la acetilación en el aumento de la RET inducido por EGF en células MDCK, un enfoque para estudiarlo, es aumentando la acetilación de proteínas. Dado que el nivel de acetilación de una proteína depende de la actividad de las KATs y las KDACs, un aumento de la acetilación puede lograrse inhibiendo a las KDAC. La tricostatina A (TSA), es un inhibidor genérico de estas enzimas (Yoshida et al. 1990), y, agregado al medio de cultivo, se esperaría que aumente la acetilación global de las proteínas.

Para investigar el papel de la acetilación en el cambio de la RET que produce el EGF, las células MDCK, se cultivaron sobre filtros de policarbonato e incubaron durante 15 horas con EGF, en presencia y ausencia de TSA 1  $\mu$ M. Para asegurar que la TSA ejerza su efecto inhibitorio sobre las desacetilasas, se adicionó una hora antes que el EGF. La figura 13 muestra la RET en función del tiempo. Tal como se esperaba, el EGF aumenta la RET significativamente. La TSA, por sí sola también aumenta la RET, incluso a un valor mayor que el EGF. La incubación de las células con ambas sustancias (EGF+TSA) produce el aumento máximo. Estos resultados indican que el aumento de la acetilación global de la célula induce un aumento de RET (Figura 13).

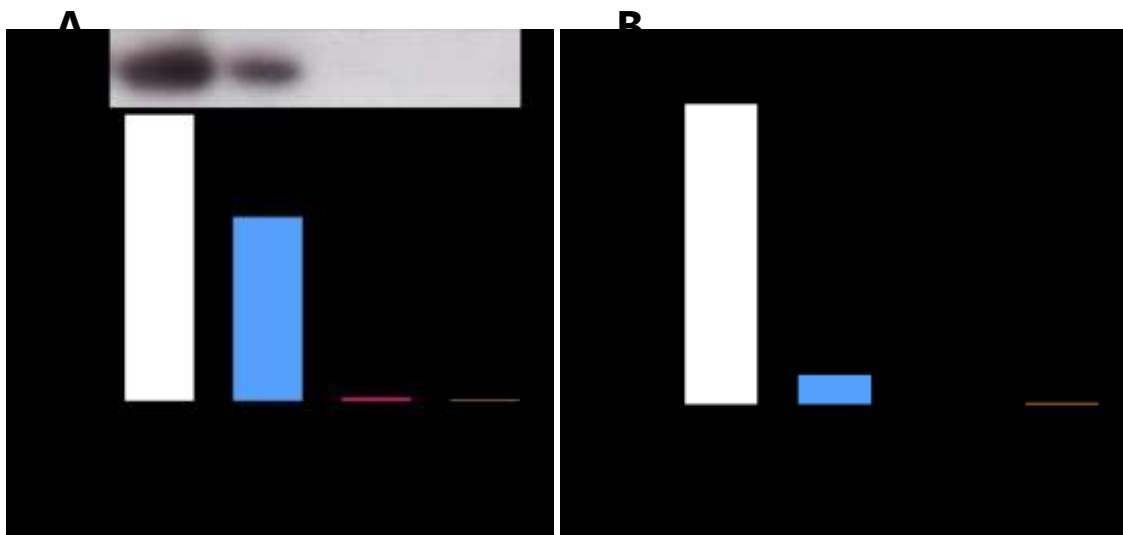


**Figura 13. La inhibición de las desacetilasas induce una respuesta similar a la del EGF.**

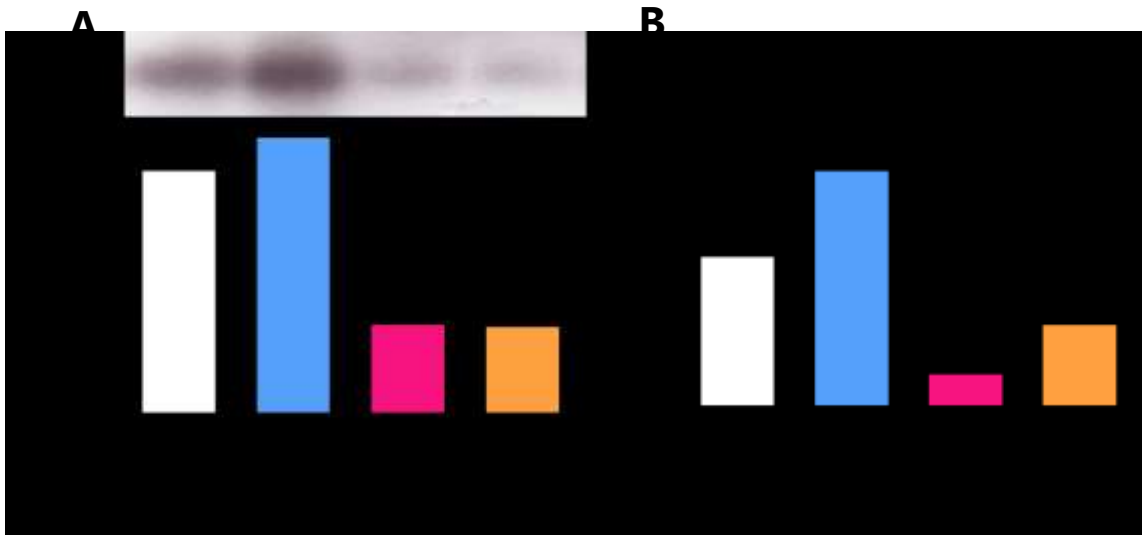
Las células MDCK se incubaron con EGF en presencia y ausencia de Tricostatina A (TSA) 1  $\mu$ M, adicionada 1 hora antes del EGF. Se les midió la RET en función del tiempo, a partir del momento en que se adicionó EGF. n representa el número de experimentos independientes.

Un aumento tan pronunciado de la RET puede resultar del aumento o disminución de uno, varios o todos los componentes de la unión estrecha. Para aclarar de qué cambios se trata, cultivamos células de la manera antes descrita, las lisamos con detergentes y determinamos la cantidad de claudinas-2 y 4 por inmunoblot, así como la cantidad de los mensajeros respectivos por RT-PCR cuantitativa. La figura 14 muestra, como se esperaba, una disminución tanto de la proteína como del mensajero de claudina-2 en presencia de EGF. La TSA tiene un efecto similar al EGF, pero con una potencia mayor, pues induce una disminución aún más pronunciada del contenido celular de claudina-2.

Por otro lado, la figura 15 muestra que el efecto de la TSA sobre la claudina-4 es opuesto al del EGF, esto es, mientras la TSA induce la disminución tanto de la proteína como del mensajero, el EGF induce un aumento en ambos. Este resultado demuestra que la disminución de la expresión de claudina-2 y -4 depende de un aumento de la acetilación, pero no el incremento de la expresión de claudina-4 inducido por el EGF.



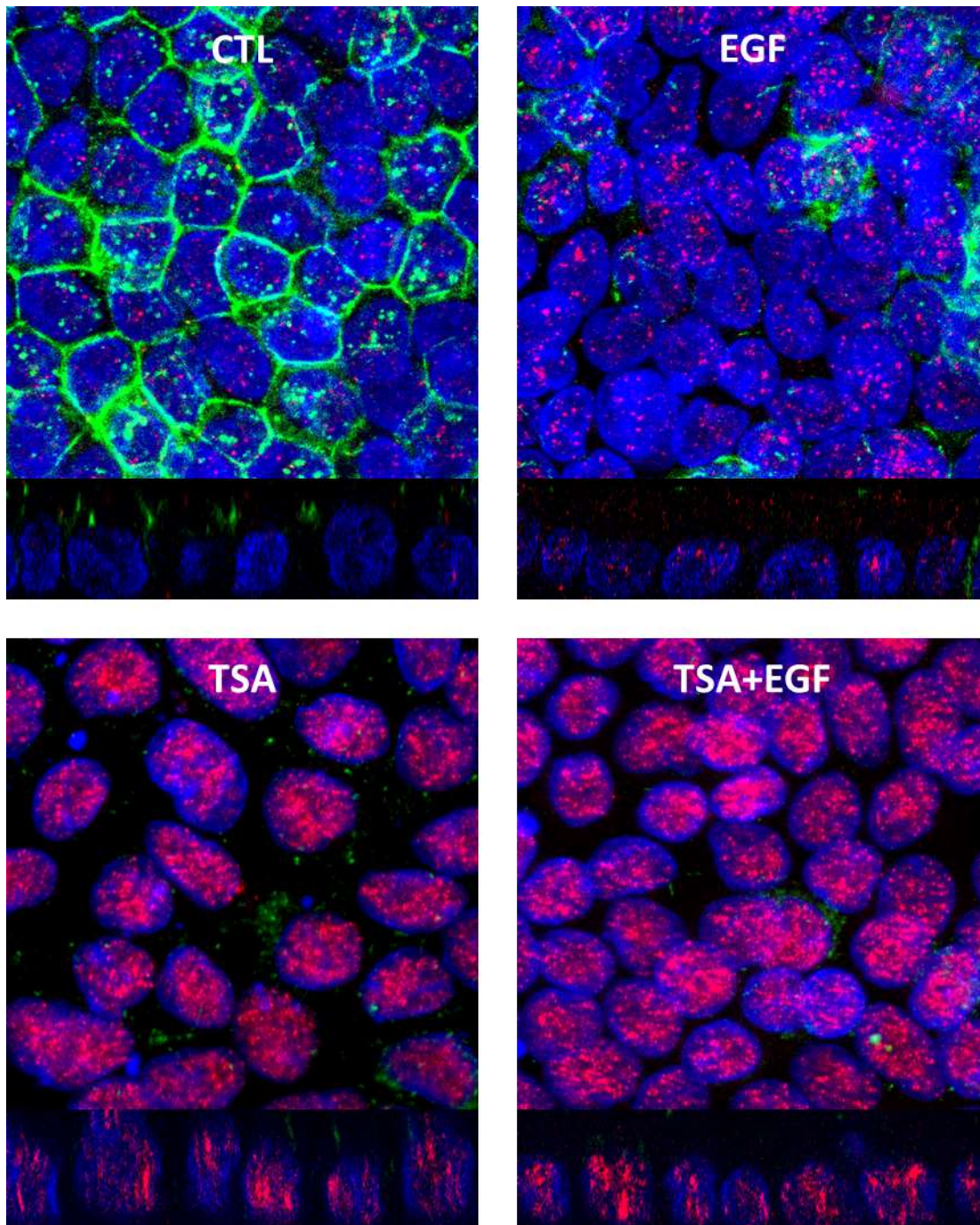
**Figura 14. La inhibición de las desacetilasas induce una disminución del contenido celular y ARN mensajero de claudina-2, mucho mayor e independiente al inducido por EGF.** Las células MDCK se incubaron en condiciones control o con EGF (100 ng/ml) en presencia y ausencia de TSA 1  $\mu$ M. A) Se muestra un blot representativo de claudina-2 y el análisis densitométrico del nivel de claudina-2 en las células tratadas con las diferentes condiciones. B) Contenido celular del ARN mensajero de claudina-2.



**Figura 15. La inhibición de las desacetilasas induce una disminución del contenido celular y ARN mensajero de claudina-4 y previene el aumento inducido por EGF.** Las células MDCK se incubaron en condiciones control o con EGF (100 ng/ml) en presencia y ausencia de TSA 1  $\mu$ M. A) En la parte de arriba se muestra un blot representativo de claudina-4 y en la de abajo, el análisis densitométrico del nivel de claudina-4 en las células tratadas con las diferentes condiciones. B) Contenido celular del ARN mensajero de claudina-4.

La disminución de la expresión de la claudina-4, como consecuencia del aumento de la acetilación global de la célula, sugiere que esté participando un factor que al acetilarse, inhiba su transcripción, por lo que investigamos qué proteína podría ser el blanco de la acetilación en estas condiciones. Se sabe que el EGF induce el aumento de la RET a través de la activación de las enzimas Src, ERK 1/2 y del factor de transcripción STAT3 por fosforilación (Singh y Harris 2004; Ikari et al. 2012; Flores-Benitez et al 2007, 2009; García-Hernández, 2015). Mientras que no hay evidencia de que Src y ERK 1/2 se acetilen, hay demostraciones múltiples de que STAT3 lo hace específicamente en la lisina 685, en las células PC3 de cáncer prostático (Yuan et al. 2005) y en las células HEK como resultado de la incubación con IL-6 (Wang et al. 2004). Si sucediera así en las células MDCK con el EGF, es posible que podamos detectarlo con anticuerpos específicos contra la lisina 685 acetilada de STAT3 (Albregues et al. 2015). Las células MDCK tratadas como se mencionó anteriormente, se fijaron, permeabilizaron e incubaron con anticuerpos contra STAT3

acetilado en la lisina 685 y claudina-2. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Estas preparaciones se analizaron por microscopía confocal.



**Figura 16. STAT3 se acetila en presencia de TSA.** Las células MDCK cultivadas con 100 mg/ml de EGF durante 15 horas en presencia o ausencia de TSA 1  $\mu$ M, se tiñeron contra STAT3 acetilado (rojo) y claudina-2 (verde). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul).

En la condición control, la claudina-2 se distribuye en la zona de la unión estrecha, en un patrón típico de “malla de gallinero” y en menor cantidad, en el citoplasma. STAT3 acetilado se encuentra en motas nucleares y con menor intensidad en el citoplasma (Figura 16). Cuando las células se incuban con EGF, disminuyen la claudina-2 de la membrana y gran parte de la que permanece en la célula lo hace, mayoritariamente, en el citoplasma. La señal de STAT3 acetilado, mientras tanto, aumenta en el núcleo y en el citoplasma. Por otro lado, el nivel de acetilación aumenta drásticamente en el núcleo en las células tratadas con TSA y aún en mayor proporción en las que se incubó con TSA+EGF, en paralelo con la disminución clara de la claudina-2, en ambos casos. Estos resultados son compatibles con la posibilidad de que el EGF induzca la acetilación de STAT3 para modificar la expresión de las claudinas e inducir el aumento de la RET.

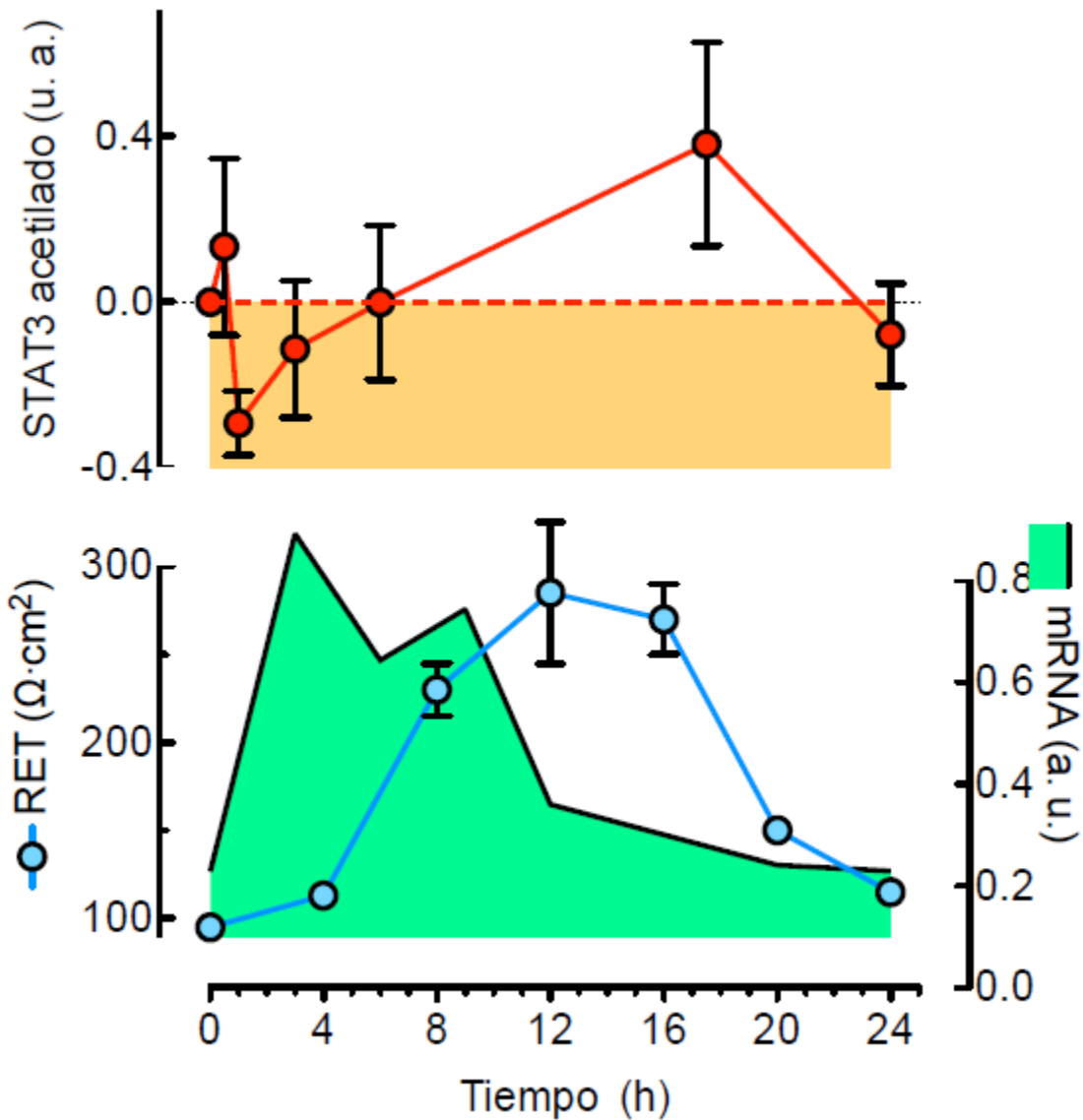
## **2) Demostrar si el EGF induce la acetilación de STAT3.**

Para determinar si el EGF induce la acetilación de STAT3, medimos la cantidad de STAT3 acetilado en función del tiempo de exposición a EGF. Las células MDCK se lisaron con detergentes y a los extractos protéicos totales se les midió la acetilación específica en la lisina 685 de STAT3 por inmunoblot. La figura 17A (círculos rojos) muestra la cinética de acetilación dependiente de EGF, los puntos que aparecen en el área resaltada con naranja corresponden a la desacetilación y los que están en el área blanca son los más acetilados, con respecto al control. Lo primero a resaltar es que la acetilación oscila con el tiempo de tratamiento de EGF: disminuye en el término de una hora y aumenta entre las 15 y 20 horas significativamente. Esta oscilación se relaciona con efectos que induce el EGF, es decir un aumento tanto de la RET como del ARN mensajero de claudina-4 (Figura 17B, círculos azules, superficie verde) como se observa, la desacetilación de STAT3 sucede justo antes del máximo incremento del ARNm, mientras que el aumento de la acetilación es consistente con



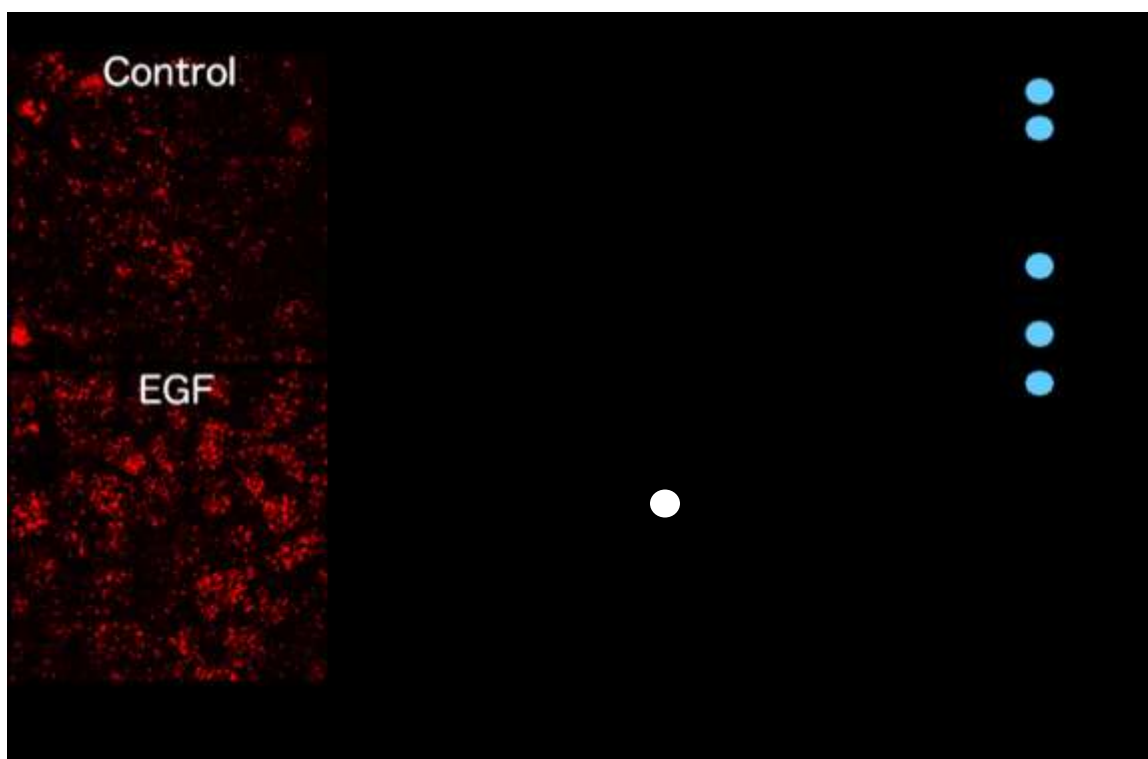
el aumento de la RET y que ambas empiezan a disminuir aproximadamente al mismo tiempo.

No obstante, el error estándar es alto y el aumento pequeño, lo que indica que los cambios no son robustos y, por lo tanto, podríamos necesitar mayor resolución para estudiar variaciones finas.



**Figura 17. STAT3 se desacetila después de 1 hora de exposición con EGF y se acetila entre las 15 y 20 horas de exposición.** A) Las células MDCK se lisaron con detergentes y a los extractos protéicos totales se les midió a cantidad de STAT3 acetilado y en función del tiempo de exposición al EGF. B) Resistencia eléctrica transepitelial y contenido de ARN mensajero de claudina-4 durante la cinética de incubación con EGF.

Para confirmar los resultados anteriores, analizamos por fluorescencia cuantitativa, la presencia de STAT3 acetilado en condiciones control y después de 15 horas de exposición a EGF. Este análisis nos indica la cantidad de puntos por campo que corresponden con la cantidad de STAT3 acetilado en las figuras de fluorescencia. En la figura 18 se presenta un ejemplo de las fluorescencias evaluadas. Tal como sucede con el inmunoblot, la respuesta es variable, se marcan en azul los puntos en donde hubo un aumento de la acetilación, y en negro aquellos en que no hubo cambios o disminuyó, sin embargo, hay una tendencia estadísticamente significativa a acetilarse en presencia de EGF.

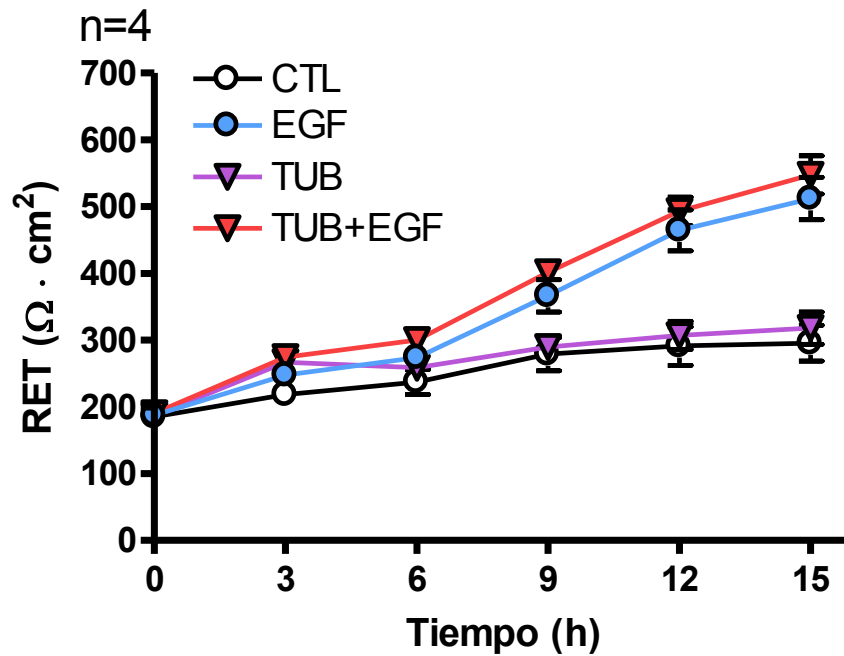


**Figura 18. STAT3 se acetila después de 15 horas exposición a EGF.** Análisis cuantitativo de la fluorescencia de STAT3 acetilado. En la izquierda un ejemplo de las fluorescencias estudiadas. En la gráfica se marcan en azul los puntos en que la acetilación de STAT3 aumentó en presencia de EGF y en negro aquellos en los que permaneció igual o disminuyó.

Otra manera de analizar la participación de la acetilación en el cambio de composición de la unión estrecha que induce el EGF se basa en identificar la KDAC involucrada. HDAC6 fue la primera opción, como se explica a continuación.

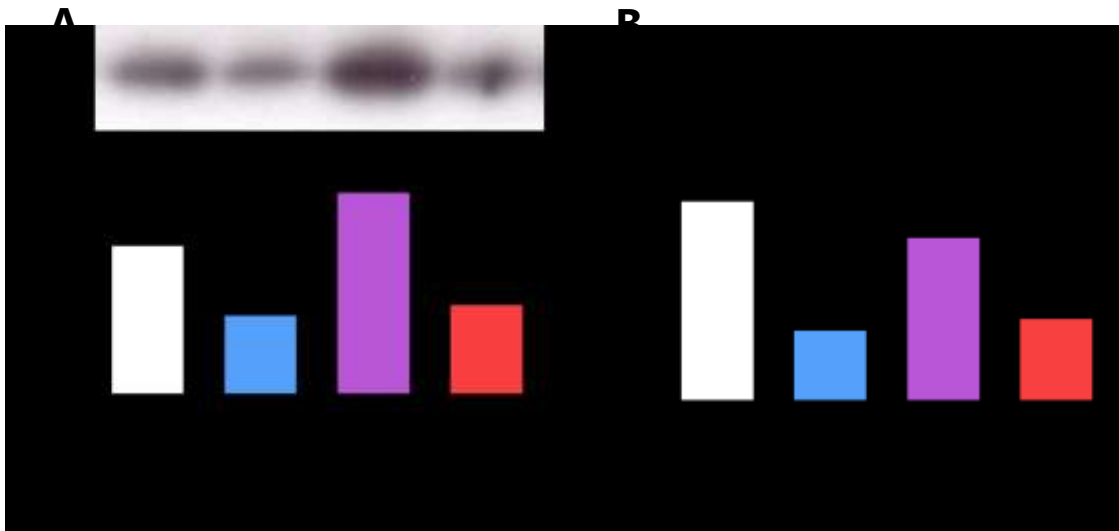
### **3) Investigar si HDAC6 participa en el aumento de la RET inducido por el EGF.**

La HDAC6 es una desacetilasa de la clase IIB que se expresa mayoritariamente en el citoplasma (McConkey et al. 2012). Tiene un papel importante en la desacetilación de los microtúbulos, cuya actividad disminuye para finalizar la señal del receptor a EGF, y aumentar su endocitosis y degradación cuando se encuentra unido a su ligando (Lee et al. 2015). Para saber si la actividad de esta desacetilasa es importante para el aumento de la RET, inducido por EGF, y los cambios en claudinas que se presentan, se utilizó tubacina (TUB), un inhibidor específico de HDAC6. Esta inhibición induciría un aumento en la acetilación de los blancos de esta enzima, principalmente de la tubulina. Se incubaron a las células MDCK durante 15 horas con EGF, en presencia y ausencia de tubacina 10  $\mu$ M, agregada una hora antes que el EGF y se midió la RET en intervalos de 3 horas durante 15 horas. Se observa que la inactivación de HDAC6 no afecta el cambio de resistencia inducido por EGF ni en condiciones control (Figura 19). Por lo tanto, concluimos que ni HDAC6, ni algunos de sus blancos, como los microtúbulos, participan en el aumento de la RET.

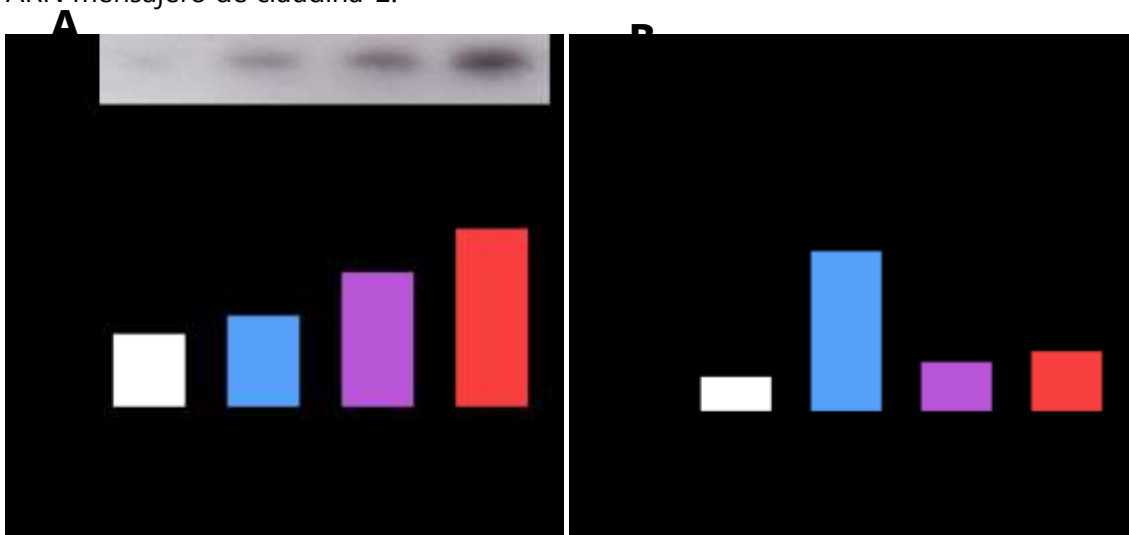


**Figura 19. La RET no se modifica por la inhibición de HDAC6.** Las células MDCK se incubaron con EGF en presencia y ausencia de tubacina 10  $\mu$ M (TUB) durante 15 horas y la RET se midió en función del tiempo.

Sin embargo, además de la medición de RET, en estas condiciones se evaluó el contenido total y el ARN mensajero de claudina-2 (Figura 20) y claudina-4 (Figura 21). Un hallazgo interesante fue que la inhibición de HDAC6 aumenta el contenido celular de ambas claudinas, independientemente del EGF, mientras que su ARN mensajero no se ve afectado. La presencia de tubacina junto al EGF no afecta la disminución de claudina-2 ni de su mensajero inducida por EGF, mientras que, en el caso de claudina-4, parece haber una sinergia entre la tubacina y el EGF pues juntos inducen un aumento mayor de la proteína sin modificar el ARN mensajero. Estos resultados nos muestran que HDAC6 juega un papel a nivel citoplásmico, como se esperaba, basándose en el hecho de que esta enzima se localiza principalmente en esta porción de la célula. Es probable que la acetilación de los microtúbulos sea un factor determinante para la degradación de las claudinas, si bien aún debemos investigar qué tan intenso debe ser para modificar, por sí sola, la RET.



**Figura 20. La inhibición de HDAC6 por sí sola aumenta en la cantidad de claudina-2, pero no de su mensajero.** Las células MDCK se incubaron en condiciones control o con EGF (100 ng/ml) en presencia y ausencia de tubacina 10  $\mu$ M. A) En la parte de arriba se muestra un blot representativo de claudina-2 y en la de abajo, el análisis densitométrico del nivel de claudina-2 en las células tratadas con las diferentes condiciones. B) Contenido celular del ARN mensajero de claudina-2.

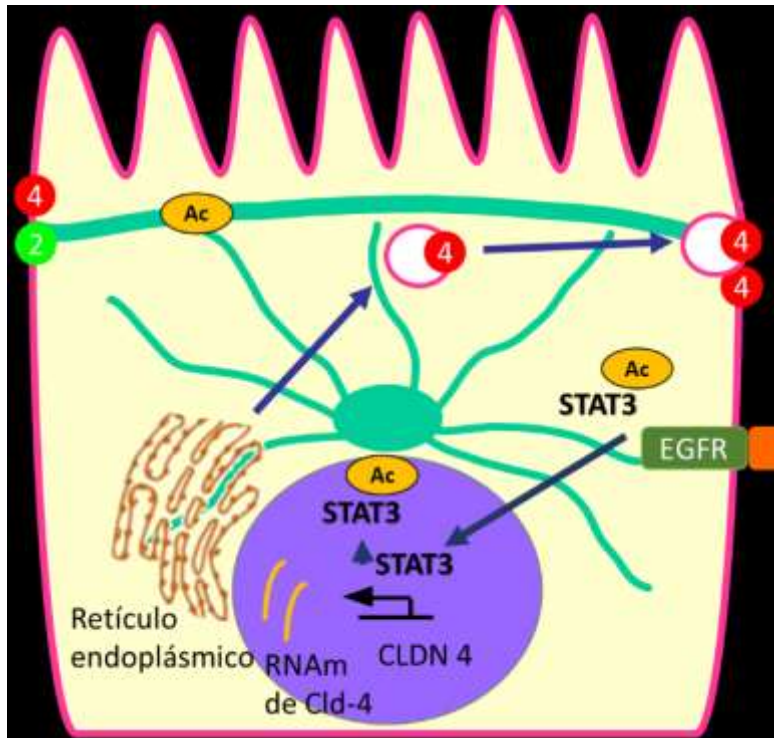


**Figura 21. La inhibición de HDAC6 por sí sola aumenta en la cantidad de claudina-4 que hace sinergia con EGF, mientras que su mensajero no se ve afectado.** Las células MDCK se incubaron en condiciones control o con EGF (100 ng/ml) en presencia y ausencia de tubacina 10  $\mu$ M. A) En la parte de arriba se muestra un blot representativo de claudina-4 y en la de abajo, el análisis densitométrico del nivel de claudina-4 en las células tratadas con las diferentes condiciones. B) Contenido celular del ARN mensajero de claudina-4.

## Discusión

---

Para evaluar el papel que tiene la acetilación global en el aumento de la RET, inducido por el EGF, utilizamos un inhibidor inespecífico de KDACs, la tricostatina A (TSA), la cual genera un aumento en la acetilación de proteínas al interferir en el equilibrio acetilación-desacetilación. Observamos que en células MDCK, el TSA reproduce los efectos que tiene el EGF sobre la RET e incluso los potencia sinérgicamente, produciendo una RET máxima (Figura 13). Esto sugiere que el aumento de la acetilación global de la célula induce cambios en la composición de la unión estrecha (Figuras 14 y 15) reflejados en el aumento de la RET. La diferencia entre la acción del EGF y la TSA, se explica porque el EGF induce una desacetilación temprana de STAT3 que dispara la transcripción de la claudina-4 (Figura 17) y la cadena de eventos subsecuente que culmina en el aumento de la RET, además un aumento de la acetilación de STAT3 coincide con el inicio de la disminución de la RET, lo que sugiere que la acetilación inhibe la actividad de STAT3. Se puede demostrar que esta cadena causal de eventos opera en las células epiteliales en experimentos con mutantes: una mutante acetilomimética de STAT3 no podría ser desacetilada como resultado del tratamiento con EGF y, por lo tanto, este factor no encendería la transcripción ni aumentaría la RET; mientras que en otra mutante no acetilable, no se daría fin a la señalización del EGF y la RET no disminuiría después de 15 horas (Figura 22A). a tenemos clonado el gen de STAT3 y los iniciadores con las mutaciones para proceder con este punto.



**Figura 22. Modelo de regulación del sellado de la unión estrecha por la acetilación de STAT3.** A) En presencia de EGF (rectángulo naranja), STAT3 se desacetila para promover la transcripción de claudina-4 y se vuelve a acetilar posteriormente para inactivarse. Además, la acetilación de los microtúbulos (verde agua), estabiliza en la membrana a las claudinas.

La TSA disminuye drásticamente la transcripción y traducción de las claudinas-2 y -4 (Figuras 14 y 15), mientras que la acetilación de las histonas generalmente activa la transcripción. Así, el efecto de la TSA sobre las claudinas-2 y -4 es una excepción a la regla y sería interesante investigar si así sucede con otras claudinas y proteínas de la unión estrecha y qué mecanismos moleculares intervienen.

Además, se sabe que algunas claudinas se expresan de manera coordinada, frecuentemente en pares. Por esta razón, cabe esperar que las variaciones de las claudinas -2 y -4 se acompañen de las correspondientes claudinas -8 y la -10, con las que suelen relacionarse (Rincón-Heredia et al. 2014; García-Hernández et al. 2015). Cabe mencionar que la expresión de estas claudinas también depende de la actividad de STAT3 (Hou et al. 2010). Si bien las razones de la regulación coordinada

se desconocen, un estudio sistemático de la expresión de todas las claudinas de las MDCK, mediante la detección de los mensajeros respectivos por PCR cuantitativa, podría arrojar luz sobre este problema.

Se ha demostrado que la entrada de STAT1 al núcleo de las células de riñón embrionario 293T, depende de la fosforilación y acetilación secuenciales, pues la primera constituye la señal de entrada al núcleo y la segunda termina la actividad transcripcional y salida de STAT3 del núcleo hacia el citoplasma (Krämer et al. 2008), lo que sugiere un mecanismo similar para el caso del TSA y el EGF.

La desacetilación y la acetilación de STAT3, inducidas por el EGF, podrían regular el tráfico vesicular. Nuestros resultados indican que la inhibición de HDAC6 y, por lo tanto, la acetilación de los microtúbulos, disminuye significativamente la degradación tanto de la claudina-2 como de la -4, sin afectar la RET (Figuras 19, 20 y 21). Si bien, la estabilidad de la RET podría deberse a que el cambio de claudina-2 se compensa con el de la -4, es posible también que el EGF, a través de la inhibición de la HDAC6, induzca la acetilación y consecuente estabilización del citoesqueleto apical de microtúbulos asociado a la unión estrecha, descrito por Yano et al. (2013). Además, la acetilación aumenta la afinidad de los microtúbulos por la kinesina1, lo que desfavorece el transporte vesicular de la proteína JIP1 hacia la punta de las neuritas de neuronas hipocampales (Reed et al. 2006). Un caso importante es el del receptor al EGF que, unido a su ligando, induce la acetilación de los microtúbulos y favorece enormemente la endocitosis y degradación del complejo, para terminar la señalización (Lee et al. 2015). Estas observaciones resaltan la importancia de estudiar cómo se ve afectada la vida media de las claudinas por la acetilación de microtúbulos.



# Conclusiones

---

Los resultados que se muestran en la presente tesis sugieren:

1. El EGF induce la desacetilación de STAT3 para promover la transcripción de la claudina-4.
2. La acetilación de los microtúbulos aumenta la vida media de las claudinas.
3. A tiempos tardíos el EGF induce la acetilación de STAT3, lo que activa la regulación a la baja del EGF.

## Material y métodos

---

Anticuerpo	Marca	Número de Catálogo
Claudina-2 ratón	Zymed-Invitrogen	325600
Claudina-4 ratón	Zymed-Invitrogen	329400
STAT3-ac en K685 conejo	Cell Signaling Technology	2523
STAT3 conejo	Cell Signaling Technology	49045
GAPDH ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-32233
Lamina ratón	Cell Signaling Technology	4777S
Anti ratón-HRP cabra	Life Technologies	62-6520
Anti conejo-HRP cabra	Life Technologies	G-21234
Anti ratón-TRITC cabra	Life Technologies	62-6511
Anti conejo-FITC cabra	Life Technologies	65-6111

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados**

### **Cultivo celular.**

Las células MDCK se obtuvieron del American Type Culture Collection (Manassas, VA). Todos los experimentos se realizaron con la clona 7.11, seleccionada por su alto nivel de respuesta al EGF. Las células crecieron en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; 31600-083, Life Technologies, Carlsbad, CA) enriquecido con suero bovino 10% (10371-029, Life Technologies) y una mezcla de antibióticos estreptomomicina/penicilina (A-01, In Vitro, México D. F.), al que se le denomina CDMEM. Después de lavarlas con PBS (GIBCO,

00300) e incubarlas con tripsina-verseno (Invitrogen, Grand Island, NY), las células se sembraron en filtros de policarbonato (Transwell, Corning Costar 3415 o 3414, Cambridge, MA) a una densidad de  $2.25 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> y se incubaron por 55 horas en CDMEM. Posteriormente, las células se depletaron de suero bovino y se incubaron durante 24 horas adicionales en DMEM, para hacer las diferentes manipulaciones experimentales. Los inhibidores se adicionaron una hora antes del EGF (Núm. Cat.: AF-100-15, Peprotech). Para realizar algunas mediciones de RT-PCR las células se cultivaron en multicámaras de 6 pozos.

### **Resistencia eléctrica transepitelial (RET).**

El sellado de la unión estrecha se evaluó a través de mediciones de RET de las monocapas sembradas sobre filtros de policarbonato con un voltímetro (EVOM2) y los sistemas EndOhm -6 y -12, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (World Precision Instruments, Sarasota, FL).

### **Inmunofluorescencia.**

Después de las mediciones de la RET, las células se lavaron tres veces con PBS complementado con calcio, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos y se permeabilizaron con metanol a -20 °C durante 10 minutos. Las preparaciones se incubaron por 1 hora con solución de bloqueo (suero 5%, tritón x100 0.03% en PBS) y luego durante 1 hora con un anticuerpo específico contra STAT3 acetilado en la lisina 685 y otro anticuerpo contra claudina-2, ambos en solución para anticuerpos (BSA 1%, tritón x100 0.3% en PBS) y se lavaron 3 veces con PBS complementado con calcio a temperatura ambiente. Las preparaciones se incubaron con la solución de anticuerpos que contenía a los anticuerpos secundarios

de cabra anti-conejo marcado con FITC, de cabra anti-ratón marcado con TRITC en solución y DAPI a una concentración 1  $\mu$ M durante 30 minutos. Las muestras se montaron con Vectashield (Núm. Cat.: H-1000, Vector Labs, Burlingame, CA) y se examinaron en el microscopio confocal Leica SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las imágenes se procesaron con el software LAS AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), con FIJI (Fiji is just image J) y con GIMP (GNU Image Manipulation Program) para obtener proyecciones máximas, cortes laterales y construir las figuras.

### **Extractos totales, nucleares y citoplásmicos de proteínas.**

Después de las mediciones de la RET, las monocapas se lavaron tres veces con PBS y después se trataron con solución amortiguadora de lisis (Tris pH: 7.0 20 mM, EGTA 2 mM, EDTA 5 mM, benzamidina 30 mM, Nonidet P-40 0.5% y coctel inhibido de proteasas Complete®, Núm. Cat.: 05892791001) durante 30 minutos a -20 °C. Los extractos se homogenizaron haciéndolos pasar 10 veces a través de una jeringa de 1 ml y se recuperaron. La cantidad total de proteínas se determinó con un ensayo BCA (Núm Cat.: 23235, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). Para los extractos citoplásmicos y nucleares se utilizó el kit de extracción NE-PER (Núm. Cat.: 78833, Thermo Fisher Scientific) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

## **Inmunoblot.**

Los extractos de proteínas totales o nucleares se separaron en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA) y se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos mencionados en la tabla 1. Las bandas inmunorreactivas se detectaron con un sustrato quimioluminiscente (ECL RPN2132, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) y se sometieron a análisis de densitometría en Fiji (Fiji is just imageJ).

## **RT-PCR.**

El ARN total se aisló con TRIzol (Núm. Cat. 15596-026, Life Technologies) y se determinó la cantidad de ARNm de las claudina-2 y -4 en el aparato LightCycler 2.0 (Roche, Basilea, Suiza) con el kit de ADN SYBR Green (Núm. Cat. 12158817001, Roche). El cADN se amplificó en 40 ciclos en una PCR de 3 pasos que incluye desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 59 °C por 30 segundos y elongación a 72 °C por 30 segundos. La expresión diferencial de las claudina-2 y -4 se calculó como una proporción normalizando con la expresión génica de la gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

## Bibliografía

---

- **Albregues J, Bertero T, Grasset E, Bonan S, Maiel M, Bourget I, Philippe C, Herraiz Serrano C, Benamar S, Croce O, Sanz-Moreno V, Meneguzzi G, Feral CC, Cristofari G, Gaggioli C. (2015).** Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat Commun.* 15;6:10204
- **Amasheh M, Fromm A, Krug SM, Amasheh S, Andres S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. (2010).** TNF $\alpha$ -induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NF $\kappa$ B signaling. *J Cell Sci* 123: 4145–4155.
- **Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. (2002).** Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115: 4969–4976.
- **Anderson JM, Van Itallie CM, Fanning AS. (2004).** Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol* 16: 140–145.
- **Aslam M, Ahmad N, Srivastava R, Hemmer B. (2012).** TNF- $\alpha$  induced NF $\kappa$ B signaling and p65 (RelA) overexpression repress Cldn5 promoter in mouse brain endothelial cells. *Cytokine* 57: 269–275.
- **Cereijido M (2001).** "Introduction". En: Tight Junctions. 2ª Edición (Cereijido, M. and Anderson, JM Eds) CRC Press. Boca Raton, Fl.
- **Cereijido M, Contreras RG, Shoshani L. (2004).** Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiol Rev.* 84(4): 1229-62.
- **Cereijido M, González-Mariscal L, Contreras RG, Gallardo JM, García-Villegas R, Valdés J. (1993).** The making of a tight junction. *J Cell Sci Suppl.*17: 127-32.
- **Cereijido M, Octavio R, Gonzalez-Mariscal L, Contreras RG, Balda MS, García-Villegas R. (1991).** The paracellular pathway: a small version of the kidney nephron. In: Audus KL, Raub TJ, editors. Biological Barriers to Protein Delivery. Boston, MA: Springer pp 3–10
- **Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. (2009).** Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science.* 325(5942): 834-40.
- **Claude P, Goodenough DA. (1973).** Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol.* 58(2): 390-400.

- **Cohen H, Lavu S, Bitterman K, Hekking B, Imahiyerobo T, Miller C, Frye R, Ploegh H, Kessler B, Sinclair D. (2004).** Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol. Cell* 13: 627–638.
- **Cohen T, Yao TP. (2004).** Ack-knowledge reversible acetylation. *Sci STKE*. 245: 42.
- **Colegio OR, Van Itallie C, Rahner C, and Anderson JM. (2003).** Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol*. 284: 1346–1354.
- **Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM. (2002).** Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: 142–147.
- **David M, Wong L, Flavell R, Thompson SA, Wells A, Larner AC, Johnson GR. (1996).** STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. *J Biol Chem* 271: 9185–9188.
- **Diamond JM. (1977).** Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist* 20: 10–18.
- **Dragsten PR, Handler JS, Blumenthal R. (1982).** Fluorescent membrane probes and the mechanism of maintenance of cellular asymmetry in epithelia. *Fed Proc*. Jan;41(1):48-53.
- **D'Souza T, Indig FE, Morin PJ. (2007).** Phosphorylation of claudin-4 by PKCepsilon regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *Exp Cell Res*. 313(15): 3364-75.
- **Epple HJ, Schneider T, Troeger H, Kunkel D, Allers K, Moos V, Amasheh M, Loddenkemper C, Fromm M, Zeitz M, Schulzke J.D. (2009).** Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients. *Gut* 58: 220–227.
- **Farquhar MG, Palade GE. (1963).** Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*. 17: 375-412.
- **Flores-Benítez D, Ruiz-Cabrera A, Flores-Maldonado C, Shoshani L, Cerejido M, Contreras RG. (2007).** Control of tight junctional sealing: role of epidermal growth factor. *Am J Renal Physiol*. 292(2): 828-36.
- **Frömter E, Diamond J. (1972).** Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat New Biol* 235: 9–13.

- **Fujibe M, Chiba H, Kojima T, Soma T, Wada T, Yamashita T, Sawada N. (2004).** Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp Cell Res.* 295(1): 36-47.
- **Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. (1998).** A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* 143(2): 391-401.
- **Gallardo JM, Hernández JM, Contreras RG, Flores-Maldonado C, González-Mariscal L, Cereijido M. (2002).** Tight junctions are sensitive to peptides eliminated in the urine. *J Membr Biol.* 188(1): 33-42.
- **García-Hernández V, Flores-Maldonado C, Rincon-Heredia R, Verdejo-Torres O, Bonilla-Delgado J, Meneses-Morales I, Gariglio P, Contreras RG. (2015).** EGF regulates claudin-2 and -4 expression through Src and STAT3 in MDCK cells. *J Cell Physiol.* 230(1): 105-15.
- **González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. (2003).** Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 81(1): 1-44.
- **Gonzalez-Mariscal L, Chávez de Ramírez B, Cereijido M. (1985).** Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol.* 86(2): 113-25.
- **Gonzalez-Mariscal L, Namorado MDC, Martin D, Sierra G, Reyes JL. (2006).** The tight junction proteins claudin-7 and -8 display a different subcellular localization at Henle's loops and collecting ducts of rabbit kidney. *Nephrol Dial Transplant* 21: 2391–2398.
- **Goodman RH, Smolik S. (2000).** CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* 14(13): 1553-77.
- **Guan X, Inai T, Shibata Y. (2005)** Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium. *Arch Histol Cytol.* 68(3): 213-25.
- **Günzel D, Yu AS. (2013).** Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 93(2) :525-69.
- **Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL. (2003).** Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci* 100(8): 4389-94.
- **Halder SK, Rachakonda G, Deane NG, Datta PK. (2008).** Smad7 induces hepatic metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 99: 957–965.



- **Hegel U, Frömter E, Wick T. (1967).** Transmural electrical resistance of the proximal convoluted rat kidney tubule. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere.* 294(4): 274-90.
- **Helman SI, Grantham JJ, Burg MB. (1971).** Effect of vasopressin on electrical resistance of renal cortical collecting tubules. *Am J Physiol.* 220(6): 1825-32.
- **Holliday R, Jeggo PA. (1985).** Mechanisms for changing gene expression and their possible relationship to carcinogenesis. *Cancer Surv.* 4(3): 557-81.
- **Honda H, Pazin MJ, Ji H, Wernyj RP, Morin PJ. (2006).** Crucial roles of Sp1 and epigenetic modifications in the regulation of the CLDN4 promoter in ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 28;281(30):21433-44.
- **Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S. (2010).** Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 18010–18015
- **Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang X, Yao T, (2002).** HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417: 455–458.
- **Ikari A, Atomi K, Takiguchi A, Yamazaki Y, Miwa M, Sugatani J. (2009).** Epidermal growth factor increases claudin-4 expression mediated by Sp1 elevation in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 384(3) :306-10.
- **Ikari A, Sato T, Watanabe R, Yamazaki Y, Sugatani J. (2012).** Increase in claudin-2 expression by an EGFR/MEK/ERK/c-Fos pathway in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochim Biophys Acta.*1823(6):1110-8.
- **Ikari A, Fujii N, Hahakabe S, Hayashi H, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Endo S, Matsunaga T, Sugatani J. (2015).** Hyperosmolarity-Induced Down-Regulation of Claudin-2 Mediated by Decrease in PKC $\beta$ -Dependent GATA-2 in MDCK Cells. *J Cell Physiol.* 230(11): 2776-87.
- **Kapus A, and Szászi K (2006).** Coupling between apical and paracellular transport processes. *Biochem. Cell Biol.* 84: 870–880.
- **Kawaguchi Y, Kovacs J, McLaurin A, Vance J, Ito A, Yao T. (2003).** The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115: 727–738.
- **Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S. (2002).** Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13: 875–886.

- **Koefoed-Johnsen V, Ussing HH. (1985).** The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand.* 42(3-4): 298–308.
- **Lee KK, Workman JL. (2007).** Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(4): 284–95.
- **Lee SJ, Li Z, Litan A, Yoo S, Langhans SA. (2015).** EGF-induced sodium influx regulates EGFR trafficking through HDAC6 and tubulin acetylation. *BMC Cell Biol.* 2015 18:16-24.
- **Li H, Singh S, Gorantla S, Potula R, Persidsky Y, Poluektova L, Kanmogne GD. (2012).** Dysregulation of claudin-5 in HIV-induced interstitial pneumonitis and lung vascular injury: protective role of PPAR- $\gamma$ . *Am J Respir Crit Care Med.*
- **Li J, Zhuo M, Pei L, Yu AS. (2013).** Conserved aromatic residue confers cation selectivity in claudin-2 and claudin-10b. *J Biol Chem.* 288(31): 22790-7.
- **Liu L, McBride KM, Reich NC. (2005).** STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- $\alpha$ 3. *Proc Natl Acad Sci* 102: 8150–8155
- **Liu N, He S, Ma L, Ponnusamy M, Tang J, Tolbert E, Bayliss G, Zhao TC, Yan H, Zhuang S. (2013).** Blocking the class I histone deacetylase ameliorates renal fibrosis and inhibits renal fibroblast activation via modulating TGF- $\beta$  and EGFR signaling. *PLoS One.* 8(1): 54001.
- **Malnic G, Giebisch G. (1972).** Some electrical properties of distal tubular epithelium in the rat. *Am J Physiol.* 223(4): 797-808.
- **Masaki T, Kojima T, Okabayashi T, Ogasawara N, Ohkuni T, Obata K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Hirakawa S, Fuchimoto J, Ninomiya T, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. (2011).** A nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway via protein kinase C delta regulates replication of respiratory syncytial virus in polarized normal human nasal epithelial cells. *Mol Biol Cell* 22: 2144–2156, 2011.
- **McConkey DJ, White M, Yan W. (2012).** HDAC inhibitor modulation of proteotoxicity as a therapeutic approach in cancer. *Adv Cancer Res.* 116:131-63.
- **Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. (1999).** Claudin multigene family encoding fourtransmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci* 96: 511–516.
- **Muto S, Hata M, Taniguchi J, Tsuruoka S, Moriwaki K, Saitou M, Furuse K, Sasaki H, Fujimura A, Imai M, Kusano E, Tsukita S, Furuse M. (2010).** Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular

- permeability properties of renal proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(17): 8011-6.
- **Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH. (2002).** Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110: 775-787.
  - **Rall LB, Scott J, Bell GI, Crawford RJ, Penschow JD, Niall HD, Coghlan JP, (1985).** Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues, *Nature* 313: 228–231.
  - **Raptis L, Arulanandam R, Vultur A, Geletu M, Chevalier S, Feracci H. (2009).** Beyond structure, to survival: activation of Stat3 by cadherin engagement. *Biochem Cell Biol* 87: 835–843.
  - **Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ. (2006).** Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol*. 2006 Nov 7;16(21):2166-72.
  - **Reyes JL, Lamas M, Martin D, Namorado MDC, Islas S, Luna J, Tauc M, González-Mariscal L. (2002).** The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int* 62: 476–487.
  - **Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Gunzel D, Fromm M. (2010).** Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci* 123: 1913–1921.
  - **Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. (2003).** Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical Journal* 370(3): 737–749.
  - **Saxholm HJ, Pestana A, O'Connor L, Sattler CA, Pitot HC. (1982).** Protein acetylation. *Mol Cell Biochem*. 46(3): 129-53.
  - **Serrador J, Cabrero J, Sancho D, Mittelbrunn M, Urzainqui A, Sanchez-Madrid F. (2004).** HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity* 20: 417–428.
  - **Shiou SR, Singh AB, Moorthy K, Datta PK, Washington MK, Beauchamp RD, Dhawan P. (2007).** Smad4 regulates claudin-1 expression in a transforming growth factor-beta-independent manner in colon cancer cells. *Cancer Res* 67: 1571–1579.
  - **Shuai K, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Sadowski HB, Gilman MZ, Darnell JE. (1993).** Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature*. 366(6455):580-583.

- **Silva CM. 2004.** Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 23: 8017–8023.
- **Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP. (1999).** Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science*. 285(5424): 103-6.
- **Singh AB, Harris RC. (2004).** Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*. (5): 3543-52.
- **Skov O, Nexø E, Poulsen SS, Hansen HF, Kirkegaard P. (1984).** Renal origin of rat urinary epidermal growth factor. *Regul. Pept.* 10: 37–45
- **Snider NT, Omary MB. (2014).** Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15(3): 163-77.
- **Stone KP, Kastin AJ, Pan W. (2011).** NFκB is an unexpected major mediator of interleukin-15 signaling in cerebral endothelia. *Cell Physiol Biochem* 28: 115–124.
- **Suzuki H, Tani K, Tamura A, Tsukita S, Fujiyoshi Y. (2015).** Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. *J Mol Biol*. 427(2): 291-7.
- **Tatum R, Zhang Y, Lu Q, Kim K, Jeanson BG, Chen YH. (2007).** WNK4 phosphorylates ser(206) of claudin-7 and promotes paracellular Cl<sup>-</sup> permeability. *FEBS Lett*. 581(20): 3887-91.
- **Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001).** Multifunctional Strands in Tight Junctions. *Mol Cell Biol*. 2: 225-293.
- **Van Itallie CM, Gambling TM, Carson JL, Anderson JM. (2005).** Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci*. 118(7): 1427-36.
- **Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, Anderson JM. (2006).** Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol*. 291(6): 1288-99.
- **van Meer G, Simons K. (1986).** The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J*. 5(7): 1455-1464.

- **Varley CL, Garthwaite MA, Cross W, Hinley J, Trejdosiewicz LK, Southgate J. (2006).** PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation. *J Cell Physiol* 208: 407–417.
- **Varley CL, Southgate J. (2008).** Effects of PPAR agonists on proliferation and differentiation in human urothelium. *Exp Toxicol Pathol* 60: 435–441, 2008.
- **Wang L, Zhang X, Liu L, Cui L, Yang R, Li M, Du W. (2010).** Tanshinone II A down-regulates HMGB1, RAGE, TLR4, and NF-kappaB expression, ameliorates BBB permeability and endothelial cell function, protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res* 1321: 143–151.
- **Wang R, Cherukuri P, Luo J. (2005).** Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *J Biol Chem.* 280(12): 11528-34.
- **Yano T1, Matsui T, Tamura A, Uji M, Tsukita S. (2013).** The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J Cell Biol.* 2013 Nov 25;203(4):605-14.
- **Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. (1990).** Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem.* 265(28): 17174-9.
- **Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE. (2005).** Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science.* 307(5707):269-73.
- **Zhou W, Cao Q, Peng Y, Zhang QJ, Castrillon DH, DePinho RA, Liu ZP. (2009).** FoxO4 inhibits NF-kappaB and protects mice against colonic injury and inflammation. *Gastroenterology* 137: 1403–1414.