



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS
CON DOMINIOS PDZ EN CÉLULAS PRESENTADORAS DE
ANTÍGENO**

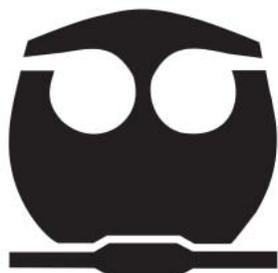
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

JESSICA LÓPEZ FLORES



MÉXICO, D.F

2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Enrique Ortega Soto

VOCAL: **Profesor:** Samuel Canizales Quinteros

SECRETARIO: **Dra. :** María Teresa Santos Mendoza

1er. SUPLENTE: **Profesor:** José Ignacio Páramo Ramírez

2° SUPLENTE: **Profesora:** Sonia Mayra Pérez Tapia

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL
COSÍO VILLEGAS”

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María Teresa Santos Mendoza

SUSTENTANTE:

Jessica López Flores

Índice

	Páginas
Índice	I
Abreviaturas y acrónimos	III
Resumen	1
1. Introducción	
1.1 Generalidades	2
1.2 Estructura	3
1.3 Función	5
1.4 Las proteínas PDZ como blanco de agentes patógenos	8
1.5 Las proteínas PDZ en células del sistema inmune	10
2. Hipótesis	13
3. Objetivos	
3.1 Objetivos generales	14
3.2 Objetivos particulares	14
4. Metodología	
4.1 Estandarización de la técnica de iF en células HeLa	
4.1.1 Cultivo de las células	15
4.1.2 Fijación, permeabilización y bloqueo	15
4.1.3 IF	16
4.2 IF en APC	
4.2.1 Obtención de PBMC's y purificación de monocitos	16
4.2.2 IF de monocitos	17

4.2.3 IF en DC	17
4.2.4 IF de MOS	18
5. Resultados	
5.1 Estandarización de la Inmunofluorescencia	19
5.2 IF en APC	22
6. Discusión	31
7. Conclusiones	37
8. Bibliografía	38

Abreviaturas y acrónimos

3x	Tres veces
Ac	Anticuerpo
Ad	Adenovirus humano
AF488	Alexa Flúor 488
Ag	Antígeno
APC	Células presentadoras de antígeno
APColi	Adenopoliposis coli
ASB	Albúmina sérica bovina
CT	Carboxilo terminal
DC	Células dendríticas
Dlg1	Disc Large 1
DMEM	Del inglés, Dulbecco's modification of Eagle's medium
GMSCF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GuK	Guanilato cinasa
HPV	Virus del papiloma humano
HTLV-1	Virus linfotrópico humano de células T tipo 1
IF	Inmunofluorescencia
iDC	Células dendríticas inmaduras.
IL 1 β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
LAP	LRR y dominio PDZ
LAPSD	Dominio específico LAP
LIM	Acrónimo de: L in11, I sl-1 y M ec-3
linB	Linfocitos B

linT	Linfocitos T
Lin27	Dominio de unión Lin2 y Lin7
LRR	Repeticiones ricas en leucina
mDC	Células dendríticas maduras
MAGI-1	Guanilato cinasa asociada a la membrana con arreglo invertido
MAGUKs	Guanilato cinasas asociadas a membrana
MeOH	Metanol
MOS	Macrófagos
NK	Del inglés Natural killers
NT	Amino terminal
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos
PDZ	Acrónimo de: P ostsynaptic density PSD-95, D isc-large y Z O-1
PDZbm	Motivo de unión a dominios PDZ
PFA	Paraformaldehído
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PH	Dominios de homología a plextrina
Phe	Fenilalanina
PRR's	Receptores de reconocimiento de patrones
PSD	Densidad postsináptica
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Del ingles Roswell Park Memorial Institute
Scrib	Scribble
Ser	Serina
SFB	Suero Fetal bovino
SH3	Dominio de homología con Src 3

SI	Sinapsis inmunológica
Snx3	Sorting nexin 3
TA	Temperatura ambiente
Thr	Treonina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
UA	Uniones adherentes
UE	Uniones estrechas

Resumen

Los dominios PDZ son módulos de interacción de proteínas que reconocen principalmente motivos cortos de aminoácidos en el extremo C-terminal de las proteínas blanco (PDZbm). Las proteínas con dominios PDZ regulan múltiples procesos biológicos tales como el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular, señalización intracelular, coordinación del tráfico de proteínas, migración celular dirigida, entre otros. Muchos patógenos, principalmente virales, producen proteínas con PDZbm y varios de ellos usurpan interacciones PDZ-dependientes del hospedero, induciendo alteraciones que favorecen su permanencia. Dada la importancia de las células presentadoras de antígeno (APC) en el inicio de la respuesta inmune antiviral, es probable que la función de proteínas con dominios PDZ sea blanco de un mecanismo de modulación por PDZbm virales. Observamos la expresión de las proteínas Dlg-1, Scrib y MAGI-1 en monocitos, células dendríticas (DC) y macrófagos (MOS). Identificamos cambios en la localización subcelular de estas proteínas dependiendo del tipo celular. En monocitos se localizan principalmente en citosol, mientras que en DC y MOS se localizan además en núcleo. También observamos cambios en los niveles de expresión dependiendo del estado de maduración de las células. Dlg-1 y Scrib se expresan más en DC maduras (mDC) y MAGI-1 se expresa más en DC inmaduras (iDC). Estos resultados sugieren un posible mecanismo de evasión de la respuesta inmune contra influenza en APC.

1.1 Generalidades

Las interacciones proteína-proteína son elementos clave en la construcción de complejos proteicos funcionales y están mediadas por dominios estructurales específicos. Estos dominios de interacción de proteínas pueden funcionar como andamiajes para complejos proteicos, dirigir proteínas a localizaciones subcelulares específicas, contribuir al reconocimiento de modificaciones post-traduccionales, especificidad de sustrato, entre otros (1). Se han identificado varios de estos dominios, por ejemplo: los SH3 (dominio de homología con Src 3) median interacciones intracelulares a través del reconocimiento de motivos con secuencias ricas en prolina; los SH2 (dominio de homología con Src 2) median localización celular, reclutamiento de sustrato y regulación de la actividad cinasa a través del reconocimiento de tirosina fosforilada; los PH (dominios de homología a plextrina) unen con alta afinidad y especificidad fosfoinosítidos que tienen un par de fosfatos adyacentes en su grupo de inositol y con menor especificidad aminoácidos (2,3). Los dominios de interacción más comúnmente encontrados en las proteínas humanas son los PDZ, identificados originalmente en las proteínas **PSD-95**, **Disc-large** y **ZO-1**, de ahí su abreviatura (4). Estos dominios se han encontrado en proteínas de bacterias, plantas, levaduras, insectos y mamíferos (2,5) y son altamente conservados filogenéticamente tanto en estructura como en función (4). Las proteínas con dominios PDZ pueden ser clasificadas en tres familias principales dependiendo de su organización modular. La primera familia incluye proteínas constituidas únicamente por dominios PDZ, las MAGUKs (Guanilato cinasas asociadas a membrana) constituyen la segunda familia y contienen dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio GuK (Guanilato cinasa) entre otros, y la tercera familia comprende proteínas que tienen dominios PDZ y otros dominios como los LIM (Del inglés: **Lin11**, **Isl-1** y **Mec-3**), L27 (Dominio de unión Lin2 y Lin7), PH, WW, LRR (Repeticiones ricas en leucina), etc. Se han identificado más de 400 proteínas con dominios PDZ en humanos (2).

1.2 Estructura

Los dominios PDZ son secuencias de 80-90 residuos de aminoácidos que se organizan estructuralmente en seis hojas β antiparalelas (β A a β F), una α -hélice corta (α A) y una α -hélice larga (α B) (Figura 1A) (6). Entre la hoja β B y la hélice α B se forma un bolsillo hidrofóbico, mediante el cual se da la interacción con sus proteínas blanco de forma específica (2,4). En esta interacción participa de manera relevante una secuencia altamente conservada localizada previo a la hoja β B: R/K-XXX-G- ϕ -G- ϕ (donde X es cualquier aminoácido y ϕ un aminoácido hidrofóbico) (4,6). La primer glicina de esta secuencia puede variar y ser reemplazada por serina (Ser), treonina (Thr) o fenilalanina (Phe) (6). Estos bolsillos hidrofóbicos reconocen principalmente, motivos cortos de aminoácidos en el carboxilo terminal (CT) de sus proteínas blanco, denominados motivos de unión a dominios PDZ (PDZbm). Los PDZbm se clasifican en al menos tres tipos con base en su secuencia, los tipo I: X(S/T)XV o X(S/T)XL, los tipo II: X ϕ X ϕ y los tipo III: X-D-X-V (donde X representa cualquier aminoácido y ϕ representa un aminoácido hidrofóbico) (Figura 1B). El aminoácido que se encuentra en el CT ocupa la posición 0 del PDZbm y hacia el amino terminal (NT) se tienen los aminoácidos -1,-2,-3, etc. (4). La especificidad del PDZbm está determinada principalmente por los aminoácidos en la posición 0 y -2 (7). Adicionalmente existen otras formas de interacción de los dominios PDZ como: el reconocimiento de motivos de péptidos internos (sólo si estos se presentan en estructura “ β -finger”; 8), dimerización PDZ-PDZ, y reconocimiento de lípidos (Figura 2; 2,9).

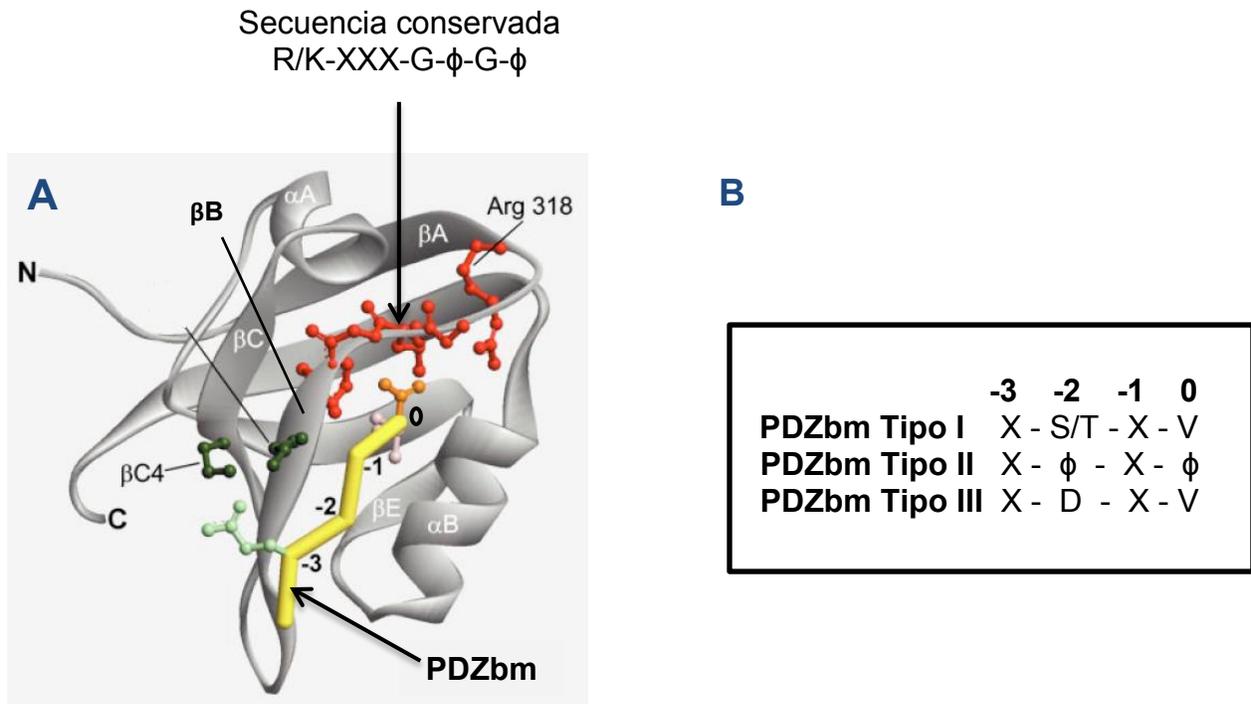


Figura 1. A. Estructura del dominio PDZ y su interacción con el PDZbm. En anaranjado se señala la secuencia conservada del bolsillo hidrofóbico y en amarillo se señala el PDZbm con sus aminoácidos en las posiciones -3,-2,-1 y 0. B. Tipos de PDZbm.

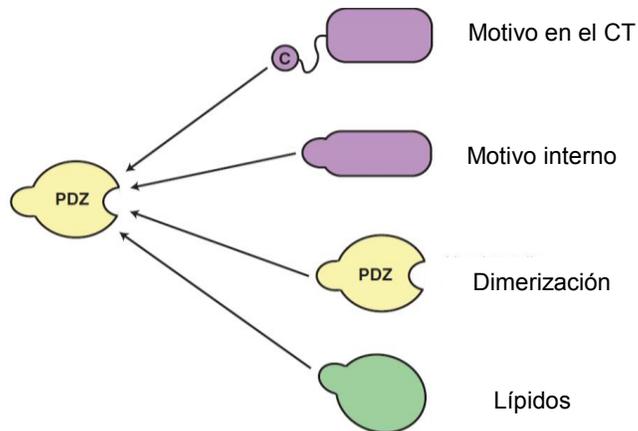


Figura 2. Formas de interacción del dominio PDZ.

1.3 Función

Las proteínas con dominios PDZ organizan complejos supramoleculares en localizaciones subcelulares específicas y están involucradas en la regulación de múltiples procesos biológicos, como el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular, señalización intracelular, coordinación del tráfico de proteínas, migración celular dirigidas, entre otros (4,7,9).

Entre las proteínas con dominios PDZ encontradas en varios tipos celulares están Dlg (Disc large), Scrib (Scribble) y MAGI-1 (Guanilato cinasa asociada a la membrana con arreglo invertido). Dlg y Scrib fueron identificadas originalmente como supresores de tumores neoplásicos en *Drosophila melanogaster*, en donde participan en una vía genética común para regular la polaridad celular apicobasal, control de proliferación celular, supervivencia y diferenciación (10,11). Dlg y Scrib se localizan en las uniones intercelulares, su función es altamente dependiente de su adecuada localización, y son altamente conservados filogenéticamente (Figura 3; 10,12,13).

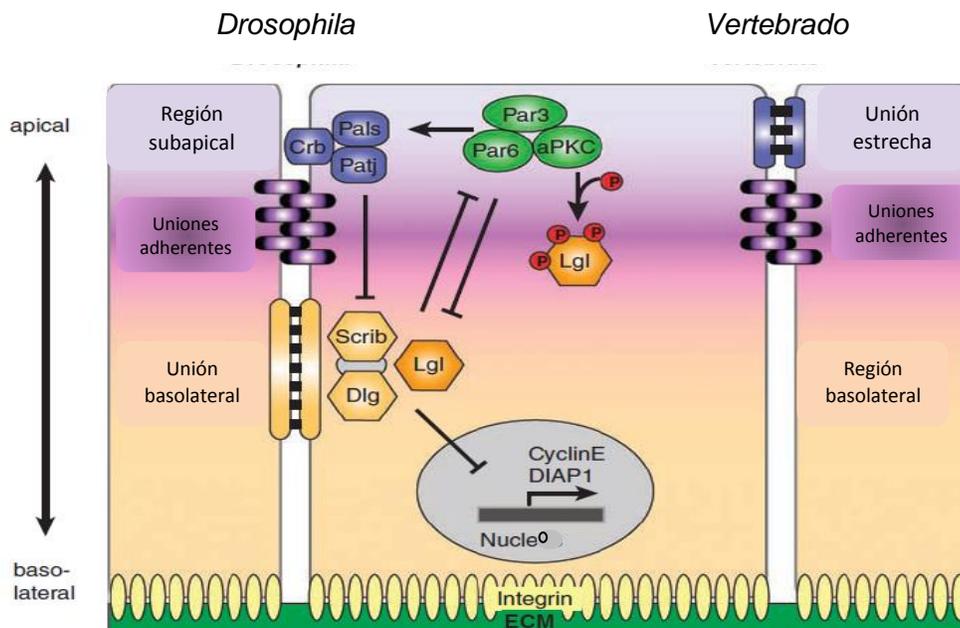


Figura 3. Complejos de proteínas con dominios PDZ en la unión de células epiteliales de *Drosophila* o mamíferos.

Dlg pertenece a la familia de las MAGUKs, un grupo altamente conservado de proteínas que se localizan en las regiones de contacto célula-célula, uniones intercelulares en células epiteliales y uniones sinápticas en neuronas (14–16).

El ortólogo de Dlg en humanos se denomina hDlg1 o Dlg1, está conformado por un dominio L27, tres dominios PDZ, un dominio SH3, un dominio HOOK, y un dominio GuK, (Figura 4; 12). En mamíferos los ortólogos de Dlg (Dlg1-Dlg5) se identificaron por primera vez en tejidos neuronales, posteriormente se observó que se expresa en una variedad de tejidos no neuronales, incluyendo las células epiteliales y linfocitos (lin) T y linB (13,17). Dlg1 participa en el tráfico vesicular en las vías endocítica o exocítica, dependiendo del contenido vesicular y del tipo de célula (18). En la vía exocítica participa en la clasificación, transporte, unión y fusión de vesículas, y en la endocítica en la internalización (18). Dlg1 también regula negativamente la proliferación celular, a través de la interacción de su 2do dominio PDZ con el PDZbm de la proteína supresora de tumores adenopolirosis coli (APCColi; Figura 5; 19).

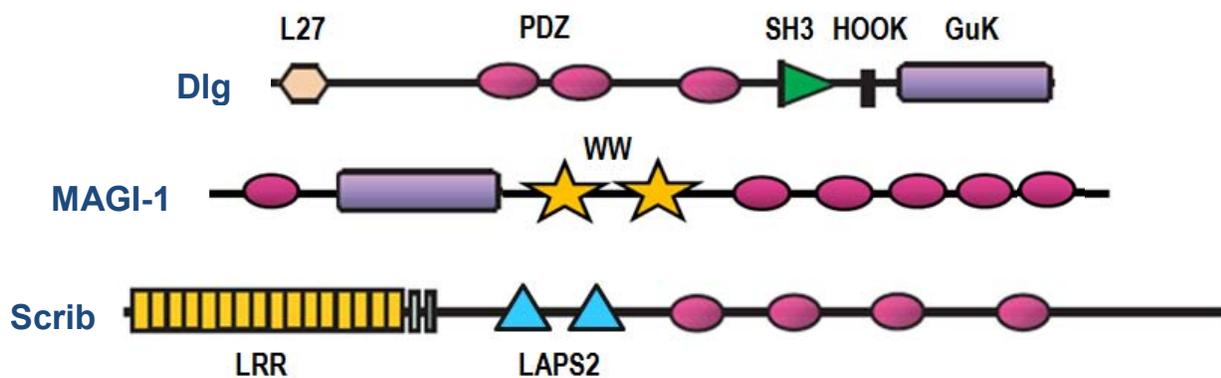


Figura 4. Estructura de las proteínas Dlg1, MAGI-1 y Scrib.

MAGI-1 también pertenece a la familia de las MAGUKs. Está conformada por un dominio Guk, dos dominios WW y seis dominios PDZ (Figura 4; 20). Esta proteína fue el primer miembro identificado de la subfamilia MAGI (MAGI-1, MAGI-2 y MAGI-3) y se localiza principalmente en membrana y citosol, aunque también se puede encontrar en núcleo (21). En células epiteliales, MAGI-1 estabiliza las uniones adherentes (UA), en complejo con β -catenina y E-cadherina (21). MAGI-1 ha sido identificada como una molécula proapoptótica y supresora de tumores, y la disminución en su expresión conduce a la proliferación celular al inhibir sus funciones (14,22). En etapas tempranas de la apoptosis MAGI-1 es escindida por las caspasas 3 y 7, esto ocasiona la pérdida de varias interacciones debilitando las uniones celulares, lo cual expone el núcleo de los complejos de adhesión al ataque proteolítico de las caspasas y provoca el desmantelamiento de las uniones celulares (14,23). Además, MAGI-1 a través de su dominio PDZ recluta a la fosfatasa PTEN a la proximidad de la cinasa Akt y, al desfosforilarla, inhibe su actividad antiapoptótica (24), molécula antiapoptótica y de regulación de señales de supervivencia en varios tipos celulares, incluyendo las células dendríticas (DC; 25,26).

En humanos el ortólogo de Scrib se denomina hScrib (10) y forma parte de la familia LAP (LRR y dominio PDZ). Esta proteína contiene 16 dominios LRRs, dos dominios LAPSD (dominio específico LAP) y cuatro dominios PDZ (Figura 4). Los miembros de la familia LAP están conservados desde *Drosophila* hasta humanos con respecto a su secuencia de aminoácidos primaria, localización subcelular (basolateral en células epiteliales o posináptica en neuronas) y arquitectura de la proteína, sugiriendo funciones biológicas conservadas (12).

En células epiteliales Scrib se localiza a lo largo de la membrana lateral, por debajo de las uniones estrechas (UE; Figura 3; 27), y regula polaridad, proliferación y apoptosis (12). También se ha identificado como un supresor de tumores y como una molécula proapoptótica que requiere una regulación fina. La disminución en su expresión o su deslocalización conducen a la pérdida de su función, inhibiendo la apoptosis y promoviendo la transformación celular (28).

Además de células epiteliales y neuronas, se ha observado la expresión de Dlg en tejidos del sistema inmune como bazo y timo (29). Particularmente Dlg1 y Scrib se expresan en linT y linB, ambas proteínas son importantes en la migración y señalización de linT durante la sinapsis inmunológica (SI;17,30). En linB Dlg1 es importante en respuestas de memoria (31). Probablemente estas proteínas tengan más funciones aún no caracterizadas en células del sistema inmune.

1.4 Las proteínas PDZ como blanco de agentes patógenos

Muchos patógenos, principalmente virales, producen proteínas con PDZbm que pueden usurpar interacciones PDZ-dependientes del hospedero, induciendo alteraciones que favorecen la permanencia de dichos patógenos (32). Estos PDZbm virales con frecuencia interactúan con los mismos o tipos similares de proteínas con dominios PDZ (32). El descubrimiento inicial de los PDZbm virales se realizó tras el estudio de tres oncoproteínas virales: E4-ORF1 de Adenovirus (Ad) humano 9, Tax del virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1) y E6 del virus del papiloma humano (HPV) (33–35). Dlg1 se identificó como la primera proteína blanco de estas oncoproteínas virales (10). El PDZbm de E6 de HPV interactúa con el segundo dominio PDZ de Dlg1, desplazando la interacción con APColi y promoviendo la degradación de Dlg1 por el proteosoma, lo que favorece la transformación celular (Figura 5; 10). Tax y E4-ORF1 también interactúan con Dlg1 y desplazan a APColi (10). Recientemente se ha descrito que E6 también puede interactuar con MAGI-1 y Scrib y promover su degradación por proteosoma (36).

En linT, la proteína Tax de HTLV-1 tiene como blanco a Scrib; esta interacción induce la deslocalización de Scrib a sitios subcelulares atípicos, lo que conduce a la entrada en ciclo celular y proliferación, promoviendo la transformación de los linT (37).

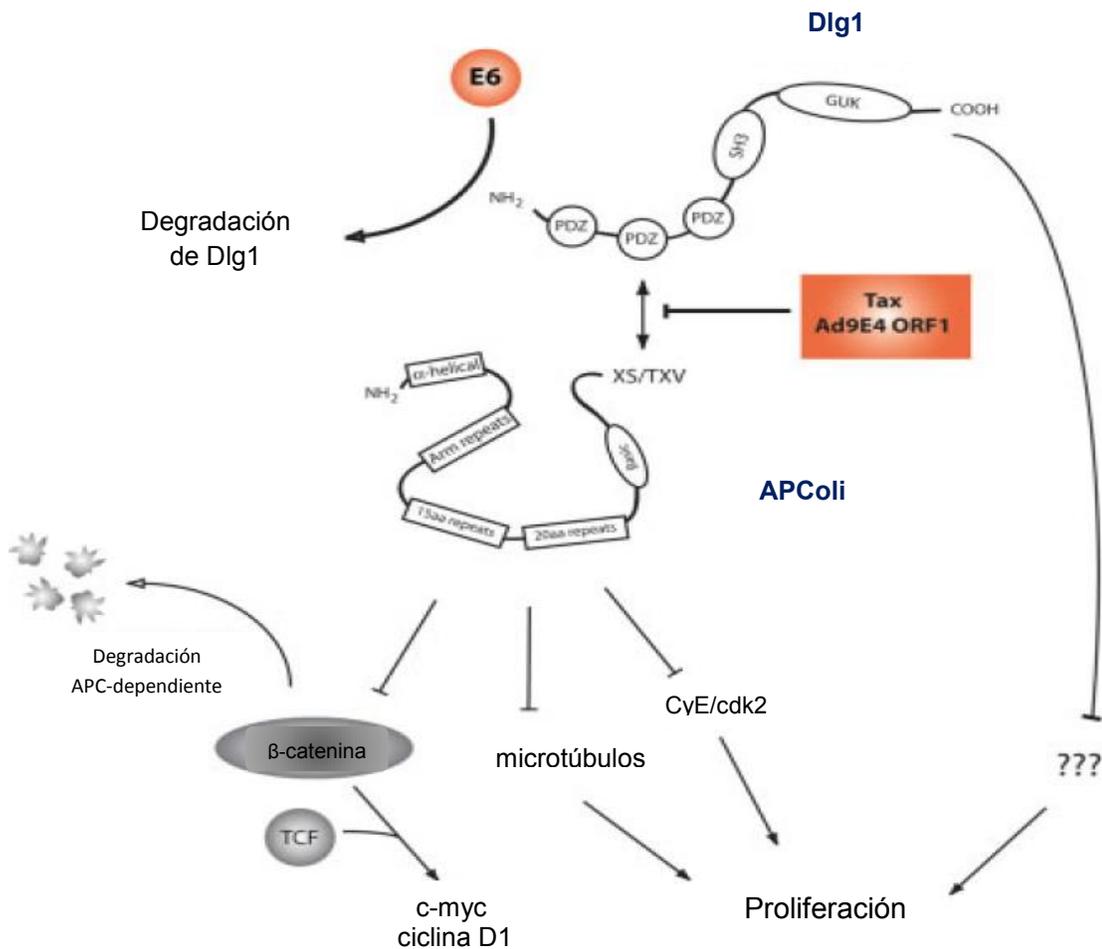


Figura 5. La interacción de Dlg1 con APColi es desplazada por diferentes oncoproteínas virales que se unen a Dlg1 en una manera PDZ-dependiente. La interacción de la proteína E6 de HPV con Dlg1 induce su degradación por el proteosoma.

En años recientes se ha encontrado que virus no transformantes como el virus de la influenza A, virus de la rabia y virus del dengue también codifican PDZbm's (32,38). La mayoría de éstos tienen mecanismos que coinciden con los descritos para los PDZbm de virus oncogénicos, promueven la degradación por el proteosoma de sus proteínas blanco o las secuestran en estructuras subcelulares atípicas lo que favorece la replicación o diseminación del virus (32).

En la Figura 6 se ilustra la localización de los complejos de proteínas PDZ Crumbs, PAR3 y Dlg-Scrib en una célula epitelial polarizada y se indican los virus que expresan PDZbm's y que tienen a estas proteínas como blanco, mostrando que Dlg, Scrib y MAGI-1 son blancos comunes de diferentes virus.

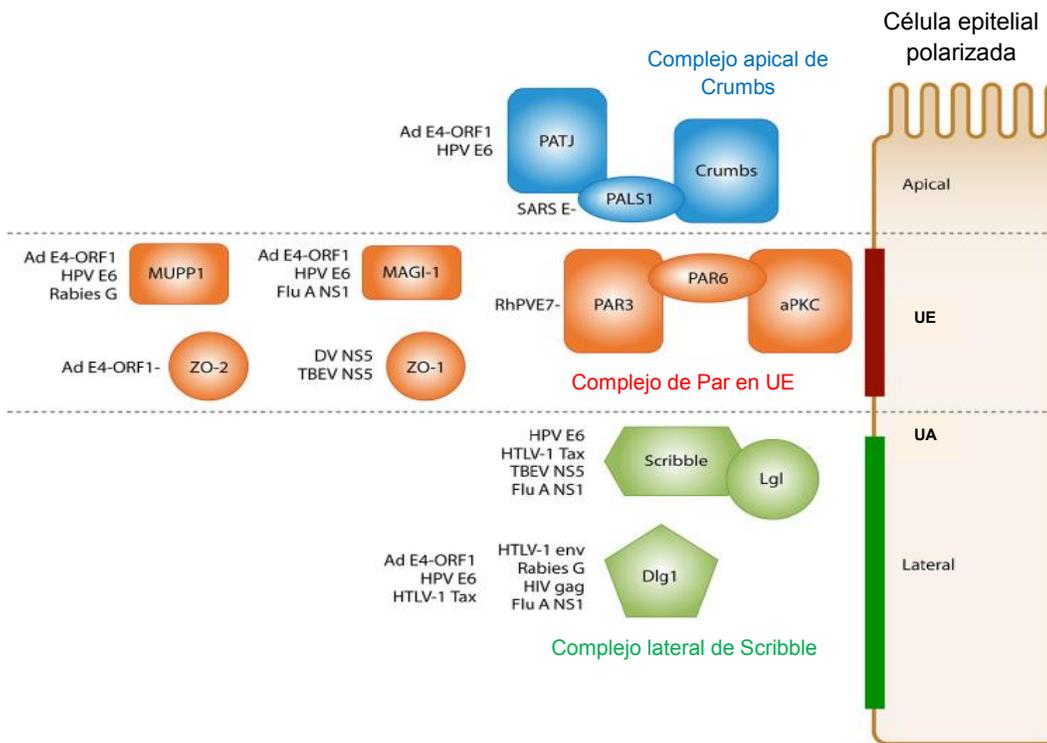


Figura 6. Las proteínas con dominios PDZ involucradas en el establecimiento de la polaridad celular son blanco de diferentes virus. (UE, uniones estrechas; UA, uniones adherentes; Ad, adenovirus; DV NS5, NS5 de virus dengue; Rh, rhesus).

1.5 Las proteínas PDZ en células del sistema inmune

El sistema inmune tiene la propiedad de diferenciar lo propio de lo extraño y montar una respuesta protectora hacia agentes patógenos (39). El sistema inmune innato es la primera línea de defensa frente a los agentes extraños, a los que reconoce de manera independiente de antígeno (Ag) a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR's). Los principales componentes de la inmunidad innata son 1) barreras físicas y químicas, como el epitelio y las sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales; 2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos (MOS)), DC y células NK; 3) proteínas sanguíneas, incluidos miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación y 4) citocinas (39).

El sistema inmune adaptativo establece una respuesta Ag-específica y tiene la capacidad de recordar y responder de forma más intensa a exposiciones repetidas al mismo patógeno. Los principales componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos de secreción como los anticuerpos (Ac's) y citocinas (39).

Las células presentadoras de antígeno (APC; MOS y DC) son fundamentales para iniciar y mantener la respuesta inmune ya que son el puente entre la inmunidad innata y la adaptativa (39). Reconocen a los patógenos vía los PRR's y en respuesta los procesan y migran para presentar Ag's a los linT (40).

Los linT y los linB adquieren una polaridad funcional dada por la segregación organizada de moléculas específicas hacia diferentes sitios subcelulares, durante su migración, reconocimiento de Ag, "capping" de receptores, etc. (41). Se ha descrito la expresión de proteínas con dominios PDZ en linT y linB (17,31). En los linT Scrib es importante para regular la morfología y mantener la SI y, junto con Dlg1 son importantes en la formación del urópodo durante la migración (17). Por otra parte, Dlg1 se asocia al receptor IgG en los linB, haciendo más eficiente la señalización, lo cual es importante en las respuestas de memoria (31).

En APC poco se sabe de la expresión de proteínas con dominios PDZ, sólo en DC se ha descrito la expresión de una proteína con dominios PDZ denominada espinofinlina, la cual es reclutada al sitio de la SI durante la presentación antigénica y es importante para que este proceso sea eficiente (42).

Varias proteínas virales poseen PDZbm que tienen como blanco proteínas con dominios PDZ del hospedero. Considerando que las APC son muy importantes para iniciar la respuesta inmune antiviral, es probable que exista un mecanismo de modulación de esta respuesta por los virus mediante la modificación de la función de proteínas con dominios PDZ. Dado que la localización subcelular de estas proteínas determina su función, nos interesa analizar su expresión y localización por inmunofluorescencia (IF).

2 Hipótesis

Los monocitos y las APC expresan las proteínas con dominios PDZ: Dlg1, MAGI-1 y Scrib.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

- Analizar la expresión y localización subcelular de las proteínas con dominios PDZ Dlg1, MAGI-1 y Scrib en monocitos y APC.

3.2 Objetivos particulares

- Estandarizar la técnica de IF para las proteínas Dlg1, MAGI-1 y Scrib en células HeLa.
- Analizar la expresión y localización subcelular de las proteínas Dlg1, MAGI-1 y Scrib en monocitos y APC mediante IF.

4.1 Estandarización de la técnica de IF en células HeLa

4.1.1 Cultivo de las células

Se cultivaron las células adherentes HeLa en botellas de cultivo T-25 o T-75 en medio DMEM (LONZA, Walkersville, MD USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, glutamina 200mM, penicilina 100U/mL y estreptomicina 100µg/mL (medio DMEM completo) y se mantuvieron a una confluencia de 80-90%. Para el subcultivo las células se lavaron con PBS y se incubaron con 2-4mL de tripsina (0.25%; LONZA, Walkersville, MD USA) por 6 min a 37°C y CO₂ 5% para desprenderlas. Para realizar la estandarización de la técnica las células se sembraron a una confluencia de aproximadamente 40% sobre cubreobjetos colocados en placas de cultivo de 24 pozos con 1mL de medio DMEM completo por pozo y se incubaron a 37°C y CO₂ 5% hasta una confluencia de aproximadamente 80%.

4.1.2 Fijación, permeabilización y bloqueo

Las células fueron fijadas con Metanol (MeOH) a -20 °C o Paraformaldehído (PFA, 2%) a temperatura ambiente (TA). Para la fijación con MeOH se quitó el medio de los pozos y se lavaron las células dos veces con 1mL de PBS, se añadió a cada pozo 500µL de MeOH enfriado a -20°C y se incubaron 4 min a TA con el objetivo de fijar y permeabilizar las células. Se lavaron las células con 1mL de PBS 2 veces y posteriormente se incubó 15 min a TA en solución de bloqueo (SFB 10%, ASB 3% en PBS). Se lavaron las células con solución de lavado e incubación (ASB 1% y Tritón x-100 0.1% en PBS) por 10 min 3 veces (3x), Para la fijación con PFA, se lavaron las células al igual que con MeOH y se incubaron 10 min a TA en 500 µL de PFA al 2%. Se lavaron las células con 1mL de PBS 2 veces y se incubó 15 min

a TA en solución de permeabilización y bloqueo (SFB 10%, ASB 3%, Tritón x-100 0.25% en PBS) y posteriormente se realizaron 3 lavados con la solución de lavado e incubación.

4.1.3 IF

Para la IF, las células fueron incubadas con los anticuerpos (Ac's) primarios (Ac 1°) anti-Dlg1 (SAP-97; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-MAGI-1 (H-70; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), o anti-Scrib (C-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por 1 hora a TA. Se lavaron 3x con 60µL de solución de lavado e incubación y se incubó 1 hora con el Ac secundario (Ac 2°) anti-rabbit-AF488 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA 19390 USA) en el caso de Dlg1 y MAGI-1 y anti-goat-AF488 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA 19390 USA) en el caso de Scrib (ambos Ac's diluidos 1:500). Se repitieron los lavados 3x. Finalmente, las preparaciones fueron montadas sobre portaobjetos con 4µL de medio de montaje Anti-fade (Biocare Medical, Concord, CA 94520 USA) sellando el perímetro del cubreobjetos con barniz de uñas transparente. Los resultados obtenidos fueron analizados en el microscopio confocal Olympus FluoView 1000.

4.2 IF en APC

4.2.1 Obtención de PBMC's y purificación de monocitos

Se usó un paquete leucocitario proveniente del banco de sangre del INER que inicialmente fue diluido 1:1 con PBS y posteriormente se estratificó sobre ficoll (linfoprep). Se centrifugó 25 min a 800g y 20°C con una aceleración de 9 y desaceleración de 1. Se recuperó la interfase que contiene a los PBMC's por aspiración en un tubo de 50mL, se aforó con PBS y se centrifugó 10 min a 1600rpm y 20°C. El sobrenadante fue desechado y se eliminaron los eritrocitos incubando 5 min a TA en solución de lisis (NH₄Cl 150mM, KHCO₃10mM, EDTA 0.1mM). Se lavó con PBS 15 min a 800 rpm y 20°C y se desechó el sobrenadante resuspendiendo posteriormente el botón celular en 20mL de PBS. Se contaron los PBMC's y se ajustó a 1x10⁸células/mL. Se añadieron 10mL de solución Miltenyi (PBS/EDTA 2mM/ SFB 0.5%) y se centrifugó 10 min a 300g y 4°C. El botón celular se resuspendió en 900µL de solución Miltenyi. Para el aislamiento de monocitos

(CD14⁺) se agregaron 100µL de perlas magnéticas anti-CD14 y se incubó en hielo por 15 min, resuspendiendo cada 5 min. Se añadieron 10mL de solución Miltenyi y se centrifugó 10 min a 300g y 4°C. El botón celular se resuspendió en 500µL de solución Miltenyi y se cargó en una columna sujeta a un magneto y previamente equilibrada con 3mL de solución Miltenyi. Se lavó 3 veces con 3mL de solución Miltenyi. Se eluyó la fracción positiva (CD14⁺) separando la columna del magneto y haciendo pasar 5mL de solución Miltenyi mediante presión con un émbolo. Se lavó con 10mL de solución de Miltenyi 10 min a 1600 rpm y 4°C. El botón celular fue resuspendido en 3mL de medio RPMI (LONZA, Walkersville, MD USA) adicionado con SFB 10%, glutamina 2mM, penicilina 100U/mL, y estreptomicina 100µg/mL (medio RPMI completo) para obtener una suspensión celular de monocitos purificados.

4.2.2 IF de monocitos

De la suspensión celular se tomaron 5×10^5 células, se ajustó a un volumen de 50µL y se colocó en el centro de un cubreobjetos previamente tratado con Poli-DL-Lisina (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO 63103 USA). Se incubaron 20 minutos a TA para permitir su adherencia. Se realizaron 2 lavados con 1mL de PBS. La fijación, permeabilización, bloqueo e IF se realizaron como se describe para las células HeLa usando el método con MeOH.

4.2.3 IF en DC

Plaqueo y diferenciación de DC

Se sembraron 5×10^6 monocitos en 6mL de RPMI completo en botellas T-25 y se diferenciaron con GMCSF (53ng/mL) e IL-4 (25ng/mL) en los días 1 y 4. En el día 6 se cosecharon como DC inmaduras (iDC) o se añadió un coctel de maduración: GMCSF (53ng/mL), IL-4 (25ng/mL), TNF-α (10ng/mL), IL 1β (10ng/mL) y PGE₂ (1µg/mL), y se cosecharon como DC maduras (mDC) 48 horas después. La

adquisición del fenotipo maduro se determinó con el aumento en la expresión de marcadores como MHC-II, CD80/CD86 y CD11c.

Cosecha y fijación de iDC y mDC

Las células se recuperaron por centrifugación (1600 rpm por 10 min y 20°C). El sobrenadante se retiró y se resuspendió el botón celular en RPMI completo ajustando a 3×10^5 células/60 μ L. Se colocaron 60 μ l de la suspensión celular anterior en el centro de un cubreobjetos previamente tratado con Poli-DL-Lisina (SIGMA-ALDRICH). Se incubó 20 minutos a TA y se realizaron 2 lavados con 1mL de PBS. Se realizó la fijación, permeabilización, bloqueo e IF como se describió para células HeLa empleando el método con MeOH.

4.2.4 IF en MOS

Plaqueo, diferenciación, cosecha y fijación de MOS

Se sembraron 1×10^6 monocitos/pozo en placa de 12 pozos con cubreobjetos en medio RPMI completo. Se diferenciaron con GMSCF (10ng/mL) en los días 1,3 y 6. En el día 9 se cosecharon como MOS. La fijación, permeabilización, bloqueo e IF se realizaron como se describe para las células HeLa usando el método con MeOH.

5.1 Estandarización de la IF

Estudios previos mostraron que la línea celular HeLa de carcinoma cervical expresa las proteínas con dominios PDZ Dlg1, MAGI-1 y Scrib (29), por lo que se realizó la estandarización de la IF en estas células. Para determinar que método de fijación mantenía mejor la morfología de las células se probaron dos métodos, uno con MeOH y otro con PFA (2%), y se realizó la IF con los Ac's Dlg1 y Scrib. En la figura 7 se observa la expresión de Dlg1 y se aprecia que hay diferencias en el patrón de expresión de esta proteína entre los dos métodos de fijación. Con MeOH (Figura 7A) la expresión de Dlg1 se muestra principalmente en citosol y en algunas células se aprecia expresión también en la membrana plasmática mientras que con PFA (Figura 7B) la expresión en algunas células parece estar tanto en citosol como en núcleo y en otras también en membrana. La tinción se ve más nítida en las células fijadas con MeOH y mantiene la morfología.

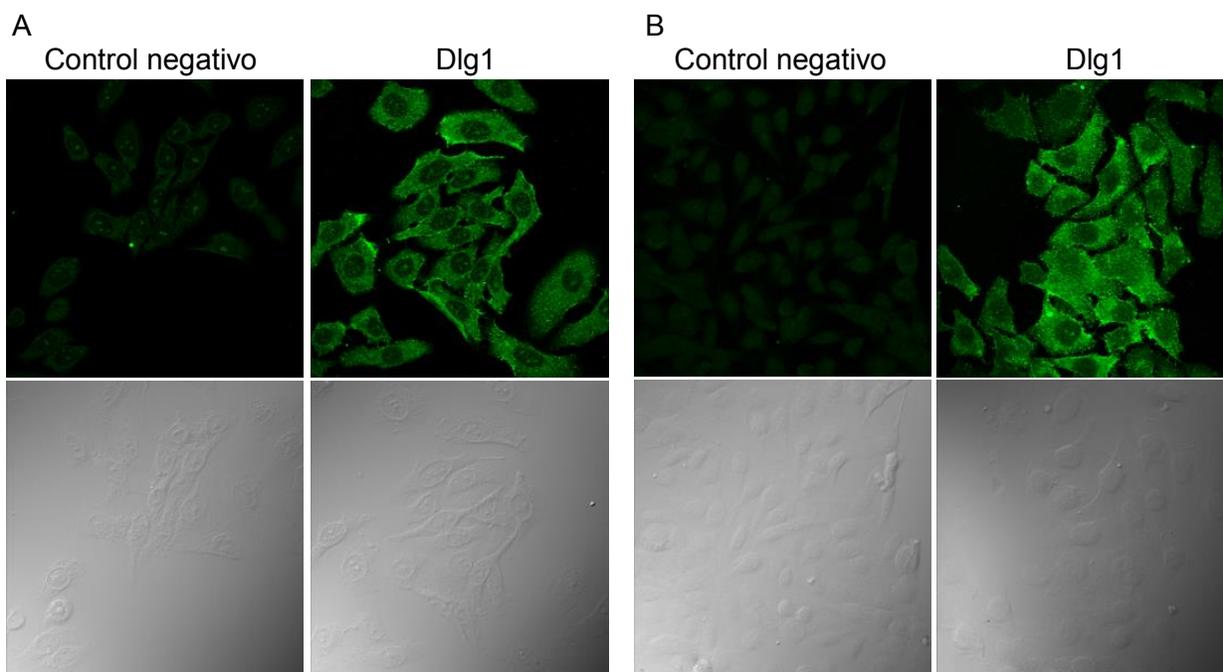


Figura 7. Expresión de la proteína Dlg1 en células HeLa con diferentes métodos de fijación. Células fijadas con (A) MeOH o (B) PFA. En el panel superior se muestra la expresión de Dlg1 o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo. En el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

En la figura 8 se observa la expresión de Scrib en células HeLa fijadas con MeOH o PFA y no se aprecian diferencias en la localización de la proteína o en la morfología de las células, aunque con PFA la monocapa de células es más confluyente. En ambos métodos de fijación Scrib tiene una localización principalmente en membrana citoplasmática.

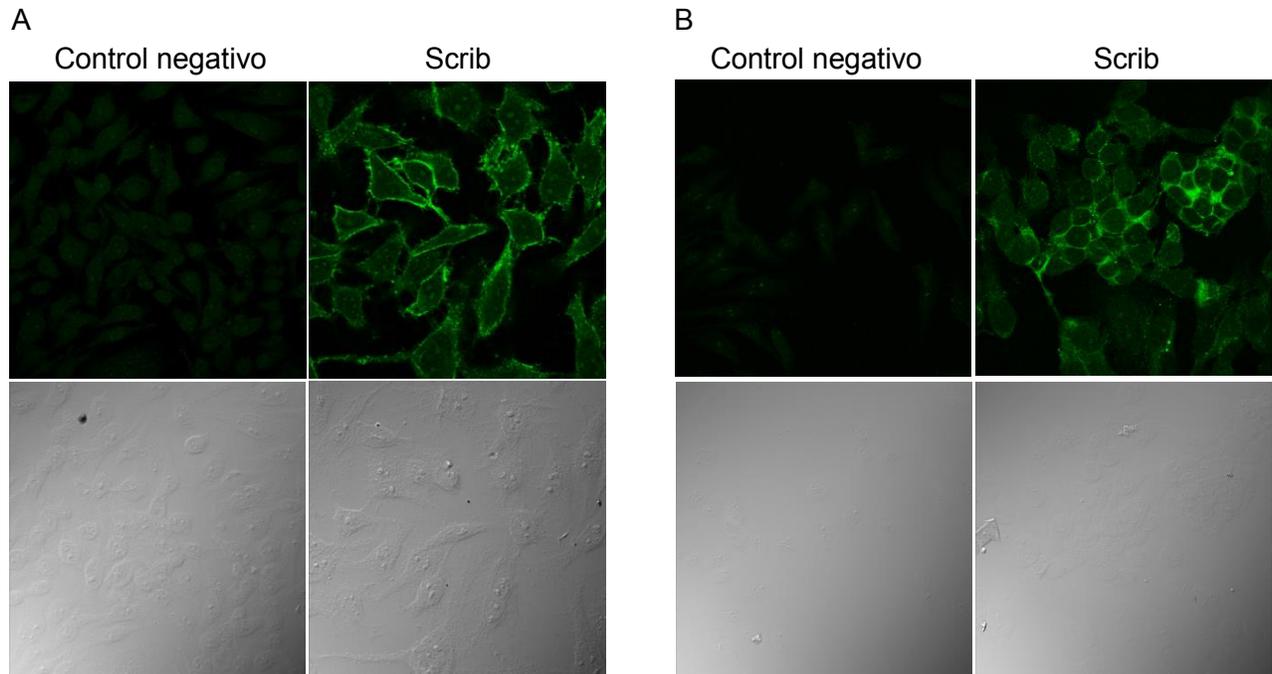


Figura 8. Expresión de la proteína Scrib en células HeLa con diferentes métodos de fijación. Células fijadas con (A) MeOH o (B) PFA. En el panel superior se muestra la expresión de Scrib o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo, en el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

Con base en estos resultados, se decidió utilizar MeOH para el resto de los experimentos, ya que mantiene la morfología de las células y nos da un menor fondo en las tinciones.

Se titularon los Ac's primarios para determinar a qué dilución la tinción era óptima. Los Ac's secundarios (anti-goat y anti-rabbit), se utilizaron a la dilución recomendada por el proveedor. En la figura 9 se observa la titulación del Ac que reconoce Dlg1.

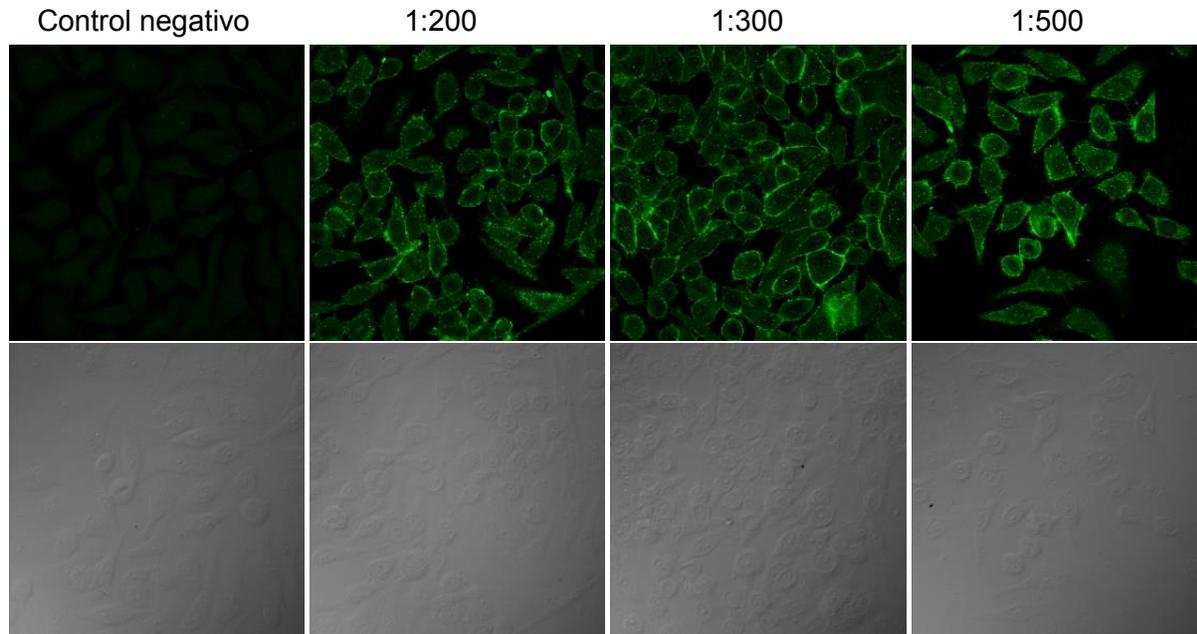


Figura 9. Titulación del Ac que reconoce Dlg1 en células HeLa. En el panel superior se muestra la expresión de Dlg1 a las diluciones indicadas o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo, en el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

En la figura 10 se observa la titulación del Ac que reconoce Scrib.

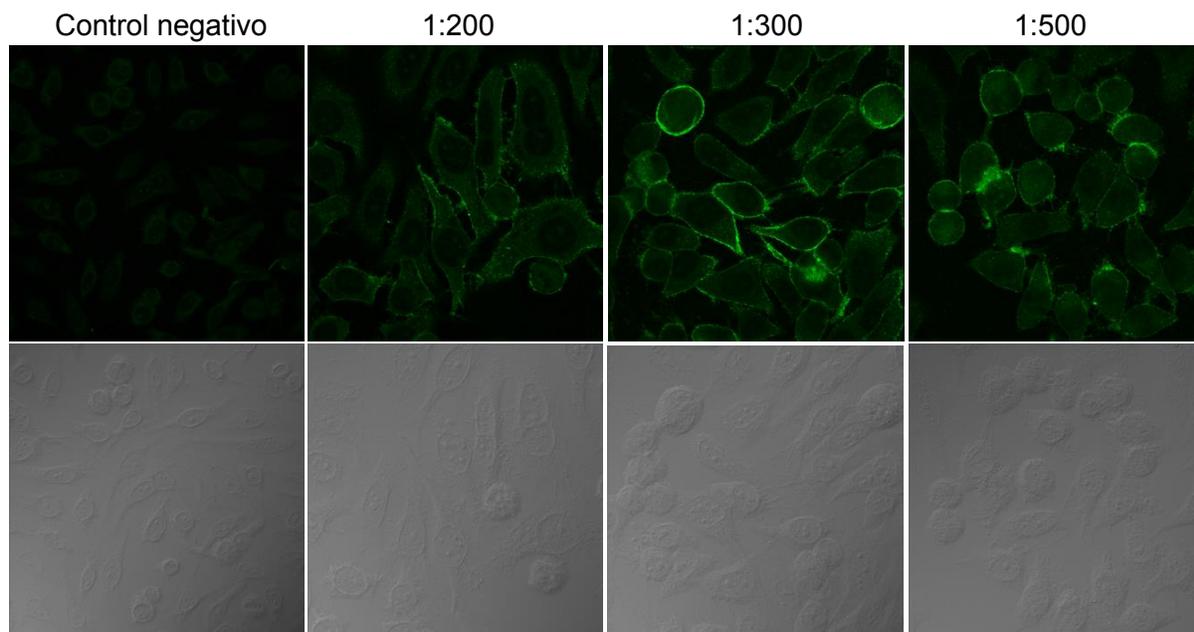


Figura 10. Titulación del Ac que reconoce Scrib en células HeLa. En el panel superior se muestra la expresión de Scrib a las diluciones indicadas o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo, en el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

En la figura 11 se observa la titulación del Ac que reconoce MAGI-1.

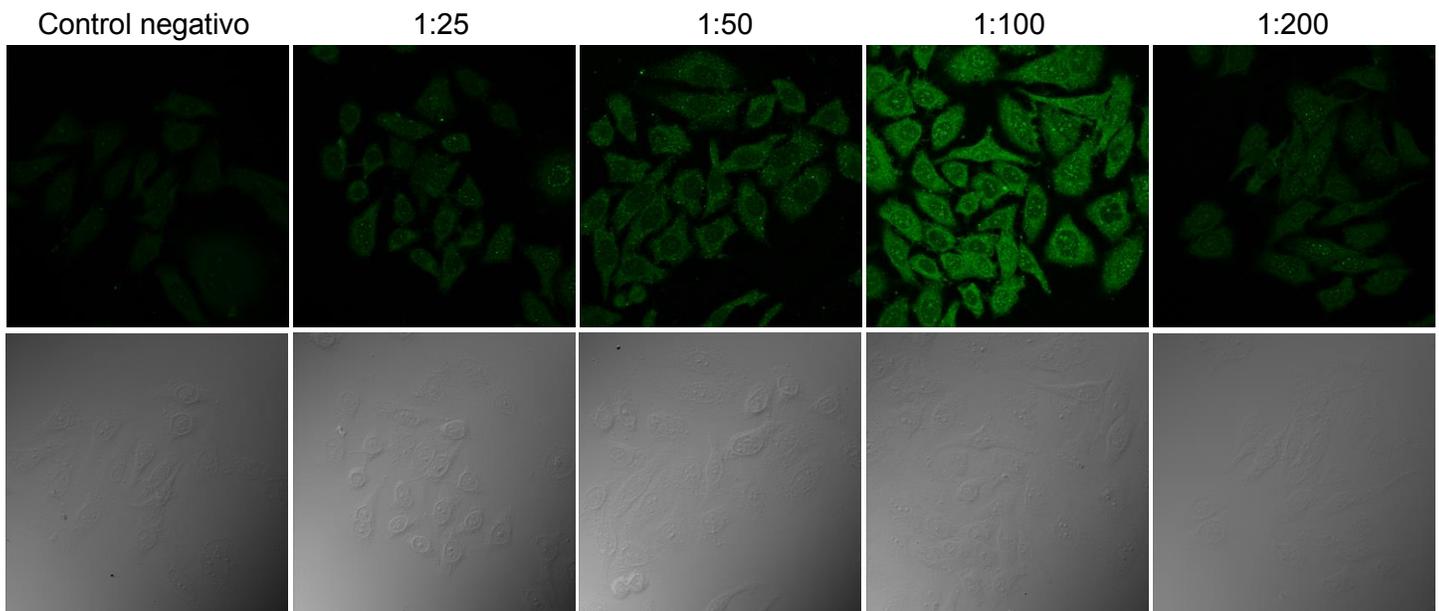


Figura 11. Titulación del Ac que reconoce MAGI-1 en células HeLa. En el panel superior se muestra la expresión de MAGI-1 a las diluciones indicadas o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo. En el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

Con base en los resultados obtenidos se decidió utilizar las siguientes diluciones de anticuerpos: 1:300 para Dlg1 y Scrib, 1:100 para MAGI-1 y 1:500 para los Ac's secundarios (anti-goat y anti-rabbit).

5.2 IF en APC

En la figura 12 se observa la expresión de la proteína Dlg1 en monocitos. La localización de esta proteína es principalmente citoplasmática, con un patrón "punteado" que sugiere una posible localización en vesículas.

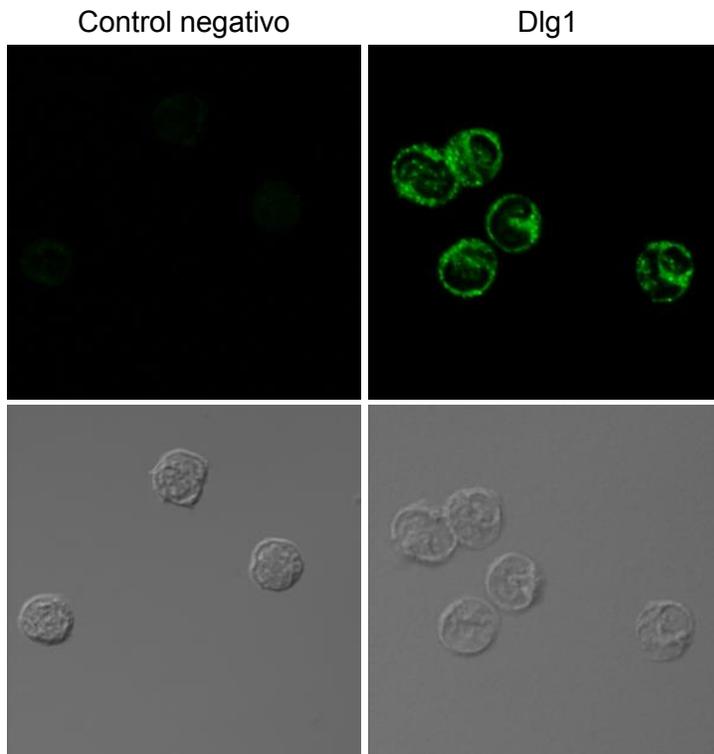


Figura 12. Los monocitos expresan Dlg1. En el panel superior se muestra la expresión de Dlg1 en monocitos (verde) o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo. En el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres

En la figura 13 se observa la expresión de Scrib en monocitos. La localización de esta proteína es predominantemente en citosol, con una posible localización en vesículas de mayor tamaño que las observadas en Dlg1.

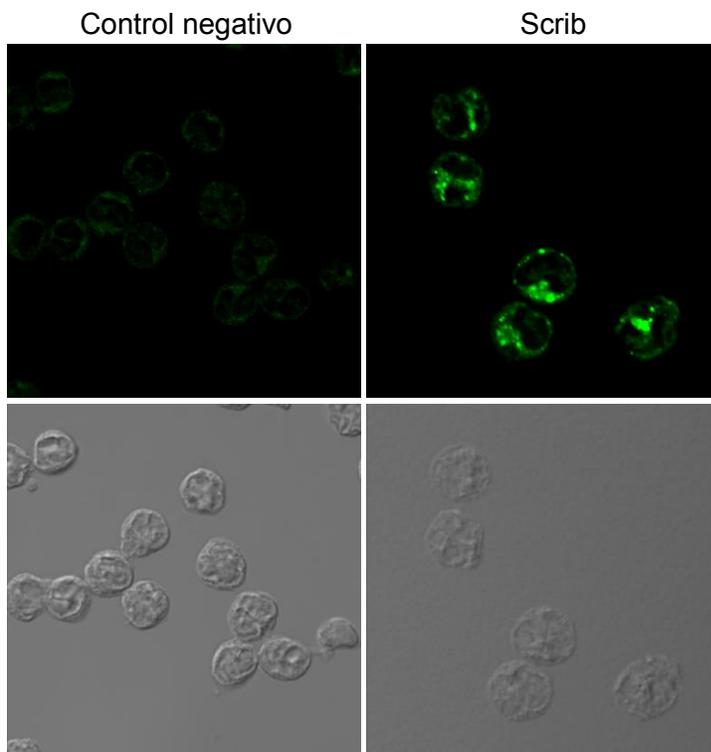


Figura 13. Los monocitos expresan Scrib. En el panel superior se muestra la expresión de Scrib en monocitos (verde) o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo. En el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

En la figura 14 se observa la expresión de MAGI-I en monocitos. La localización de esta proteína es predominantemente en citosol, con una posible localización en vesículas, igual que Scrib se observan vesículas de mayor tamaño que las de Dlg1.

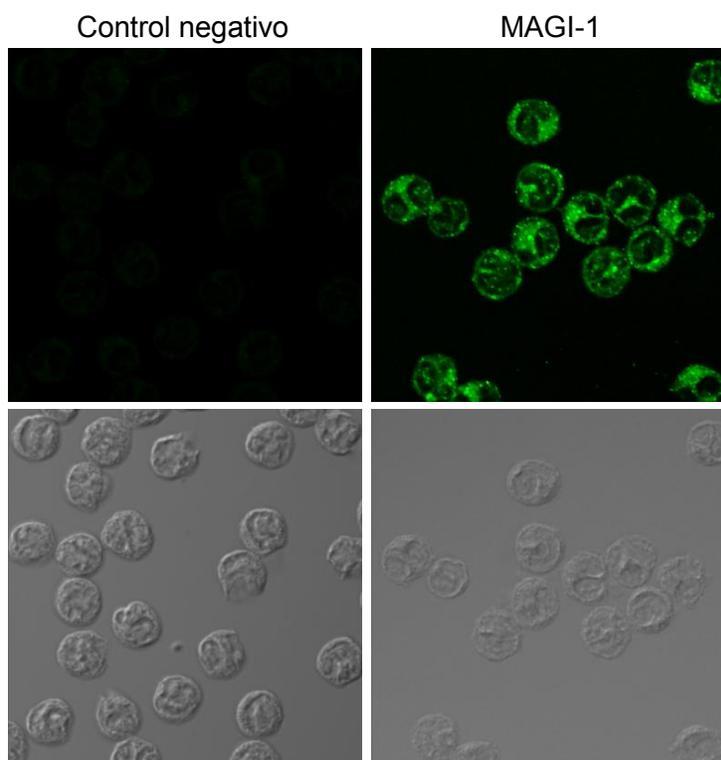


Figura 14. Los monocitos expresan MAGI-1. En el panel superior se muestra la expresión de MAGI-1 en monocitos (verde) o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo. En el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

En la Figura 15 se observa la expresión de Dlg1 en las células dendríticas inmaduras (iDC) y células dendríticas maduras (mDC). Dlg1 se localiza en núcleo, y en citosol en un patrón de tinción “punteado” similar al visto en monocitos, lo que sugiere una localización en vesículas citosólicas, y su expresión es mayor en las mDC que en las iDC.

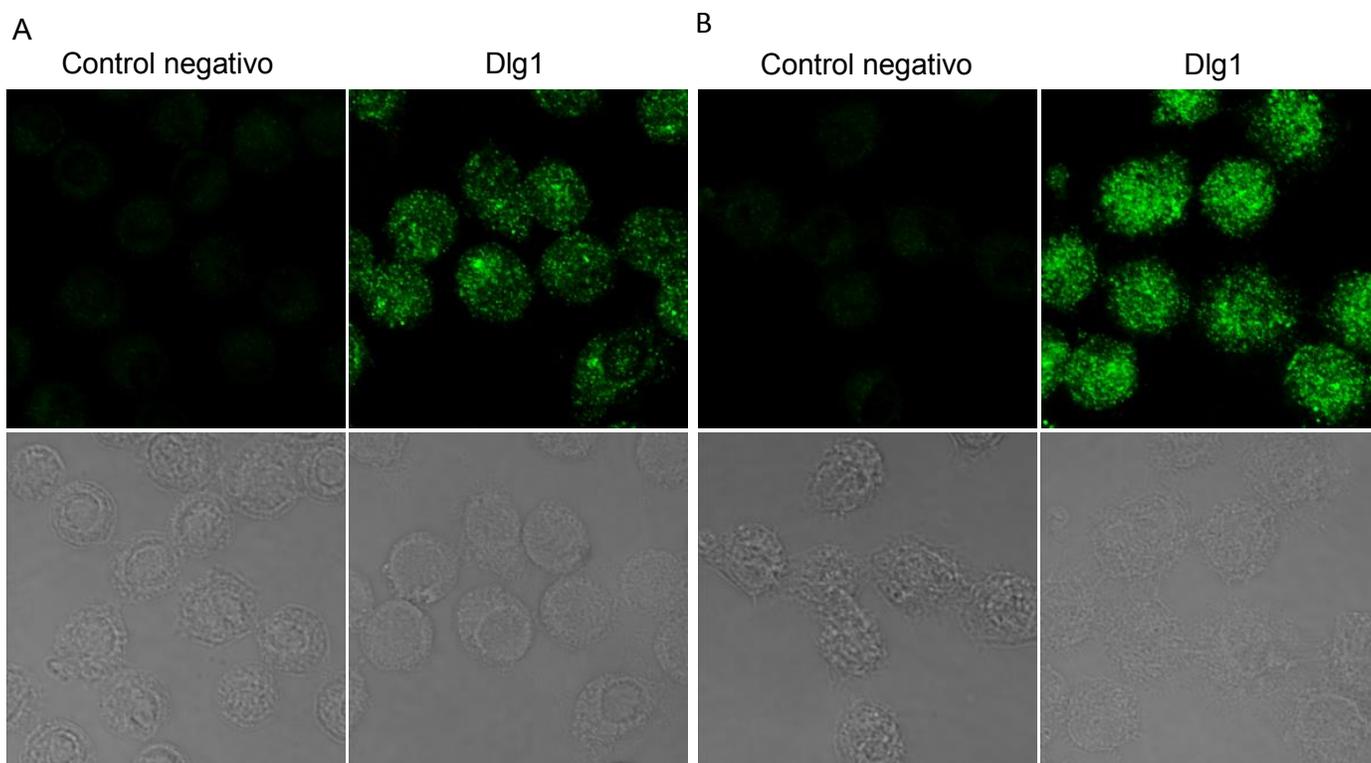


Figura 15. Las DC expresan Dlg1. IF de (A) iDC o (B) mDC para Dlg1 (verde) o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo. En el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

En la figura 16 se observa la expresión de la proteína Scrib tanto en iDC como en mDC. La expresión de Scrib en iDC se observa principalmente en citosol, aunque no es tan marcada como la de Dlg1. Sin embargo, en mDC hay una relocalización de la proteína hacia la membrana plasmática, además de un aumento en su expresión.

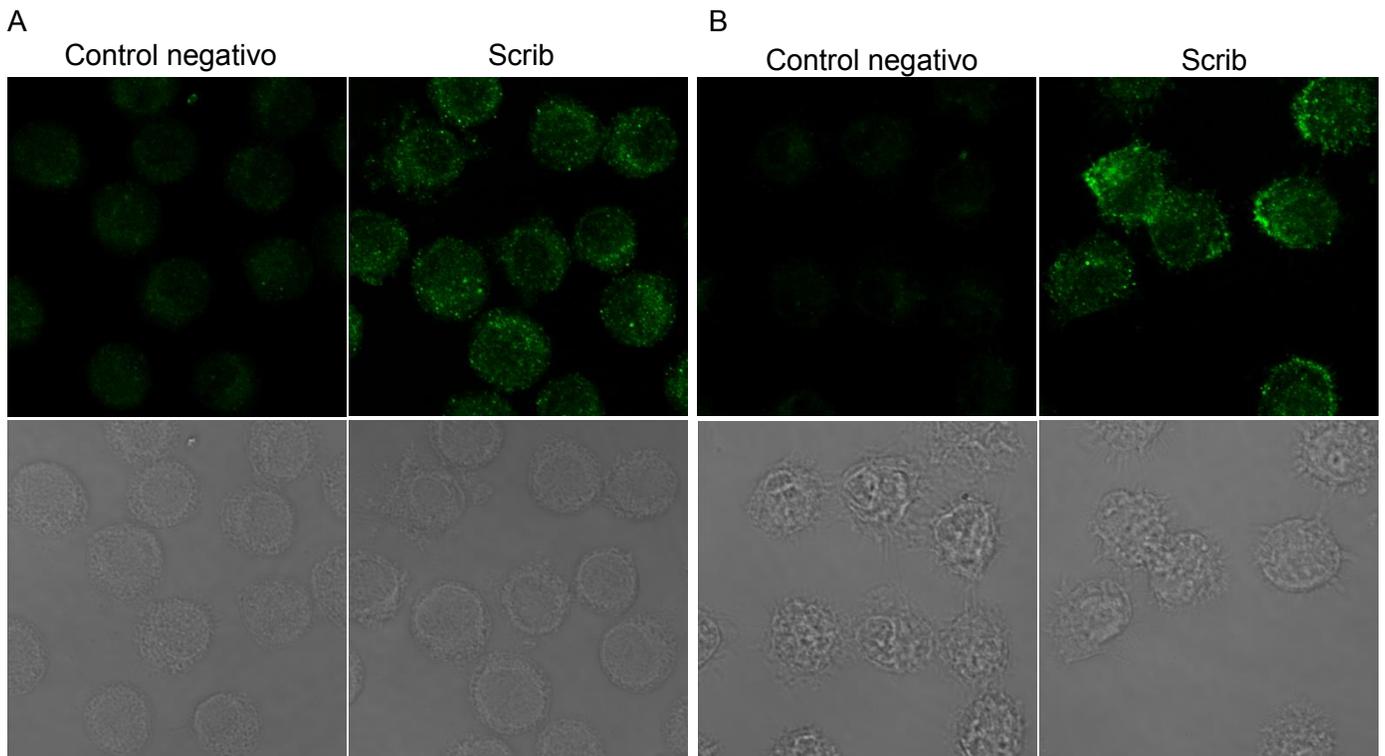


Figura 16. Las DC expresan Scrib. IF de (A) iDC o (B) mDC para Scrib (verde) o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo. En el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

En la figura 17 se observa la expresión de la proteína MAGI-1 en iDC y mDC. La localización de esta proteína es principalmente en citosol al parecer en vesículas por el patrón de tinción “punteado” observado. A diferencia de Dlg1, la expresión es mayor en las iDC que en las mDC.

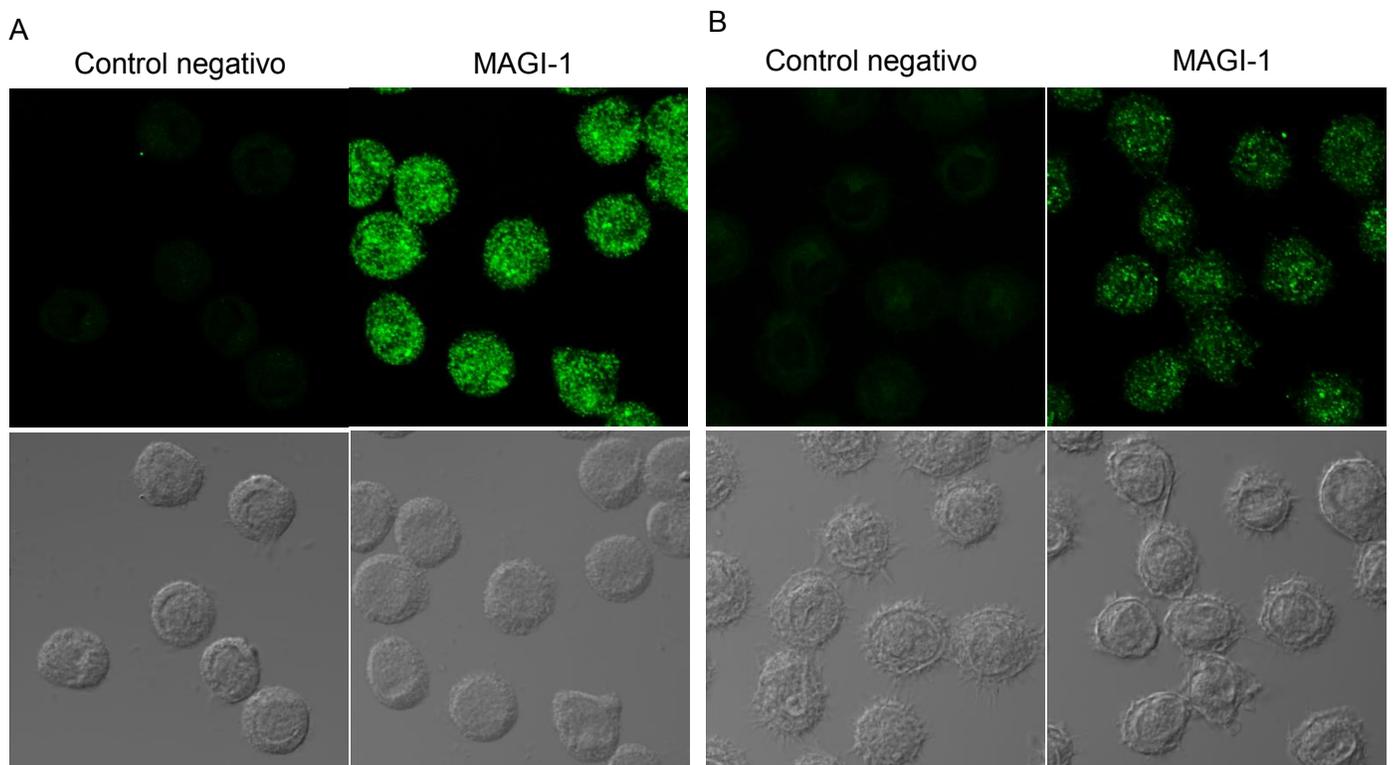


Figura 17. Las DC expresan MAGI-1. IF de (A) iDC o (B) mDC para MAGI-1 (verde) o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo. En el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

En la figura 18 se muestra la expresión de la proteína Dlg1 en MOS. La localización de esta proteína es en citosol y núcleo, y se observa un patrón de tinción “punteado” similar al visto en los otros tipos celulares que, como ya se mencionó, podría indicar localización en vesículas.

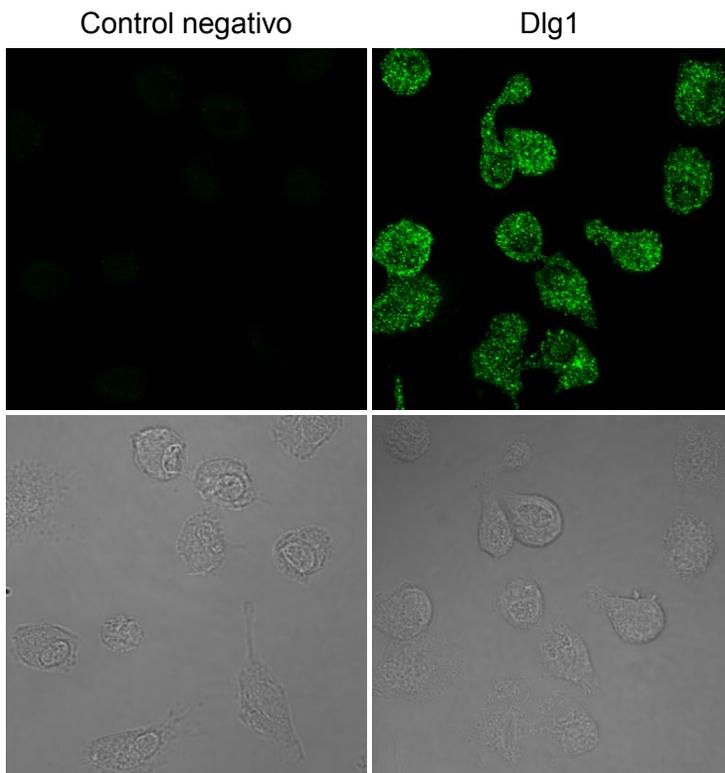


Figura 18. Los MOS expresan Dlg1. En el panel superior se muestra la expresión de Dlg1 en MOS (verde) o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo. En el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

En la figura 19 se muestra la expresión de Scrib en MOS. La localización de Scrib es principalmente citosólica, y también en membrana citoplasmática, sin embargo, la señal es menos intensa que la observada enDlg1 y MAGI-1.

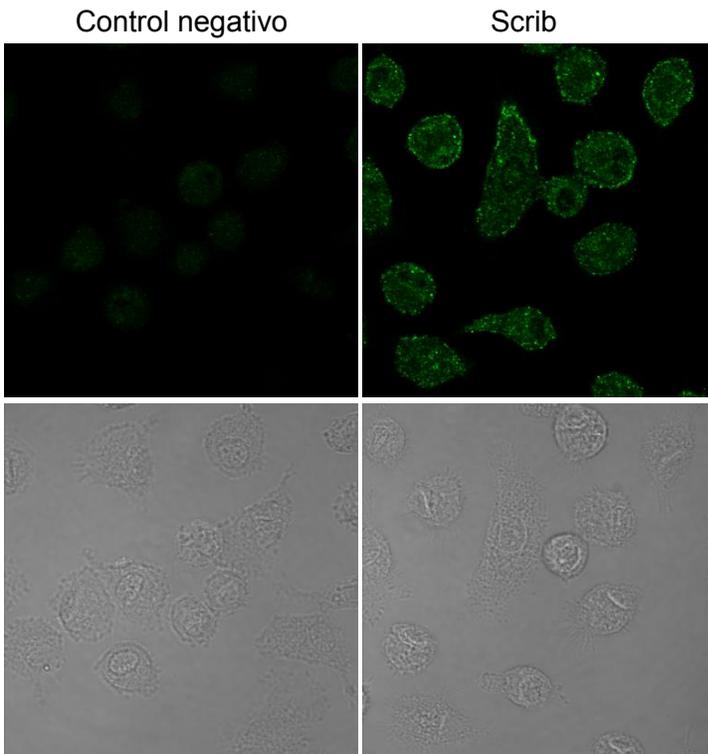


Figura 19. Los MOS expresan Scrib. En el panel superior se muestra la expresión de Scrib en MOS (verde) o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo. En el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

En la figura 20 se muestra la expresión de MAGI-1 en MOS. La localización de esta proteína es en citosol y en núcleo.

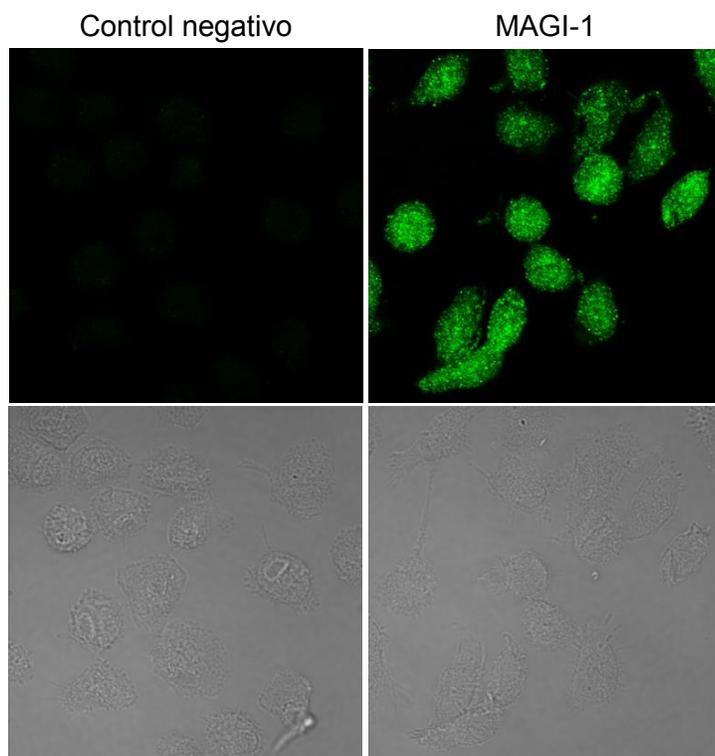


Figura 20. Los MOS expresan MAGI-1. En el panel superior se muestra la expresión de MAGI-1 en MOS (verde) o la tinción únicamente con Ac 2° como control negativo. En el panel inferior se muestran las células en campo claro. Imágenes representativas de 10 campos de al menos tres experimentos realizados.

6. Discusión

En este trabajo describimos que los monocitos, MOS y DC expresan las proteínas con dominios PDZ: Dlg1, Scrib y MAGI-1, cuya función ha sido muy estudiada en células polarizadas como las epiteliales y neuronas (12) y en menor medida en linT y lin B (17,31) pero no en APC. Estudios previos de nuestro grupo (datos no publicados) han descrito la expresión de estos genes en APC por RT-PCR, por lo que en este trabajo se analizó la expresión de estas proteínas por IF, para determinar su localización subcelular, ya que la función de estas proteínas está relacionada estrechamente con su localización.

Se estandarizó la IF para determinar el mejor método de fijación y las concentraciones óptimas de Ac. La fijación es un paso crítico en la preparación de muestras para ensayos de inmunotinción, y su elección depende de la naturaleza del epítipo del Ag que se examina y de las propiedades del Ac utilizado (43,44). El tratamiento de las muestras con fijadores químicos puede alterar la conformación de la proteína, o incluso destruir los epítipos, previniendo la unión de los Ac's a éstos (45), por lo que probamos dos métodos distintos de fijación de las células; uno con MeOH y otro con PFA. La morfología de las células HeLa teñidas con Dlg1 (Figura 7) se preservó independientemente del método de fijación, sin embargo, el patrón de expresión de Dlg1 presenta diferencias, con MeOH se observa principalmente en citosol, y con PFA se observa en citosol y núcleo. En las células teñidas con Scrib (Figura 8) no se observan cambios en la localización de la proteína ni en la morfología de la célula con respecto al método de fijación. Se decidió fijar las células con MeOH en experimentos subsecuentes ya que se observa una tinción con menos fondo, y la localización de Dlg1 y Scrib con este método de fijación coincide con la reportada en trabajos previos (46).

Otro punto importante en las inmunotinciones es la titulación de los Ac's. La cantidad de Ac puede ser insuficiente para evidenciar la unión Ag-Ac, o ser demasiada y provocar la saturación (47). La titulación nos permitió determinar la

concentración óptima de los Ac's con la que se obtiene la mayor señal positiva y el menor fondo. La proteína Dlg1 (Figura 9) no mostró cambios considerables en la señal entre las diluciones de Ac probadas, sugiriendo que las tres diluciones probadas caen en la zona de equilibrio Ag-Ac donde se observa la mayor señal, por lo que se eligió la dilución 1:300. En las tres diluciones de Ac probadas para Scrib se detecta una señal clara (Figura 10), por lo cual probablemente las tres se encuentran en la zona de equilibrio Ag-Ac, sin embargo, se eligió la dilución 1:300 porque representó el mejor balance entre intensidad y definición de la señal en comparación con las otras diluciones. MAGI-1 mostró la mayor variabilidad entre las diluciones de Ac probadas (Figura 11) y se eligió la dilución 1:100 porque es en donde se observó la mayor intensidad de la señal indicando que se encuentra en el punto más alto de la zona de equilibrio Ag-Ac.

Una vez estandarizada la IF en células HeLa, estas condiciones se usaron para la IF en monocitos, DC y MOS. El patrón punteado en la expresión de Dlg1, Scrib y MAGI-1 observada en los tres tipos celulares (monocitos, MOS y DC) nos sugirió la presencia de estas proteínas en vesículas citosólicas. En DC por ejemplo, la proteína Sorting nexin 3 (Snx3) tiene un patrón punteado similar al que observamos en las células analizadas; Snx3 se localiza en endosomas tempranos y fagosomas (48) y se usa como marcador de estos compartimientos. Estudios futuros, mediante co-tinciones, permitirán evaluar si la expresión de Dlg1, Scrib y MAGI-1 corresponde también con endosomas tempranos y fagosomas o con otro tipo de estructuras.

En monocitos se observaron unas vesículas de mayor tamaño con Scrib y MAGI-1 que con Dlg1 (Figuras 13 y 14), esto sugiere que podrían ser compartimientos diferentes u otro tipo de agregados, lo cual se determinará en estudios posteriores. Adicionalmente se observó que a diferencia de la expresión en monocitos (Figuras 12-14), en DC y MOS las proteínas Dlg1, Scrib y MAGI-1, se expresan también en núcleo (Figuras 15-17), además de la expresión citosólica. Nuestros experimentos parten de monocitos y, mediante la adición de citocinas, se inició un programa de diferenciación hacia DC o MOS. Es probable que la expresión observada en núcleo de Dlg1, Scrib y MAGI-1 en DC y MOS, pero no en monocitos, esté

relacionada con esta diferenciación, sugiriendo que en DC y MOS estas proteínas participan en alguna función que requiere su presencia en núcleo. En células epiteliales Dlg1 y MAGI-1 pueden tener una translocación activa entre citosol y núcleo (49,50). Dlg1 cambia su patrón de expresión durante el ciclo celular, por ejemplo, puede expresarse en citosol en la fase S y translocar a núcleo en la fase M, cuando es fosforilado por las cinasas CDK1 y CDK2 (49); MAGI-1 está presente en la membrana como parte de las uniones celulares, sin embargo, durante la apoptosis es escindida por caspasas y una fracción se relocaliza a núcleo (23,50). Sería interesante conocer el mecanismo que está regulando la localización en núcleo de estas proteínas en las APC y la función que tienen.

La mayoría de las estirpes celulares están polarizadas con orientaciones estructurales distintas, que corresponden con la segregación de diferentes moléculas a sitios subcelulares específicos y permiten a las células llevar a cabo funciones especializadas (polaridad funcional; 51,52).

Las células del sistema inmune no tienen una morfología estrictamente polarizada como las neuronas o células epiteliales, sin embargo, adquieren polaridades funcionales durante la migración, el reconocimiento antigénico, presentación antigénica o la secreción de citocinas, entre otros procesos (51,53).

Dlg1 y Scrib son parte de los complejos que regulan la polaridad en varios tipos celulares. En los linT están involucradas en la formación del urópodo y frente de avance durante la migración (17). Adicionalmente, durante el reconocimiento del Ag, Dlg1 y Scrib son reclutadas inicialmente a la SI y posteriormente ambas moléculas se relocalizan en el polo distal de la célula (17). Los mecanismos que ocurren durante la SI han sido muy estudiados en los linT pero no en las DC (26), sin embargo, moléculas presentes en los linT tienen una contraparte en las DC y deben reclutarse al sitio de la SI, en tanto que otras moléculas deben excluirse de la misma (26). En las iDC y mDC se observó la expresión de las tres proteínas analizadas (Figuras 15-17). Dlg1 y Scrib son reclutadas a sitios específicos durante la presentación antigénica en linT, por lo que es probable que en las mDC

sucedan algo similar. Esto plantea la posibilidad de estudiar el comportamiento y función de estas proteínas en las mDC cuando se establece la SI.

Dlg1 participa en el tráfico vesicular de varios tipos celulares, reclutando componentes de esta maquinaria a la membrana plasmática o a vesículas de transporte (18). Una función muy importante de las APC es la secreción de citocinas que son transportadas en vesículas al complejo de Golgi para su procesamiento, y posteriormente son cargadas en vesículas o transportadores para su liberación a la superficie de la célula u otros organelos (54). Estudios posteriores evaluarán la posible participación de Dlg1 en el tráfico vesicular de citocinas en DC y MOS en respuesta a estimulación de receptores.

Observamos un aumento en la expresión de Dlg1 cuando las DC maduran, es probable que esta proteína tenga un papel relevante en la presentación antigénica, ya que varias moléculas de co-estimulación como MHC II, CD80 o CD86 incrementan su expresión en las mDC favoreciendo dicho proceso. La espinofilina es una proteína con dominios PDZ que se expresa en DC y participa en la presentación antigénica (42). En las iDC la espinofilina se expresa con un patrón de tinción punteado, que se distribuye en toda la célula y es distinto al del MHC II, al de endosomas tardíos y al de lisosomas. En las mDC esta proteína se redistribuye cerca de la membrana plasmática y es reclutada al sitio de la SI durante la presentación de Ag, donde es importante para que el proceso sea eficiente (42). Se observó que Scrib, de manera similar a la espinofilina, tiene un patrón punteado en iDC y se relocaliza a la membrana plasmática cuando las células maduran (Figura 16), por lo que probablemente participa en la presentación antigénica, sin embargo, es necesario corroborarlo con otro tipo de estudios.

Cuando las DC maduran encienden varios mecanismos intrínsecos que las hacen más resistentes a estímulos proapoptóticos inducidos por receptores de muerte, células citotóxicas o ambos (26). Estos mecanismos son importantes durante la SI, y, una vez finalizado el proceso de presentación antigénica las mDC entran espontáneamente en un programa de apoptosis (26). Como se mencionó, Scrib es

una molécula proapoptótica que requiere una regulación fina, ya que su eliminación o su deslocalización son suficientes para anular sus funciones (28) conduciendo al bloqueo de la apoptosis, promoviendo la proliferación y transformación celular (28). El cambio observado en la localización subcelular de Scrib entre iDC y mDC, podría modular la apoptosis en las mDC, iniciando un programa celular que retarde este evento cuando establecen la SI, por lo que es necesario evaluar si este cambio puede estar inhibiendo su actividad proapoptótica.

MAGI-1 también es una molécula proapoptótica que se regula por mecanismos similares descritos para Scrib (14,22). Observamos una disminución en la expresión de MAGI-1 en mDC, por lo tanto es probable que este sea otro mecanismo de la célula para bloquear la apoptosis.

En resumen, en mDC observamos cambios en la localización de Scrib y disminución en la expresión de MAGI-1. Estos dos mecanismos podrían participar de forma complementaria en la inhibición de la apoptosis en mDC.

En MOS observamos la expresión novedosa de las proteínas Dlg1 y MAGI-1 en citosol y en núcleo (Figuras 18 y 20), y de Scrib que además se expresa en membrana citoplasmática (Figura 19). Los MOS son las principales células involucradas en la limpieza de los patógenos microbianos a través de su fagocitosis. Este proceso requiere la segregación y localización de componentes moleculares en sitios subcelulares específicos (55), es decir una polaridad funcional, en la que podrían estar involucradas Dlg1, MAGI-1 y Scrib. Los eventos de fisión y fusión de membranas mediados por el tráfico vesicular (56) podrían estar coordinados por Dlg1 durante la fagocitosis. Además, sería interesante investigar la participación de Dlg1 en la secreción de citocinas, de manera similar a las DC.

En MOS es probable que, Dlg1 y Scrib se recluten en sitios específicos no sólo durante la internalización de los patógenos, sino también en la presentación de Ag's y el establecimiento de una polaridad funcional, de tal manera que el patrón de expresión de Dlg1 y Scrib observado podría indicar una disponibilidad de proteína lista para ser reclutada a sitios específicos durante estos eventos.

Es importante recordar que en nuestro análisis se usaron MOS recién diferenciados que no recibieron estímulos de activación, sin embargo, sería importante analizar la modulación de la expresión y localización de Dlg1, Scrib y MAGI-1 ante un estímulo de activación, sobre todo considerando los cambios observados en la localización y expresión de estas proteínas tras la maduración de las DC.

Los PDZbm de proteínas virales usurpan los mecanismos que ocurren en las células de manera intrínseca para anular la función de las proteínas PDZ endógenas (32). El PDZbm de la proteína NS1 del virus de influenza A, prevalente en cepas aviarias (ESEV), tiene como blanco a Dlg1, MAGI-1 y Scrib en células epiteliales (38,57,58); la unión del PDZbm ESEV con Scrib y Dlg1 induce el desmantelamiento de las uniones estrechas en células epiteliales (38) y, la interacción con Scrib, además, resulta en la inhibición de su función proapoptótica, lo que le permite al virus seguir infectando células y diseminarse (58). Nosotros demostramos que Dlg1, Scrib y MAGI-1 también se expresan en DC y MOS, lo que representa un posible blanco para NS1 u otras proteínas virales con PDZbm, y un efecto potencial en la función de estas células indispensables en la iniciación y mantenimiento de la respuesta inmune del hospedero, lo que sugiere una gran relevancia de las interacciones PDZ-dependientes en la respuesta inmune.

La expresión de las proteínas con dominios PDZ (Dlg1, Scrib y MAGI-1) y los cambios en sus niveles de expresión o localización subcelular entre iDC y mDC, sugieren un papel para estas proteínas en las funciones de las APC. La expresión de Dlg1, Scrib y MAGI-1 como blanco potencial de proteínas virales en APC sugiere un mecanismo de evasión de la respuesta inmune. Este mecanismo proporcionaría nuevas opciones para futuras terapias.

7. Conclusiones

- ✓ La expresión novedosa de Dlg1, Scrib y MAGI-1 en APC indica un papel importante para las proteínas con dominios PDZ en la función de estas células.
- ✓ Los cambios en la expresión y localización de Dlg1, Scrib y MAGI-1 sugieren un papel importante en la presentación antigénica y apoptosis.
- ✓ La expresión de Dlg-1, Scrib y MAGI-1, que son blancos de proteínas virales, sugiere un posible mecanismo de evasión de la respuesta inmune en APC.

8. Bibliografías

1. Pawson T, Nash P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*. 2003 Apr 18;300(5618):445–52.
2. Nourry C, Grant SGN, Borg J-P. PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ*. 2003 Apr 22;2003(179):RE7.
3. Lemmon MA. Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem Soc Symp*. 2007;(74):81–93.
4. Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:1–29.
5. Ponting CP. Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci Publ Protein Soc*. 1997 Feb;6(2):464–8.
6. Lee H-J, Zheng JJ. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal CCS*. 2010 May 28;8:8.
7. Ye F, Zhang M. Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *Biochem J*. 2013 Oct 1;455(1):1–14.
8. Harris BZ, Lim WA. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci*. 2001 Sep 15;114(18):3219–31.
9. Chang BH, Gujral TS, Karp ES, BuKhalid R, Grantcharova VP, MacBeath G. A systematic, family-wide investigation reveals that ~30% of mammalian PDZ domains engage in PDZ-PDZ interactions. *Chem Biol*. 2011 Sep 23;18(9):1143–52.
10. Humbert P, Russell S, Richardson H. Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2003 Jun;25(6):542–53.
11. Woods DF, Hough C, Peel D, Callaini G, Bryant PJ. Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J Cell Biol*. 1996 Sep;134(6):1469–82.
12. Su W-H, Mruk DD, Wong EWP, Lui W-Y, Cheng CY. Polarity Protein Complex Scribble/Lgl/Dlg and Epithelial Cell Barriers. *Adv Exp Med Biol*. 2012;763:149–70.

13. Humbert PO, Grzeschik NA, Brumby AM, Galea R, Elsum I, Richardson HE. Control of tumourigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module. *Oncogene*. 2008 Nov 24;27(55):6888–907.
14. Gregorc U, Ivanova S, Thomas M, Guccione E, Glaunsinger B, Javier R, et al. Cleavage of MAGI-1, a tight junction PDZ protein, by caspases is an important step for cell-cell detachment in apoptosis. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. 2007 Feb;12(2):343–54.
15. González-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol*. 2000 Aug;11(4):315–24.
16. Albornoz V, Mendoza-Topaz C, Oliva C, Tello J, Olguín P, Sierralta J. Temporal and spatial expression of *Drosophila* DLGS97 during neural development. *Gene Expr Patterns GEP*. 2008 Jul;8(6):443–51.
17. Ludford-Menting MJ, Oliaro J, Sacirbegovic F, Cheah ET-Y, Pedersen N, Thomas SJ, et al. A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity*. 2005 Jun;22(6):737–48.
18. Walch L. Emerging Role of the Scaffolding Protein Dlg1 in Vesicle Trafficking. *Traffic*. 2013 Sep 1;14(9):964–73.
19. Matsumine A, Ogai A, Senda T, Okumura N, Satoh K, Baeg GH, et al. Binding of APC to the human homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Science*. 1996 May 17;272(5264):1020–3.
20. Dobrosotskaya I, Guy RK, James GL. MAGI-1, a Membrane-associated Guanylate Kinase with a Unique Arrangement of Protein-Protein Interaction Domains. *J Biol Chem*. 1997 Dec 12;272(50):31589–97.
21. Dobrosotskaya IY, James GL. MAGI-1 interacts with beta-catenin and is associated with cell-cell adhesion structures. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Apr 21;270(3):903–9.
22. Zaric J, Joseph J-M, Tercier S, Sengstag T, Ponsonnet L, Delorenzi M, et al. Identification of MAGI1 as a tumor-suppressor protein induced by cyclooxygenase-2 inhibitors in colorectal cancer cells. *Oncogene*. 2012 Jan 5;31(1):48–59.
23. Ivanova S, Repnik U, Banks L, Turk V, Turk B. Cellular localization of MAGI-1 caspase cleavage products and their role in apoptosis. *Biol Chem*. 2007;388(11):1195–8.
24. Yasuko Kitagishi SM. MAGI Scaffolding Molecules Involved in Cancer Cell Signaling. *J Carcinog Mutagen [Internet]*. 2013 [cited 2014 Nov 29]; Available from: <http://omicsonline.org/magi-scaffolding-molecules-involved-in-cancer-cell-signaling-2157-2518-S7-005.php?aid=20425>

25. Blüml S, Schabbauer G, Hainzl E, Niederreiter B, Hladik A, Lohmeyer T, et al. PTEN in antigen presenting cells is a master regulator for Th17-mediated autoimmune pathology. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(Suppl 1):P9.
26. José Luis Rodríguez-Fernández LR-B. What is the function of the dendritic cell side of the immunological synapse? *Sci Signal.* 2010;3(105):re2.
27. Roh MH, Margolis B. Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Sep;285(3):F377–87.
28. Zhan L, Rosenberg A, Bergami KC, Yu M, Xuan Z, Jaffe AB, et al. Dereglulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma. *Cell.* 2008 Nov 28;135(5):865–78.
29. Nakamura H, Sudo T, Tsuiki H, Miyake H, Morisaki T, Sasaki J, et al. Identification of a novel human homolog of the *Drosophila* dlg, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55. *FEBS Lett.* 1998 Aug 14;433(1-2):63–7.
30. Ramnik Xavier SR. Discs large (Dlg1) complexes in lymphocyte activation. *J Cell Biol.* 2004;166(2):173–8.
31. Liu W, Chen E, Zhao XW, Wan ZP, Gao YR, Davey A, et al. The scaffolding protein synapse-associated protein 97 is required for enhanced signaling through isotype-switched IgG memory B cell receptors. *Sci Signal.* 2012;5(235):ra54.
32. Javier RT, Rice AP. Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *J Virol.* 2011 Nov;85(22):11544–56.
33. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Oct 14;94(21):11612–6.
34. Lee SS, Weiss RS, Javier RT. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 24;94(13):6670–5.
35. Rousset R, Fabre S, Desbois C, Bantignies F, Jalinot P. The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. *Oncogene.* 1998 Feb 5;16(5):643–54.
36. Kranjec C, Banks L. A systematic analysis of human papillomavirus (HPV) E6 PDZ substrates identifies MAGI-1 as a major target of HPV type 16 (HPV-16) and HPV-18 whose loss accompanies disruption of tight junctions. *J Virol.* 2011 Feb;85(4):1757–64.

37. Arpin-André C, Mesnard J-M. The PDZ domain-binding motif of the human T cell leukemia virus type 1 tax protein induces mislocalization of the tumor suppressor hScrib in T cells. *J Biol Chem*. 2007 Nov 9;282(45):33132–41.
38. Golebiewski L, Liu H, Javier RT, Rice AP. The Avian Influenza Virus NS1 ESEV PDZ Binding Motif Associates withDlg1 and Scribble To Disrupt Cellular Tight Junctions. *J Virol*. 2011 Oct 15;85(20):10639–48.
39. Abbas, A. S P. INMUNOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR. 6ta ed. 566 p.
40. Monserrat Sanz J, Martín M, Reyes E, Prieto Martín A. Células presentadoras de antígeno. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. 2013 Mar;11(28):1720–7.
41. Russell S. How polarity shapes the destiny of T cells. *J Cell Sci*. 2008 Jan 15;121(2):131–6.
42. Bloom O, Unternaehrer JJ, Jiang A, Shin J-S, Delamarre L, Allen P, et al. Spinophilin participates in information transfer at immunological synapses. *J Cell Biol*. 2008 Apr 21;181(2):203–11.
43. Kurth T. Immunocytochemistry of the amphibian embryo--from overview to ultrastructure. *Int J Dev Biol*. 2003 Jun;47(5):373–83.
44. Goossens K, Vandaele L, Wydooghe E, Thys M, Dewulf J, Peelman LJ, et al. The importance of adequate fixation for immunofluorescent staining of bovine embryos. *Reprod Domest Anim Zuchthyg*. 2011 Dec;46(6):1098–103.
45. Goldstein NS, Ferkowicz M, Odish E, Mani A, Hastah F. Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2003 Jul;120(1):86–92.
46. Sabio G, Arthur JSC, Kuma Y, Peggie M, Carr J, Murray-Tait V, et al. p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *EMBO J*. 2005 Mar 23;24(6):1134–45.
47. Hulspas R. Titration of Fluorochrome-Conjugated Antibodies for Labeling Cell Surface Markers on Live Cells. In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dobrucki J, Hyun WC, Nolan JP, Orfao A, et al., editors. *Current Protocols in Cytometry* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010 [cited 2014 Nov 11]. Available from: <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/CPUnit/refld-cy0629.html>
48. Chua RYR, Wong SH. SNX3 recruits to phagosomes and negatively regulates phagocytosis in dendritic cells. *Immunology*. 2013 May;139(1):30–47.
49. Narayan N, Massimi P, Banks L. CDK phosphorylation of the discs large tumour suppressor controls its localisation and stability. *J Cell Sci*. 2009 Jan 1;122(1):65–74.

50. Laura RP, Ross S, Koeppen H, Lasky LA. MAGI-1: A Widely Expressed, Alternatively Spliced Tight Junction Protein. *Exp Cell Res.* 2002 May 1;275(2):155–70.
51. Macara IG, Mili S. Polarity and Differential Inheritance—Universal Attributes of Life? *Cell.* 2008 Nov 28;135(5):801–12.
52. Krummel MF, Macara I. Maintenance and modulation of T cell polarity. *Nat Immunol.* 2006 Nov;7(11):1143–9.
53. Chang JT. Polarity and lymphocyte fate determination. *Curr Opin Cell Biol.* 2012 Aug;24(4):526–33.
54. Lacy P, Stow JL. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood.* 2011 Jul 7;118(1):9–18.
55. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:593–623.
56. Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The Cell Biology of Phagocytosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2012;7(1):61–98.
57. Kumar M, Liu H, Rice AP. Regulation of Interferon- β by MAGI-1 and Its Interaction with Influenza A Virus NS1 Protein with ESEV PBM. *PLoS ONE.* 2012 Jul 20;7(7):e41251.
58. Liu H, Golebiewski L, Dow EC, Krug RM, Javier RT, Rice AP. The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble. *J Virol.* 2010 Nov;84(21):11164–74.