



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Zacatenco

Departamento de Biomedicina Molecular

“Análisis de la expresión y función de proteínas PDZ en células presentadoras de antígeno profesionales humanas”

Tesis

Que presenta

M en C. Jorge Rosas García

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Biomedicina Molecular

Directores de la Tesis:

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Dra. María Teresa Santos Mendoza

Ciudad de México

Febrero, 2023

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Transcriptómica e Inmunología Molecular del Instituto de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas bajo la tutoría de la Dra. María Teresa Santos Mendoza, así como en el departamento de Biomedicina molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la tutoría del Dr Marco Antonio Meraz Ríos

COMITÉ TUTORIAL

Directores de tesis:

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Dra. María Teresa Santos Mendoza

Asesores:

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dra. María del Carmen Sánchez Torres

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV.

Dr. Michael Schnoor

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV.

Dr. José Manuel Hernández

Departamento de Biología Celular, CINVESTAV.

El M en C. Jorge Rosas García realizó ésta tesis de doctorado con una beca otorgada por CONACYT, con número (CVU/Becario): 545867

Índice

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
JUSTIFICACIÓN	28
OBJETIVO	30
OBJETIVOS PARTICULARES	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIÓN	74
PERSPECTIVAS	75
REFERENCIAS.....	76

AGRADECIMIENTOS

Al INER, al Conacyt y al Cinvestav.

A la Dra. Teresa Santos y al Dr. Marco Meraz

A la Dra. Bobadilla y al Dr. Sevilla

A la Dra. Carmen Sánchez, al Dr. Vianney, y al Dr. Leopoldo Santos

Al Dr. Schnoor y al Dr. José Manuel

A mi familia: Jorge, Inés, Adriana, Karina, Daniel, Omar y Franco.

A Marian.

A mis compañeros en el INER: Andrés, Lore, Dante, Karen, Olivia, Brenda, Donato y Karla.

A mis compañeros del Cinvestav: Sorely, Benjamin, Diana, Mayte, Lory, Chicalote, Guillermo, Miguel, Thalía, Vane, Eduardo y Mike.

A la Mtra. Pilar y a la Dra. Norma

ABREVIATURAS

AJ: Unión adherente
APC: células presentadoras de antígenos
BSA: albúmina sérica bovina
Cq: cuantificación de ciclo
DAMP: patrones moleculares asociados a daño
DC: células dendríticas
ECM: Matriz extracelular
GLGF: Gly-Leu-Gly-Phe
GTPasa: guanosina trifosfatasa
iDC: Célula dendrítica inmadura
IFC: Circuito fluídico integrado
IL: interleucina
JAM: Moléculas de unión adhesión
JNK: la cinasa c-Jun N-terminal
LPS: Lipopolisacárido
MAGUK: Cinasa de guanilato asociadas a membrana
MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos
M ϕ : macrófagos humanos
NOX: NADPH oxidasa
NF- κ B: factor nuclear κ B
PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos
PDZ: Acrónimo de PSD95, Dlg y ZO-1
PDZbm: Motivo de unión a dominio PDZ
PGE2: Prostaglandina E2
PH: Homología a pleckstrina
PRR: receptores de reconocimiento de patrones
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SI: Sinapsis inmunológica
sliMs: Motivos lineales cortos
TA: Temperatura ambiente
TCR: Receptor de células T
TE: Tris/ácido etilendiaminotetraacético
TJ: Unión estrecha
TLR: Receptor tipo Toll
TNF: Factor de necrosis tumoral
TYK: tirosina cinasa
ZO: Zonula Occludens
 β PIX: proteína de intercambio que interactúa con β PAK

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura tridimensional del segundo dominio PDZ de Dlg1 en complejo con el PDZbm de la subunidad GluR-A de los receptores de glutamato.	11
Figura 2. Repertorio de interacciones PDZ.	13
Figura 3. Clasificación de proteínas que contienen dominios PDZ.	14
Figura 4. Distintos tipos de polaridad.	16
Figura 5. Nuevo modelo de polaridad.	17
Figura 6. Complejos de polaridad ápico-basal en linfocitos T.	19
Figura 7: El complejo Scribble en la activación de linfocitos T.	20
Figura 8. Polarización M1 y M2 de M ϕ	23
Figura 9. Vías activadas durante la maduración de las DC.	25
Figura 10. Scrib y Dlg1 regulan las funciones de las APC.	27
Figura 11. Análisis geNorm M and V en M ϕ	40
Figura 12. Diferentes PAMP inducen perfiles de expresión génica distintos de genes PDZ en M ϕ derivado de monocitos humanos.	45
Figura 13. Análisis geNorm M and V en DC.	45
Figura 14. Diferentes estímulos indujeron perfiles de expresión génica específicos de genes PDZ en DC derivadas de monocitos humanos.	49
Figura 15. La fagocitosis indujo perfiles de expresión distintos de genes PDZ en M ϕ y DC derivadas de monocitos humanos.	52
Figura 16. Genes PDZ expresados diferencialmente en M ϕ estimulados con HKMtb y LPS durante una cinética de estimulación.	54
Figura 17. Genes PDZ expresados diferencialmente en DC estimuladas con HKMtb y MC.	57
Figura 18. Expresión diferencial de genes PDZ tras la estimulación con HKMtb en M ϕ y DC.	60
Figura 19. Análisis de la expresión de ZO-1 y ZO-2 en M ϕ	62
Figura 20. Análisis de la expresión de ZO-1 y ZO-2 en DC.	64
Figura 21. Localización de ZO-1 en APC.	65
Figura 22. Localización de ZO-2 en APC.	66

Índice de Tablas

Tabla 1. Clases de PDZbm.....	12
Tabla 2. Pares de cebadores utilizados.....	34
Tabla 3. Genes PDZ con los cambios más significativos en la expresión génica después de la estimulación M ϕ con HKMtb.	41
Tabla 4. Genes PDZ correspondientes a los cambios más significativos en la expresión génica comparando la estimulación de M ϕ con HKMtb y LPS.	43
Tabla 5. Genes PDZ con los cambios más significativos en la expresión génica tras los estímulos HKMtb y MC en DC.....	47
Tabla 6. Genes PDZ con los cambios más significativos en la expresión de genes PDZ en M ϕ vs DC después del estímulo fagocítico.	50
Tabla 7. DEG en M ϕ tras la estimulación con LPS	54
Tabla 8. Valores de veces de cambio de los DEG en M ϕ estimulados con HKMtb o LPS.....	55
Tabla 9. DEG en común entre la estimulación del curso del tiempo con HKMtb en DC.	57
Tabla 10. DEG en común entre la estimulación del curso del tiempo con MC en DC.	58
Tabla 11. Valores de veces de cambio de los DEG en DC estimuladas con HKMtb y MC.	59

RESUMEN

Los genes PDZ (PSD95, Dlg y ZO-1) codifican para proteínas que funcionan principalmente como andamios de diversas vías de señalización. Hasta la fecha, se han identificado 153 genes PDZ en el genoma humano, la mayoría de estos genes tienen múltiples isoformas de proteínas ampliamente estudiadas en células epiteliales y neurales. Sin embargo, su expresión y función en las células inmunitarias ha sido poco estudiada. El objetivo de este trabajo fue evaluar los perfiles transcripcionales de 83 genes PDZ en macrófagos (M ϕ) y en células dendríticas (DC) humanos y determinar los cambios en su expresión relativa durante la estimulación celular por receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Nuestros resultados muestran que existen perfiles transcripcionales de los genes PDZ, que son significativamente distintos en diferentes condiciones de estimulación. Además, se encontró una firma transcripcional de los genes PDZ distinta en M ϕ , comparado con las DC bajo los mismos estímulos fagocíticos. En particular, más de 40 genes PDZ tuvieron cambios significativos en su expresión, sugiriendo funciones potencialmente relevantes en las células presentadoras de antígenos (APC). Dado que algunas proteínas PDZ pueden ser blancos de productos virales, nuestros resultados sustentan que muchas de estas proteínas pudieran ser blancos virales en APC como parte de mecanismos de evasión. Nuestros resultados sugieren un uso diferencial de proteínas PDZ en la activación de las vías de señalización de M ϕ y DC. Además, encontramos una distinta regulación transcripcional y traduccional en respuesta a distintos PRR de las proteínas PDZ ZO-1 y ZO-2 así como una localización distinta entre M ϕ y DC, lo cual puede conferir distintas funciones en ambas APC. Este trabajo abre la pauta para evaluaciones sobre las funciones de las proteínas PDZ en las APC y su papel en los mecanismos de activación de estas células.

ABSTRACT

The PDZ (PSD95, Dlg, and ZO-1) genes encode proteins that primarily function as scaffolds of diverse signaling pathways. To date, 153 PDZ genes have been identified in the human genome, most of which have multiple protein isoforms widely studied in epithelial and neural cells. However, their expression and function in immune cells have been poorly studied. Herein, we aimed to assess the transcriptional profiles of 83 PDZ genes in human macrophages (M ϕ) and dendritic cells (DC) and changes in their relative expression during cell PRR stimulation. Significantly distinct PDZ gene transcriptional profiles were identified under different stimulation conditions.

Furthermore, a distinct PDZ gene transcriptional signature was found in M ϕ and DC under the same phagocytic stimuli. Notably, more than 40 PDZ genes had significant changes in expression, with potentially relevant functions in antigen-presenting cells (APCs). Given that viral products target several PDZ proteins, our results support that many of these proteins might be viral targets in APCs as part of evasion mechanisms. Our results suggest a distinct requirement for PDZ scaffolds in M ϕ and DC signaling pathways activation. We report different transcriptional and translational regulations in response to different PRRs of ZO-1 and ZO-2, as well as different localization between M ϕ and DC, which can confer different abilities to both APCs. This work provides the basis for more assessments of PDZ proteins' functions in APCs and their role in APC activation mechanisms.

INTRODUCCIÓN

Dominios proteicos

El estudio de las proteínas se ha estado enfocado a analizar polipéptidos estables y plegados con estructuras bien definidas. Una característica recurrente de tales polipéptidos es que a medida que aumenta su tamaño, generalmente se subdividen en regiones espacialmente distintas que pueden funcionar de forma semiautónoma. Estas regiones se denominan dominios proteicos.¹

Cada dominio de proteína específico puede repetirse en una misma proteína o se comparten entre diferentes proteínas. Los tipos de dominios proteicos únicos se definen como familias de dominios^{2,3} Cada familia de dominio tiene un identificador de dominio y un nombre únicos. Los dominios de proteínas que pertenecen a una misma familia generalmente tienen las mismas características estructurales y funcionales.⁴

Existe redundancia en la función de las proteínas la cual está evolutivamente conservada desde procariontes hasta eucariontes. En el centro de la redundancia de las proteínas se encuentran las interacciones de dominios de proteína-proteína que permite a redes de proteínas ser organizadas en forma modular. Estos dominios deben estar altamente conservados y funcionalmente independientes de las proteínas que los contienen. También requieren identificar un motivo estructural dentro del blanco con el que interactúan tanto de forma específica como no específica.⁵

Los dominios PDZ (PSD95, Dlg y ZO-1) son prevalentes en casi todas las especies biológicas, se encuentran en bacterias, plantas, aves, peces y mamíferos, incluido el humano. Importamente, los dominios PDZ son de los dominios más promiscuos de todas las interacciones proteína- proteína encontradas en los animales junto con el dominio PH (Homología a Pleckstrina) o SH3 (domino 3 de homología a src).^{5,6} La alta promiscuidad combinada con su alta ocurrencia hace al dominio PDZ uno de los más importantes formadores de bloques de las vías de proteínas celulares.⁷

El reconocimiento de motivos lineales cortos (sLiMs) o péptidos por proteínas, que permite la interacción entre ellas, es un componente de muchos procesos celulares. Aunque muchas de estas interacciones son transitorias o de relativa baja afinidad, su existencia es vital.⁸

Dominio PDZ

Los dominios PDZ se describieron con la base en las aparentes secuencias repetidas en tres proteínas, la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95), Dlg y Zonula occludens-1 (ZO-1), que contienen este tipo de dominios. Fueron llamados originalmente dominios GLGF (Gly-Leu-Gly-Phe) o dominio DHR por la región de homología de los discos largos.⁷

Los dominios PDZ suelen tener entre 80 y 100 residuos de aminoácidos y adoptan una topología similar, que adopta una estructura de barril antiparalelo que comprende 6 láminas β y 2 α hélices, contiene un bolsillo hidrofóbico donde se llevan a cabo las interacciones proteína-proteína. Este bolsillo hidrofóbico generalmente une secuencias carboxilo-terminales de las proteínas conocidas como motivos de unión a dominios PDZ (PDZbm).

Figura 1.

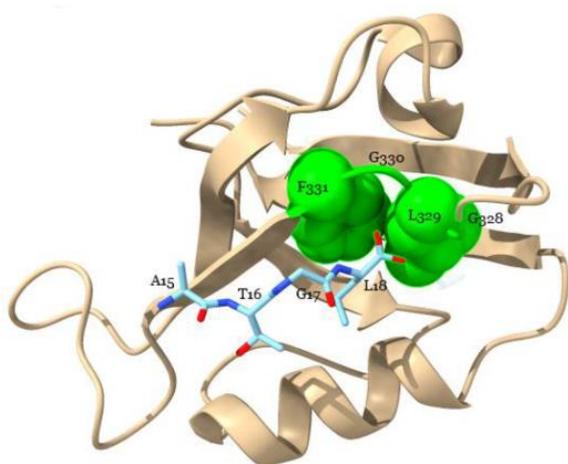


Figura 1. Estructura tridimensional del segundo dominio PDZ de Dlg1 en complejo con el PDZbm de la subunidad GluR-A de los receptores de glutamato. Dominio PDZ en complejo con el PDZbm clase I de la subunidad GluR-A (azul) de los receptores de glutamato. La secuencia de GLGF conservada en el dominio PDZ se muestra en verde.¹⁰

El PDZbm comprende los cuatro últimos aminoácidos numerados a partir de la última posición en el C-terminal (P0) y hacia el extremo N-terminal P-1, P-2, P-3 y/o P-4 según la referencia que se consulte.⁹ El PDZbm se pueden clasificar con base en los últimos cuatro aminoácidos de las proteínas que interactúan, en tres clases.^{7, 11} **Tabla1**

Tabla 1. Clases de PDZbm. Φ aminoácido hidrofóbico; X, amino no especificado.

Clases de PDZbm	Secuencias de aminoácidos
Clase I	X-S/T-X-V X-S/T-X-L
Clase II	X- Φ - X- Φ
Clase III	X-D/E-X-V

Aunque la representación canónica de los dominios PDZ involucra la unión al PDZbm, los dominios PDZ también pueden interactuar entre ellos para formar dímeros o estructuras en tándem e incluso con lípidos como el PIP3 fosfatidil inositol (3,4,5)-trifosfato.^{12,13} (**Figura 2**)

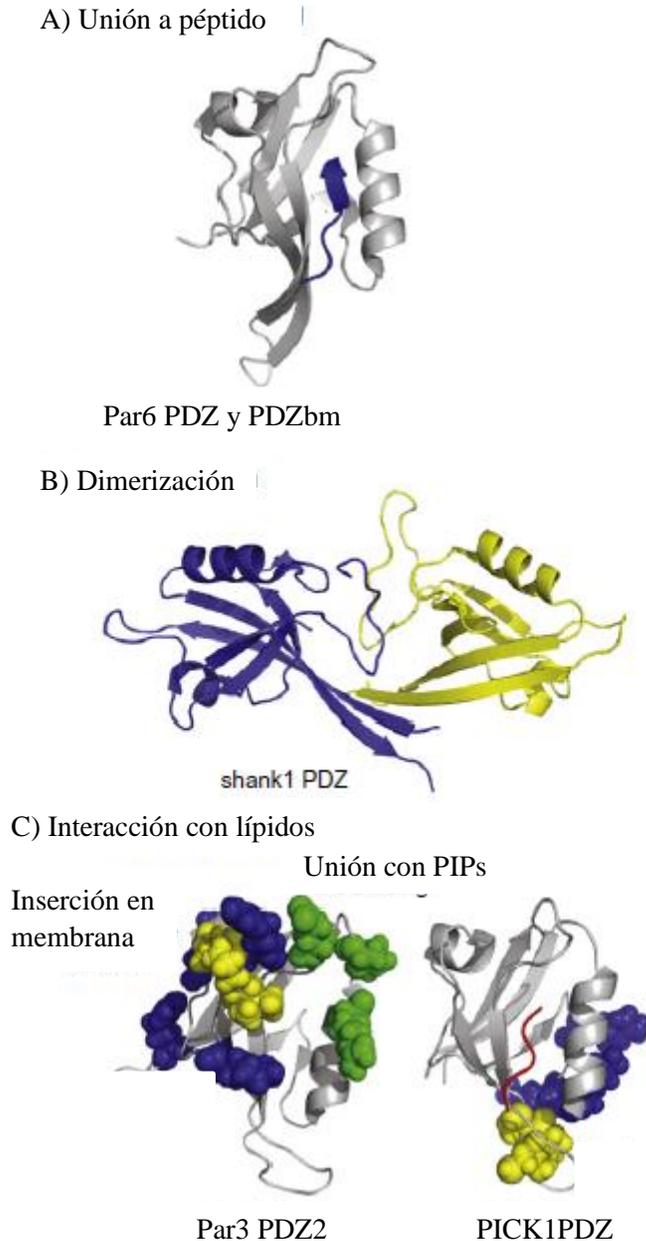


Figura 2. Repertorio de interacciones PDZ. (A) unión de péptidos, (B) dimerización y (C) interacciones con fosfolípidos ¹²

Los dominios PDZ pueden ocurrir en una o múltiples copias dentro de una amplia familia de proteínas que pueden ser clasificadas en cuatro subfamilias de acuerdo con la organización de sus dominios. Las cinasas de guanilato asociadas a membrana (MAGUK), las cuales contienen uno o tres dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio guanilato cinasa; una subfamilia que contiene únicamente dominios PDZ cuyo número puede variar; proteínas que

contienen un dominio PDZ y otros dominios con actividad enzimática y, por último, la subfamilia de proteínas con dominios PDZ y con otros dominios de interacción¹⁴ **Figura 3.**

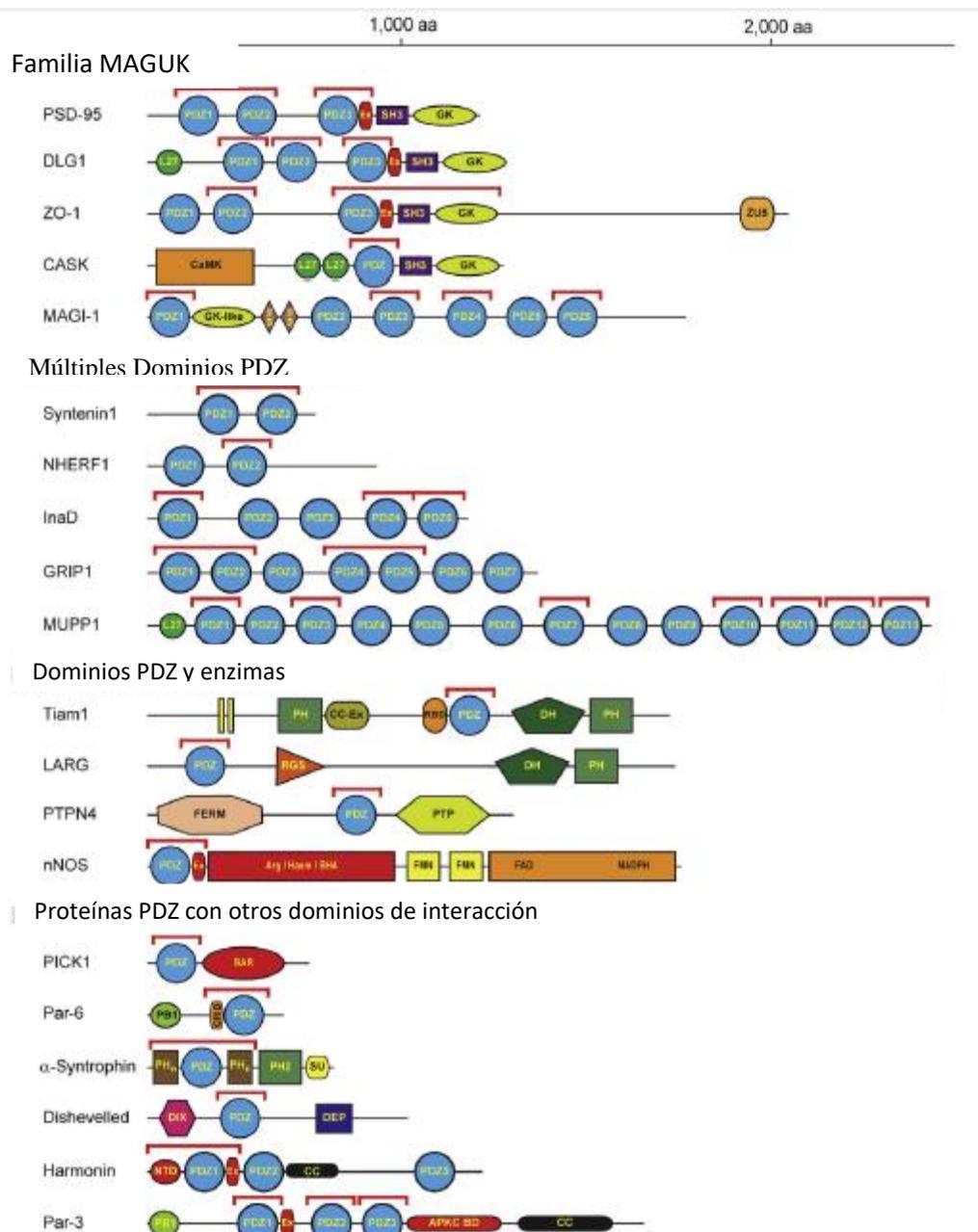


Figura 3. Clasificación de proteínas que contienen dominios PDZ. Las proteínas se clasifican de acuerdo a los dominios que contienen en: 1) MAGUK, 2) múltiples dominios PDZ, 3) dominio PDZ con dominios con actividad enzimática y 4) dominios PDZ con otros dominios de interacción.¹⁴

Polaridad y proteínas PDZ

La capacidad de las células para mantener y establecer dominios funcionalmente distintos implica interacciones complejas entre muchos complejos de proteínas, que regulan diferentes vías de señalización.¹⁵ La función primordial de las proteínas que contienen dominios PDZ, es el ensamblar complejos multiproteicos y localizarlos en regiones específicas dentro de la célula.

Las proteínas que contienen dominios PDZ a menudo se localizan en sitios subcelulares específicos cerca de la membrana plasmática de células polarizadas, como células epiteliales, endoteliales y neuronas donde están involucrados en diversos procesos como las uniones célula-célula, reciclaje, tráfico y de manera importante en la polaridad celular.

El establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular dentro de varios órganos es crucial para el apropiado desarrollo tanto de organismos invertebrados como vertebrados.¹⁶

La polaridad celular, está definida como la distribución asimétrica de proteínas, organelos y componentes del citoplasma, y se presenta de muchas formas.¹⁷ Como la polaridad celular ápico basal (APCB) permite el tráfico especializado de solutos, la polaridad en la división asimétrica permite el desarrollo de nuevos tipos celulares mientras se mantiene un pool de células progenitoras, la polaridad antero-posterior de las células migratorias mientras algunas células siempre están polarizadas y tienen cilios o flagelos que las ayudan a migrar, otras se polarizan por el crecimiento de lamelipodios o filopodios en respuesta a estímulos y la polaridad planar que permite la organogénesis y polariza las células que se encuentran en un plano del tejido.^{18,19} **(Figura 4)**

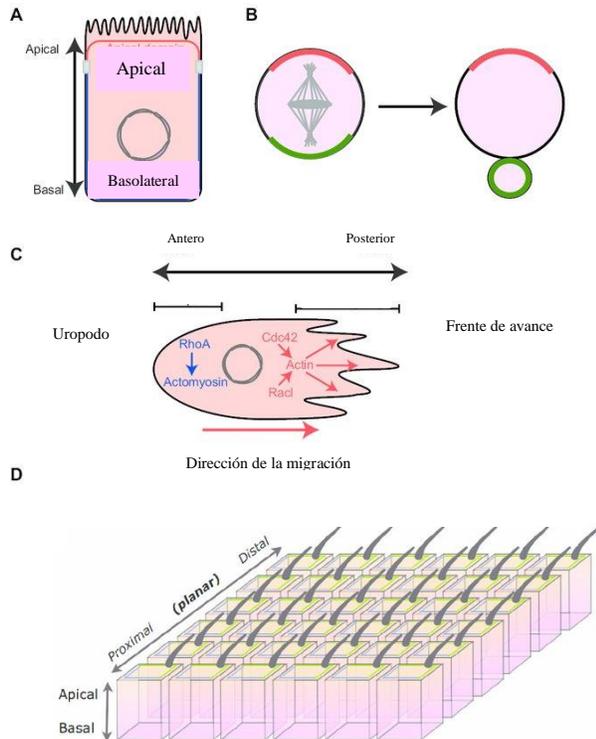


Figura 4. Distintos tipos de polaridad. (A) La polaridad ápico-basal. (B) La polaridad en la división asimétrica, (C) Polaridad antero- posterior (D) Polaridad planar²⁰

La polaridad apical-basal de las células epiteliales, es una de las más conocidas y está conformada por tres complejos de polaridad: el complejo PAR3/PAR6/aPKC, el complejo CRUMBS/PALS1/PATJ y el complejo Scrib/DLG/LGL, los cuales son cruciales para la formación de las uniones apicales tales como uniones estrechas en células epiteliales de los mamíferos.²¹

La polaridad ápico-basal en las células epiteliales requiere la formación de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (ECM); estas interacciones proporcionan la información espacial requerida para redistribuir la superficie celular y proteínas citoplasmáticas (incluyendo proteínas de polaridad y del citoesqueleto).

Las membranas de las células epiteliales se organizan en dos regiones diferentes con propiedades bioquímicas y funcionales distintas: Las uniones adherentes (AJ) de las membranas laterales regulan la adhesión célula-célula y las uniones estrechas (TJ) impiden la mezcla de componentes de los compartimentos apical y lateral.^{7,11}

La composición proteica de estas regiones difiere, reflejando sus funciones específicas.

Las TJ son complejos celulares de adhesión célula-célula que regulan el flujo paracelular de solutos y prevén la entrada de patógenos a través del epitelio y endotelio incluyendo la barrera hematoencefálica. Existe una placa densa de proteínas en el lado citoplasmático que regula.²² Las TJ están compuestas por más de 40 proteínas que son proteínas transmembrana o proteínas de unión a actina. Las primeras se encargan de establecer el contacto célula-célula en el espacio intercelular, mientras que las segundas sirven de enlace con el citoesqueleto de actina. Los principales componentes del grupo transmembranal son las claudinas, la ocludina y las moléculas de unión adhesión (JAM). Las principales proteínas de unión a actina citoplásmica en las uniones estrechas son las proteínas Zonula Occludens (ZO).²³ Además de la tradicional forma de polaridad celular, que está implicada en el establecimiento del mantenimiento de la estructura celular normal y asimetría, se ha propuesto que algunas proteínas de polaridad en mamíferos, también regulan la polaridad subcelular (asimetría intracelular), que ayuda y puede mejorar la aptitud celular para llevar a cabo funciones específicas como la proliferación, la apoptosis, la adaptación al estrés, la troncalidad y la función de los organelos.²⁴ **(Figura 5)**

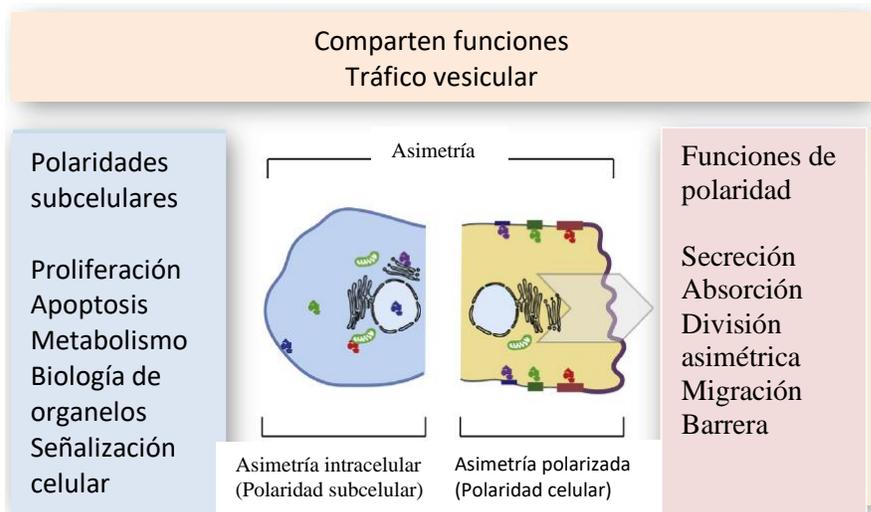


Figura 5. Nuevo modelo de polaridad. Un nuevo modelo integrado para comprender las polaridades subcelulares.

Polaridad en el sistema inmune

El sistema inmune es una red interactiva de órganos linfoides, células, factores humorales y citocinas que orquestan reacciones inmunitarias para proteger al organismo en respuesta a señales de peligro endógenas o bien contra amenazas ajenas a través de mecanismos celulares

y moleculares. Estos mecanismos pueden subdividirse en respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, y son ejecutadas por células de diferentes linajes. Estas dos respuestas son interdependientes: las células innatas son desencadenantes esenciales de respuestas adaptativas, por ejemplo, a través de la presentación antigénica dependiente de MHC (complejo principal de histocompatibilidad); además, las células que median las respuestas adaptativas mejoran y amplifican el sistema inmunitario innato, por ejemplo, a través de los contactos entre células y la secreción de citocinas.²⁵

La polaridad en linfocitos está involucrada en los cambios de segregación morfológica y molecular que ocurren durante la migración, las funciones efectoras como la liberación de gránulos citotóxicos y en el contacto entre la célula T y la APC que toma una forma muy específica denominada sinapsis inmunológica (IS). Esta estructura actúa como una plataforma de comunicación transitoria entre la célula T y la APC.^{26,27}

El complejo Scribble en el sistema inmune

Dentro de los mecanismos que subyacen en la respuesta de las células T en el marco de la polaridad, está la orientación de los complejos de polaridad ápico-basal Scribble, Par3, y Crumbs con un patrón de expresión particular, dependiendo de las funciones específicas que ocurren durante la migración y formación de la SI.^{27,28,29} **(Figura 6).**

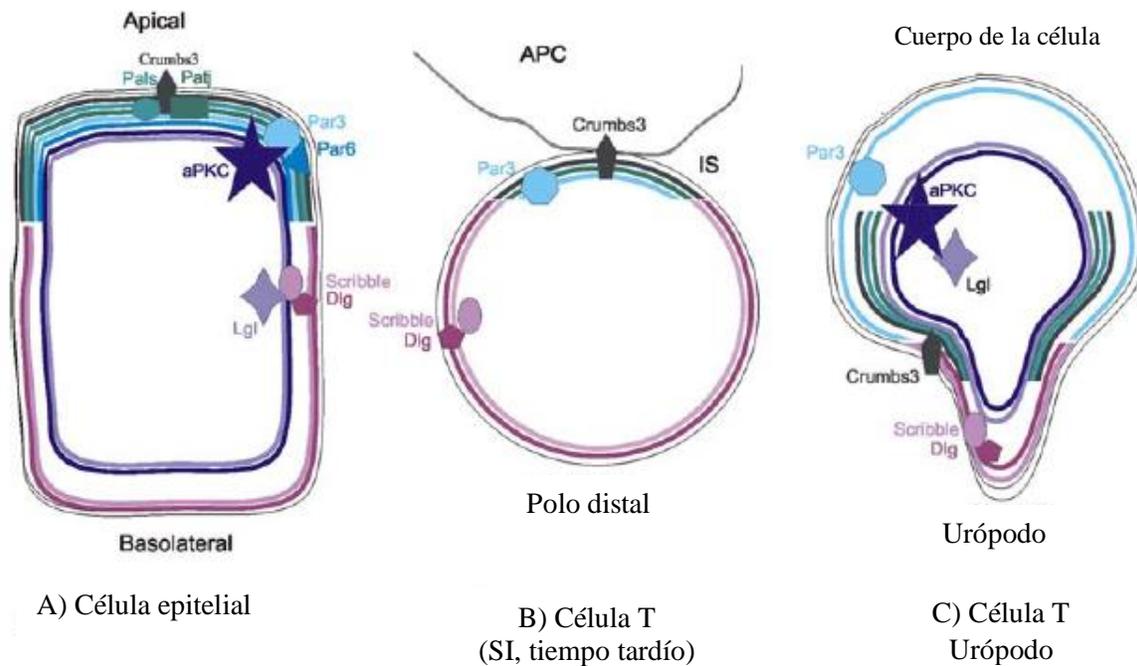


Figura 6. Complejos de polaridad ápico-basal en linfocitos T. La regulación de la localización de los complejos de polaridad en Célula epitelial (A), en células T en la SI (B) y en células migrantes (C).

El complejo Scribble y la activación de los linfocitos T

En los linfocitos T, Dlg1 se encuentra expresado constitutivamente en balsas lipídicas asociadas con la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASp), la proteína tirosina cinasa específica de linfocitos (Lck) y la proteína cinasa 70 asociada a la cadena zeta (Zap70). La activación del receptor de células T (TCR) aumenta la asociación del complejo formado por Dlg1 con Lck-WASp y Lck-Zap70 y la formación de este complejo depende de la asociación con Dlg1 ya que estos complejos se reducen en las células reguladas negativamente la expresión de Dlg1. Por otro lado, la interacción de Dlg1 con Lck, promueve la activación de p38 MAPK (quinasas de proteínas activadas por mitógeno P38) en linfocitos T CD8⁺ efectoras, lo que resulta en la translocación del factor nuclear de células T activadas (NFAT) al núcleo, por lo tanto, la producción de IFN γ y TNF α .^{30,31} **Figura 7.**

CRTAM (molécula clase-I asociada a células T restringida por MHC), es una proteína transmembranal de tipo I que contiene dominios tipo Ig V y C1.³² Crtam coordina un complejo de señalización en un subconjunto de células T CD4⁺ mediado por Scrib que

controla la activación y localización de la GTPasa pequeña Cdc42 por el reclutamiento de su activador (GEF) β PIX (proteína de intercambio que interactúa con β PAK) 12 horas después de la activación del TCR. De esta forma la función adaptadora de la proteína Scrib dirige la respuesta de células T hacia la producción de citocinas proinflamatorias como $\text{IFN}\gamma$ e IL-22.

31,33

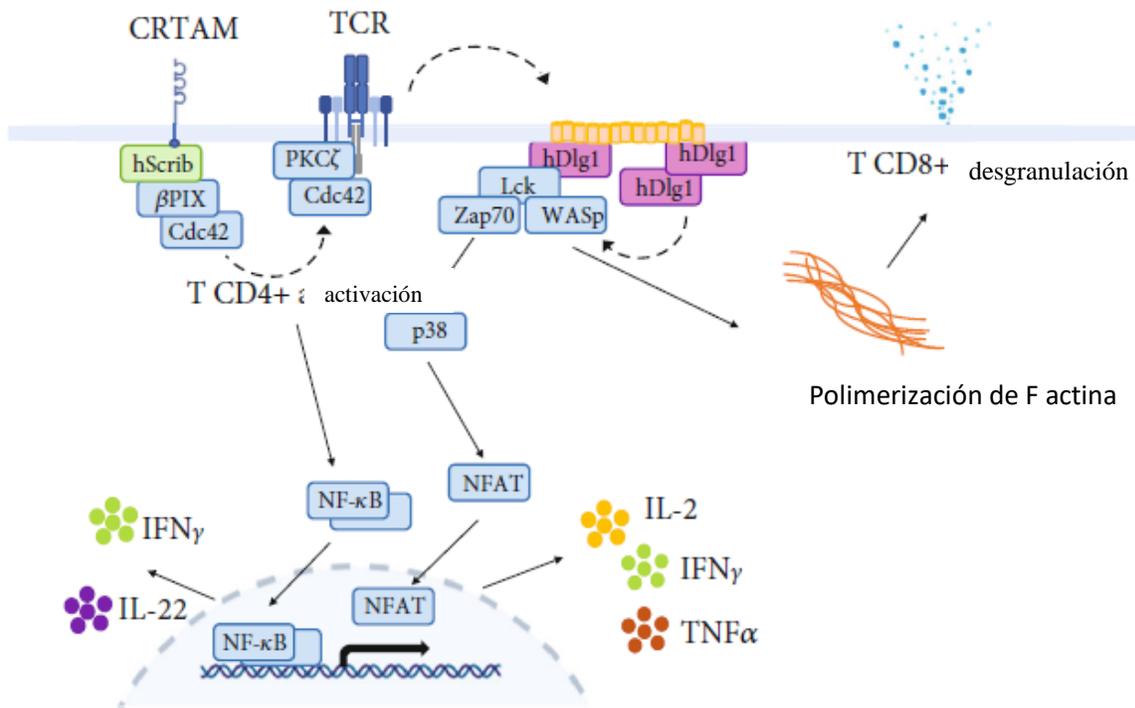


Figura 7: El complejo Scribble en la activación de linfocitos T. Funciones de Scrib y Dlg1 durante la activación de las células T. La estimulación del TCR induce la interacción de Scrib con CRTAM para regular la liberación del $\text{IFN}\gamma$ e IL-22. Dlg1 se encuentra asociada con Lck, Zap70 y WASp y después de la estimulación del TCR, se reclutan más moléculas Dlg1 activando la vía p38 MAPK/NFAT para inducir la producción de citocinas además de la polimerización F actina y la desgranulación de células T.³¹

Células presentadoras de antígeno (APC)

El sistema inmune humano consiste en el sistema inmune adaptativo y el innato. Las células del sistema inmune adaptativo reconocen fragmentos de polipéptidos de antígenos potenciales, estos péptidos antigénicos son expresados en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC), unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Por lo que las APC son células especializadas en la captación, el procesamiento y la presentación de antígenos para iniciar y regular las respuestas inmunitarias adaptativas.³⁴

Las APC proporcionan tres señales (presentación de antígeno a través de moléculas MHC, expresión de moléculas coestimuladores y secreción de citocinas/quimioquinas) necesarios para entrenar y activar las células T. Se pueden dividir en APC profesionales (células dendríticas (DC), células B y macrófagos ($M\phi$)) y no profesionales APC (fibroblastos y hepatocitos, etc).³⁵

Tanto las APC profesionales como las no profesionales pueden captar antígenos exógenos y presentarlos en ambas clases de MHC, I y II. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, la expresión de MHCII y de moléculas coestimuladoras está ausente en la mayoría de las APC no profesionales.³⁶

Los $M\phi$ y las DC funcionan como células presentadoras de antígenos (APC). Ellos presentan antígenos peptídicos en el MHC clase II y pueden activar la inmunidad adquirida mediante la activación de las células T colaboradoras. Mientras que los $M\phi$ presentan antígenos dentro tejidos, las células dendríticas presentan antígenos en el ganglio linfático. Las DC poseen características especializadas para activar células T naïve para convertirlas en células T efectoras por lo que son las APC más potentes.³⁷

Las APC expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) producidos por patógenos y patrones moleculares asociados a daños (DAMP) producidos por células huésped dañadas, activando las respuestas de APC.³⁴

Macrófagos

Los $M\phi$ regulan la inmunidad y son fundamentales para el desarrollo, la homeostasis, el combate a las infecciones, el saneamiento de las lesiones y la reparación de tejidos. Debido a que la función de los $M\phi$ está determinada por su tejido de residencia y el entorno local, es

posible que los fenotipos específicos no sean universalmente aplicables a todos los tejidos.
39,40

Los M ϕ residentes en tejidos en organismos adultos se originan a partir de progenitores embrionarios, médula ósea o una mezcla de ambos ⁴⁰⁻⁴³

La activación de los M ϕ se ha definido por la inducción de la función efectora, como la fagocitosis, la producción de citocinas o la inducción de moléculas de la superficie celular como consecuencia del reconocimiento de señales exógenas.⁴⁴

La activación de los M ϕ se subdividido de manera simplificada en M ϕ clásicos o M1 y M ϕ activados alternativamente o M2. Los M ϕ M1 adoptan estado proinflamatorio preprogramado, que resulta en un M ϕ con un fenotipo proinflamatorio que produce citocinas proinflamatorias como TNF e interleucina-6 (IL-6) entre otras y son células altamente fagocíticas, lo que les permite fagocitar y eliminar patógenos.⁴⁵

Los estímulos M1 son agrupados de acuerdo a su habilidad para inducir un prototipo proinflamatorio, se han clasificado en tres estímulos M1 principalmente. El INF- γ , patógenos o ligandos de TLR como LPS, muramil dipéptido y ácido lipoleicoico y por último el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF). El GM-CSF aumenta la presentación de antígeno, la fagocitosis mediada por complemento y anticuerpos, la capacidad microbicida, quimiotaxis y adherencia.⁴⁹

Los M ϕ M2 son típicamente antiinflamatorios se agrupan principalmente por su capacidad para antagonizar las respuestas inflamatorias y en la reparación e de heridas y se pueden producir in vitro mediante la adición de estímulos M2 como la IL-4 o IL-13, glucocorticoides e IL-10 así como con factor estimulante de colonias de M ϕ (M-CSF).^{39, 45}

(Figura 8)

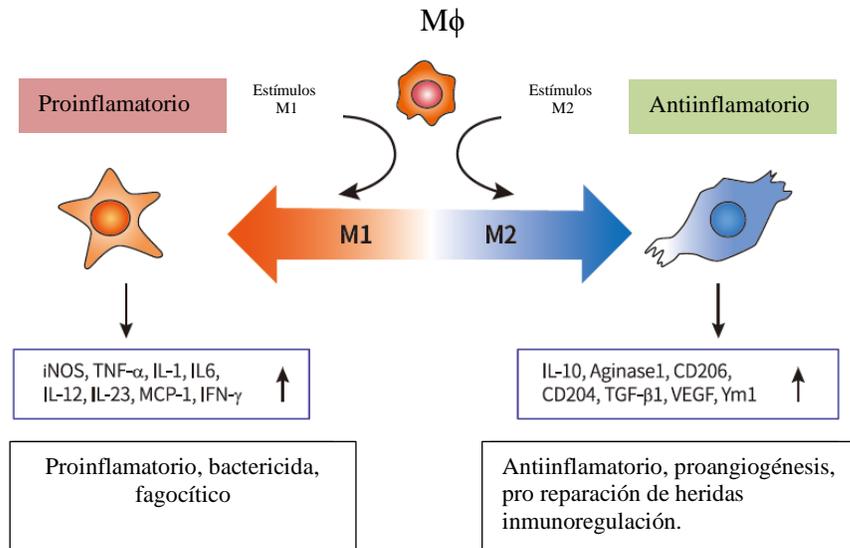


Figura 8. Polarización M1 y M2 de $M\phi$. Los monocitos se pueden activar clásica o alternativamente para formar macrófagos M1 y M2 respectivamente ^{45,47}

Cedulas Dendríticas

Las células dendríticas (DC), son una población especializada de APC que patrullan varios lugares anatómicos e interfaces ambientales, capturan antígenos, procesan y presentan a las células efectoras los antígenos para iniciar la respuesta inmune específica y, dependiendo del microambiente, además también pueden inducir tolerancia y regular la homeostasis inmune.⁴⁸

Las DC comprenden poblaciones heterogéneas que se clasifican en diferentes subconjuntos y se basa en factores como: el fenotipo, factores de transcripción, expresión de TLR específicos y otras moléculas funcionalmente relevantes incluidos los receptores de quimiocinas y los receptores de lectina tipo C y la ontogenia.⁴⁸

Las DC también expresan receptores que determinan su entrada en proceso de maduración desencadenado tanto por PAMPs como patógenos, componentes de bacterias o DAMPS como estímulos inflamatorios como citocinas que inducen modificaciones funcionales que permiten la migración de las células de tejidos periféricos a órganos secundarios linfoides e involucra la redistribución de moléculas MHC de compartimentos intracelulares hacia la superficie celular así como una disminución de la internalización de antígenos y patógenos y un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras que transforman una célula dendrítica inmadura (iDC), con poca capacidad de activación de la célula T, en células dendríticas maduras (mDC) con una alta capacidad de activar a células T. Durante la maduración, la capacidad de procesamiento de antígenos de las DC disminuye mientras que aumenta su capacidad de presentación de antígenos y la expresión de moléculas coestimuladoras.⁴⁹

Diversas estrategias experimentales han sido usadas para producir DC maduras. Dentro de los factores usados para madurar a las DC se incluyen lipopolisacárido (LPS), ligando de CD40 (CD40L), Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α), que permiten la activación de distintos factores de transcripción como el factor nuclear κ B (NF- κ B), la proteína cinasa mitógeno activado p38 (p38 MAPK), la cinasa c-Jun N-terminal (JNK), proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK 1/2) y aunque CD40L y TNF- α también activan NF- κ B, esta activación comparten parcialmente las vías de señalización. EN contraste INF- α , e INF- γ señalizan a través de cinasa Janus y tirosina cinasa (TYK) permitiendo la activación de transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT), que permiten la activación

de NF- κ B. Por otro lado, también se han usado cocteles que combinan algunos de estos factores para recrear un ambiente inflamatorio como por ejemplo: Prostaglandina E2 (PGE2), Interleucina1- β (IL-1 β), IL-6 y ácido policitídílico (poly (I:C); TNF- α , IL-1 β , IL-6 y PGE2.

⁵⁰ (Figura 9)

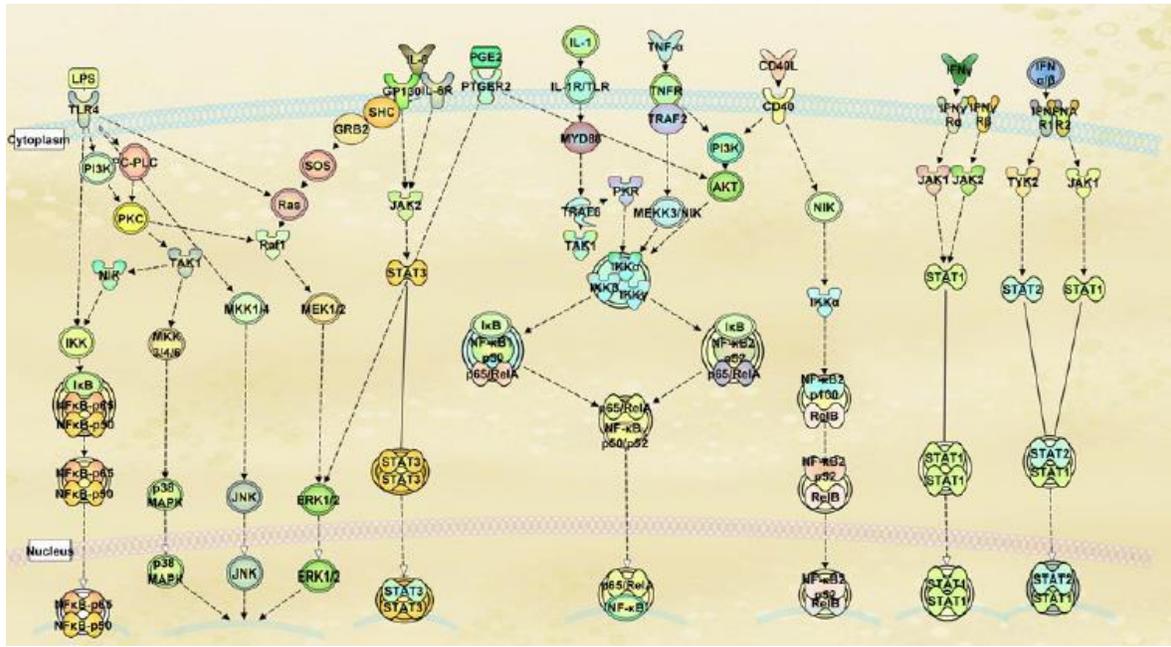


Figura 9. Vías activadas durante la maduración de las DC. Las DC pueden iniciar su proceso de maduración con diversos estímulos como el LPS que interacciona con los receptores tipo Toll permitiendo la activación de NF- κ B, p38-MAPK, ERK1/2 y JNK. Aunque IL-1, CD40L y TNF- α se unen a diferentes receptores inducen la activación de NF- κ B. En contraste la estimulación por IFN estimula diferentes vías de señalización que incluyen JAKs, TYK2 y STAT1/2.

Proteínas PDZ en las APC

Recientemente, se han demostrado los roles relevantes de algunas proteínas PDZ en las APC por ejemplo, se ha demostrado la expresión y regulación de Scrib y Dlg1 en las APC humanas, incluyendo a los monocitos, los M ϕ y las DC; Scrib y Dlg1 aumentan su expresión en mDC en comparación con iDC pero no se encuentra colocación en ninguna de estas condiciones, sugiriendo que Scrib y Dlg1 pueden participar de manera independiente en distintas funciones durante la maduración de las DC.⁵¹

De manera similar a la Espinofilina, que es una proteína PDZ de andamiaje que funciona como una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1a, Scrib se reubica en la membrana

plasmática en las mDC y en la SI durante la presentación antigénica y es requerida para una óptima activación de células T.^{51,52}

Recientemente, la interacción de la proteína Dlg1 con canales de potasio Kv1.3 ha sido implicada en la regulación de las funciones en DC de ratón como la captación de antígeno y la secreción de citocinas.⁵³

Además, Scrib y Dlg1 desempeñan un papel importante durante la presentación de antígeno ya que contribuyen a la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de IL-12 durante la maduración de las DC derivadas de monocitos humanos.⁵⁴

Por otro lado, la función de andamiaje de la proteína de polaridad Scrib, es necesaria para el correcto ensamblaje del complejo NADPH oxidasa (NOX) de manera PDZ dependiente y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por NOX en los Mφ, los cuales son indispensables para la destrucción de patógenos.⁵⁵

En consecuencia, diversas proteínas PDZ podrían estar implicadas en la regulación de las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas provocadas por las células inmunes.

(Figura 10)

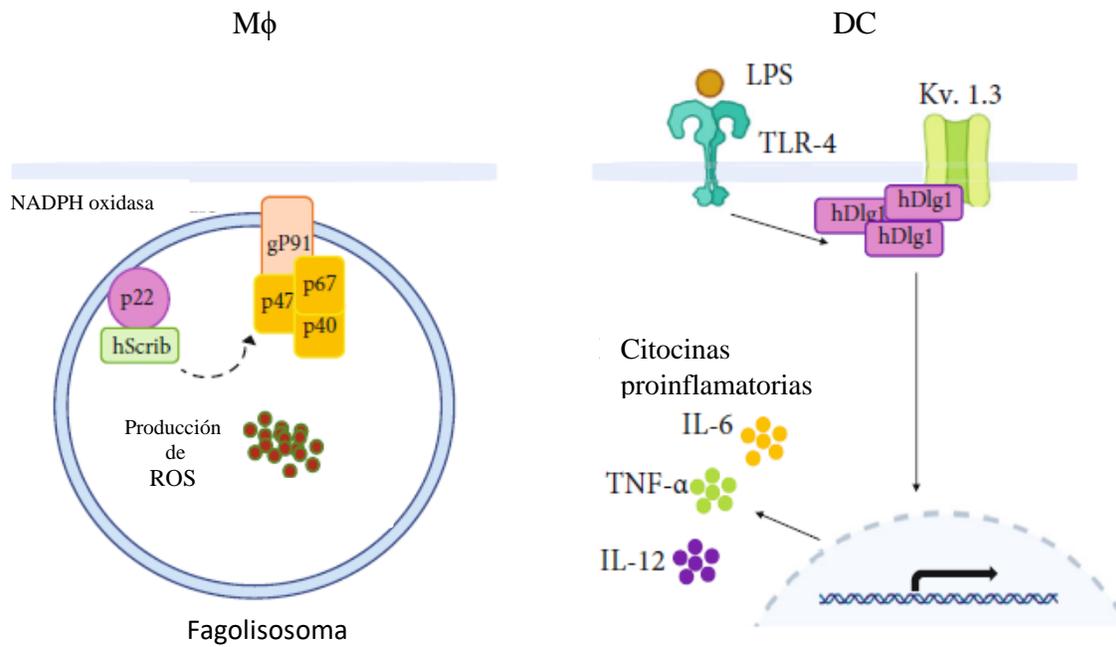


Figura 10. Scrib y Dlg1 regulan las funciones de las APC. En los Mφ, Scrib es necesario para el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa y producción de ROS. En las DC, la interacción de Dlg1 con canales de potasio Kv1.3 participa en la producción de citocinas bajo la estimulación del TCR.³¹

JUSTIFICACIÓN

Las proteínas PDZ son altamente conservadas evolutivamente y su función de andamiaje regula distintos procesos biológicos, el papel de estas proteínas en la regulación y funciones de células del sistema inmune adaptativo ha sido demostrado en funciones relevantes tales como la migración, la sinapsis inmunológica y la secreción de citocinas.

Existen escasos reportes en el sistema inmune innato que han demostrado funciones relevantes de proteínas PDZ en M ϕ y DC, tales como la producción de ROS, la regulación de la expresión de moléculas coestimuladoras o en la secreción de citocinas

Dada su alta conservación evolutiva y su relevancia en la regulación de distintos procesos biológicos en células del sistema inmune, proponemos que proteínas PDZ adicionales se expresarán en APC y que modificarán su expresión ante estímulos PRR específicos; ese conocimiento permitirá proponer algunas proteínas PDZ con potenciales funciones relevantes en APC.

HIPÓTESIS

Dada la alta conservación evolutiva de las proteínas PDZ, y que algunas tienen funciones relevantes en APC, proponemos que proteínas PDZ adicionales se expresarán en APC y que la estimulación de diversos PRR mostrará cambios en la expresión de proteínas PDZ involucradas en la activación de las APC con potenciales funciones relevantes.

OBJETIVO

Evaluar la expresión de proteínas PDZ en células presentadoras de antígeno profesionales humanas, así como cambios en su expresión relativa cuando las APC son sometidas a distintos estímulos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la expresión de genes que codifican para proteínas PDZ en células presentadoras de antígeno profesionales humanas tanto en estado basal como cambios en la expresión relativa ante estímulos específicos.
2. Seleccionar un grupo de genes PDZ y evaluar cambios en la expresión de sus proteínas durante la activación de APC profesionales humanas.
3. Evaluar la localización en espacios subcelulares de estas proteínas en APC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y Diferenciación de M ϕ y DC

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de concentrados leucocitarios provenientes de donadores sanos tanto del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias como del Instituto Nacional de Cardiología con la previa aprobación de los comités científico y de ética institucionales (IRB# B16-20 aprobada en 2020). Este estudio se realizó de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki y no se requirió el consentimiento informado por escrito de acuerdo con la legislación nacional y los requisitos institucionales.

Cada concentrado leucocitario se diluyó 1:1 con PBS 1X para después centrifugarlos a 800g durante 25 min a Temperatura ambiente (T.A.) se obtuvo por gradiente de densidad con Lymphoprep™ (Alere Technologies, Oslo, Noruega) a los monocitos CD14+ se purificaron por selección positiva mediante el uso de perlas magnéticas marcadas con anticuerpo humano anti-CD14 y columnas LS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EE. UU.).

Para la obtención de los M ϕ a partir de los monocitos CD14+, se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos 1.263×10^6 células/mL, en 3 mL de medio RPMI 1640 (Corning, Nueva York, NY, EE. UU.) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (HyClone, New Hampshire, UT, EE. UU.), 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina y 200 L-glutamina mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 7 días adicionado GM-CSF (10 ng/mL) (R&D System, Minneapolis, MN, EE. UU.) en el día 0, día 2 y día 4. Por otro lado, para la obtención de las DC, se sembraron 18×10^6 de monocitos en botellas T-75 en 15 mL de RPMI suplementado con GM-CSF (53 ng/mL) e IL-4 (25 ng/ml) (R&D System, Minneapolis, MN, EE. UU.) adicionados en el día 0 y día 3 para obtener iDC en el día 5, luego, de ser necesario para obtener las DC con un fenotipo maduro, en el día 5 se recuperaron por centrifugación (300 g por 10 min a TA) y se contaron las DC y se resuspendieron en RPMI completo para ser sembradas en placas de cultivo de 12 pozos a una densidad de 1×10^6 células/mL a los que se adicionó un cóctel de maduración (MC) (GM-CSF 53 ng/mL, IL-4 25 ng/ml, TNF- α 10 ng/mL, IL-1 β 10 ng/mL y PGE2 1 μ g/mL (Biolegend, San Diego, CA, EE. UU.) por 24 h.

Condiciones de estimulación de los M ϕ y las DC

Para el análisis de la expresión de mRNA de las APC los M ϕ se estimularon con LPS (100ng/mL) durante 6 y 24 h y las DC con coctel de maduración (MC) durante 2, 6, 12 y 24 h. Los M ϕ y las DC también se estimularon con Mycobacterium tuberculosis cepa H37Ra muerta por calor (HKMtb) a una multiplicidad de infección (MOI) de 1:10 (1 célula por 10 bacilos) durante 2, 6, 12 y 24 h. La HKMtb se incubó previamente en un medio que contenía FCS al 10% a 37 °C para favorecer la fagocitosis tipo II.

Para el análisis de la expresión de proteína, las APC fueron estimuladas durante 2, 6, 12 y 24 h con LPS, MC y HKMtb con las mismas concentraciones usadas para la obtención de mRNA.

Purificación de mRNA, síntesis de cDNA y preamplificación

El mRNA total se extrajo con un kit Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) y se cuantificó con el kit de ensayo Qubit™ y un fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Waltham, MA, EE. UU.). Existen reportados 153 genes PDZ en el genoma humano (Apéndice 1). Para el análisis de expresión de los genes que codifican para proteínas PDZ (genes-PDZ) en las APC, se seleccionó un panel de 83 genes PDZ que ya han sido reportados que se expresan en células del sistema inmune. Se incluyeron 64 genes PDZ con un nivel de expresión medio y alto en diversas células de origen mieloide y linfoide previamente reportado.⁵⁶ El conjunto de genes que se usó en este análisis se completó con 11 genes PDZ pertenecientes a la subfamilia MAGUK y 8 genes PDZ implicados en los procesos de tráfico, señalización y reciclaje celular. Cinco genes de referencia fueron incluidos en los análisis de expresión relativa.

Los cebadores se diseñaron utilizando un ensayo Deltagene (Fluidigm, South San Francisco, CA, EE. UU.) y se enumeran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Pares de cebadores utilizados

Target	FP 5'->3'	RP 5'->3'
AHNAK	GCAAGGCATTCGCTCCTGA	AGCCACTACCCTGCCAGTT
APBA3	CTACAAGATGCTCTGCCACGTA	TCCCGTAGGAACTGGCTGTA
ARHGAP21	GGAAGGGTGGCTTCATTTCC	TCCATGGCCGAATACTTCCA
ARHGEF11	GTGGCTACCGTTCCTCCCTA	GTTTCGCTTCTTGTCTCCTCAA
ARHGEF12	TTGATTTCCACCACCTCCA	TGGTGTCCCATGTTTCAGTCA
b2M	TTAGCTGTGCTCGCGCTAC	CTCTGCTGGATGACGTGAGTAA
CARD10	CACAGCTCAGTGAGGAGAAGAA	CACTTTGAGCTTGAGCTGATCC
CARD11	GCTGCCATCCAAGATCAACC	TCTCCAAGAAGACCACATAGCC
CARD14	CCTGGATTATGAGCTCCTAGACAC	CCGAGACATCAAGCCTTCCA
CASK	GCTGACGCTGGTTTTGTGTA	CAGTAGCGTAGAGCTTCCAGTA
CNKS1	CTTCATCTTCGCTGCTGATAC	GACTGGTACTTGGAGATGCA
CNKS2	TGCTGACTGCAGGATATGCA	CTTCCTTGTCACTCTCACTCCA
CYTIP	CCTGATCAGATCGTCCGAAA	GCTTCAAGCTCCGTTCTTTTCA
DEPTOR	AGTAAGCCATGCCACATCCA	TGACAGAGACGACAAACTGACA
DLG1	AACTAGCCAGAAGCGATCCC	CTGGGAAGCCCCTGTCTTTA
DLG2	GGATCCCTGCGAACCAATCA	CCTTGCTCTTGTCTAGTCGAA
DLG3	GATCGGTGTGATCCCCAGTAA	GTCCTGGCATGGAACCTCAC
DLG4	AGCTGGAGCAGGAGTTCAC	ACACGCTTACCTTGTGGTA
DLG5	CGGATCCATGGAGTGGGAAA	TCAAACCCCAGTGCCTTCAA
DVL1	CAAGAACGTGCTCAGCAACC	GGAAGCTTGGCATTGTCATCAAA
DVL2	TGCCTCCCGCCTCCTTAA	TGACGCTGCTGAAGGATGAC
DVL3	TTTGCAGCGACCCAGCTATA	CATCCGAGATCTCCTCCTTAC
ERBIN	TTCCCTCAACAGCCAAGGAC	GTTTCCTCTGTTCTCCACAA
GAPDH	GAACGGGAAGCTTGTCTATCAA	ATCGCCCCACTTGATTTTGG
GIPC1	CTGGCTCTGGCCACAA	GCAGGTCATCCACCTTCTCAA
GIPC2	CTGAGGATTCCTTGGTCTCA	TCCCCAACACAGATTGTTTTAAC
GRASP	ACCTTTGTCTGCCGAGTTC	CTTCCACATTCAGGCCATTGAC
HPRT1	GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA	ACTTCGTGGGGTCTTTTTCAC
HTRA1	CGGGAGGCCCGTTAGTAAA	CAAAGGAGATTCCAGCTGTCAC
HTRA2	TCTGGAGGTCCCCTGGTTAA	GAGATTCCAGCTGTGACCTTCA
IL16	GCAGCCAGTGATGTTTCTGTA	CCTGCCGACATCTTCTCCA
LIMK1	TGAGAAGGTGGATGTGTTCTCC	GTAGTCAGGGTCTGCGTTCA
LIMK2	TGAGACGGTGGATATCTTCTCC	AGGCAGTCAGGATCTGCATA
LIN7A	AGACCAGCTGCTATCAGTGAA	AGCAGCCTTGAGTAGTTC
LIN7B	AAGCTGGTTGTCCGTTACACA	GGTTTCAACCTCGAGACTCCAA
LIN7C	GGACATCAGTAGCAGTCTGAA	TGTCCTTCACTGGCAGCAA
MAGI1	GTTCAAAGCACCCCAAGCAA	CTCGAAGGCTAAAGCCAAATCC
MAGI2	TTCAGCTGCAAGGACACGAA	GCTGTCCGATGTCTGGTTTCA
MAGI3	GTCTCTTTCACCAACCAAAA	CATTTATGGCTCCAAACTTCC

MAST2	TCCAAACTGCTCCACCAGAA	AAAGAATGGGTGCTGCTTCAC
MAST3	TTCCGGCTATGGAACCAACA	AAGGGAAGCTGGTGGAGAC
MPDZ	GGGCTGACGTCAAGCAGTATA	TCTGGTCTCGCTCTAGTGTA
MPP1	CCTGCATTCAAGAGGAAGACC	GCTGAGCAGGGCATTCTTAA
MPP2	GGCAGCCTTTCAGGAAAGAA	GCAGCTCATGACGGTCAAA
MPP3	GTCCGCTTGGTGAAGAACAA	TGATCCTGGCCACCACAA
MPP4	AGGGACTGGACCCTGAACA	AGAGACTGGAACCACCTGAAC
MPP5	GGGAAGGGGACGAAGATAATCA	GCTTCCCTTTGCTGCTGAAA
MPP6	TCACAAAAGAGCTGGGGAAC	CATGGAGGATTGGGCAATTA
MPP7	ACCGTATCGGCGACAAACTA	TCAGTTCATTACGCCCTACTCC
NOS1	TTCCACCAGGAGATGCTCAAC	TTCCAGACATGCGTGTCCA
PARD3	GAACCACGCAGATTGGGAA	TTCACCCGAAGCCTTCCA
PARD6A	GCGCCTACTGGTGCAGAA	CTGCAGAGAGTTGGAGGCAAA
PATJ	TCCCTTTCCAGTGCCATCAA	GCTGCCATCTTCTCACTACTA
PDLIM1	TCAACAATGCCCTGGAGTCAAA	TGGAGGCTGAGCATGGTCTA
PDLIM2	GATTTCCACACGCCCATCA	GATGGCCACGATTATGTCTCC
PDLIM5	CACCGCGAGTCACTTGTC	GGGCCAACCAGTGACACA
PDLIM7	AGGCCAGTCGCGTTCCTT	TGCTCCTCATCCGGGTCTTG
PDZD4	ACAGCATTGCAGCCAAAGAC	GTTCTGGACGTCTACACCGTTA
PDZRN3	GGCCATGCAATTCACAGCTA	TGGACAAGATGGTGGCTGTA
PDZRN4	CCTGCTGATGCAGACAGAAC	CCCAGCTTCTTGTACTGCTA
POLR2A	CTCGCCTCTTCTACTCCAACA	ATGGAGTCCCAATGCCAATA
PPP1R9A	AGAAGGTGGTGTGCTCAA	ACCCACCAAGCTGATTCCA
PPP1R9B	CGAGCCGGAAGATCCATTTC	TCGTTGCGACGATCGTAATCC
PREX1	TACGACGATGGCACCTACAA	AGACGGCAGTAAAGCCTCA
PRX	CGGCGGCAAAGAGGGAA	GAAGAACAACCTCGGGCACTCA
PTPN13	TGAGGGCAATGACCCTTGAA	TCTGGCCAGGCAGTGAAA
PTPN4	TGCTGCCCTTTAGCTTCA	TCTGAGAGGTAGCCTGACAA
RAPGEF2	GAAGTGGAAACAAGAAAGGGACAC	GAATGCTCTTCCACCAAATGCA
RAPGEF6	GTTGTAGCATTGCCAGTGAC	ACATCTCCTACCTCACTCTCC
RGS12	AAGGGACCTGCGCCTAGAAA	TGAGTCCCACTGACCGGTAA
RIMS1	TCACACAAAAGCCTGGTTCC	GCTATACAGGCCCCATTTTCC
SCRIB	AAGACGCCGAAGAGGACTA	TCGATCTCCCTGTCATCCC
SDCBP	TGTCTCTCTATCCATCTCTCGAA	TGGCAGGGTTTGCAGAAA
SHANK3	GCAGTTTGCAAAGCTTCACAC	ACCTTGTCCGTGCTATGCA
SIPA1	ATGCTGCCTTACACCCCTAA	CTGGAACACGATGGTCACAA
SIPA1L1	TGTCACGGTGAAGGTTGTCA	TGCGGTAGGTTTCAGAGCAA
SIPA1L3	TACGTGAGATAACAAGCCATCCC	GTGGCTGAAGTGGGGATCA
SLC9A3R1	GGGGCTGGCAACGAAAA	GGGGCCCTTCTTCATGGTA
SLC9A3R2	TCACCCGTCACCAATGGAA	AGTGTCTTGTTCGGAACCA
SNTA1	TGCAGGTCCTCAAGAAGACA	AATACGGTGAGACGTCCTTCA

SNTB1	CCTGGTTCAGCCCAGTTCA	CCTGGGGTGATCCCTTTCC
SNX27	GACGTCGGGGATTGGAAGAATA	TCCTGCATGATGTCACTCTCAC
TAX1BP3	GAGCAGGGTTCGAGATGTCCTA	ACCTTGACGCAGCTTGTGAA
TBP	TGCCCCGAAACGCCGAATATA	CGTGGTTCGTGGCTCTCTTA
TIAM1	ACTGCTGTGGTCCTTGTGTA	AAATGGAAAGCCTGTGAGATCC
TJP1	AGCCAGCCTGCTAAACCTA	TGGCTTGCCAATCGAAGAC
TJP2	CACTGGAGTGGTCCGGTAAA	GCTTTCGGAGTCACATCCAGTA
WHRN	TCGTCATGGCCCTGTTCAA	GGGAAATGGTGCCTCTCA

Para medir los niveles de mRNA de cada uno de los genes PDZ, se usó mRNA total (200 ng de RNA total en un volumen de reacción de 20 μ L) con ello se sintetizó cDNA con el kit OneStep RT-PCR (Qiagen, Hilden, Alemania). Posteriormente, se realizó una mezcla con los 88 pares de cebadores (**Tabla 2**) que reconocen a los genes PDZ, bajo las siguientes condiciones: 50 °C durante 30 min, 95 °C durante 15 min, seguido de 15 ciclos de amplificación cíclica previa a la PCR a 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 60 s y 72 °C durante 60 s. El producto preamplificado se diluyó 15 veces con Tampón Tris/ácido etilendiaminotetraacético (TE).

PCR en tiempo real

La qPCR se realizó en un circuito fluídico integrado (IFC) BioMark 48.48 (Fluidigm, South San Francisco, EE. UU.) combinando 48 muestras preamplificadas con 48 pares de cebadores para llevar a cabo las reacciones de qPCR multiparalelas. La mezcla de las muestras incluía: SSoFast Master Mix (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) y 20 μ L de reactivo de carga de muestra (Fluidigm, South San Francisco, CA, EE. UU.) para cada cDNA preamplificado. Cada una de las 88 mezclas diferentes para cada uno de los ensayos con 100 μ M del respectivo par de cebadores y tampón de suspensión de DNA (tampón TE). El ciclo térmico y de detección, se realizaron en un instrumento BioMark (Fluidigm, South San Francisco, CA, EE. UU.) con las siguientes condiciones: 15 min a 95 °C, 30 ciclos a 94 °C durante 10 s, 54 °C durante 30 s y 72 °C durante 10 s. El análisis de la curva de fusión (70–90 °C) se realizó después de la amplificación por PCR para evaluar cada uno de los distintos amplicones. Se analizaron los valores de Cq y las curvas de amplificación utilizando el software Real-Time PCR Analysis 4.5.2 (Fluidigm, South San Francisco, CA, EE. UU.).

Western blot

Los Mφ y las DC una vez estimulados, se cosecharon y lisaron con buffer RIPA (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% Deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 140mM NaCl) complementado con inhibidores de proteasas. El sobrenadante se recolectó en tubos eppendorf de 1.5 mL y se cuantificó la concentración de proteína por el método colorimétrico de Lowry mediante el estuche comercial DC Protein assay (BioRad laboratorios Hércules, California USA), usando albúmina sérica bovina (BSA) como curva estándar. Las muestras fueron mezcladas con el amortiguador de carga 6X (1.5M de Tris pH6.8, 10% de SDS Glicerol + Azul de Bromofenol, β-mercaptoetanol, 500mM de EDTA) y separadas (80 µg de proteína total) mediante SDS-PAGE en un gel al 7.5% de acrilamida mediante una electroforesis. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y para detectar las proteínas de interés se usaron los anticuerpos que reconocen a las proteínas ZO-1 (Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.), en una dilución 1:1000, ZO-2 (Cell Signaling, Danvers, MA, EE. UU.) en una dilución de 1:500, Tubulina (Genetex) en una dilución de 1:2000. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante, posteriormente se lavaron 4 veces por 10 min con TBS 1X, 0.1% Tween 20 y se incubaron por una hora con el anticuerpo secundario anti inmunoglobulinas de conejo o ratón conjugado a HRP (Peroxidasa de rábano) a una dilución de 1:2000 durante una hora a temperatura ambiente (TA) en agitación constante, seguido de 4 lavados de 10 min con TBS 1X, 0.1% Tween 20. Las membranas se revelaron con el reactivo Chemiluminescent HRP Substrate (MILLIPORE, CA, EE. UU) que consiste en luminol y solución de peróxido de hidrógeno en el fotodocumentdor ChemiDOC XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.).

Inmunofluorescencia

Para la realización de la inmunofluorescencia (IF) de las DC, se sembraron 5×10^6 monocitos en 5mL de RPMI completo en botellas T-25 y se sometieron al proceso de diferenciación antes mencionado. Al término de su diferenciación las células dendríticas inmaduras (iDC) se cosecharon y centrifugaron (200g por 10 min) y se resuspendió el botón celular en PBS para obtener una concentración de 3×10^5 células/60µL., los cuales se colocaron en cubreobjetos previamente tratados con poli-DL-Lisina (SIGMA-ALDRICH), se incubaron por 20 min y se realizaron 2 lavados de 1ml de PBS 1x.

Con respecto a los M ϕ , se sembraron 300×10^5 monocitos/pozo en placa de 24 pozos con cubreobjetos con medio RPMI completo y se sometieron a su proceso de diferenciación, como se mencionó anteriormente, al término de su diferenciación, tanto los M ϕ como las DC fueron fijadas y permeabilizadas con 0.5 mL de metanol a -20°C durante 4 minutos, consecutivamente fueron lavadas 2 veces con 1 mL de PBS 1X. Para bloquear las células se utilizaron 60 μL de Solución de bloqueo Cell sataining Buffer (Biolegend, San Diego, CA. EE. AA.) durante 20 min y posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min con solución de lavado, para posteriormente incubar con los anticuerpos primarios; ZO-1 (Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.), en una dilución 1:200 y ZO-2 (Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.) en una dilución de 1:200 par IF anti ZO-2 (Cell Signaling, Danvers, MA, EE. UU.). Las células se lavaron con solución de lavado y se incubaron con el anticuerpo secundario Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE.AA.) en una dilución 1:200. Las preparaciones fueron montadas sobre un portaobjetos con $5\mu\text{L}$ de medio de montaje para ser observadas en un microscopio confocal Olympus Fluoview 1000.

Análisis de los datos

Se utilizó el paquete de software qBase + (BioGazelle, Zwijnaarde, Bélgica, <https://www.qbaseplus.com/> consultado el 15 de febrero de 2021) para determinar la estabilidad de la expresión de los genes de referencia con la aplicación del algoritmo geNorm para identificar los genes de referencia más estables (geNorm M) y la variación por pares utilizando $n + 1$ genes de referencia requeridos para determinar el número más bajo de genes de referencia necesarios para una normalización precisa (geNorm V), de acuerdo con las normas MIQE.^{57,58} La expresión relativa de cada gen blanco se determinó utilizando tres a seis muestras de donantes de células independientes (replicas biológicas) y tres repeticiones técnicas por muestra y se comparó con las referencias elegidas.

Normalizamos los datos de qPCR sin procesar (valores de cuantificación del ciclo (Cq)) con la media geométrica valor de los genes de referencia más estables para cada tipo celular (genes GAPDH, TBP y b2M fueron los más estables para los M ϕ , mientras que GAPDH, TBP y POLR2A para las DC). Se calculó la expresión relativa de cada gen PDZ en cada condición en comparación con la condición no estimulada y se construyó una matriz de cambio de plegado. Esta matriz se utilizó para la transformación Z y análisis de los genes expresados diferencialmente (DEG). Los datos de los DEG se expresan como la media de

log₂ de las veces cambio. La normalidad se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. ANOVA unidireccional con la prueba de Dunnett para comparar la expresión después de cada tratamiento con la expresión inicial en los Mφ o las DC no estimulados. La significación estadística se fijó en $p < 0,05$. El análisis de expresión génica global no supervisado se realizó utilizando el análisis de componentes principal (PCA). Los análisis DEG y PCA se realizaron utilizando la versión GraphPad Prism 9.1.2 (Software GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.).

Los datos de RT-qPCR se transformaron en puntuación Z y se agruparon usando el método de la vinculación promedio de la medida de la distancia por la correlación de Pearson por el servidor web Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca/expression/> consultado el 11 de abril de 2022). Luego, las puntuaciones Z fueron utilizadas para calcular la relación Z. Una puntuación $Z > 2.0$ o < -2.0 se consideró significativa para resaltar condiciones en las que un gen en particular tuvo cambios máximos en la expresión génica en la puntuación Z durante el transcurso del tiempo de su estimulación.⁵⁹ Los diagramas de Venn se construyeron usando el Servidor web de InteractiVenn (<http://www.interactivenn.net/> consultado el 19 de abril de 2022). Para el análisis de las bandas observadas en el Western blot, se obtuvieron con usando el analizador de imágenes ChemiDoc XRS con el software Image Lab versión 5.2 build 14; 2014 (Bio-Rad Laboratories), el análisis densitométrico se cuantificó con el Software ImageJ, correspondiente a tres experimentos independientes, el análisis estadístico se realizó con ANOVA unidireccional con la prueba de Dunnett para comparar la expresión después de cada tratamiento con la expresión inicial en Mφ o DC no estimulados.

RESULTADOS

Diferentes PAMP inducen perfiles de expresión génica distintos de genes PDZ en M ϕ derivado de monocitos humanos

Se compararon los cambios en la expresión relativa de los genes PDZ en M ϕ tras el estímulo de la fagocitosis inducido por HKMtb, así como con un estímulo proinflamatorio del TLR4 con LPS. Los M ϕ fueron expuestos a bacterias *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (HKMtb) muerta por calor. Las exposiciones se hicieron durante 2, 6, 12 y 24 h o estimulados con LPS durante 6 y 24 h. En estas condiciones de estimulación, se realizó un análisis para identificar a los genes de referencia más estables a partir de los genes: HPRT1, b2M, POLR2A, TBP y GAPDH y se seleccionamos mediante el análisis geNorm M and V los genes de referencia más estables para M ϕ que resultaron ser b2M, TBP y GAPDH. (**Figura 11**)

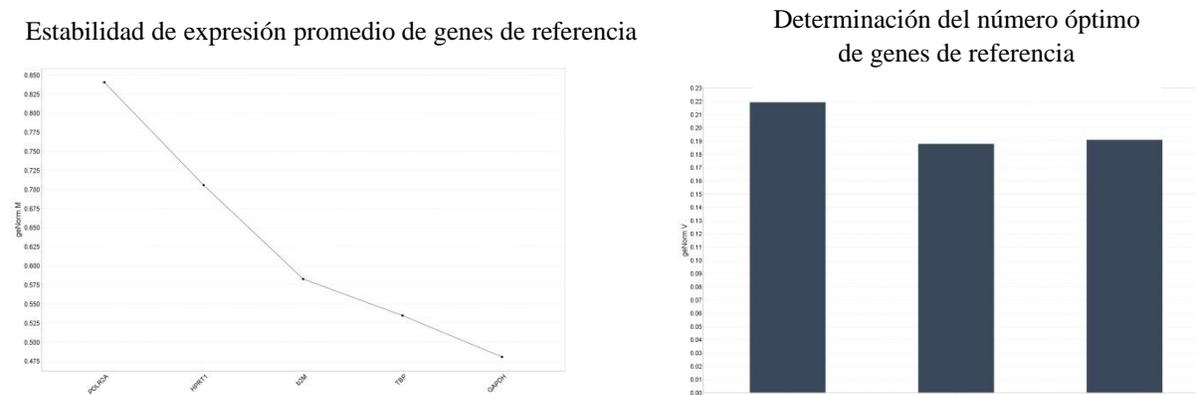


Figura 11. Análisis geNorm M and V en M ϕ . Los genes de referencia más estables para M ϕ en estas condiciones de estimulación se calcularon de acuerdo con los valores de geNorm M y geNorm V.

La media geométrica de estos genes se utilizó para normalizar los cambios en la expresión de los genes PDZ. Posteriormente, los valores de veces de cambio expresados en \log_2 se transformaron en puntuaciones Z para comparar los perfiles transcripcionales con ambos estímulos. Se encontró que un total de 75 de los 83 genes PDZ analizados se expresaban en los M ϕ y las DC en condiciones basales; dos genes (PDZRN4 y CNKSR1) fueron expresados exclusivamente por los M ϕ y otros dos genes (CNKSR2 y NOS1) fueron expresados exclusivamente por las DC en condiciones basales. Aunque NOS1 no se expresó en condiciones basales en los M ϕ , fue inducido por ambos estímulos. (**Figura 12A**) La

respuesta transcripcional general de los M ϕ a HKMtb se resume en un mapa de calor, donde mediante un análisis de conglomerados jerárquico no supervisado de los genes PDZ expresados de forma basal y sus cambios con el estímulo HKMtb en una cinética de estimulación, donde los datos se presentan como puntuación Z, que corresponde al cambio de expresión de cada punto de tiempo con respecto a la media de los cambios durante todo el transcurso del tiempo de la cinética de estimulación, en la **Figura 12 B** identificamos dos grupos de expresión (C) (C1 y C2) con una respuesta transcripcional característica. Por un lado, identificamos una reacción bifásica dentro de ambos grupos: C1 contiene genes PDZ que aumentaron a las 2 y/o 6 h disminuyeron a las 12 y 24 h. En cambio, C2 tenía genes con expresión disminuida a las 2 y 6 h, pero aumentaba principalmente a las 12 y 24 h (**Figura 12B**). Los genes PDZ con los cambios más significativos en la expresión génica (relación Z) después de la estimulación con HKMtb se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Genes PDZ con los cambios más significativos en la expresión génica después de la estimulación M ϕ con HKMtb. El valor de la relación Z se usó para representar las condiciones en las que un gen en particular tuvo sus cambios máximos considerando todo el transcurso del tiempo. En verde están aquellos genes que aumentaron su expresión, y en rojo, los que disminuyeron. Se consideró significativa un valor de relación Z > 2.0 o < -2.0.

M ϕ							
HKMtb							
2h		6h		12h		24h	
LIMK2	↑	APBA3	↑	AHNAK	↑	APBA3	↑
MAGI3	↑	DVL1	↑	APBA3	↑	LIMK2	↑
PDZRN4	↑	GIPC1	↑	DVL3	↑	MPP7	↑
PREX1	↑	LIMK2	↑	GIPC1	↑	PDZRN4	↑
RAPGEF2	↑	PDLIM5	↑	LIMK2	↑	PPP1R9B	↑
SIPA1	↑	PDZRN4	↑	PDLIM5	↑	PPP1R9A	↑
ARHGAP21	↓	PPP1R9B	↑	PPP1R9B	↑	RAPGEF2	↑
ARHGEF11	↓	RAPGEF2	↑	PRX	↑	SIPA1	↑
DLG4	↓	SIPA1	↑	RAPGEF2	↑	TAX1BP3	↑
DVL2	↓	ARHGAP21	↓	SCRIB	↑	ARHGAP21	↓
HTRA2	↓	ARHGEF12	↓	SIPA1	↑	DLG4	↓
LIMK1	↓	CARD11	↓	ARHGAP21	↓	DVL2	↓

LIN7B	↓	CNKSR1	↓	DLG4	↓	HTRA1	↓
MAST2	↓	DLG3	↓	DVL2	↓	IL16	↓
MAST3	↓	DLG4	↓	IL16	↓	LIMK1	↓
MPP1	↓	DVL2	↓	LIMK1	↓	LIN7B	↓
MPP5	↓	HTRA2	↓	LIN7B	↓	LIN7C	↓
MPP6	↓	LIMK1	↓	LIN7C	↓	MAST2	↓
PARD3	↓	LIN7B	↓	MAST2	↓	MAST3	↓
PDLIM2	↓	MAST2	↓	MAST3	↓	MPP1	↓
PDZRN3	↓	MAST3	↓	MPP1	↓	MPP6	↓
RGS12	↓	MPP1	↓	PARD3	↓	PDLIM2	↓
SDCBP	↓	PARD3	↓	PDLIM2	↓	PDZD4	↓
SLC9A3R2	↓	PARD6	↓	PTPN4	↓	PDZRN3	↓
		PDLIM2	↓	RGS12	↓	RGS12	↓
		PDZRN3	↓	SDCBP	↓	SDCBP	↓
		PTPN4	↓	SLC9A3R2	↓	SLC9A3R2	↓
		RGS12	↓	SNTA1	↓	SNTA1	↓
		RIMS1	↓	TIAM1	↓	TIAM1	↓
		SDCBP	↓				
		SLC9A3R1	↓				
		SLC9A3R2	↓				
		TIAM1	↓				

La respuesta transcripcional de M ϕ estimulados con LPS se clasificó en dos grupos de genes (**Figura 12C**). C3 agrupó genes que disminuían con HKMtb a las 6 y 24 h que aumentaban con el estímulo de LPS. Por el contrario, los genes en C4 aumentaban por el estímulo de la fagocitosis y disminuían en su mayoría con el estímulo de LPS. El conjunto de genes PDZ con los cambios más significativos (relación Z) en función de la comparación de ambos estímulos se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Genes PDZ correspondientes a los cambios más significativos en la expresión génica comparando la estimulación de M ϕ con HKMtb y LPS. El valor de la relación Z se usó para representar las condiciones en las que un gen en particular tuvo sus cambios máximos considerando todo el transcurso del tiempo de estimulación. En verde están aquellos genes que aumentaron su expresión, y en rojo, los que disminuyeron. Se consideró significativa un valor de relación Z > 2.0 o < -2.0.

M ϕ							
HKMtb				LPS			
6h		24h		6h		24h	
GIPC1	↑	MPP3	↑	CASK	↑	CYTIP	↑
MPP3	↑	MPP7	↑	CYTIP	↑	GIPC1	↑
ARHGEF12	↓	ARHGAP21	↓	DVL3	↑	GRASP	↑
PARD6	↓	IL16	↓	GIPC2	↑	LIMK2	↑
PDZRN3	↓	PDZD4	↓	GRASP	↑	PDLIM1	↑
		PDZRN3	↓	LIMK2	↑	SIPA1	↑
				MAGI3	↑	ARHGAP21	↓
				RAPGEF2	↑	DLG1	↓
				TJP1	↑	DLG5	↓
				TJP2	↑	HTRA1	↓
				CARD11	↓	IL16	↓
				CNKSRI	↓	LIMK1	↓
				DLG1	↓	LIN7A	↓
				DLG4	↓	LIN7C	↓
				DLG5	↓	MAST2	↓
				DVL2	↓	MPP1	↓
				HTRA1	↓	MPP6	↓
				HTRA2	↓	PDLIM2	↓
				IL16	↓	PDZRN3	↓
				LIN7A	↓	RAPGEF6	↓
				LIN7B	↓	RGS12	↓
				MAST2	↓	SDCBP	↓
				MAST3	↓	SNTA1	↓
				MPP5	↓	SNTB1	↓
				PDLIM2	↓	TIAM1	↓

PDZRN3	↓
PTPN4	↓
SIPA1L3	↓
SLC9A3R1	↓
SLC9A3R2	↓
TIAM1	↓

Para visualizar estos cambios globalmente, aplicamos el método de análisis de PCA. El primer componente principal (PC1) explicó el 81,50 % de la varianza en el conjunto de datos del gen PDZ, mientras que el PC2 explicó el 7,90 %. Según el agrupamiento, los estímulos fagocíticos provocaron cambios de expresión similares entre los puntos de tiempo, que se agruparon de manera distinta a los cambios con LPS (**Figura 12D**).

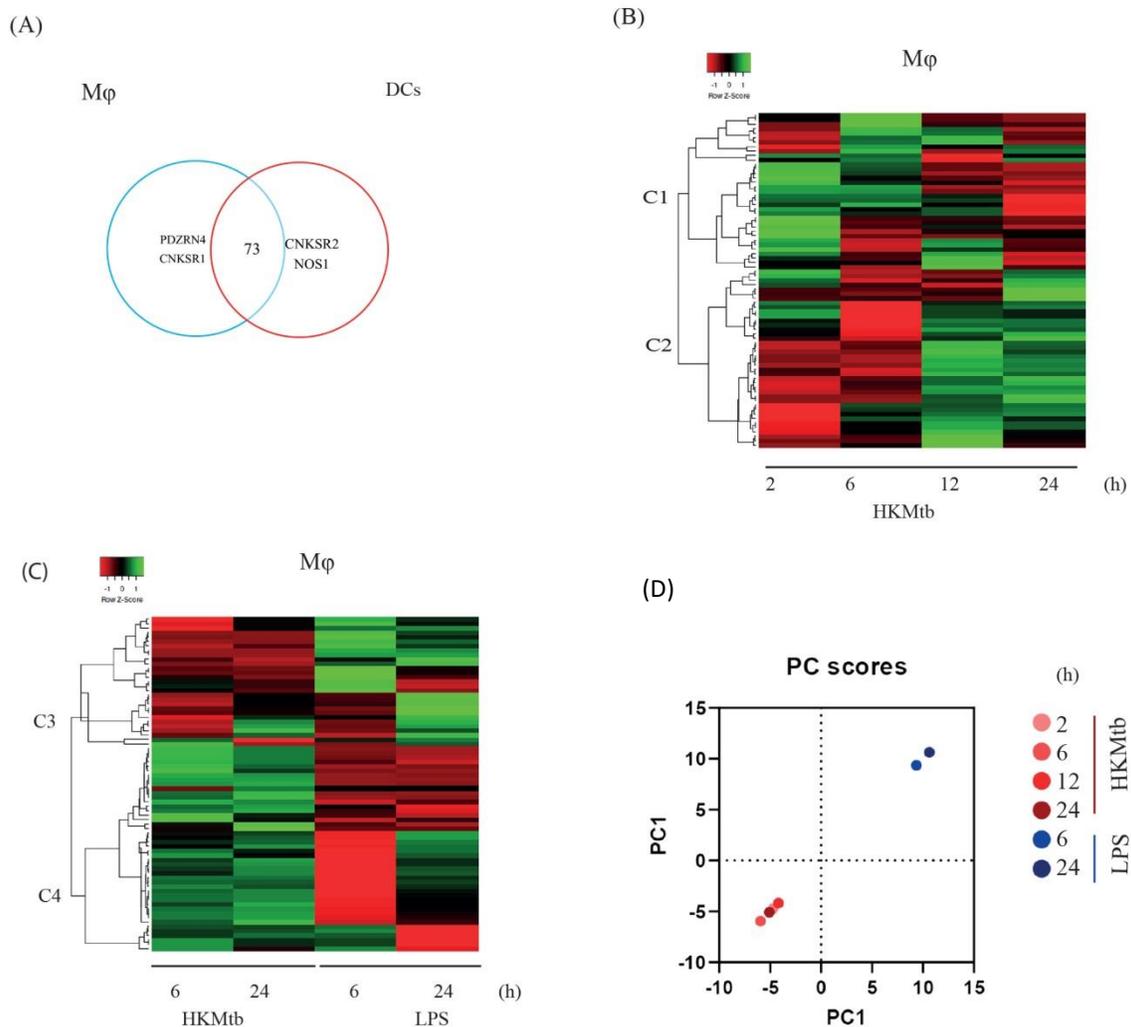


Figura 12. Diferentes PAMP inducen perfiles de expresión génica distintos de genes PDZ en M ϕ derivado de monocitos humanos. (A) Diagrama de Venn de los genes PDZ expresados antes de la estimulación en M ϕ y DC. Se encontró que un total de 75 de los 83 paneles de genes se expresaron en M ϕ al inicio del estudio, ocho genes no se expresaron en condiciones basales (CARD10, CARD14, DLG2, MAGI1, MAGI2, MPP4, NOS1, CNKSR2). (B) Mapa de calor que muestra el agrupamiento jerárquico de los cambios en el perfil de expresión de los genes PDZ de M ϕ estimulados con HKMtb referenciados a M ϕ en condiciones basales. Los datos se presentan como puntuación Z, que corresponde al cambio de expresión de cada punto de tiempo con respecto a la media de los cambios durante todo el transcurso del tiempo, donde la puntuación Z negativa indica una disminución (rojo) y la puntuación Z positiva indica un aumento (verde) de cada gen PDZ. (C) Mapa de calor que muestra el agrupamiento jerárquico de los cambios en el perfil de expresión génica PDZ de M ϕ comparando la estimulación por fagocitosis (izquierda) o LPS (derecha) durante 6 y 24 h, con referencia a M ϕ en condiciones basales. Los datos se presentan como puntuación Z, donde la puntuación Z negativa indica una disminución (rojo) y la puntuación Z positiva indica un aumento (verde) de la expresión génica. (D) Análisis PCA de datos de qPCR de M ϕ estimulados con HKMtb a las 2, 6, 12, 24 h y con LPS a las 6 y 24 h.

Diferentes PAMP y DAMP inducen distintos perfiles de expresión de genes PDZ en DC derivadas de monocitos humanos

Las DC se estimularon con se estimularon con Mycobacterium tuberculosis cepa H37Ra muerta por calor (HKMtb) a una multiplicidad de infección (MOI) de 1:10 (1 célula por 10 bacilos) o con el cóctel de maduración (MC) durante 2, 6, 12 y 24 h para analizar los cambios en la expresión relativa de los genes PDZ. En estas condiciones de estimulación, usamos HPRT1, b2M, POLR2A, TBP y GAPDH y se seleccionamos mediante el análisis geNorm M and V los genes de referencia más estables para DC que resultaron ser POLR2A, TBP y GAPDH. **Figura 13**

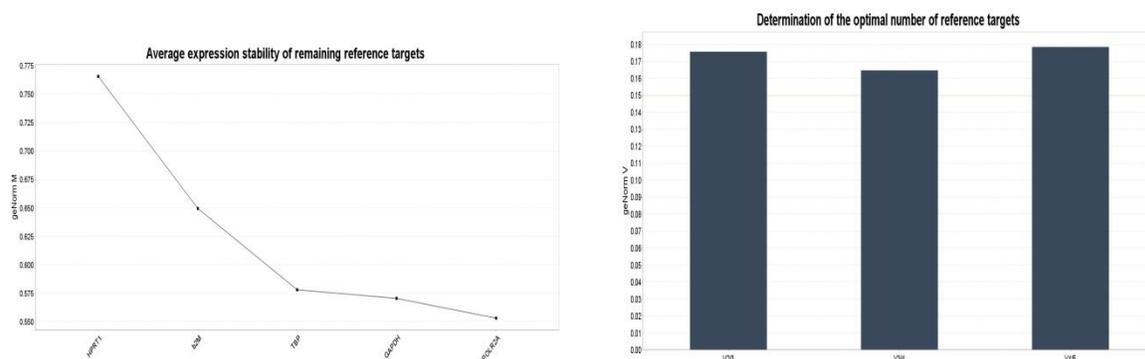


Figura 13. Análisis geNorm M and V en DC. Los genes de referencia más estables para DC en estas condiciones de estimulación se calcularon de acuerdo con los valores de geNorm M y geNorm V.

La respuesta transcripcional general de las DC a ambos estímulos se resume en un mapa de calor donde observamos dos grupos principales; C5 y C6 (**Figura 14A**). De acuerdo con la puntuación Z, C5 agrupó principalmente genes regulados positivamente durante todo el curso de tiempo con HKMtb; sin embargo, con MC, estos genes aumentaron a las 2 h y disminuyeron a partir de las 6 h. Por el contrario, los genes PDZ en C6 disminuyeron con la estimulación de la HKMtb y aumentaron con MC a las 12 y 24 h. Los genes PDZ con los cambios más significativos en la expresión génica (relación Z) se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Genes PDZ con los cambios más significativos en la expresión génica tras los estímulos HKMtb y MC en DC. El valor de la puntuación Z se usó para representar las condiciones en las que un gen en particular tuvo sus cambios máximos considerando todo el transcurso del tiempo. En verde están aquellos genes que aumentaron su expresión, y en rojo, los que disminuyeron. Se consideró significativa un valor de relación $Z > 2.0$ o < -2.0 .

DC															
HKMtb							MC								
2h		6h		12h		24h		2h		6h		12h		24h	
WHRN	↑	PPP1R9A	↑	CNKS2	↑	CNKS2	↑	GRASP	↑	GRASP	↑	WHRN	↑	DEPTOR	↑
DLG3	↑	CASK	↓	TJP1	↑	CYTIP	↑	CARD11	↑	CYTIP	↑	APBA3	↑	APBA3	↑
PPP1R9A	↑	DLG1	↓	DLG1	↓	DEPTOR	↑	CYTIP	↑	PARD3	↑	CYTIP	↑	CYTIP	↑
TJP1	↑	DVL2	↓	DVL2	↓	GRASP	↑	LIN7A	↑	TJP1	↑	DEPTOR	↑	ARHGEF12	↓
DLG1	↓	DVL3	↓	DVL3	↓	MPP3	↑	PDZD4	↑	AHNAK	↓	GRASP	↑	DLG1	↓
DVL2	↓	HTRA2	↓	HTRA2	↓	NOS1	↑	RAPGEF2	↑	CASK	↓	MPP3	↑	DLG5	↓
DVL3	↓	LIMK2	↓	LIMK2	↓	TJP1	↑	ARHGEF11	↓	DLG1	↓	SIPA1L1	↑	DVL2	↓
GIPC1	↓	LIN7B	↓	LIN7B	↓	DLG1	↓	DLG1	↓	DLG4	↓	TIAM1	↑	DVL3	↓
HTRA2	↓	MAGI3	↓	MAGI3	↓	DLG5	↓	DVL2	↓	DVL2	↓	TJP1	↑	ERBIN	↓
LIMK2	↓	MAST3	↓	MPDZ	↓	DVL2	↓	DVL3	↓	DVL3	↓	ARHGAP21	↓	HTRA2	↓
LIN7B	↓	MPP5	↓	MPP6	↓	DVL3	↓	HTRA2	↓	ERBIN	↓	DLG1	↓	IL16	↓
MAGI3	↓	MPP6	↓	MPP7	↓	HTRA2	↓	IL16	↓	HTRA2	↓	DVL2	↓	LIMK1	↓
MAST3	↓	MPP7	↓	PTPN4	↓	IL16	↓	LIMK2	↓	IL16	↓	DVL3	↓	LIMK2	↓
MPP6	↓	PTPN4	↓	RAPGEF6	↓	LIMK2	↓	LIN7B	↓	LIMK1	↓	ERBIN	↓	LIN7B	↓
MPP7	↓	SCRIB	↓	SIPA1	↓	LIN7B	↓	MAGI3	↓	LIMK2	↓	GIPC1	↓	MAGI3	↓
PRX	↓	SIPA1	↓	SNX27	↓	MAGI3	↓	MAST3	↓	LIN7B	↓	HTRA2	↓	MAST2	↓
PTPN4	↓	SLC9A3R1				MAST3	↓	MPP6	↓	MAGI3	↓	IL16	↓	MAST3	↓
SCRIB	↓	SNTB1				MPP5	↓	MPP7	↓	MAST3	↓	LIMK1	↓	MPP1	↓
SIPA1	↓	SNX27				MPP6	↓	PPP1R9B	↓	MPP1	↓	LIMK2	↓	MPP6	↓
SNX27	↓					MPP7	↓	PRX	↓	MPP6	↓	LIN7B	↓	MPP7	↓
						PTPN4	↓	PTPN4	↓	MPP7		MAGI3	↓	PARD6A	↓
						SIPA1	↓	SIPA1	↓	PREX1	↓	MAST3	↓	PDLM2	↓
						SLC9A3R1	↓	SLC9A3R1	↓	PRX	↓	MPP1	↓	PTPN4	↓
						SNX27	↓	SNX27	↓	PTPN4	↓	MPP6	↓	RGS12	↓

SIPA1	↓	MPP7	↓	SDCBP	↓
SLC9A3R1	↓	PDLIM2	↓	SIPA1	↓
SLC9A3R2	↓	PREX1	↓	SLC9A3R1	↓
SNTA1	↓	PRX	↓	SNTA1	↓
SNTB1	↓	PTPN4	↓	SNTB1	↓
SNX27	↓	RGS12	↓	SNX27	↓
TAX1BP3	↓	SDCBP	↓	TAX1BP3	↓
TJP2	↓	SIPA1	↓		
		SLC9A3R1	↓		
		SNTA1	↓		
		SNTB1	↓		
		SNX27	↓		
		TAX1BP3	↓		
		TJP2	↓		

Se procedió a analizar los componentes principales de estos datos. PC1 explicó el 39,57 % de la varianza en el conjunto de datos, mientras que el PC2 explicó el 21,77 %. Los datos mostraron diferencias pronunciadas durante todo el transcurso del tiempo con ambos estímulos y un comportamiento diferente entre los estímulos (**Figura 14B**).

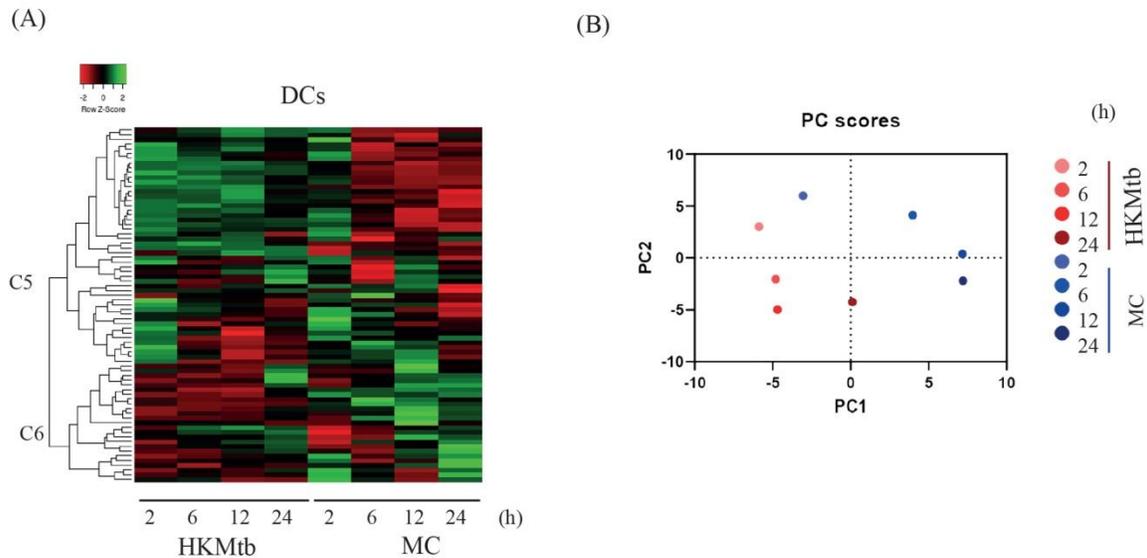


Figura 14. Diferentes estímulos indujeron perfiles de expresión génica específicos de genes PDZ en DC derivadas de monocitos humanos. Se encontró que un total de 75 de los 83 genes PDZ analizados se expresaron en DC en condiciones basales, ocho genes no se expresaron en condiciones basales (CARD10, CARD14, DLG2, MAGI-1, MAGI2, MPP4, PDZRN4, CNKSR1). (A) Mapa de calor que muestra el agrupamiento jerárquico de los cambios en el perfil de expresión de genes PDZ de las DC a las 2, 6, 12 y 24 h después de la estimulación con HKMtb y MC, con referencia a las DC no estimuladas. Los datos se presentan como puntuación Z, que corresponde al cambio de expresión de cada punto de tiempo con respecto a la media de los cambios durante todo el transcurso del tiempo, donde la puntuación Z negativa indica una disminución (rojo) y la puntuación Z positiva indica un aumento (verde) de cada gen PDZ. (B) Análisis PCA de datos de qPCR de DC estimuladas durante 2, 6, 12 y 24 h con HKMtb o MC.

La fagocitosis de HKMtb induce perfiles de expresión de genes PDZ distintos en Mφ y DC

Se compararon y analizaron los perfiles transcripcionales de los 73 genes PDZ expresados en forma basal en DC y Mφ derivados de monocitos humanos estimulados por la misma Mycobacteria H37Ra muerta por calor incubada con suero que favorece la fagocitosis tipo II (**Figura 15A**); Se identificaron dos agrupaciones principales, una donde los genes C7 aumentaban en Mφ, mientras que en las DC disminuían durante el transcurso del tiempo de estimulación. Por el contrario, en C8, la expresión de genes PDZ disminuyó en Mφ y aumentó en las DC durante todo el transcurso del tiempo. Los cambios más significativos en la expresión génica (relación Z) se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Genes PDZ con los cambios más significativos en la expresión de genes PDZ en Mφ vs DC después del estímulo fagocítico. El valor de la puntuación Z se usó para representar las condiciones en las que un gen en particular tuvo sus cambios máximos considerando todo el transcurso del tiempo. En verde están aquellos genes que aumentaron su expresión, y en rojo, los que disminuyeron. Se consideró significativa un valor de relación Z > 2.0 o < -2.0.

HKMtb															
Mφ							DC								
2h		6h		12h		24h		2h		6h		12h		24h	
DVL2	↓	APBA3	↑	APBA3	↑	APBA3	↑	PDLIM7	↑	PPP1R9A	↑	DEPTOR	↑	APBA3	↑
MAST2	↓	DVL2	↓	DVL2	↓	ARHGAP21	↓	PPP1R9A	↑	CASK	↓	PPP1R9A	↑	CYTIP	↑
		MAST2	↓	MAST2	↓	DVL2	↓	SIPA1L1	↑	DVL2	↓	TJP1	↓	DEPTOR	↑
		PARD6	↓	PDLIM2	↓	IL16	↓	ARHGEF11	↓	HTRA2	↓	DVL2	↓	GRASP	↑
		PDLIM2	↓			MAST3	↓	DLG1	↓	IL16	↓	HTRA2	↓	MPP2	↑
						PDLIM2	↓	DVL2	↓	LIN7B	↓	IL16	↓	MPP3	↑
						PDZD4	↓	HTRA2	↓	MAST3	↓	LIMK1	↓	PATJ	↑
								IL16	↓	MPP5	↓	LIN7B	↓	WHRN	↑
								LIMK1	↓	MPP6	↓	MAST3	↓	DLG1	↓
								LIN7B	↓	PTPN4	↓	MPDZ	↓	DLG4	↓
								MAST3	↓	SLC9A3R1	↓	MPP1	↓	DLG5	↓
								PREX1	↓	SNTA1	↓	MPP6	↓	DVL2	↓
								PRX	↓	SNTB1	↓	PARD6	↓	ERBIN	↓
								PTPN4	↓			PDZRN3	↓	HTRA2	↓
								SIPA1L3	↓			PTPN4	↓	IL16	↓

SNTA1	↓		
RAPGEF6	↓	LIMK1	↓
SDCBP	↓	LIN7B	↓
SNTA1	↓	MAST2	↓
		MAST3	↓
		MPP1	↓
		MPP5	↓
		MPP6	↓
		PDLM2	↓
		PTPN4	↓
		SDCBP	↓
		SLC9A3R1	↓
		SNTA1	↓
		TJP2	↓

El análisis de componentes principales muestra PC1 explicó el 81,50 % de la varianza en el conjunto de datos, mientras que el PC2 explicó el 7,90 % (**Figura 15B**), con un comportamiento distinto de la expresión de genes PDZ en M ϕ vs DC con el mismo estímulo fagocítico. Los cambios de expresión fueron sutiles y similares entre los diferentes tiempos de estimulación en M ϕ , en tanto que, en las DC, los cambios fueron más pronunciados y disímiles entre diferentes puntos de tiempo (**Figura 15B**).

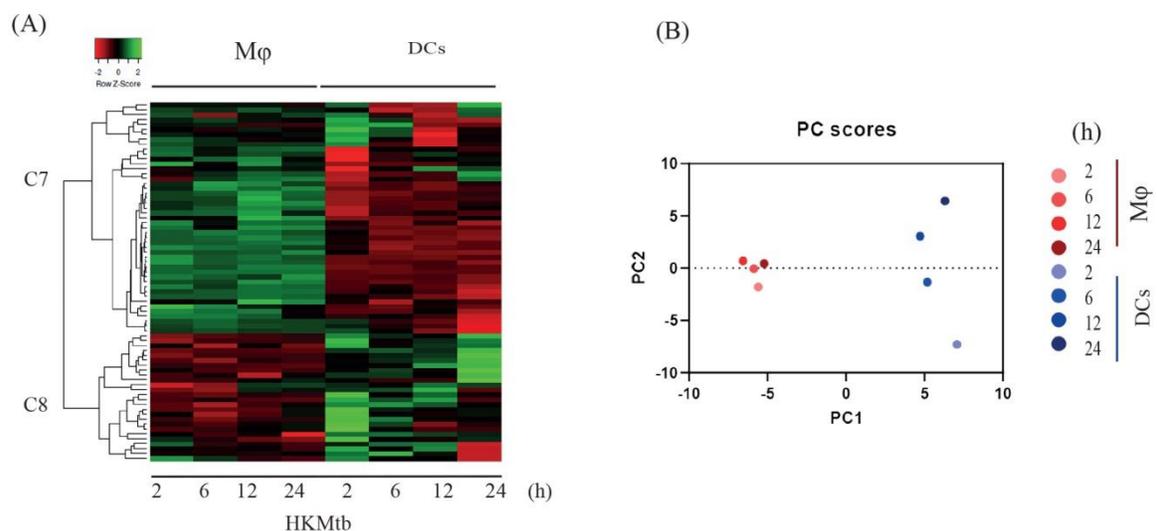


Figura 15. La fagocitosis indujo perfiles de expresión distintos de genes PDZ en M ϕ y DC derivadas de monocitos humanos. (A) Mapa de calor que muestra el agrupamiento jerárquico de los cambios en el perfil de expresión de genes PDZ en ambas APC estimuladas a las 2, 6, 12 y 24 h con la fagocitosis de HKMtb referenciados a M ϕ y DC no estimuladas. Los datos se presentan como puntuación Z, que corresponde al cambio de expresión de cada punto de tiempo con respecto a la media de los cambios durante todo el transcurso del tiempo, donde la puntuación Z negativa indica una disminución (rojo) y la puntuación Z positiva indica un aumento (verde) de cada gen PDZ. (B) Análisis PCA de datos de expresión relativa de los genes PDZ de M ϕ y DC estimulados con HKMtb durante 2, 6, 12 y 24 h.

Análisis de genes PDZ expresados diferencialmente (DEG)

Los datos se representan como veces de cambio en log₂ de tres a seis donantes sanos. Los genes PDZ expresados diferencialmente en los Mφ a las 2, 6, 12 y 24 h posteriores a la estimulación con HKMtb se muestran en la **(Figura 16A)** y 6 y 24 h posteriores a la estimulación con LPS en la **(Figura 16B)** en comparación con la expresión basal en Mφ. El estímulo HKMtb indujo un número limitado de DEG en Mφ con cero genes a las 2 h, dos genes a las 6 h, dos genes a las 12 h y tres genes a las 24 h. En particular, PDLIM2 tuvo cambios significativos de 6 h a 24 h con estímulo HKMtb **(Figura 16C)**.

Notablemente, hubo un mayor número de DEG en Mφ estimulados con LPS en comparación con el estímulo de fagocitosis. Con LPS se encontraron 27 DEG a las 6 h y 16 a las 24 h; además, un grupo de 12 genes que se modificaron desde las 6 hasta las 24 h. **Figura 16D y Tabla 7.**

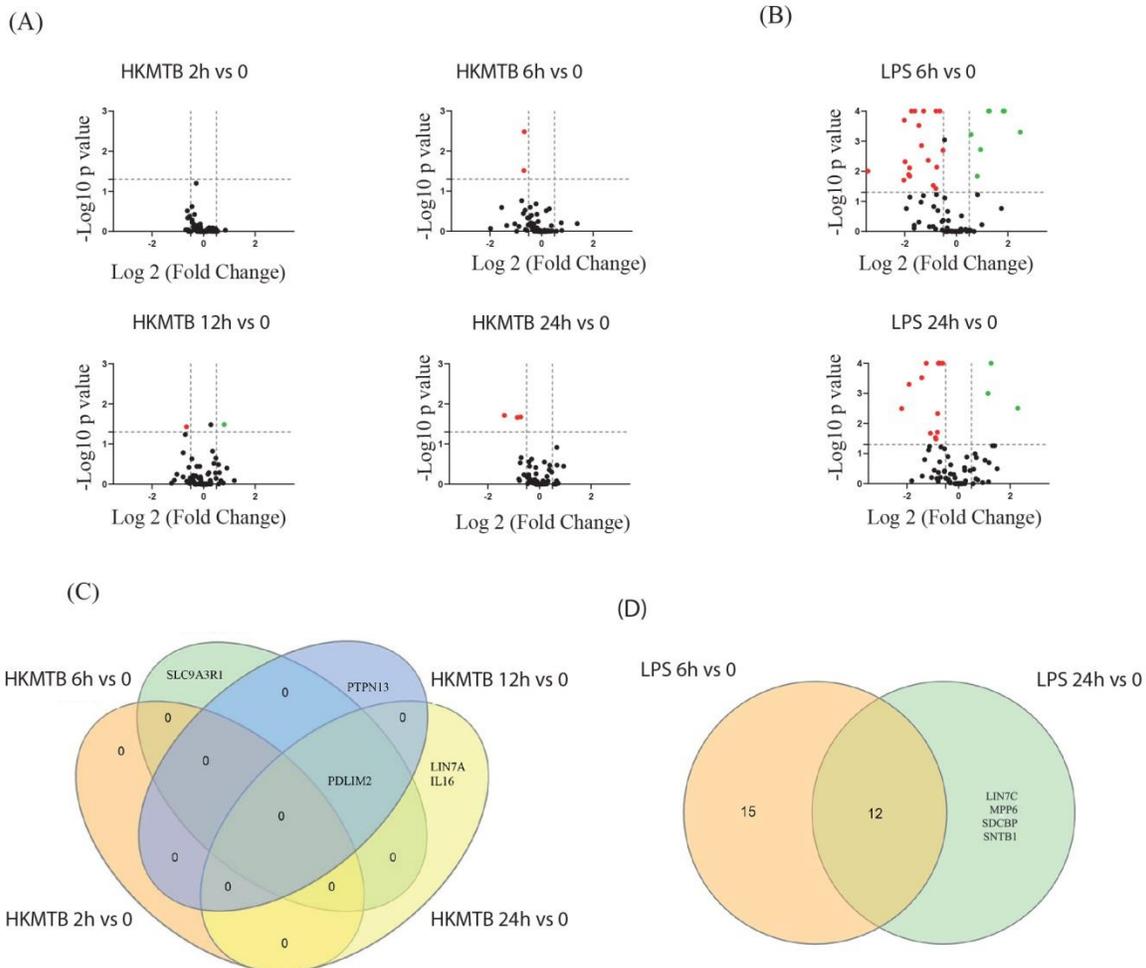


Figura 16. Genes PDZ expresados diferencialmente en M ϕ estimulados con HKMtb y LPS durante una cinética de estimulación. Gráficas de volcán de DEG en M ϕ a las 2, 6, 12 y 24 h posteriores a la estimulación con HKMtb (A) y a las 6 y 24 h posteriores a la estimulación con LPS (B) en comparación con la expresión basal M ϕ sin estimular. Los datos se muestran como la media de veces de cambio representados en log₂ sujetos a una ANOVA con una post prueba de Dunnett (eje x); las veces de cambio en log₂ $\geq 0,5$ (puntos verdes) o $\leq -0,5$ (puntos rojos) se considera significativo. El eje y representa $-\log_{10}$ del valor P; la significación estadística se fijó en $P < 0,05$. Los diagramas de Venn muestran la comparación de DEG durante la estimulación con HKMtb (C) o LPS (D) en M ϕ . El conjunto de DEG se enumera en la **Tabla 7**.

Tabla 7. DEG en M ϕ tras la estimulación con LPS. La tabla muestra el conjunto de DEG de M ϕ estimulado con LPS 6 h frente a M ϕ no estimulado representado en la **Figura 16D**.

M ϕ LPS 6h	M ϕ LPS (6h~24h)
ARHGEF11	DLG1
CARD11	HTRA1
CYTIP	IL16
DVL2	LIMK2
DVL3	LIN7A
MAST2	PDLIM2
MAST3	RAPGEF6
MPP5	RGS12
PPP1R9B	SIPA1L1
PTPN13	SLC9A3R1
PTPN4	TIAM1
RAPGEF2	TJP1
SIPA1L3	
SLC9A3R2	
TJP2	

Los valores de los niveles de expresión génica expresados en la media de las veces de cambio en log₂ de M ϕ estimulados tanto por la fagocitosis como por el estímulo de LPS se encuentran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Valores de veces de cambio de los DEG en M ϕ estimulados con HKMtb o LPS. Valores de los nivel de expresión génica (media de veces de cambio expresados en log2) sujeto a ANOVA unidireccional con una posprueba de Dunnett. La significación estadística se fijó en $p < 0,05$.

M ϕ											
HKMtb						LPS					
HKMtb 2 h vs. 0		HKMtb 6 h vs. 0		HKMtb 12 h vs. 0		HKMtb 24 h vs. 0		LPS 6 h vs. 0		LPS 24 h vs. 0	
Gene Name	Log2 (FC)	Gene Name	Log2 (FC)	Gene Name	Log2 (FC)	Gene Name	Log2 (FC)	Gene Name	Log2 (FC)	Gene Name	Log2 (FC)
		SLC9A3R1	-0.67	PTPN13	0.80	IL16	-1.36	ARHGEF11	1.25	LIMK2	2.30
		PDLIM2	-0.69	PDLIM2	-0.66	PDLIM2	-0.73	CYTIP	0.81	SIPA1L1	1.26
						LIN7A	-0.86	DVL3	0.57	TJP1	1.14
								LIMK2	2.48	DLG1	-0.78
								RAPGEF2	1.82	HTRA1	-0.82
								SIPA1L1	1.28	IL16	-2.21
								TJP1	1.86	LIN7A	-1.92
								TJP2	0.94	LIN7C	-0.62
								CARD11	-1.85	MPP6	-0.90
								DLG1	-0.79	PDLIM2	-1.43
								DVL2	-1.99	RAPGEF6	-0.81
								HTRA1	-0.79	RGS12	-0.77
								IL16	-1.81	SDCBP	-0.72
								LIN7A	-2.02	SLC9A3R1	-1.25
								MAST2	-1.09	SNTB1	-1.09
								MAST3	-1.81	TIAM1	-0.88
								MPP5	-0.64		
								PDLIM2	-1.45		
								PPP1R9B	-1.27		
								PTPN13	-3.43		
								PTPN4	-1.35		
								RAPGEF6	-0.76		
								RGS12	-0.52		
								SIPA1L3	-1.61		
								SLC9A3R1	-1.74		

SLC9A3R2	-2.04
TIAM1	-0.90

Los DEG en DC a las 2, 6, 12 y 24 h posteriores a la estimulación con **HKMTb (Figura 17A)** y **MC (Figura 17B)** se muestran en la **Figura 17** y se enumeran en la **Tabla 11**. HKMTb indujo 18 DEG a las 2 h, 19 a las 6 h, 20 a las 12 h y 22 a las 24 h (**Figura 17C**); dentro de estos, se identificó un grupo de 15 DEG que se modificaron durante toda la cinética, desde las 2 hasta las 24 horas (**Tabla 9**).

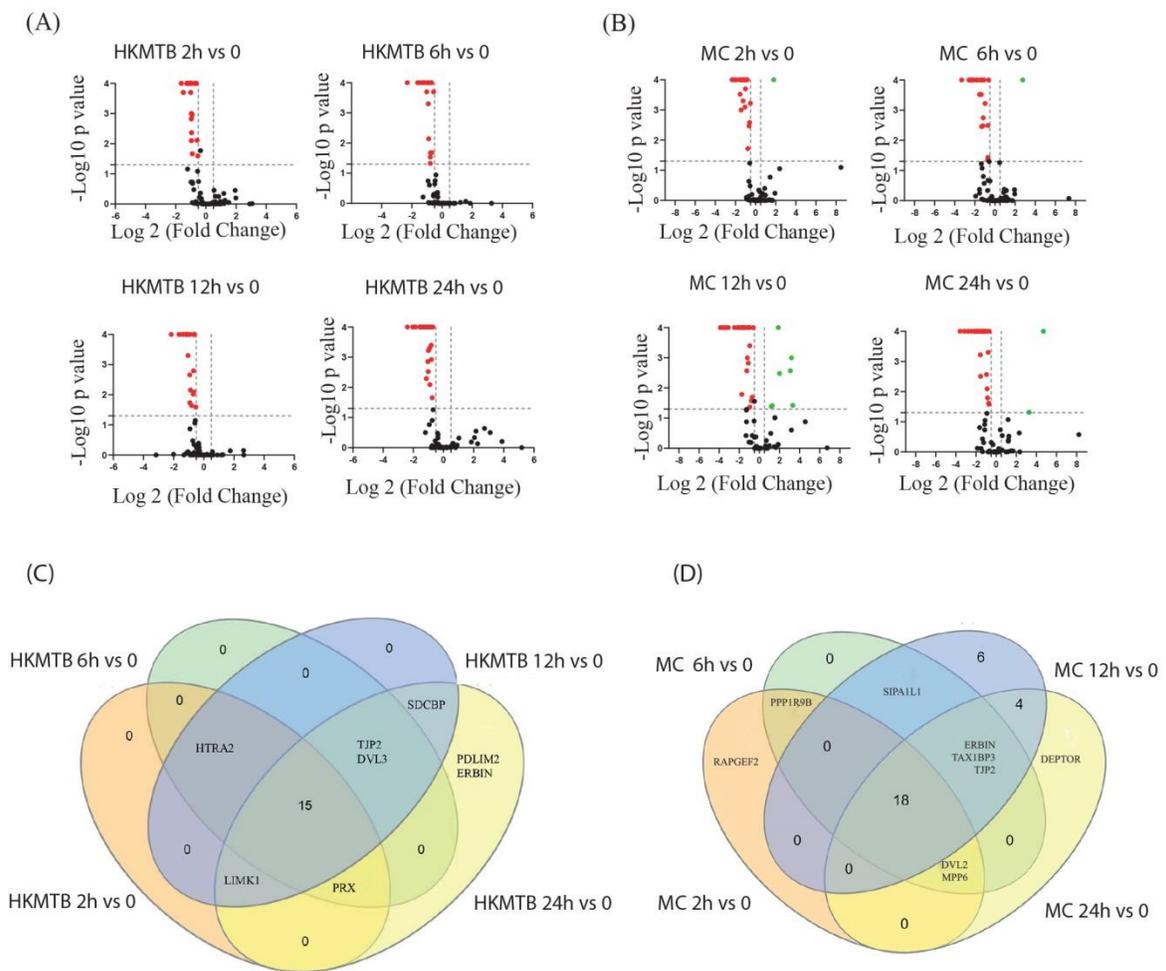


Figura 17. Genes PDZ expresados diferencialmente en DC estimuladas con HKMtb y MC. Gráficas de volcán de DEG en DC a las 2, 6, 12 y 24 h posteriores a la estimulación con HKMtb (A) y MC (B) en comparación con la expresión basal en DC no estimuladas. Los datos se muestran como las veces de cambio representadas en \log_2 sujeto a una ANOVA con una posprueba de Dunnett (eje x); las veces de cambio en $\log_2 \geq 0.5$ (puntos verdes) o ≤ -0.5 (puntos rojos) se considera significativo. El eje y representa $-\log_{10}$ del valor P; la significación estadística se fijó en $P < 0,05$. Los diagramas de Venn muestran la comparación de DEG durante la cinética de estimulación con HKMtb (C) (enumerados en la **Tabla 9**) o MC (D) (enumerados en la **Tabla 10**) en DC.

Tabla 9. DEG en común entre la estimulación del curso del tiempo con HKMtb en DC. La tabla muestra el conjunto de 15 DEG en común durante todo el curso de tiempo de las DC estimuladas con HKMtb frente a las DC no estimuladas, representadas en la **Figura 17C**.

HKMtb (2h \cap 6h \cap 12h \cap 24h)
DLG1
DVL2
IL16
LIMK2
LIN7B
MAGI3
MAST3
MPP1
MPP6
MPP7
PTPN4
SIPA1
SLC9A3R1
SNTB1
SNX27

Los DEG en DC estimuladas con MC se muestran en la **Figura 17B**. Veintiún genes se regularon negativamente, mientras que solo uno se reguló positivamente a las 2 h; 24 genes estaban regulados negativamente y solo uno estaba regulado positivamente a las 6 h; 25 genes estaban regulados negativamente y siete estaban regulados positivamente a las 12 h; y 26

genes estaban regulados a la baja y dos estaban regulados al alza a las 24 h. Se modificó un núcleo de 18 DEG de 2 h a 24 h (**Figura 17D y Tabla 10**).

Tabla 10. DEG en común entre la estimulación del curso del tiempo con MC en DC.

La tabla muestra el conjunto de 18 DEG en común durante todo el curso de tiempo de las DC estimuladas con MC frente a las DC no estimuladas (columna derecha). Los cinco DEG en 12h de estimulación (columna central) y los cuatro DEG en común en 12 y 24h de estimulación MC (columna derecha). Todos estos DEG están representados en la **Figura17D**.

MC (2h \cap 6h \cap 12h \cap 24h)	MC 12h	MC (12h \cap 24h)
DLG1	APBA3	ARHGAP21
DVL3	CYTIP	MAST2
HTRA2	PPP1R9A	PATJ
IL16	PTPN13	SDCBP
LIMK1	SNTA1	
LIMK2	TIAM1	
LIN7B		
MAGI3		
MAST3		
MPP1		
MPP7		
PDLIM2		
PRX		
PTPN4		
SIPA1		
SLC9A3R1		
SNTB1		
SNX27		

Los valores de los niveles de expresión génica expresados en la media de las veces de cambio en \log_2 de DC estimuladas tanto por la fagocitosis como por el estímulo proinflamatorio de MC se encuentran en la **Tabla 11**. Todos los DEG se regularon negativamente para todos los tiempos de estimulación de la fagocitosis, en cuanto al estímulo de MC redujeron su expresión en su mayoría.

Tabla 11. Valores de veces de cambio de los DEG en DC estimuladas con HKMtb y MC. Nivel de expresión génica (cambio de pliegue medio log2) sujeto a ANOVA unidireccional con una prueba de Dunnett. La significación estadística se fijó en $p < 0,05$.

DC																	
HKMtb								MC									
HKMtb 2 h vs. 0		HKMtb 6 h vs. 0		HKMtb 12 h vs. 0		HKMtb 24 h vs. 0		MC 2 h vs. 0		MC 6 h vs. 0		MC 12 h vs. 0		MC 24 h vs. 0			
Gene Name	Log2(FC)	Gene Name	Log2(FC)	Gene Name	Log2(FC)	Gene Name	Log2(FC)	Gene Name	Log2(FC)	Gene Name	Log2(FC)	Gene Name	Log2(FC)	Gene Name	Log2(FC)		
DLG1	-0.74	DLG1	-0.69	DLG1	-0.66	DLG1	-0.84	RAPGEF2	1.80	SIPA1L1	2.76	APBA3	2.00	DEPTOR	4.69		
DVL2	-0.95	DVL2	-0.88	DVL2	-0.89	DVL2	-0.74	DLG1	-1.01	DLG1	-1.13	CYTIP	3.09	PATJ	3.28		
HTRA2	-0.96	DVL3	-0.56	DVL3	-0.61	DVL3	-0.70	DVL2	-1.24	DVL2	-1.16	PATJ	3.32	ARHGAP21	-0.74		
IL16	-1.62	HTRA2	-0.77	HTRA2	-0.81	ERBIN	-1.03	DVL3	-0.51	DVL3	-0.64	PPP1R9A	3.19	DLG1	-1.07		
LIMK1	-0.53	IL16	-1.22	IL16	-1.64	IL16	-2.39	HTRA2	-1.53	ERBIN	-1.37	PTPN13	1.29	DVL2	-0.72		
LIMK2	-1.16	LIMK2	-1.22	LIMK1	-0.53	LIMK1	-0.79	IL16	-2.06	HTRA2	-1.19	SIPA1L1	1.88	DVL3	-0.68		
LIN7B	-0.90	LIN7B	-0.78	LIMK2	-1.17	LIMK2	-1.15	LIMK1	-1.26	IL16	-3.31	TIAM1	1.19	ERBIN	-1.69		
MAGI3	-1.01	MAGI3	-1.01	LIN7B	-0.93	LIN7B	-1.14	LIMK2	-2.34	LIMK1	-2.28	ARHGAP21	-1.09	HTRA2	-0.86		
MAST3	-0.91	MAST3	-0.91	MAGI3	-1.06	MAGI3	-0.91	LIN7B	-1.43	LIMK2	-1.86	DLG1	-1.13	IL16	-3.58		
MPP1	-1.02	MPP1	-1.24	MAST3	-0.66	MAST3	-1.07	MAGI3	-1.25	LIN7B	-1.32	DVL3	-0.60	LIMK1	-2.19		
MPP6	-0.58	MPP6	-0.99	MPP1	-1.62	MPP1	-2.03	MAST3	-1.01	MAGI3	-0.98	ERBIN	-1.63	LIMK2	-1.91		
MPP7	-1.24	MPP7	-2.31	MPP6	-0.92	MPP6	-0.98	MPP1	-0.59	MAST3	-1.35	HTRA2	-0.79	LIN7B	-1.57		
PRX	-1.50	PRX	-0.77	MPP7	-2.16	MPP7	-1.85	MPP6	-0.65	MPP1	-2.55	IL16	-3.63	MAGI3	-1.69		
PTPN4	-1.26	PTPN4	-1.20	PTPN4	-1.15	PDLIM2	-1.01	MPP7	-1.46	MPP6	-0.70	LIMK1	-2.47	MAST2	-1.54		
SIPA1	-0.97	SIPA1	-0.90	SDCBP	-0.70	PRX	-0.90	PDLIM2	-1.61	MPP7	-2.56	LIMK2	-1.83	MAST3	-1.73		
SLC9A3R1	-0.96	SLC9A3R1	-1.42	SIPA1	-0.69	PTPN4	-1.38	PPP1R9B	-0.76	PDLIM2	-2.14	LIN7B	-1.25	MPP1	-3.15		
SNTB1	-0.96	SNTB1	-1.61	SLC9A3R1	-1.04	SDCBP	-0.99	PRX	-1.93	PPP1R9B	-0.72	MAGI3	-0.95	MPP6	-0.80		
SNX27	-0.64	SNX27	-0.72	SNTB1	-1.39	SIPA1	-0.81	PTPN4	-1.16	PRX	-1.53	MAST2	-0.96	MPP7	-1.97		
		TJP2	-0.68	SNX27	-0.63	SLC9A3R1	-1.56	SIPA1	-0.96	PTPN4	-1.77	MAST3	-1.46	PDLIM2	-2.78		
				TJP2	-0.93	SNTB1	-1.28	SLC9A3R1	-1.37	SIPA1	-1.47	MPP1	-3.87	PRX	-0.90		
						SNX27	-0.80	SNTB1	-1.05	SLC9A3R1	-2.43	MPP7	-1.68	PTPN4	-1.18		
								TJP2	-1.46	SNX27	-0.81	SNTB1	-2.33	PDLIM2	-3.32		
										SNX27	-1.11	PRX	-1.20	SIPA1	-0.96		
											TAX1BP3	-0.70	PTPN4	-1.46	SLC9A3R1	-2.00	
												TJP2	-2.27	SDCBP	-1.17	SNTB1	-2.45
													SIPA1	-1.62	SNX27	-1.28	

Procedimos a comparar los DEG de M ϕ y DC expuestos a un mismo estímulo de fagocitosis (HKMtb), como se muestra en la **Figura 18**. M ϕ y DC mostraron diferencias pronunciadas en la regulación de genes PDZ durante la fagocitosis de HKMtb, donde los DEG se encontraron principalmente en DC, a las 2h 18 DEG solo en las DC y ninguno para M ϕ , a las 6h 19 DEG para las DC, 2 genes para M ϕ y únicamente SLC9A3R1 se compartió, a las 12h 20 DEG únicos en DC y 2 únicos en M ϕ y a las 24h 22 DEG en DC y 3 en M ϕ donde 2 DEG compartieron PDLIM2 e IL16.

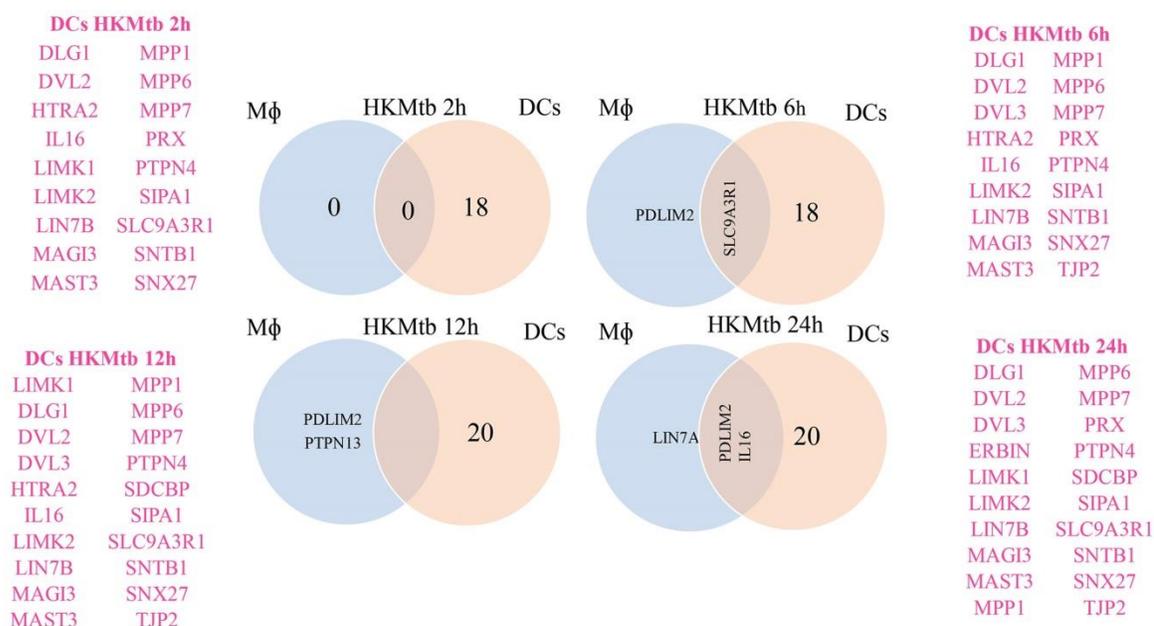


Figura 18. Expresión diferencial de genes PDZ tras la estimulación con HKMtb en M ϕ y DC. Diagrama de Venn muestran los DEG en ambas APC en cada tiempo de estimulación durante la cinética de estimulación de la fagocitosis de HKMtb.

Expresión de las proteínas PDZ en APC

Basados en nuestros resultados de expresión génica encontramos que TJP1 y TJP2, genes que codifican las proteínas Zónula Occludens (ZO) ZO-1 y ZO-2 respectivamente, y que son miembros de la subfamilia MAGUK involucradas en la TJ, presentaban cambios significativos en la expresión génica ante la estimulación de los PRR evaluados, por lo que se realizaron ensayos de western blot para determinar los niveles de expresión de las proteínas ZO-1 y ZO-2 en APC. Se analizó la expresión en condiciones basales y con la cinética de estimulación de 2, 6, 12 y 24h con el estímulo proinflamatorio LPS para M ϕ y MC para DC, y con la fagocitosis de HKMtb para ambas APC, en tres experimentos independientes (**Figura 19 y 20**).

En la **Figura 19** se aprecia como en M ϕ el estímulo de la fagocitosis de la HKMtb no indujo cambios significativos en la expresión del mRNA de TJP-1, aunque se observó una tendencia a aumentar a las 12 y 24 h (**Figura 19A**), mientras que el estímulo proinflamatorio de LPS aumentó la expresión del mRNA de TJP-1 en los dos tiempos probados de 6 y 24 h, siendo las 6h el tiempo que mayor aumento presentó (**Figura 19B**). El análisis de la expresión de la proteína ZO-1 se realizó con tres experimentos independientes; aunque no encontramos una diferencia significativa, se observó una tendencia a disminuir la expresión de ZO-1 con el estímulo de la fagocitosis de la HKMtb a las 24h (**Figura 19 C y 19D**), mientras que el estímulo proinflamatorio con LPS mostró una tendencia a disminuir la expresión a las 12, y 24h (**Figura 19C y 19D**). En cuanto a TJP-2 la fagocitosis de la HKMtb no ocasionó cambios significativos en la expresión génica en ningún punto de la cinética de estimulación, a diferencia del estímulo proinflamatorio de LPS que mostró un aumento significativo a las 6h (**Figura 19B**). En lo que respecta a la expresión de la proteína ZO-2 se evidenció una tendencia a disminuir a las 12 y 24 h (**Figura 19C**) sin embargo al promediar el resultados de tres donantes distintos ésta no llegó a ser significativa (**Figura 19E**), y con respecto al estímulo proinflamatorio ZO-2 mostró una tendencia disminuir desde las 2 hasta las 24 h, sin embargo tampoco llegó a ser significativa.

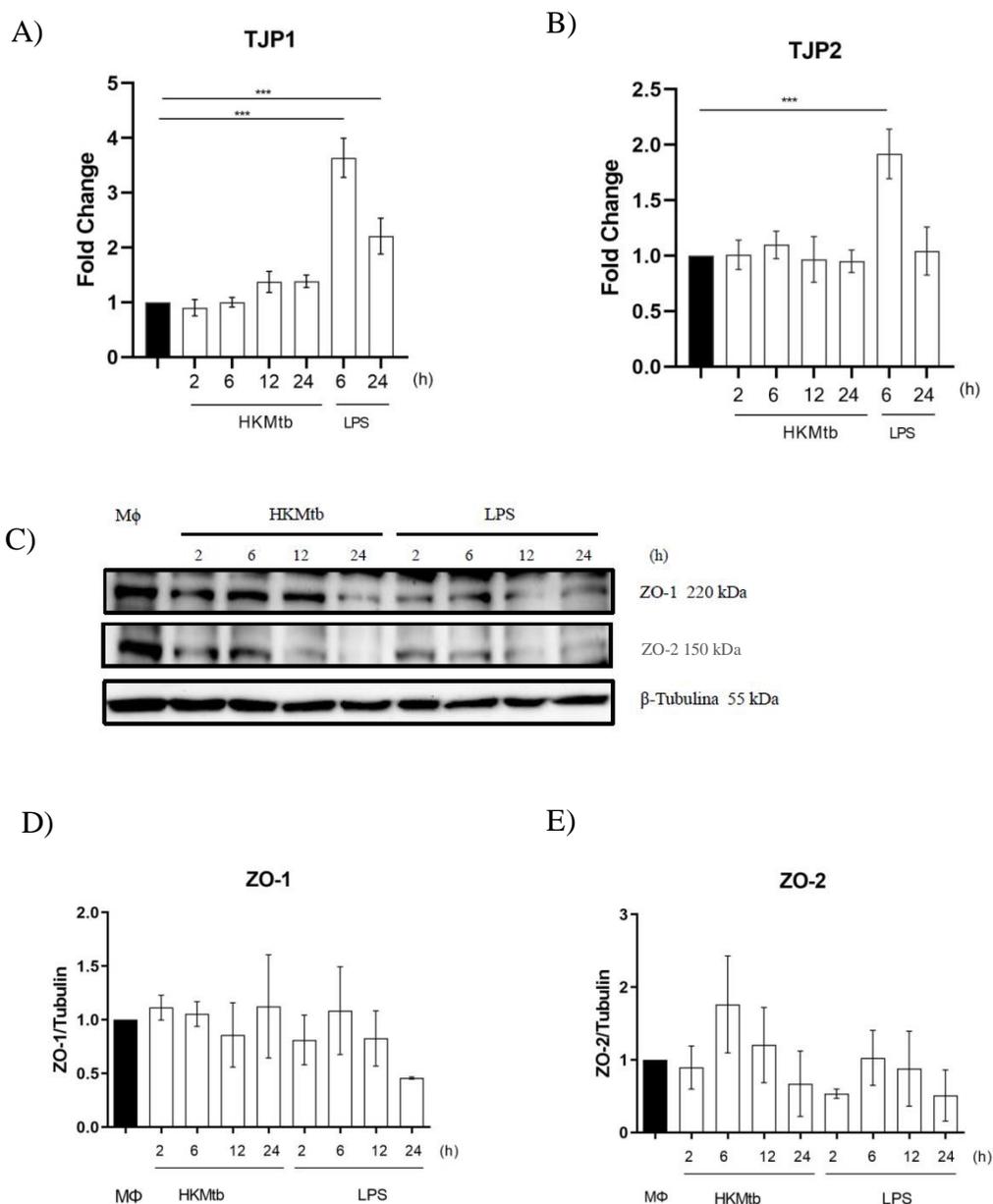


Figura 19. Análisis de la expresión de ZO-1 y ZO-2 en Mφ. Los Mφ fueron estimulados durante 2, 6, 12 y 24 h con HKMtb así como con LPS. Expresión relativa de mRNA en Mφ de (A) TJP-1 y (B) TJP-2. (C) Inmunoblot representativo de la expresión ZO-1 y ZO-2. Análisis densitométrico de la expresión de (D) ZO-1 y (E) ZO-2. El análisis se realizó con tres experimentos independientes y la comparación se realizó por una análisis de varianza con un posprueba de Dunnett, la significación estadística se fijó en $P < 0,05$.

Por otro lado, la expresión del mRNA de TJP1 en las DC mostró una tendencia a aumentar tanto con la fagocitosis como con el MC sin embargo, no llegaron a ser significativos en ningún punto de la cinética de estimulación (**Figura 20A**). En cuanto a la expresión de la proteína ZO-1 se observa una disminución de la expresión a las 12 y 24h en la fagocitosis sin embargo no llegaron a ser significativa (**Figura 20C y D**). En lo que respecta al MC observamos una tendencia a disminuir de la proteína ZO-1 desde las 2 h, un restablecimiento cercano a los niveles basales a las 6h y una disminución a las 12 y 24h sin embargo tampoco llegaron a ser significativos (**Figura 20C y D**). En cuanto a la expresión de mRNA de TJP2 en DC hay una disminución en la fagocitosis de HKMtb desde las 6 hasta las 24h, disminuyendo su expresión conforme aumenta la cinética de expresión. De manera similar, con el estímulo de MC hay una disminución desde las 6 h la cual se mantienen hasta los 24h (**Figura 20B**).

Sin embargo, la expresión de la proteína ZO-2, el estímulo de fagocitosis hay una tendencia a aumentar la expresión de ZO-2 alcanzando su punto máximo a las 24h (**Figura 20C y E**), y con estímulo proinflamatorio con MC, aumentó la expresión de ZO-2 desde las 2h, teniendo su mayor aumento a las 6h, aunque no llegó a ser significativo. (**Figura 20C y E**).

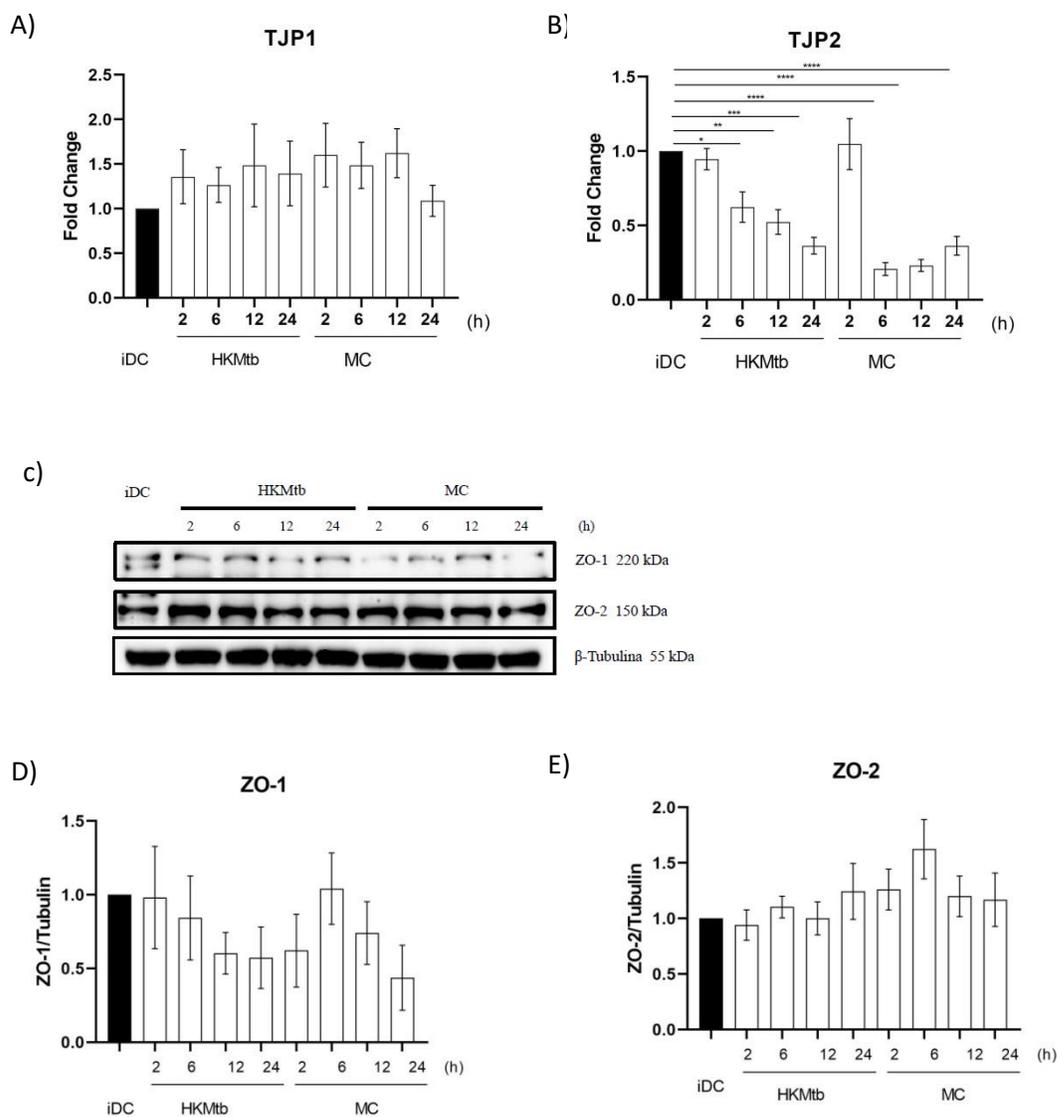


Figura 20. Análisis de la expresión de ZO-1 y ZO-2 en DC. Las DC fueron estimuladas durante 2, 6, 12 y 24 h con HKMtb así como con LPS. Expresión relativa de mRNA en DC de (A) TJP-1 y (B) TJP-2 (C) Inmunoblot representativo de la expresión ZO-1 y ZO-2. Análisis densitométrico de la expresión de (D) ZO-1 y (E) ZO-2. El análisis se realizó con tres experimentos independientes y la comparación se realizó por un análisis de varianza con un posprueba de Dunnett, la significación estadística se fijó en $P < 0,05$.

Localización de ZO1 y ZO-2 en APC

Se realizó la IF para analizar la localización de ZO-1 en M ϕ derivados de monocitos humanos en condiciones basales. Como se puede apreciar en la **Figura 21A**, al parecer ZO-1 se localiza principalmente en membrana celular aunque también se observa un patrón de punteado fino en el citosol y en núcleo, en contraste con la localización de ZO-1 en DC que en condiciones basales no se encuentra en la membrana celular sino principalmente en vesículas citoplasmáticas y en núcleo. (**Figura 21B**)

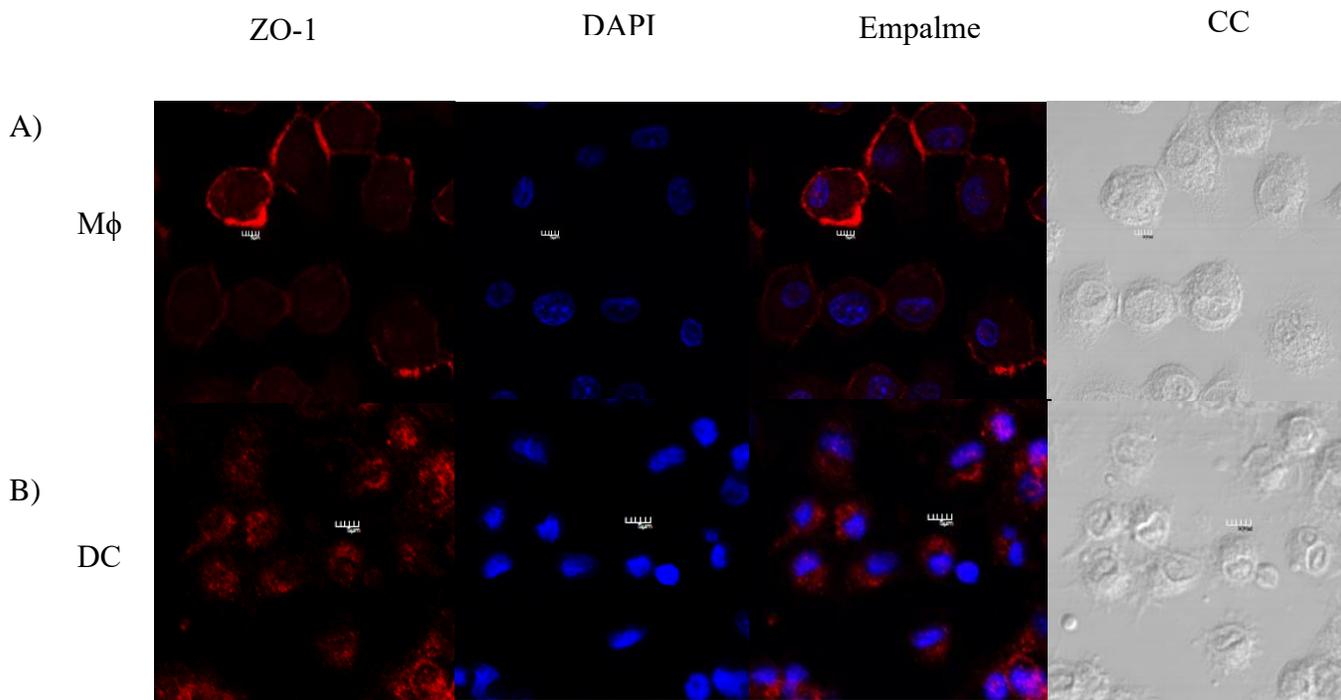


Figura 21. Localización de ZO-1 en APC. IF de ZO-1 en condiciones basales de ZO-1 en M ϕ (A) y DC (B). ZO-1 (rojo), núcleo en azul, empalme y CC. Imágenes representativas de 5 campos en tres experimentos independientes.

De manera similar a ZO-1, ZO-2 en M ϕ (**Figura 22A**) muestra una localización en la membrana celular, mientras que en DC se localiza con un patrón punteado en todo el citosol con apariencia vesicular; en DC además presenta una localización nuclear.

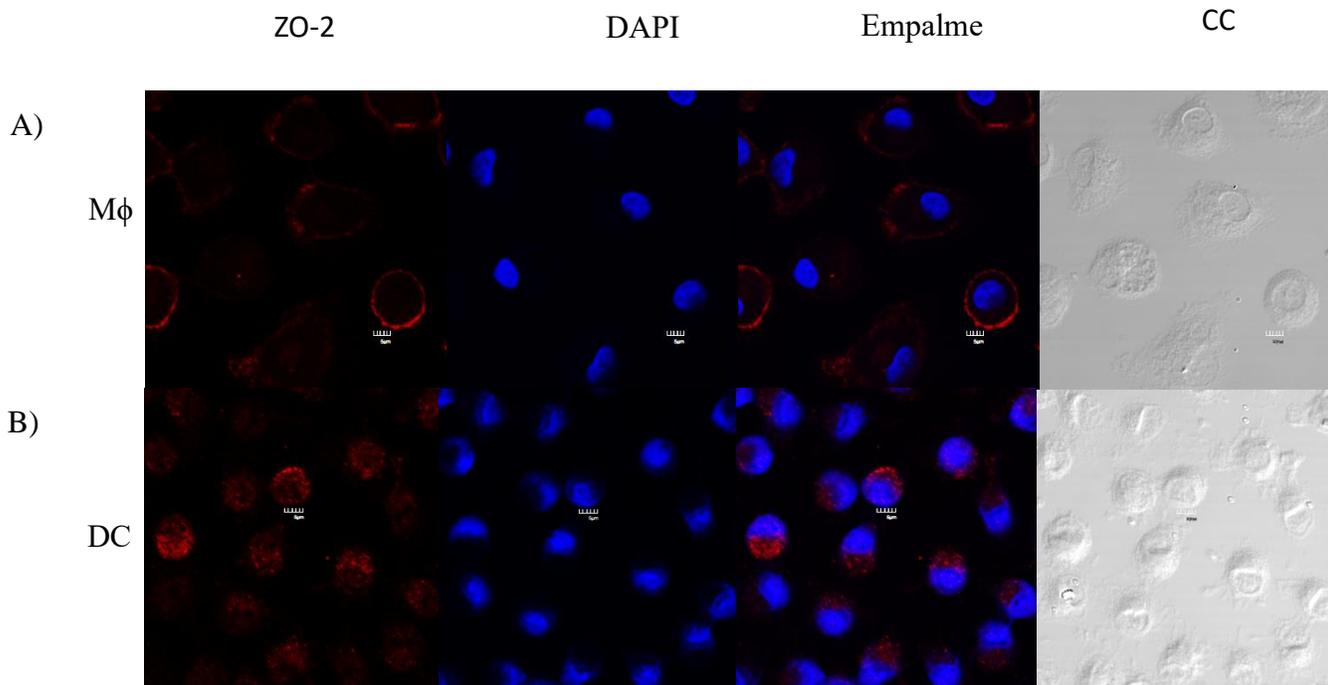


Figura 22. Localización de ZO-2 en APC. IF de ZO-2 en condiciones basales de ZO-2 en M ϕ (A) y DC (B). ZO-2 (rojo), núcleo en azul, empalme y CC. Imágenes representativas de 5 campos en tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Las proteínas de andamiaje son de vital importancia en la organización de respuestas celulares a estímulos específicos. Las proteínas PDZ pueden mejorar la respuesta celular al formar complejos transitorios involucrados en varios procesos celulares, como la proliferación, la apoptosis, la adaptación al estrés, la troncalidad y la disposición y funciones biológicas de los organelos celulares.²⁴

Varios ejemplos ilustran cómo las disfunciones en estas proteínas, o su perturbación por proteínas virales, pueden alterar diversas funciones celulares; tal es el caso de la haploinsuficiencia de SHANK3 en el síndrome de delección 22q13 caracterizado por retraso del habla, hipotonía neonatal y problemas de comportamiento, entre otras características, donde SHANK3 se produce de manera ineficiente, por lo que la función de andamiaje en las densidades postsinápticas de las sinapsis excitatorias es inadecuada.⁶⁰ Otro ejemplo es la mutación Asp-274-Asn en PDZRN3, que afecta su interacción con el motivo de unión a dominios PDZ (PDZbm) del receptor tirosina-proteína cinasa músculo-esquelético (MUSK); esta mutación está relacionada con la esquizofrenia.⁶¹ Existen múltiples ejemplos de proteínas virales^{67,68} como la proteína NS1 que codifica un PDZbm del virus H5N1 se une a Scrib y Dlg1 y ocasiona una disrupción funcional de las TJ, alterando la localización de ZO-1 y occludina⁶²⁻⁶⁴ y más recientemente la proteína E de SARS-CoV^{65,66} y SARS-CoV-2 que codifican un PDZbm que media las interacciones con grupos de proteínas PDZ celulares.⁶⁹ En el SI el estudio de las proteínas PDZ es escaso y se ha enfocado principalmente en el sistema inmune adaptativo. Como se ha demostrado que las proteínas PDZ previamente implicadas en el control de polaridad epitelial como Scrib y Dlg1 también desempeñan un papel importante en funciones polarizadas en como la migración y la sinapsis inmunológica en células T.²⁸

Recientemente, nuestro grupo y otros investigadores obtuvieron información sobre Scrib y Dlg1, que son dos proteínas PDZ que gobiernan la ABCP de las células epiteliales, en funciones centrales de los M ϕ y las DC tanto en ratones como en humanos.^{51,53,54} Scrib y Dlg1 se expresan y regulan en APC humanas, incluidos los monocitos, los M ϕ y las DC, y desempeñan un papel clave en la expresión de moléculas coestimuladoras y en la producción de IL-12 en DC donde ambas proteínas pueden ser objetivo del virus de Influenza A.^{51,54}

Debido a este conocimiento y la conservación evolutiva de proteínas de andamiaje PDZ, planteamos la hipótesis de que más miembros de esta amplia familia de proteínas serían relevantes en varios procesos celulares involucrados en la activación de las APC.

En este trabajo, como primera aproximación para someter a prueba la hipótesis, se realizó un análisis de expresión de genes PDZ a gran escala en los M ϕ y la DC estimuladas a través de diversos PRR. Analizamos los perfiles transcripcionales de 83 genes PDZ en M ϕ y DC por RT-qPCR y encontramos que la mayoría de los éstos (90%) se expresaban en condiciones basales tanto en los M ϕ como en las DC (**Figura 12A**). Además, el 41,3% de estos genes modificaron significativamente su perfil transcripcional después de la estimulación con LPS, mientras que solo el 6,7% cambió después de la fagocitosis en los M ϕ (**Figura 16**). En el caso de las DC, el 30,6 % de los genes PDZ expresados basalmente cambiaron significativamente con la fagocitosis, mientras que el 49,3 % cambiaron con la estimulación con un cóctel de citocinas inflamatorias (**Figura 17**). Por lo tanto, los estímulos inflamatorios, como LPS y MC, indujeron una modificación transcripcional más significativa de los genes PDZ que la fagocitosis de HKMtb (**Figura 16**). Además, HKMtb causó cambios transcripcionales más grandes en las DC comparado con los M ϕ (**Figura 18**); este hallazgo se correlaciona con informes previos que demuestran que las DC son más responsivas que los M ϕ después de la exposición a los diferentes estímulos analizados.^{70,71}

Anteriormente en nuestro grupo se reportaron funciones de Dlg1 y Scrib en las DC humanas. Aquí, demostramos que el mRNA de Dlg1 cambió abrupta y significativamente en M ϕ estimulados con LPS (**Figura 16 y Tabla 4**). Además, los niveles de mRNA de Dlg1 disminuyeron sustancialmente con ambos estímulos utilizados en las DC durante toda la cinética de estimulación (**Figura 17, Tabla 5**). Debido a nuestro extenso análisis de genes PDZ, identificamos que existen más genes PDZ con cambios transcripcionales significativos en los M ϕ y las DC bajo diferentes condiciones de estimulación (**Tablas 7 y 10**). Nuestros hallazgos sugieren que estas proteínas PDZ tienen funciones relevantes en las vías de señalización de APC.

Con nuestro análisis masivo de expresión de genes PDZ, encontramos otros genes PDZ con cambios de expresión con todos los estímulos en las APC, como IL16 y PDLIM2.

IL-16 disminuyó los niveles de mRNA tanto en M ϕ como en DC con todos los estímulos probados (**Figuras 16 y 17 y Tabla 8 Y 10**). Se ha reportado que los niveles de mRNA de

IL-16 disminuye en las células T tras la activación.^{98,99} IL-16 se describió inicialmente como una quimiocina quimioatrayente de células T¹⁰¹ y se conoce como un inmunomodulador que altera la activación de células T inducida por antígenos.^{100,101} Identificar la función inmunomoduladora de IL-16 en M ϕ y DC sería un hallazgo significativo.

En cuanto a PDLIM2, tuvo cambios significativos durante todo el tiempo de estimulación con todos los estímulos tanto en M ϕ como en DC (**Figuras 16 y 17 y Tabla 8 Y 10**). PDLIM2 se expresa en varias células inmunitarias y es un regulador negativo central de la actividad del factor de transcripción NF-kB, lo que disminuye la producción de citocinas inflamatorias.^{102,103} PDLIM2 puede desplazarse entre el núcleo y el citoplasma, y se han descrito funciones adicionales para PDLIM2 citoplasmático, incluida la promoción de la adhesión.¹⁰⁴ En M ϕ , ambos estímulos provocaron una disminución significativa de PDLIM2, teniendo LPS un efecto significativo mayor. En las DC, la estimulación con MC, que estimula un entorno inflamatorio, provocó la disminución más significativa de PDLIM2 durante todo el transcurso del tiempo. Nuestros resultados sugieren que los cambios en la expresión del mRNA de PDLIM2 contribuyen a la regulación de sus funciones en M ϕ y DC estimuladas a través de diversos PRR, posiblemente disminuyendo su efecto como regulador negativo central de la actividad del factor de transcripción NF-kB, lo que permitiría un aumento en la producción de citocinas inflamatorias. Notablemente, ZO-1 (TJP-1) y ZO-2 (TJP-2) son proteínas PDZ comúnmente relacionadas con ABCP y el mantenimiento TJ. Nuestros resultados muestran una tendencia a aumentar el mRNA de ZO-1 con el estímulo fagocítico en M ϕ (**Figura 19A**) y en DC (**Figura 20A**) sin embargo no llegaron a ser significativos, en cuanto a los estímulos proinflamatorios del LPS en M ϕ aumentó significativamente a las 6 y 24 h (**Figura 19A**), mientras en DC el MC mostró una tendencia a aumentar (**Figura 20A**). Sin embargo, al comparar los resultados del mRNA de ZO-1 con la expresión de la proteína con estos mismos estímulos, se observó una tendencia a disminuir la proteína ZO-1 con respecto a ambos estímulos en la fagocitosis en M ϕ y DC y con el LPS en M ϕ (**Figura 19C**) con el MC en DC (**Figura 20C**).

Con respecto a la comparación de los niveles de mRNA de ZO-1 y la expresión de la proteína, estudios sistemáticos de cuantificación de transcritos y proteínas han revelado la importancia de múltiples procesos más allá de la concentración del transcrito que contribuyen a establecer el nivel de expresión de una proteína,⁷² con respecto a la modulación de las proteínas de

uniones celulares, se ha propuesto la interacción entre el sistema ubiquitina/proteosoma y las proteínas ZO⁷³, donde por ejemplo en la infección por el virus de encefalitis japonesa (JEV) se induce la expresión de IL-6 lo que activa las UPS, con el aumento del componente E3 ubiquitina ligasa n-reconocimiento (Ubr-1) y subsecuente ubiquitinación de ZO-1 y degradación.⁷⁴ Por lo que proponemos que la disminución de la proteínas ZO-1 en Mφ y DC, podría deberse a por la ubiquitinación y subsecuente degradación con los estímulo de fagocitosis y de LPS. Aunque la regulación de ZO-2 y degradación por UPS no se ha estudiado aún, proponemos que podría estar ocurriendo un mecanismo similar al de la degradación de ZO-1 en Mφ.

Estas tendencias (**Figura 19 y 20**) que son evidentes en la imagen representativas en Mφ (**Figura 19C**) y DC (**Figura 20C**) no llegaron a ser significativas con el promedio de 3 donantes de Mφ y DC derivados de monocitos, por lo que para esclarecer si existen diferencias significativas se deberá aumentar la población de estudio ya que se debe considerar que partimos de población abierta que aprobó los criterios de inclusión del banco de sangre y que representan una amplia variación genética que se debe tomar en cuenta por lo que es recomendable aumentar la población de estudio.

La tendencia a disminuir de la proteína ZO-1 en Mφ y DC (**Figura 19C 20C**) podría estar relacionado con la regulación de la interacción hetero celular de los Mφ con las células epiteliales.⁷⁶ Y es consistente con el hecho de que en respuesta a citocinas proinflamatorias o productos bacterianos, como LPS, la expresión de ZO-1 se reduce y se redistribuye lejos de la TJ, lo que da como resultado un aumento de la permeabilidad epitelial.⁷⁵⁻⁷⁷

Se ha reportado que el LPS puede desencadenar la reorganización de las proteínas de TJ induciendo la expresión de ZO-1 en las DC de ratón. Éste incremento de ZO-1 parece estar relacionado con el mecanismo de emisión de proyecciones a través de la mucosa epitelial para muestrear el entorno exterior o un posible papel en la regulación de la comunicación intercelular de la unión comunicante entre las células inmunitarias y las células epiteliales.^{78,79} Aunque no estimulamos las DC con LPS, nuestros resultados muestran las diferencias entre las DC de ratón y DC derivadas de monocitos humanos, debido a que en DC de ratón no se expresa ZO-1 de manera basal⁷⁸ y esta se induce con estímulos proinflamatorios como el LPS, mientras que en Mφ y DC derivados de monocitos humanos existe una expresión basal y esta disminuye ante el estímulo de la fagocitosis así como con

el estímulo proinflamatorio del MC. Con estos datos es posible especular que en condiciones basales M ϕ y DC humanos establecen interacciones hetero celulares mediante proteínas de TJ y tanto la fagocitosis como los estímulos inflamatorios ocasionan una reorganización de las TJ, lo que les permitiría despegarse de las células epiteliales y poder migrar, en el caso de las DC hacia nódulos linfáticos e inducir respuestas sistémicas. De hecho, se ha identificado que la expresión disminuida de ZO-1 está asociada con la migración asociada con procesos de transición epitelial-mesenquimal.⁸⁰ Asimismo, se correlaciona con una mayor invasividad en los cánceres de mama, colorrectal y del tracto digestivo⁸⁰⁻⁸² Por lo que la disminución de ZO-1 en M ϕ y DC podría estar relacionada con un aumento en la capacidad migratoria en M ϕ y DC.

Por otro lado, se ha evidenciado que las proteínas ZO-1 y ZO-2 interactúan con los PDZbm del coactivador transcripcional (TAZ),⁸³ y la proteína asociada a Yes (YAP) con ZO-2⁸⁴ y con ZO-1 mediado por angiomotin (AMOT).⁸⁵ YAP/TAZ son coreguladores transcripcionales de la vía de señalización de Hippo, involucrada en regulación de la proliferación celular, apoptosis y de manera muy importante, en la regulación de la inmunidad innata durante la infección por patógenos.⁸⁶ Se ha reportado por ejemplo que YAP y TAZ funcionaron como supresores de la activación de NF- κ B. Se ha demostrado que YAP inhibe la accesibilidad del sustrato de TAK1 lo que anula la activación de IKK α/β y suprime la degradación de I κ B α lo que da como resultado la atenuación de la actividad de señalización de NF- κ B.^{87,88,89}

Nuestros resultados de la expresión de la proteína ZO-1 y ZO-2 en M ϕ y ZO-1 en DC (**Figura 19C y 20C**) muestra una tendencia a disminuir tanto con la fagocitos de la HKMtb así como con el estímulo proinflamatorio del LPS en M ϕ y MC en DC, y dada la asociación de las proteínas ZO-1 y ZO-2 con YAP/TAZ, hipotetizamos que mediante la función de andamiaje de ZO-1 y ZO-2 se forma un complejo multiprotéico con YAP y TAK1 y que la reducción de ZO-1 y ZO-2 favorezca la activación de NF- κ B al reducir la proteína de andamiaje que estabiliza el complejo multiprotéico.

ZO-2 también está involucrado en la organización molecular en la sinapsis inmunológica (IS) en las células T, mediando la formación de un tipo de unión gap a través de la interacción con la conexina 43.⁹⁰ Si ZO-2 también regula o no la organización de la SI en el lado de APC, sería un hallazgo interesante; nuestro grupo previamente describió que Scrib es reclutado a

la zona de contacto de la SI en DC, en ensayos similares podríamos analizar si ZO-2 también se recluta a la SI en las APC.

Por otro lado, se ha demostrado que tanto los complejos de proteínas de polaridad y de las TJ están involucradas en la formación de inclusiones durante un tipo particular de endocitosis en células epiteliales⁹¹ y dada la distinta localización de ZO-1 (**Figura 21**) y ZO-2 (**Figura 22**) en M ϕ y DC, es posible hipotetizar que desempeñen un papel distinto donde en M ϕ al encontrarse en la membrana celular, ZO-1 (**Figura 21A**) y ZO-2 (**Figura 22A**) estén involucradas directamente en la formación de inclusiones en la fagocitosis o bien en DC este implique el reclutamiento de ZO-1 (**Figura 21B**) y/o ZO-2 (**Figura 22B**) hacia la membrana plasmática y contribuya con la formación de inclusiones, sin embargo, se requiere trabajo experimental para demostrar el papel que juegan ZO1 y ZO-2 en situaciones fisiológicas y fisiopatológicas que requieran regular las funciones en respuesta a los estímulos en particular. Según nuestra estrategia experimental, la estimulación con HKMtb favorece la fagocitosis tipo II, regulada principalmente por el receptor 3 del complemento (CR3). Los resultados funcionales después de la fagocitosis son diferentes entre los M ϕ y las DC. En general, los M ϕ destruyen eficazmente los patógenos fagocitados, en tanto las DC muestran una capacidad limitada de la degradación lisosomal que les permite la preservación de péptidos para su función principal, el procesamiento de antígenos y su presentación a los linfocitos T.⁹² Los fagosomas de los M ϕ adquieren progresivamente las enzimas lisosomales durante la maduración en fagolisosomas.⁹³ En cambio, la maduración del fagolisosoma de las DC contiene menos enzimas degradantes y recluta inhibidores de proteasas, lo que conduce a un medio degradativo controlado.^{94,95} Las diferencias entre los M ϕ y las DC en términos de su sistema proteolítico y el control del pH durante la maduración del fagolisosoma^{96,97} sugieren diferentes componentes y temporalidad en la formación de complejos proteicos específicos, por lo tanto, un uso distinto de proteínas de andamiaje.

Identificamos una firma transcripcional distinta después de la fagocitosis de HKMtb en M ϕ en comparación con las DC (**Figura 15**). Es de destacar que solo se encontraron cinco DEG PDZ en M ϕ (**Figura 16**), mientras que se encontró que un grupo de 15 DEG PDZ, esta disminución en las DC durante todo el transcurso del tiempo; Se encontraron DEG adicionales que sólo cambiaban en puntos de tiempo específicos (**Figura 17**). Por lo tanto,

las respuestas particulares de M ϕ y DC después de la fagocitosis pueden estar relacionadas con proteínas de andamiaje PDZ específicas y diferentes para cada tipo celular.

Además, M ϕ y DC expresan diferentes transportadores acarreadores de solutos humanos (SLC)⁹⁷ algunos de las cuales están relacionadas con la función lisosomal.^{105,106} En M ϕ por ejemplo, se conoce que el SLC29A3 es esencial para mantener la integridad del lisosoma.¹⁰⁷ Notablemente, las proteínas PDZ como PDZK1 y NHERF1, también llamada SLC9A3R1¹⁰⁸ tienen un papel esencial en la localización subcelular de algunos transportadores SLC¹⁰⁹ Interesantemente, los transportadores SLC5A8 y SLC5A12 tienen un PDZbm en su C-terminal, y se ha identificado a PDZK1 como una proteína PDZ que interactúa y mejora su actividad de transporte¹¹⁰ lo que respalda a las proteínas PDZ son relevantes para la función lisosomal, por lo tanto, para las funciones degradativas de M ϕ y DC.

En evaluaciones anteriores que utilizaron un modelo experimental similar al nuestro (M ϕ y DC derivados de monocitos humanos), se reveló la existencia de respuestas específicas para cada células y estímulo en ambos tipos celulares, para moléculas efectoras inmunitarias como citocinas y quimiocinas.⁷⁰ Nuestros resultados sugieren que estas vías de señalización específicas requieren la organización de proteínas de andamiaje PDZ específicas.

Los genes PDZ mencionados anteriormente tienen funciones importantes en las células inmunitarias. Nuestro análisis de 83 genes PDZ en solo dos tipos de células inmunitarias sometidas a pocos estímulos reveló los cambios transcripcionales significativos durante la activación de M ϕ y DC a través de diversos PRR.^{15,16} Se identificaron perfiles transcripcionales de genes PDZ significativamente distintos en diferentes condiciones de estimulación. Además, se encontró una firma transcripcional de genes PDZ distinta en M ϕ y DC bajo el mismo estímulo fagocítico. En particular, más de 40 genes PDZ tuvieron cambios significativos de expresión, sugiriendo funciones potencialmente relevantes en las APC. Nuestros resultados sugieren un uso diferencial de proteínas PDZ en la activación de las vías de señalización de M ϕ y DC tales como la fagocitosis, la producción de citocinas o la producción de ROS.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados destacan una firma transcripcional distinta de la expresión de genes PDZ en M ϕ y DC, relacionadas con sus funciones especializadas después de la estimulación con diversos PRR, lo que sugiere un uso distinto de este tipo de andamios en las funciones de M ϕ y DC.

Nuestros hallazgos contribuyen a una mejor comprensión del papel de las proteínas de andamiaje PDZ en las vías de señalización generales de la activación de APC y pueden conducir a establecer la base para explorar las funciones de las proteínas PDZ no solo en M ϕ y DC, sino también en otras células inmunes.

PERSPECTIVAS

Hasta la fecha, se han identificado 153 genes PDZ en el genoma humano; por lo tanto, se necesita más investigación en este campo emergente para evaluar otros genes PDZ en APC que no están incluidos en este estudio. Además, la red de andamios PDZ involucrados en respuestas a otros PRR en células inmunes adicionales, como linfocitos, neutrófilos o mastocitos, entre otras, deben dilucidarse.

En este trabajo destacamos la importancia de dos proteínas PDZ, ZO-1 y ZO-2, proteínas pertenecientes a las TJ, que como se demostró tienen una regulación distinta tanto transcripcional y traduccional en respuesta a distintos estímulos de PRR así como una localización diferente, por lo que sugerimos que forman distintos tipos de complejos multiproteicos y pueden ser, en parte, responsables de las funciones especializadas de las APC como la fagocitosis.

REFERENCIAS

1. Yegambaram K, Bulloch EM, Kingston RL. Protein domain definition should allow for conditional disorder. *Protein Sci.* 2013;22(11):1502-18.
2. Koonin EV, Wolf YI, Karev GP. The structure of the protein universe and genome evolution. *Nature.* 2002;420(6912):218-23.
3. Yu L, Tanwar DK, Penha EDS, Wolf YI, Koonin EV, Basu MK. Grammar of protein domain architectures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(9):3636-45.
4. Gao C, Ma C, Wang H, Zhong H, Zang J, Zhong R, et al. Intrinsic disorder in protein domains contributes to both organism complexity and clade-specific functions. *Sci Rep.* 2021;11(1):2985.
5. Manjunath GP, Ramanujam PL, Galande S. Structure function relations in PDZ-domain-containing proteins: Implications for protein networks in cellular signalling. *J Biosci.* 2018;43(1):155-71.
6. Basu MK, Poliakov E, Rogozin IB. Domain mobility in proteins: functional and evolutionary implications. *Brief Bioinform.* 2009;10(3):205-16.
7. Nourry C, Grant SG, Borg JP. PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE.* 2003;2003(179):RE7.
8. Valgardson J, Cosbey R, Houser P, Rupp M, Van Bronkhorst R, Lee M, et al. MotifAnalyzer-PDZ: A computational program to investigate the evolution of PDZ-binding target specificity. *Protein Sci.* 2019;28(12):2127-43.
9. Luck K, Charbonnier S, Trave G. The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains. *FEBS Lett.* 2012;586(17):2648-61.
10. Gutierrez-Gonzalez LH, Rivas-Fuentes S, Guzman-Beltran S, Flores-Flores A, Rosas-Garcia J, Santos-Mendoza T. Peptide Targeting of PDZ-Dependent Interactions as Pharmacological Intervention in Immune-Related Diseases. *Molecules.* 2021;26(21).
11. Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1-29.
12. Ivarsson Y. Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling. *FEBS Lett.* 2012;586(17):2638-47.
13. Lee HJ, Zheng JJ. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal.* 2010;8:8.
14. Liu X, Fuentes EJ. Emerging Themes in PDZ Domain Signaling: Structure, Function, and Inhibition. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2019;343:129-218.
15. Allam AH, Charnley M, Russell SM. Context-Specific Mechanisms of Cell Polarity Regulation. *J Mol Biol.* 2018;430(19):3457-71.
16. Roh MH, Margolis B. Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285(3):F377-87.
17. Nelson WJ. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature.* 2003;422(6933):766-74.
18. Gong Y, Mo C, Fraser SE. Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature.* 2004;430(7000):689-93.
19. Piroli ME, Blanchette JO, Jabbarzadeh E. Polarity as a physiological modulator of cell function. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2019;24(3):451-62.20. Lo P, Hawrot H, Georgiou M. Apicobasal polarity and its role in cancer progression. *Biomol Concepts.* 2012;3(6):505-21.
21. Assemat E, Bazellieres E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D. Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(3):614-30.
22. Beutel O, Maraschini R, Pombo-Garcia K, Martin-Lemaitre C, Honigsmann A. Phase Separation of Zonula Occludens Proteins Drives Formation of Tight Junctions. *Cell.* 2019;179(4):923-36 e11.

23. Campbell HK, Maiers JL, DeMali KA. Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp Cell Res.* 2017;358(1):39-44.
24. Saito Y, Desai RR, Muthuswamy SK. Reinterpreting polarity and cancer: The changing landscape from tumor suppression to tumor promotion. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018;1869(2):103-16.
25. Bustos-Moran E, Blas-Rus N, Martin-Cofreces NB, Sanchez-Madrid F. Orchestrating Lymphocyte Polarity in Cognate Immune Cell-Cell Interactions. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2016;327:195-261.
26. Huse M. Lymphocyte polarity, the immunological synapse and the scope of biological analogy. *Bioarchitecture.* 2011;1(4):180-5.
27. Russell S. How polarity shapes the destiny of T cells. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 2):131-6.
28. Ludford-Menting MJ, Oliaro J, Sacirbegovic F, Cheah ET, 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;22(6):737-48.
29. Krummel MF, Macara I. Maintenance and modulation of T cell polarity. *Nat Immunol.* 2006;7(11):1143-9.
30. Round JL, Tomassian T, Zhang M, Patel V, Schoenberger SP, Miceli MC. Dlg1 coordinates actin polymerization, synaptic T cell receptor and lipid raft aggregation, and effector function in T cells. *J Exp Med.* 2005;201(3):419-30.
31. Barreda D, Gutierrez-Gonzalez LH, Martinez-Cordero E, Cabello-Gutierrez C, Chacon-Salinas R, Santos-Mendoza T. The Scribble Complex PDZ Proteins in Immune Cell Polarities. *J Immunol Res.* 2020;2020:5649790.
32. Du Pasquier L. Innate immunity in early chordates and the appearance of adaptive immunity. *C R Biol.* 2004;327(6):591-601.
33. Yeh JH, Sidhu SS, Chan AC. Regulation of a late phase of T cell polarity and effector functions by Crtam. *Cell.* 2008;132(5):846-59.
34. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997;9(1):4-9.
35. Gaudino SJ, Kumar P. Cross-Talk Between Antigen Presenting Cells and T Cells Impacts Intestinal Homeostasis, Bacterial Infections, and Tumorigenesis. *Front Immunol.* 2019;10:360.
36. Eiz-Vesper B, Schmetzer HM. Antigen-Presenting Cells: Potential of Proven und New Players in Immune Therapies. *Transfus Med Hemother.* 2020;47(6):429-31.
37. Knight SC, Stagg AJ. Antigen-presenting cell types. *Curr Opin Immunol.* 1993;5(3):374-82.
38. Harryvan TJ, de Lange S, Hawinkels L and Verdegaal EME. The ABCs of Antigen Presentation by Stromal Non-Professional Antigen-Presenting Cells. *Int J Mol Sci.* 2021; 23(1):137–150.
39. Amit I, Winter DR, Jung S. The role of the local environment and epigenetics in shaping macrophage identity and their effect on tissue homeostasis. *Nat Immunol.* 2016;17(1):18-25.
40. Lacerda Mariano L, Rousseau M, Varet H, Legendre R, Gentek R, Saenz Coronilla J, et al. Functionally distinct resident macrophage subsets differentially shape responses to infection in the bladder. *Sci Adv.* 2020;6(48).
41. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science.* 2012;336(6077):86-90.
42. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity.* 2013;38(4):792-804.

43. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2013;38(1):79-91.
44. Schultze JL, Schmidt SV. Molecular features of macrophage activation. *Semin Immunol*. 2015;27(6):416-23.
45. Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7).
46. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
47. Lee YK, M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review *Med Biol Sci Eng* 2019;2(1):1-5
48. Balan S, Saxena M, Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2019;348:1-68.
49. They C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(1):45-51.
50. Castiello L, Sabatino M, Jin P, Clayberger C, Marincola FM, Krensky AM, et al. Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(4):457-66.
51. Barreda D, Sanchez-Galindo M, Lopez-Flores J, Nava-Castro KE, Bobadilla K, Salgado-Aguayo A, et al. PDZ proteins are expressed and regulated in antigen-presenting cells and are targets of influenza A virus. *J Leukoc Biol*. 2018;103(4):731-8.
52. Bloom O, Unternaehrer JJ, Jiang A, Shin JS, Delamarre L, Allen P, et al. Spinophilin participates in information transfer at immunological synapses. *J Cell Biol*. 2008;181(2):203-11.
53. Dong X, Wei L, Guo X, Yang Z, Wu C, Li P, et al. Dlg1 Maintains Dendritic Cell Function by Securing Voltage-Gated K(+) Channel Integrity. *J Immunol*. 2019;202(11):3187-97.
54. Barreda D, Ramon-Luing LA, Duran-Luis O, Bobadilla K, Chacon-Salinas R, Santos-Mendoza T. Scrib and Dlg1 polarity proteins regulate Ag presentation in human dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2020;108(3):883-93.
55. Zheng W, Umitsu M, Jagan I, Tran CW, Ishiyama N, BeGora M, et al. An interaction between Scribble and the NADPH oxidase complex controls M1 macrophage polarization and function. *Nat Cell Biol*. 2016;18(11):1244-52.
56. Giallourakis C, Cao Z, Green T, Wachtel H, Xie X, Lopez-Illasaca M, et al. A molecular-properties-based approach to understanding PDZ domain proteins and PDZ ligands. *Genome Res*. 2006;16(8):1056-57.. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.
58. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):RESEARCH0034.
59. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn*. 2003;5(2):73-81.
60. Boccuto L, Lauri M, Sarasua SM, Skinner CD, Buccella D, Dwivedi A, et al. Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(3):310-6.
61. Christensen NR, Calyseva J, Fernandes EFA, Luchow S, Clemmensen LS, Haugaard-Kedstrom LM, et al. PDZ Domains as Drug Targets. *Adv Ther (Weinh)*. 2019;2(7):1800143.
62. Javorsky A, Humbert PO, Kvensakul M. Structural Basis of the Avian Influenza NS1 Protein Interactions with the Cell Polarity Regulator Scribble. *Viruses*. 2022;14(3).
63. Golebiewski L, Liu H, Javier RT, Rice AP. The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions. *J Virol*. 2011;85(20):10639-48.

64. 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;84(21):11164-74.
65. Castano-Rodriguez C, Honrubia JM, Gutierrez-Alvarez J, Sola I, Enjuanes L. Viral PDZ Binding Motifs Influence Cell Behavior Through the Interaction with Cellular Proteins Containing PDZ Domains. *Methods Mol Biol.* 2021;2256:217-36.
66. Jimenez-Guardeno JM, Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, Castano-Rodriguez C, et al. The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2014;10(8):e1004320.
67. Gutierrez-Gonzalez LH, Santos-Mendoza T. Viral targeting of PDZ polarity proteins in the immune system as a potential evasion mechanism. *FASEB J.* 2019;33(10):10607-17.
68. Javier RT, Rice AP. Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *J Virol.* 2011;85(22):11544-56.
69. Caillet-Saguy C, Durbesson F, Rezelj VV, Gogl G, Tran QD, Twizere JC, et al. Host PDZ-containing proteins targeted by SARS-CoV-2. *FEBS J.* 2021;288(17):5148-62.
70. Chaussabel D, Semnani RT, McDowell MA, Sacks D, Sher A, Nutman TB. Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood.* 2003;102(2):672-81.
71. Tailleux L, Waddell SJ, Pelizzola M, Mortellaro A, Withers M, Tanne A, et al. Probing host pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both *Mycobacterium tuberculosis* and infected human dendritic cells and macrophages. *PLoS One.* 2008;3(1):e1403.
72. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell.* 2016;165(3):535-50.
73. Cai J, Culley MK, Zhao Y, Zhao J. The role of ubiquitination and deubiquitination in the regulation of cell junctions. *Protein Cell.* 2018;9(9):754-69.
74. Chen CJ, Ou YC, Li JR, Chang CY, Pan HC, Lai CY, et al. Infection of pericytes in vitro by Japanese encephalitis virus disrupts the integrity of the endothelial barrier. *J Virol.* 2014;88(2):1150-61.
75. Shen ZY, Zhang J, Song HL, Zheng WP. Bone-marrow mesenchymal stem cells reduce rat intestinal ischemia-reperfusion injury, ZO-1 downregulation and tight junction disruption via a TNF-alpha-regulated mechanism. *World J Gastroenterol.* 2013;19(23):3583-95.
76. Tian S, Guo R, Wei S, Kong Y, Wei X, Wang W, et al. Curcumin protects against the intestinal ischemia-reperfusion injury: involvement of the tight junction protein ZO-1 and TNF-alpha related mechanism. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2016;20(2):147-52.
77. Lee TJ, Choi YH, Song KS. The PDZ motif peptide of ZO-1 attenuates *Pseudomonas aeruginosa* LPS-induced airway inflammation. *Sci Rep.* 2020;10(1):19644.
78. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2001;2(4):361-7.
79. Al-Ghadban S, Kaissi S, Homaidan FR, Naim HY, El-Sabban ME. Cross-talk between intestinal epithelial cells and immune cells in inflammatory bowel disease. *Sci Rep.* 2016;6:29783.
80. Salvador E, Burek M, Forster CY. Tight Junctions and the Tumor Microenvironment. *Curr Pathobiol Rep.* 2016;4:135-45.
81. Kaihara T, Kusaka T, Nishi M, Kawamata H, Imura J, Kitajima K, et al. Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2003;22(1):117-23.
82. Polette M, Mestdagt M, Bindels S, Nawrocki-Raby B, Hunziker W, Foidart JM, et al. Beta-catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes. *Cells Tissues Organs.* 2007;185(1-3):61-5.

83. Remue E, Meerschaert K, Oka T, Boucherie C, Vandekerckhove J, Sudol M, et al. TAZ interacts with zonula occludens-1 and -2 proteins in a PDZ-1 dependent manner. *FEBS Lett.* 2010;584(19):4175-80.
84. Oka T, Remue E, Meerschaert K, Vanloo B, Boucherie C, Gfeller D, et al. Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem J.* 2010;432(3):461-72.
85. Kim SY, Park SY, Jang HS, Park YD, Kee SH. Yes-Associated Protein Is Required for ZO-1-Mediated Tight-Junction Integrity and Cell Migration in E-Cadherin-Restored AGS Gastric Cancer Cells. *Biomedicines.* 2021;9(9).
86. Zhang Q, Zhou R, Xu P. The Hippo Pathway in Innate Anti-microbial Immunity and Anti-tumor Immunity. *Front Immunol.* 2020;11:1473.
87. Deng Y, Lu J, Li W, Wu A, Zhang X, Tong W, et al. Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF-kappaB regulates osteoarthritic cartilage degradation. *Nat Commun.* 2018;9(1):4564.
88. Hong L, Li X, Zhou D, Geng J, Chen L. Role of Hippo signaling in regulating immunity. *Cell Mol Immunol.* 2018;15(12):1003-9.
89. Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* 2016;30(1):1-17.
90. Tello-Lafoz M, Martinez-Martinez G, Rodriguez-Rodriguez C, Albar JP, Huse M, Gharbi S, et al. Sorting nexin 27 interactome in T-lymphocytes identifies zona occludens-2 dynamic redistribution at the immune synapse. *Traffic.* 2017;18(8):491-504.
91. Engevik AC, Krystofiak ES, Kaji I, Meyer AR, Weis VG, Goldstein A, et al. Recruitment of Polarity Complexes and Tight Junction Proteins to the Site of Apical Bulk Endocytosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2021;12(1):59-80.
92. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev.* 2007;219:143-56.
93. Claus V, Jahraus A, Tjelle T, Berg T, Kirschke H, Faulstich H, et al. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem.* 1998;273(16):9842-51.
94. Hartmann S, Lucius R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Int J Parasitol.* 2003;33(11):1291-302.
95. Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science.* 2003;299(5611):1400-3.
96. Lukacs GL, Rotstein OD, Grinstein S. Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages. *J Biol Chem.* 1990;265(34):21099-107.
97. Duclos S, Clavarino G, Rousserie G, Goyette G, Boulais J, Camossetto V, et al. The endosomal proteome of macrophage and dendritic cells. *Proteomics.* 2011;11(5):854-64.
98. Cruikshank WW, Lim K, Theodore AC, Cook J, Fine G, Weller PF, et al. IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation. *J Immunol.* 1996;157(12):5240-8.
99. Theodore AC, Center DM, Nicoll J, Fine G, Kornfeld H, Cruikshank WW. CD4 ligand IL-16 inhibits the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol.* 1996;157(5):1958-64.
100. Ren F, Zhan X, Martens G, Lee J, Center D, Hanson SK, et al. Pro-IL-16 regulation in activated murine CD4+ lymphocytes. *J Immunol.* 2005;174(5):2738-45.
101. Laberge S, Cruikshank WW, Beer DJ, Center DM. Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. *J Immunol.* 1996;156(1):310-5.
102. Tanaka T, Soriano MA, Grusby MJ. SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling. *Immunity.* 2005;22(6):729-36.
103. Tanaka T, Grusby MJ, Kaisho T. PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit. *Nat Immunol.* 2007;8(6):584-91.

104. Healy NC, O'Connor R. Sequestration of PDLIM2 in the cytoplasm of monocytic/macrophage cells is associated with adhesion and increased nuclear activity of NF- κ B. *J Leukoc Biol.* 2009;85(3):481-90.
105. Gan Q, Wang X, Zhang Q, Yin Q, Jian Y, Liu Y, et al. The amino acid transporter SLC-36.1 cooperates with PtdIns3P 5-kinase to control phagocytic lysosome reformation. *J Cell Biol.* 2019;218(8):2619-37.
106. Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(8):543-60.
107. Hsu CL, Lin W, Seshasayee D, Chen YH, Ding X, Lin Z, et al. Equilibrative nucleoside transporter 3 deficiency perturbs lysosome function and macrophage homeostasis. *Science.* 2012;335(6064):89-92.
108. Watanabe C, Kato Y, Ito S, Kubo Y, Sai Y, Tsuji A. Na⁺/H⁺ exchanger 3 affects transport property of H⁺/oligopeptide transporter 1. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005;20(6):443-51.
109. Sugiura T, Kato Y, Tsuji A. Role of SLC xenobiotic transporters and their regulatory mechanisms PDZ proteins in drug delivery and disposition. *J Control Release.* 2006;116(2):238-46.
110. Srivastava S, Nakagawa K, He X, Kimura T, Fukutomi T, Miyauchi S, et al. Identification of the multivalent PDZ protein PDZK1 as a binding partner of sodium-coupled monocarboxylate transporter SMCT1 (SLC5A8) and SMCT2 (SLC5A12). *J Physiol Sci.* 2019;69(2):399-408.

Apendice

Los genes PDZ humanos. La lista humana 153 PDZ de acuerdo (Comité de nomenclatura de genes HUGO en el Instituto Europeo de Bioinformática

HGNC ID (gene)	Símbolo	Nombre aprobado	Simbolo previo	Alias
HGNC :347	AHNAK	AHNAK nucleoprotein		MGC5395,AHNAK1
HGNC :20125	AHNAK 2	AHNAK nucleoprotein 2	C14orf78	
HGNC :578	APBA1	amyloid beta precursor protein binding family A member 1	MINT1	D9S411E,X11
HGNC :579	APBA2	amyloid beta precursor protein binding family A member 2	X11L,MINT2	D15S1518E,LIN-10,MGC:14091,HsT16821
HGNC :580	APBA3	amyloid beta precursor protein binding family A member 3		X11L2,mint3
HGNC :23725	ARHGA P21	Rho GTPase activating protein 21		KIAA1424,ARHGAP10
HGNC :29293	ARHGA P23	Rho GTPase activating protein 23		KIAA1501
HGNC :14580	ARHGE F11	Rho guanine nucleotide exchange factor 11		KIAA0380,GTRAP48,PDZ-RHOGEF
HGNC :14193	ARHGE F12	Rho guanine nucleotide exchange factor 12		KIAA0382,LARG
HGNC :16422	CARD10	caspase recruitment domain family member 10		CARMA3, BIMP1
HGNC :16393	CARD11	caspase recruitment domain family member 11		CARMA1,BIMP3
HGNC :16446	CARD14	caspase recruitment domain family member 14	PSORS2	CARMA2,BIMP2
HGNC :1497	CASK	calcium/calmodulin dependent serine protein kinase	TNRC8	LIN2,CAGH39,FGS4
HGNC :19700	CNKSRI	connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1		CNK1,KSR,CNK

HGNC :19701	CNKSR2	connector enhancer of kinase suppressor of Ras 2		KIAA0902,CNK2,KSR 2
HGNC :23034	CNKSR3	CNKSR family member 3	MAGI1	FLJ31349
HGNC :9506	CYTIP	cytohesin 1 interacting protein	PSCDBP	B3- 1,HE,CYBR,CASP,CY THIP
HGNC :22953	DEPTO R	DEP domain containing MTOR interacting protein	DEPDC6	DEP.6,FLJ12428
HGNC :2900	DLG1	discs large MAGUK scaffold protein 1		SAP97,SAP- 97,hdlg,DLGH1,dJ1061 C18.1.1
HGNC :2901	DLG2	discs large MAGUK scaffold protein 2		PSD- 93,PSD93,chapsyn- 110,PPP1R58
HGNC :2902	DLG3	discs large MAGUK scaffold protein 3		NE-Dlg,SAP102,SAP- 102,NEDLG,KIAA123 2,MRX90,PPP1R82
HGNC :2903	DLG4	discs large MAGUK scaffold protein 4		PSD- 95,PSD95,SAP90,SAP- 90
HGNC :2904	DLG5	discs large MAGUK scaffold protein 5		P-dlg,KIAA0583
HGNC :3084	DVL1	dishevelled segment polarity protein 1		
HGNC :3086	DVL2	dishevelled segment polarity protein 2		
HGNC :3087	DVL3	dishevelled segment polarity protein 3		KIAA0208
HGNC :15842	ERBIN	erbb2 interacting protein	ERBB2IP	LAP2
HGNC :29159	FRMPD 1	FERM and PDZ domain containing 1		KIAA0967,FRMD2
HGNC :29382	FRMPD 3	FERM and PDZ domain containing 3		RP5- 1070B1.1,KIAA1817
HGNC :1226	GIPC1	GIPC PDZ domain containing family member 1	C19orf3,RGS19IP1	TIP- 2,Hs.6454,GIPC,SEMC AP,GLUT1CBP,SYNE CTIN,NIP

HGNC :18177	GIPC2	GIPC PDZ domain containing family member 2		FLJ20075,SEMCAP-2
HGNC :18183	GIPC3	GIPC PDZ domain containing family member 3	C19orf64,DFNB72,DFNB15	DFNB95
HGNC :17643	GOPC	golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing		dJ94G16.2,PIST,FIG,GOPC1,CAL
HGNC :16769	GORASP1	golgi reassembly stacking protein 1	GOLPH5	GRASP65,P65,FLJ23443
HGNC :17500	GORASP2	golgi reassembly stacking protein 2		GRASP55,GRS2,GOLPH6
HGNC :18707	TAMALIN	trafficking regulator and scaffold protein tamalin	GRASP	
HGNC :18464	GRID2IP	Grid2 interacting protein		
HGNC :18708	GRIP1	glutamate receptor interacting protein 1		
HGNC :23841	GRIP2	glutamate receptor interacting protein 2		KIAA1719
HGNC :9476	HTRA1	HtrA serine peptidase 1	PRSS11	HtrA,IGFBP5-protease,ARMD7
HGNC :14348	HTRA2	HtrA serine peptidase 2	PRSS25	OMI,PARK13
HGNC :30406	HTRA3	HtrA serine peptidase 3		Tasp,Prsp
HGNC :26909	HTRA4	HtrA serine peptidase 4		FLJ90724
HGNC :5980	IL16	interleukin 16		LCF,IL-16,prIL-16,HsT19289,FLJ42735,FLJ16806
HGNC :28881	PATJ	PATJ crumbs cell polarity complex component	INADL	Cipp
HGNC :6613	LIMK1	LIM domain kinase 1		LIMK
HGNC :6614	LIMK2	LIM domain kinase 2		
HGNC :17787	LIN7A	lin-7 homolog A, crumbs cell polarity complex component		MALS-1,TIP-33,LIN7A,VELI1

HGNC :17788	LIN7B	lin-7 homolog B, crumbs cell polarity complex component		MALS-2,LIN-7B,VELI2
HGNC :17789	LIN7C	lin-7 homolog C, crumbs cell polarity complex component		MALS-3,LIN-7C,LIN-7-C,VELI3,FLJ11215
HGNC :6646	LMO7	LIM domain 7	FBXO20	FBX20,KIAA0858
HGNC :18531	LRRC7	leucine rich repeat containing 7		KIAA1365,densin-180
HGNC :30006	MAGIX	MAGI family member, X-linked		PDZX,JM10,FLJ21687
HGNC :946	MAGI1	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1	BAIAP1	BAP1,MAGI-1,TNRC19,AIP3,WWP3
HGNC :18957	MAGI2	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2		AIP1,ARIP1,KIAA0705,ACVRIP1,MAGI-2
HGNC :29647	MAGI3	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3		MAGI-3
HGNC :19034	MAST1	microtubule associated serine/threonine kinase 1		SAST,KIAA0973
HGNC :19035	MAST2	microtubule associated serine/threonine kinase 2		MAST205,KIAA0807
HGNC :19036	MAST3	microtubule associated serine/threonine kinase 3		KIAA0561
HGNC :19037	MAST4	microtubule associated serine/threonine kinase family member 4		KIAA0303
HGNC :7137	AFDN	afadin, adherens junction formation factor	MLLT4	AF-6,AF6
HGNC :7208	MPDZ	multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex component		MUPP1
HGNC :7219	MPP1	MAGUK p55 scaffold protein 1	DXS552E	PEMP
HGNC :7220	MPP2	MAGUK p55 scaffold protein 2	DLG2	DKFZp761D0712
HGNC :7221	MPP3	MAGUK p55 scaffold protein 3	DLG3	
HGNC :13680	MPP4	MAGUK p55 scaffold protein 4	DLG6	

HGNC :18669	PALS1	protein associated with LIN7 1, MAGUK p55 family member	MPP5	FLJ12615
HGNC :18167	PALS2	protein associated with LIN7 2, MAGUK p55 family member	MPP6	VAM-1,p55T
HGNC :26542	MPP7	MAGUK p55 scaffold protein 7		FLJ32798
HGNC :31104	MYO18 A	myosin XVIII A	TIAF1	KIAA0216,MysPDZ
HGNC :7872	NOS1	nitric oxide synthase 1	NOS	nNOS
HGNC :16051	PARD3	par-3 family cell polarity regulator		PAR3,PARD3A,Bazooka,Baz,ASIP,PPP1R118
HGNC :14446	PARD3B	par-3 family cell polarity regulator beta	ALS2CR19	Par3L,PAR3beta
HGNC :15943	PARD6 A	par-6 family cell polarity regulator alpha		PAR-6,PAR-6A,TAX40,PAR6alpha,TIP-40
HGNC :16245	PARD6B	par-6 family cell polarity regulator beta		PAR-6B
HGNC :16076	PARD6 G	par-6 family cell polarity regulator gamma		PAR-6G,PAR6gamma
HGNC :13406	PCLO	piccolo presynaptic cytomatrix protein		KIAA0559,DKFZp779G1236,ACZ
HGNC :2067	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1	CLIM1	CLP-36,hCLIM1,CLP36
HGNC :13992	PDLIM2	PDZ and LIM domain 2		
HGNC :20767	PDLIM3	PDZ and LIM domain 3		ALP
HGNC :16501	PDLIM4	PDZ and LIM domain 4		RIL
HGNC :17468	PDLIM5	PDZ and LIM domain 5		LIM,Enh
HGNC :15710	LDB3	LIM domain binding 3	CMD1C	PDLIM6,KIAA0613,ZASP
HGNC :22958	PDLIM7	PDZ and LIM domain 7		ENIGMA

HGNC :8821	PDZK1	PDZ domain containing 1		PDZD1,NHERF3
HGNC :18486	PDZD2	PDZ domain containing 2	PDZK3	KIAA0300
HGNC :19891	PDZD3	PDZ domain containing 3	PDZK2	FLJ22756,IKEPP,NHERF4
HGNC :21167	PDZD4	PDZ domain containing 4	PDZK4	KIAA1444,LU1,FLJ34125,PDZRN4L,LNX5
HGNC :16843	FRMPD2B	FERM and PDZ domain containing 2B, pseudogene	PDZK5A,PDZD5A,FRMPD2L1,FRMPD2P2,PDZK5B,PDZD5B,FRMPD2L2,FRMPD2P1	yX59F3.2,bA556L1.2
HGNC :28572	FRMPD2	FERM and PDZ domain containing 2	PDZD5C,PDZK5C	MGC35285
HGNC :29239	INTU	inturned planar cell polarity protein	PDZK6,PDZD6	KIAA1284,CPLANE4
HGNC :26257	PDZD7	PDZ domain containing 7	PDZK7,DFNB57	FLJ23209,bA108L7.8
HGNC :12597	USH1C	USH1 protein network component harmonin	DFNB18	PDZ73,harmonin,NY-CO-37,NY-CO-38,PDZ-73,AIE-75,PDZD7C
HGNC :26974	PDZD8	PDZ domain containing 8	PDZK8	bA129M16.2,FLJ34427
HGNC :28740	PDZD9	PDZ domain containing 9	C16orf65	MGC50721
HGNC :29007	FRMPD4	FERM and PDZ domain containing 4	PDZK10,PDZD10	KIAA0316
HGNC :28034	PDZD11	PDZ domain containing 11	PDZK11	
HGNC :16854	RAPGEF2	Rap guanine nucleotide exchange factor 2	PDZGEF1	PDZ-GEF1,RA-GEF,DKFZP586O1422,KIAA0313
HGNC :20655	RAPGEF6	Rap guanine nucleotide exchange factor 6	PDZGEF2	RA-GEF-2,PDZ-GEF2
HGNC :51488	PDZPH1P	PDZ and pleckstrin homology domains 1, pseudogene		
HGNC :20421	LNX2	ligand of numb-protein X 2	PDZRN1	MGC46315
HGNC :6657	LNX1	ligand of numb-protein X 1	LNX	MPDZ,PDZRN2

HGNC :17704	PDZRN3	PDZ domain containing ring finger 3		KIAA1095,SEMACAP3,LNX3,SEMCAP3
HGNC :30552	PDZRN4	PDZ domain containing ring finger 4		DKFZp434B0417,LNX4,FLJ33777,IMAGE5767589
HGNC :16361	WHRN	whirlin	DFNB31	CIP98,USH2D,PDZD7B
HGNC :9394	PICK1	protein interacting with PRKCA 1	PRKCABP	dJ1039K5,MGC15204
HGNC :14946	PPP1R9A	protein phosphatase 1 regulatory subunit 9A		Neurabin-I,KIAA1222,FLJ20068
HGNC :9298	PPP1R9B	protein phosphatase 1 regulatory subunit 9B	PPP1R6,PPP1R9	Spn,SPINO
HGNC :32594	PREX1	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 1		KIAA1415,P-REX1
HGNC :22950	PREX2	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 2	DEPDC2	DEP.2,FLJ12987,P-REX2,PPP1R129
HGNC :13797	PRX	periaxin		KIAA1620
HGNC :9567	PSMD9	proteasome 26S subunit, non-ATPase 9		p27,Rpn4
HGNC :9655	PTPN3	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 3		PTPH1
HGNC :9656	PTPN4	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 4		PTPMEG
HGNC :9646	PTPN13	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 13		PTP1E,PTP-BAS,PTPL1,PTP-BL
HGNC :22226	RADIL	Rap associating with DIL domain		FLJ10324,KIAA1849,RASIP2
HGNC :9999	RGS3	regulator of G protein signaling 3		C2PA,FLJ20370,PDZ-RGS3
HGNC :9994	RGS12	regulator of G protein signaling 12		
HGNC :19973	RHPN1	rhopilin Rho GTPase binding protein 1		KIAA1929,RHPN,ODF5
HGNC :19974	RHPN2	rhopilin Rho GTPase binding protein 2		

HGNC :17282	RIMS1	regulating synaptic membrane exocytosis 1	RAB3IP2,CORD7	RIM,KIAA0340,RIM1
HGNC :17283	RIMS2	regulating synaptic membrane exocytosis 2	RAB3IP3	KIAA0751,RIM2,OBOE
HGNC :30377	SCRIB	scribble planar cell polarity protein		KIAA0147,SCRIB1,Var tul
HGNC :10662	SDCBP	syndecan binding protein		SYCL,MDA-9
HGNC :15756	SDCBP2	syndecan binding protein 2		ST-2,SITAC18
HGNC :15474	SHANK 1	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 1		SSTRIP,SPANK- 1,synamon
HGNC :14295	SHANK 2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2	CORTBP1	CTTNBP1,ProSAP1,S HANK,SPANK-3
HGNC :14294	SHANK 3	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3		SPANK- 2,prosap2,KIAA1650,P SAP2
HGNC :630	SHROO M2	shroom family member 2	APXL	
HGNC :30422	SHROO M3	shroom family member 3		ShrmL,SHRM,KIAA14 81,APXL3
HGNC :29215	SHROO M4	shroom family member 4		KIAA1202
HGNC :10885	SIPA1	signal-induced proliferation-associated 1		SPA1
HGNC :20284	SIPA1L1	signal induced proliferation associated 1 like 1		KIAA0440,E6TP1,SPA R1
HGNC :23800	SIPA1L2	signal induced proliferation associated 1 like 2		KIAA1389,SPAR2
HGNC :23801	SIPA1L3	signal induced proliferation associated 1 like 3		KIAA0545,SPAR3
HGNC :11075	SLC9A3 R1	SLC9A3 regulator 1		NHERF,EBP50,NHER F1
HGNC :11076	SLC9A3 R2	SLC9A3 regulator 2		SIP-1,TKA-1,NHERF- 2,E3KARP
HGNC :11167	SNTA1	syntrophin alpha 1	SNT1	TACIP1,LQT12

HGNC :11168	SNTB1	syntrophin beta 1	SNT2B1	59- DAP,A1B,BSYN2,TIP- 43,SNT2
HGNC :11169	SNTB2	syntrophin beta 2	SNT2B2,SNTL,D16S2531E	EST25263,SNT3
HGNC :13740	SNTG1	syntrophin gamma 1		SYN4,G1SYN
HGNC :13741	SNTG2	syntrophin gamma 2		SYN5,G2SYN
HGNC :20073	SNX27	sorting nexin 27		MY014,KIAA0488,M GC20471
HGNC :19694	STXBP4	syntaxin binding protein 4		Synip,MGC50337
HGNC :18955	SYNJ2B P	synaptojanin 2 binding protein		Arip2
HGNC :17732	SYNPO2	synaptopodin 2		MYOPODIN,SYISL
HGNC :23532	SYNPO2 L	synaptopodin 2 like		FLJ12921
HGNC :30684	TAX1BP 3	Tax1 binding protein 3		TIP-1
HGNC :11805	TIAM1	TIAM Rac1 associated GEF 1		
HGNC :11806	TIAM2	TIAM Rac1 associated GEF 2		STEF
HGNC :11827	TJP1	tight junction protein 1		ZO- 1,MGC133289,DKFZp 686M05161
HGNC :11828	TJP2	tight junction protein 2	DFNA51	ZO-2,X104,ZO2
HGNC :11829	TJP3	tight junction protein 3		ZO-3