



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas -
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado:

**"Análisis de la expresión de proteínas de polaridad
celular y su incumbencia en los procesos oncogénicos
asociados a infecciones virales"**

Presentada por:

Federico Emanuel Marziali

Rosario, Argentina

2017

"Análisis de la expresión de proteínas de polaridad celular y su incumbencia en los procesos oncogénicos asociados a infecciones virales"

Federico Emanuel Marziali

**Licenciado en Biotecnología
Universidad Nacional de Rosario**

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Virus Oncogénicos del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Área Virología, de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre abril 2012 y febrero de 2017, bajo la dirección de la Dra. Daniela Gardiol.

AGRADECIMIENTOS

*¡Cómo no acordarme en este momento de todos los que me ayudaron a alcanzar esta meta!
Tantas personas por agradecer...*

En primer lugar, a mi directora Daniela. Quiero decirte que hay pocas personas tan apasionadas por la ciencia como vos. Gracias por transmitirme ese entusiasmo, por incentivar-me y no dejarme caer nunca. Por tu ejemplo, del cual pude entender que siempre hay que seguir adelante, buscarle la vuelta a todo y aprovechar al máximo todas las posibilidades que se presentan. Te agradezco poder seguir a tu lado aprendiendo de vos!

También a Ana Laura por estar siempre ahí, escuchando cada ocurrencia mía y dándome su opinión sabia, práctica y esencial para que no pierda un montón tiempo. Te agradezco mucho por compartir tus conocimientos y por ofrecerme tu amistad. A Miguel, Mencha y Maria Rosa, por llevar adelante una cátedra de personas tan lindas y tenerme en cuenta desde el primer día. Por ser amables, por compartir su experiencia y estar predispuestos a solucionar cualquier problema que tenga.

A mis compañeros del laboratorio porque por ellos cada día de trabajo fue distinto, siempre divertido, pero sobre todo porque se convirtieron en mis amigos.

Flor, una hermana mayor tapando mis mandadas. No puedo continuar sin agradecerte “tu complicidad”, sin mencionar “para qué te traje?” y sin recordarte rasqueteando conmigo la pared del autoclave con el tenedor de Eli. Gracias por ser una persona simple y transparente, y por permitirme ser el padrino de Luquita!. A Marina, porque siempre me hiciste ver las cosas desde otro punto de vista y así me ayudaste a crecer como persona. Agradezco los años que trabajamos juntos y poder ser tu amigo!. A Eli, por el aguante de tantos “reality shows”, por ser una persona cálida, comprensiva y en la que se puede confiar para lo que sea. A Diego (o simplemente Chui) por ser mi modelo de researcher a seguir, siempre tranquilo y humilde ante todo. Tengo mucho para agradecer a Lola por ayudarme con las células, facilitando mis días de trabajo, pero más por enseñarme a aprender a esperar y confiar y porque con tu ejemplo me ayudaste a entender muchas cosas de la vida.

Gracias al resto de los divorciados de Viro!: German y Pablo, por hacerme reír con sus chistes y por ayudarme en cualquier situación o duda que me surja, (y además por los excelentes menús que prepararon en cada juntada). A Cone, siempre prendiéndose en todas y trayendo buena onda con su particular estilo. También a las mellis, Ale y Rox, y a Sergio que compartieron conmigo tantos momentos divertidos y me hicieron sentir cómodo desde el principio. A Nadu porque me brindaste tu amistad desde el día cero, por tantas risas y obviamente por el helado compartido cada día de resultados negativos. A Clau, que con tu alegría y bromas me animaste cada vez que aparecías por el lab, gracias por tu comprensión y ayuda en tiempos de escasez de western blots exitosos y sobre todo gracias por tu amistad. Por último, a Ramón y Amalia que con su experiencia contribuyeron a que aprenda cada día más.

También quiero agradecer a Clarisse, por su paciencia y por aguantarme, y por mostrarme que queriendo se pueden lograr cosas grandes. A Lucia, por su calidez y sencillez, y a Guido, por su buena onda en el poco tiempo que pude compartir con él. A Emma por ayudarme a solucionar problemas de cualquier tipo y a los chicos del Cuas 1 y Sala 9 que siempre me ayudaron cuando los necesité. A Rodrigo, por tantas horas de confocal compartidas y por su predisposición.

A la Universidad Pública y a CONICET, por permitirme realizar esta Tesis Doctoral, trabajando de lo que me gusta y perfeccionándome día tras día. Quiero agradecer a mis Tutores de Tesis, Javier Girardini y María Cecilia Larocca, por su tiempo en evaluar mi trabajo durante estos 5 años. Además, a Eleonora García Vescovi por colaborar con mi trabajo aportando reactivos y constructos para distintos experimentos.

A Lawrence Banks y su grupo, porque confiaron en mí, permitiéndome trabajar en su laboratorio teniendo una experiencia internacional enriquecedora. También a la Fundación Bunge y Born por respaldar ésta estadía, sin la cual muchos de los experimentos mostrados en esta Tesis no se hubiesen realizado.

Quiero decir gracias a mis amigos de Casilda porque están conmigo en todas. Les agradezco su apoyo en todo lo que hago. También a mis amigos de la facu, Cabru, Lucio y Pau, por compartir este camino conmigo.

A mis padres, por haberme apoyado en esta etapa de mi vida como lo hacen con todo lo que emprendo, por el amor que me tienen y porque sin ellos sería nada. A mi hermano Franco y a Erika por ser incondicionales y confiar en mí en todo lo que hago. A mi tío Héctor y mis abuelos. Gracias familia!

A Dios, por haber puesto en mi camino a todas estas personas hermosas como parte de Su plan para mi vida. Por quererme tanto, ser tan paciente y estar siempre conmigo!

De verdad, a todos gracias!

Parte de los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis Doctoral han sido publicados en:

-Transcriptional and translational mechanisms contribute to regulate the expression of Disc Large 1 protein during different biological processes. Federico Marziali*, Ana Laura Cavatorta*, Marina Bugnon Valdano, Florencia Facciuto y Daniela Gardiol. *Biological Chemistry*; volume 396, issue 8, 893-902 (2015).

- Human Discs large 1 and Human T cell leukemia virus type 1 Tax proteins directly interact in association with the Golgi apparatus. Federico Marziali, Marina Bugnon Valdano, Clarisse Brunet Avalos, Lucía Moriena, Ana Laura Cavatorta y Daniela Gardiol. *Enviado*.

Participación en otros trabajos publicados en el grupo de investigación:

- DLG1 polarity protein expression associates with the disease progress of low-grade cervical intraepithelial lesions. Cavatorta AL, Di Gregorio A, Bugnon Valdano M, Marziali F, Cabral M, Bottai H, Cittadini J, Nocito AL y Gardiol D. *Experimental and Molecular Pathology*. *En prensa* (2017).

-Disc Large 1 expression is altered by Human Papillomavirus E6/E7 proteins in organotypic cultures of human keratinocytes. Bugnon Valdano M, Cavatorta AL, Morale MG, Marziali F, de Souza Lino V, Steenbergen R, Boccardo E y Gardiol D. *J Gen Virol*; volume 97, issue 2, 453-462 (2016).

-Human Papillomavirus (HPV) -18 E6 oncoprotein interferes with the epithelial cell polarity Par3 protein. Florencia Facciuto, Marina Bugnon Valdano, Federico Marziali, Paola Massimi, Lawrence Banks, Ana Laura Cavatorta y Daniela Gardiol. *Molecular oncology*; volume 8, issue 3, 533-543 (2014).

-Differential expression of PDZ-containing proteins in human diseases: challenging topics and novel issues. Florencia Facciuto, Ana Laura Cavatorta, Marina Bugnon Valdano, Federico Marziali, y Daniela Gardiol. *FEBS Journal*; volume 279, issue 19, 3538-3548 (2013).

-Regulation of Translational Efficiency by Different Splice Variants of the Disc Large 1 Oncosuppressor 5'UTR. Ana Laura Cavatorta, Florencia Facciuto, Marina Bugnon Valdano, Federico Marziali, Adriana A. Giri, Lawrence Banks y Daniela Gardiol. *FEBS Journal*; volume 278, issue 14 .2596-2608 (2011).

Presentaciones a reuniones científicas:

-Marziali F, Cavatorta AL, Bugnon Valdano MP, Brunnet C, Moriena L, Barbieri G y Gardiol D. "Interferencia de Tax de HTLV-1 sobre la localización intracelular de la proteína de polaridad DLG1". XXXVI Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Virología (SAV). Asociación Argentina de Microbiología. Ciudad autónoma de Buenos Aires, Argentina, 5 y 6 de diciembre de 2016. Presentación oral.

-Facciuto F, **Marziali F**, Massimi P, Bugnon Valdano MP, Cavatorta AL, Banks L y Daniela Gardiol. "*High risk HPVs interfere with the regulation of the Par polarity complex*". Congreso Internacional ICGEB DNA Tumour Virus Meeting 2015. Trieste, Italia, 21 al 26 de Julio de 2015. Presentación tipo póster.

-Bugnon Valdano M, **Marziali F**, Cavatorta AL, Barbieri G, Facciuto F, Boccardo E y Gardiol D. "*Cell polarity disruption during HPV infections*". Congreso Internacional ICGEB DNA Tumour Virus Meeting 2015. Trieste, Italia, 21 al 26 de Julio de 2015. Presentación tipo póster.

-Ana Laura Cavatorta, Alejandra Di Gregorio, Mariela Cabral, Marina Bugnon Valdano, **Federico Marziali**, Jorge Cittadini, Ana Lia Nocito y Daniela Gardiol. "*DLG1 protein expression in squamous intraepithelial cervical lesions and its relevance to disease outcome*". Congreso Internacional ICGEB DNA Tumour Virus Meeting 2015. Trieste, Italia, 21 al 26 Julio de 2015. Presentación tipo póster.

-Ana Laura Cavatorta, Alejandra Di Gregorio, Mariela Cabral, Marina Bugnon Valdano, **Federico Marziali**, Jorge Cittadini, Ana Lia Nocito y Daniela Gardiol. "*Análisis de la expresión de la proteína Discs large en lesiones intraepiteliales escamosas de cuello uterino y su significado pronóstico en la evolución de la patología*". XI Congreso Argentino de Virología. II Congreso Latinoamericano de Virología. 23-26 Junio 2015. Buenos Aires, Argentina. Presentación tipo póster.

-Bugnon Valdano M, Cavatorta AL, **Marziali F**, Barbieri G, Facciuto F, Boccardo E y Gardiol D. "*Regulation of cell polarity protein expression during Human Papillomavirus infections*". XI Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires- Argentina, 23 al 26 Junio de 2015. Presentación tipo póster.

-**Marziali F**, Cavatorta AL, Bugnon Valdano M, Facciuto F y Gardiol D. "*Different Mechanisms regulates Disc Large 1 protein levels in different biological processes*". L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Rosario, 11 a 14 de noviembre de 2014. Presentación tipo póster. BIOCELL 38 (Suppl. 2).

-**Marziali F**, Facciuto F, Massimi P, Bugnon Valdano MP, Cavatorta AL, Banks L y Gardiol D. "*PAR3 polarity protein, a target of HPV E6, is also mislocalized by HTLV-1 Tax oncoprotein*". First ICGEB Workshop Human Papillomavirus: From Basic Biology to Cervical Cancer Prevention. Rosario, 19 a 21 de noviembre de 2014. Presentación tipo póster.

-Bugnon Valdano M, Cavatorta AL, **Marziali F**, Facciuto F, Boccardo E, Gardiol D. "*Regulation of cell polarity proteins during the HPV infection*". First ICGEB Workshop Human Papillomavirus: From Basic Biology to Cervical Cancer Prevention. Rosario, 19 a 21 de noviembre de 2014. Presentación oral.

-Bugnon Valdano M, Cavatorta AL, **Marziali F**, Facciuto F, Boccardo E y Gardiol D. "*Cell polarity disruption during HPV carcinogenic processes: analysis of cellular and viral contributions*". First ICGEB Workshop Human Papillomavirus: From Basic Biology to Cervical Cancer Prevention. Rosario, 19 a 21 de noviembre de 2014. Presentación tipo póster.

-Ana Laura Cavatorta; Alejandra Di Gregorio; Marina Bugnon Valdano; **Federico Marziali**; Jorge Cittadini; Ana Lia Nocito, Daniela Gardiol. "*DLG1 protein expression in squamous intraepithelial cervical lesions and its relevance to disease outcome*". First ICGEB Workshop Human Papillomavirus: From Basic Biology to Cervical Cancer Prevention. Rosario, 19 a 21 de noviembre de 2014. Presentación tipo póster.

-Bugnon Valdano M, Cavatorta AL, **Marziali F**, Facciuto F, Boccardo E y Gardiol D. "*Cell polarity disruption during carcinogenic processes: analysis of cellular and viral contributions*". L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Rosario, 11 a 14 de noviembre de 2014. Presentación tipo póster. BIOCELL 38 (Suppl. 2).

-Marina Bugnon Valdano, Ana Laura Cavatorta, **Federico Marziali**, Florencia Facciuto, Enrique Boccardo y Daniela Gardiol. "*Regulation of cell polarity during carcinogenic processes associated to HPV infections*". III Latin American Zebrafish Network (LAZEN) Symposium. 11 y 12 de abril de 2014. Valparaíso, Chile. Presentación tipo póster.

-Facciuto Florencia N, Bugnon Valdano Marina P, **Marziali Federico E**, Cavatorta Ana Laura, Banks Lawrence y Gardiol Daniela N. "*Oncogenic Human Papillomavirus E6 oncoproteins interfere with cell polarity network*". Discussion meeting on Cellular Polarity: from mechanisms to disease The Royal Society. Londres, Inglaterra, 15-16 de abril de 2013. Presentación tipo póster.

-Facciuto Florencia N, Cavatorta Ana Laura, Bugnon Valdano Marina, **Marziali Federico** y Gardiol Daniela. "*Las oncoproteínas E6 de Papilomavirus humanos interfieren con la función de componentes celulares que regulan la polaridad celular*". XX Jornadas de Jóvenes Pesquisadores AUGM. Curitiba, Brasil, 3 al 5 de octubre 2012. Presentación tipo póster.

-**Federico Marziali**, Florencia Facciuto, Marina Bugnon Valdano, Ana Laura Cavatorta y Daniela Gardiol. "*Interferencia de virus oncogénicos con la polaridad celular: rol de los dominios de interacción proteica PDZ*". XXXII Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Virología (SAV) Asociación Argentina de Microbiología. Valle Hermoso, Córdoba. 4 al 7 de diciembre de 2012. Presentación oral.

-**Federico Marziali**, Marina Bugnon Valdano, Florencia Facciuto, Ana Laura Cavatorta y Daniela Gardiol. "*Analysis of molecular mechanisms that contribute to the development of HTLV-1 associated pathologies*". 3rd ICGEB Workshop on Human RNA Viruses. Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina. 2 al 5 de abril de 2012. Presentación tipo póster.

-Facciuto F, Cavatorta AL, Bugnon Valdano M, **Marziali F**, Gardiol D. *"The human papillomavirus E6 oncoproteins interfere with the function of cellular components involved in the regulation of cell polarity"*. Cell Polarity and Membrane Traffic Meeting. Polonia Castle, Pultusk, Poland 31 de Marzo a 5 de abril de 2012. Presentación tipo póster.

-**Federico Marziali**, Ana Laura Cavatorta, Marina Bugnon Valdano, Florencia Facciuto y Daniela Gardiol. *"Estudio de los mecanismos que contribuyen a la regulación del oncosupresor Disc Large 1, blanco de las oncoproteínas E6 de HPV oncogénico"*. XIX Jornada de Jóvenes Investigadores. Asociación de Universidades de Grupo Montevideo (AUGM). Ciudad del Este, Paraguay. 25 al 27 de Octubre de 2011. Presentación oral.

-Ana Laura Cavatorta, Marina Bugnon Valdano, **Federico Marziali**, Florencia Facciuto, Lawrence Banks y Daniela Gardiol. *"Different mechanisms contribute to regulate the expression of Disc Large 1 Oncosuppressor, a target of high-risk HPV E6 proteins"*. Congreso Internacional DNA Tumour Virus Meeting. Trieste, Italia, 19 al 24 de Julio de 2011.

-Cavatorta Ana Laura, Facciuto Florencia, Bugnon Valdano Marina, **Marziali Federico**, Gardiol Daniela. *"Estudio de los mecanismos que contribuyen a la regulación de la expresión del oncosupresor Disc Large, blanco de las oncoproteínas E6 de HPV oncogénico"*. XXX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología (SAV), Asociación Argentina de Microbiología. Villa Giardino, Córdoba, 8 al 11 de diciembre de 2010.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
1.1- Polaridad Celular.....	5
1.1.2-Complejos de polaridad.....	6
1.1.3-Mecanismo de acción de las proteínas de los complejos de polaridad.....	8
1.1.4-Proteínas de polaridad DLG1 y PAR3.....	8
1.1.5-Alteración de la expresión de proteínas de polaridad celular durante el desarrollo oncogénico.....	11
1.2-Mecanismos de regulación de la proteína de polaridad DLG1.....	12
1.2.1-Características de la transcripción y de eventos post-transcripcionales de DLG1.....	12
1.2.2-Regiones 5'UTR y su asociación con la carcinogénesis.....	14
1.2.3-Influencia de las formas alternativas de la 5'UTR del ARNm de DLG1 en la eficiencia de la traducción.....	16
1.3-Interferencia de virus humanos sobre la expresión de proteínas de polaridad celular.....	17
1.3.1-HPV de alto riesgo y cáncer cervical.....	18
1.3.2-Virus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1).....	24
OBJETIVOS	29
2.1- Objetivo general.....	30
2.2- Objetivos específicos.....	31
2.2.1-Estudio de la implicancia de mecanismos transcripcionales y post transcripcionales en la regulación de la expresión de la proteína de polaridad DLG1 en distintos contextos biológicos.....	31
2.2.2- Rol de DLG1 en los procesos tumorales asociados a infecciones por HPV de alto riesgo oncogénico.....	31
2.2.3- Rol de DLG1 en los procesos tumorales asociados a infecciones por HTLV-1	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1-Cepas bacterianas y vectores de expresión.....	33
3.2-Células animales utilizadas.....	35
3.3-Condiciones y medios de cultivo.....	35

3.3.1-Medios de cultivo para células bacterianas.....	35
3.3.2-Medio de crecimiento, mantenimiento y soluciones utilizadas para el cultivo de las células animales.	35
3.4-Cultivo celular.	36
3.4.1-Cultivo bacteriano.....	36
3.4.2-Mantenimiento de las células animales.	36
3.5-Transformación de células de <i>E. coli</i>	37
3.6-Transfección de células animales.....	37
3.7-Diferenciación de la línea THP-1 a macrófagos.....	38
3.8-Técnicas concernientes a la manipulación de ácidos nucleicos (AN).....	39
3.8.1-Aislamiento y purificación de ADN plasmídico.	39
3.8.2-Extracción de ARN y transcripción reversa (RT).	39
3.8.3-Estimación de la concentración y calidad de AN.	39
3.8.4-Digestión de ADN con enzimas de restricción.	40
3.8.5-Electroforesis de AN en geles de agarosa.....	40
3.8.6-Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa.....	40
3.8.7-Ligado de moléculas de ADN.	40
3.8.8-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo final y PCR en tiempo real (qPCR).....	41
3.8.9-Secuenciación de ADN.....	44
3.9-Técnicas concernientes a la manipulación de proteínas.....	44
3.9.1-Preparación de los extractos proteicos.....	44
3.9.2-Cuantificación de extractos proteicos.	45
3.9.3-Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).	45
3.9.4-Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Western Blot, WB) e inmunodetecciones.....	45
3.9.5- Expresión de proteínas transgénicas en <i>E. coli</i> como producto de fusión con la proteína glutatión-S-transferasa (GST).....	46
3.9.6- Co-Inmunoprecipitación (IP).....	48
3.10-Inmunofluorescencia (IF).....	48
3.11-Silenciamiento de la expresión proteica por técnicas que utilizan siARN.	49
3.12- Fraccionamiento subcelular.....	49
3.13-Obtención de muestras y tratamiento para análisis del contenido de ADN por citometría de flujo.....	50

3.14-Detección de eventos de transferencia de energía resonante fluorescente (FRET, del inglés <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>) por fotoblanqueo del aceptor.	51
RESULTADOS.....	53
CAPÍTULO 1.....	54
Estudio de la implicancia de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales en la regulación de la expresión de la proteína de polaridad DLG1 en distintos contextos biológicos.	54
4.1.1-Análisis de la presencia de las isoformas Short y Large en distintos tipos celulares.....	55
4.1.2- Regulación de la expresión de DLG1 durante el aumento de la confluencia celular epitelial.	56
4.1.3- Regulación de la expresión de DLG1 durante la progresión del ciclo celular epitelial.	58
4.1.4-Regulación de la expresión de DLG1 durante la diferenciación celular.	62
CAPÍTULO 2.....	64
Rol de DLG1 en los procesos tumorales asociados a infecciones por HPV de alto riesgo oncogénico.	64
4.2.1-Análisis de la expresión subcelular de la proteína de polaridad DLG1 y la oncoproteína E6 de HPV-18 en células epiteliales.	66
4.2.2-Análisis de la expresión diferencial de DLG1 y E618 según la abundancia relativa de las mismas.	69
4.2.3-Estudio de la interacción entre DLG1 y E618 por microscopía FRET.	72
4.2.4-Influencia de la pérdida de DLG1 en la expresión de otras proteínas de polaridad.	75
CAPÍTULO 3.....	79
Rol de DLG1 en los procesos tumorales asociados a infecciones por HTLV-1	79
4.3.1-Análisis de la expresión subcelular de la oncoproteína viral Tax1.....	80
4.3.2-Análisis de la co-expresión de Tax1 y la proteína de polaridad DLG1.	82
4.3.3- Estudio de la interacción de Tax1 y DLG1 por técnicas de FRET.	89
4.3.4-Identificación de estructuras subcelulares donde tiene lugar la interacción Tax1- DLG1.....	91
DISCUSIÓN.....	100
CONCLUSIONES	118
LENGUAJE ESPECIAL	122
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	123
BIBLIOGRAFÍA.....	126

RESUMEN

El mantenimiento de la polaridad celular representa un mecanismo de supresión oncogénica. La interferencia en la expresión de los factores que la regulan es un hecho evidente en la progresión de diferentes tumores. Es por ello que dichos factores constituyen un tema de estudio de gran relevancia. La proteína DLG1 es considerada como un regulador importante de polaridad, siendo capaz de formar complejos multiproteicos en dominios intracelulares específicos. De esta forma, DLG1 contribuye a la formación de las uniones intercelulares adherentes y además regula negativamente la progresión del ciclo celular. La expresión de DLG1 se encuentra afectada en gran medida durante la evolución tumoral, observándose cambios en sus niveles y en su localización subcelular. Al momento, el conocimiento de los mecanismos que regulan sus niveles de expresión es muy pobre e incierto. Dicho conocimiento representaría el punto de partida para la búsqueda de estrategias que permitan revertir los cambios observados. Por ello, parte de este Trabajo de Tesis Doctoral se dedicó al estudio de los mecanismos implicados en la definición de los niveles de DLG1 en contextos biológicos que requieren de una correcta expresión de esta proteína. En este sentido, estudiamos la implicancia de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales, en especial un mecanismo de *splicing* alternativo descubierto en nuestro laboratorio que tiene lugar en la región 5' no traducible (5'UTR) del ARN mensajero y es capaz de modular la abundancia de DLG1. Así, aplicando técnicas de cuantificación de transcritos y de niveles proteicos, exploramos la participación de estos mecanismos bajo diversas circunstancias, como la adhesión celular y la progresión del ciclo celular epitelial, procesos donde DLG1 es particularmente importante. Además, analizamos la existencia del *splicing* en células provenientes de diversos tejidos pudiendo detectar a su vez la participación de este mecanismo en procesos de diferenciación celular. De este modo, logramos contribuir a la identificación de nuevos mecanismos de regulación para DLG1, los cuales podrían verse afectados en procesos tumorales.

Determinados virus oncogénicos pueden tomar ventaja de los reguladores de polaridad para facilitar su ciclo de replicación interfiriendo con la polarización y contribuyendo a la transformación celular. Este es el caso de los virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico (HPV de alto riesgo), asociados estrechamente al desarrollo de carcinomas cervicales y de otros tumores; y del virus linfotrópico de células

T del adulto tipo 1 (HTLV-1), considerado como el agente etiológico de la leucemia humana de células T (ATL). Estos virus, con ciclo replicativo diferentes, codifican para oncoproteínas denominadas E6 y Tax1 respectivamente, con actividades similares en cuanto a su capacidad para promover la proliferación celular. En las mismas resalta, sin embargo, la presencia de motivos C-terminales que les permiten interactuar con reguladores de polaridad, dentro de los cuales se encuentra DLG1, siendo todavía incierta su función como *partner* de dichas proteínas virales. Por lo tanto, llevamos a cabo una serie de experimentos para profundizar en la significancia biológica de dichas interacciones. En este punto sobresalió la aplicación de la técnica de microscopía de fluorescencia FRET, capaz de detectar interacciones directas entre proteínas. Pudimos observar que la unión a DLG1 por parte de E6 y Tax1 puede implicar consecuencias diferentes, indicando que estos virus oncogénicos pueden hacer un uso distinto de sus *partners* de polaridad para favorecer su replicación y estimular la transformación celular. En este sentido, detectamos una interacción entre E6 y DLG1 en los bordes celulares y región citoplasmática con posibles consecuencias en la proliferación celular. Además, descubrimos la existencia de una relación dependiente de la abundancia relativa de cada proteína, lo que resulta en diferentes niveles de expresión para cada una de ellas. Estas observaciones contribuyen a comprender el significado biológico de las variaciones detectadas en la expresión de DLG1 durante la evolución de las lesiones cervicales asociadas a infecciones por HPV. En tanto, en relación a la asociación entre Tax1 y DLG1, pudimos detectar su ocurrencia en estructuras semejantes a compartimientos subcelulares definidos. En este caso, luego del análisis de una variedad de organelas celulares, evidenciamos que la asociación Tax1-DLG1 tiene lugar principalmente en la región perinuclear, co-localizando con marcadores del aparato de Golgi y del centrosoma. En dicha región Tax1 podría reclutar a DLG1 como mecanismo que impediría su tráfico a los bordes celulares o bien estimular su participación en mecanismos de traducción de señales, teniendo así una significancia oncogénica. Al mismo tiempo, conociéndose la polarización del centrosoma inducida por Tax1 necesaria para la transmisión del genoma de HTLV-1 a una célula no infectada, es posible que DLG1 pueda cumplir alguna función en dicho proceso.

En resumen, teniendo en cuenta los datos alcanzados, este trabajo de Tesis Doctoral aporta al conocimiento integral de los mecanismos que regulan la expresión de DLG1 y además contribuye al entendimiento de la forma en que los HPV del alto riesgo y el HTLV-1 pueden utilizar o interferir con esta proteína de polaridad para promover

funciones relacionadas a la transformación celular. Este trabajo también robustece la idea de la existencia de mecanismos comunes de patogénesis viral donde la asociación con proteínas de polaridad puede relacionarse con el ciclo de replicación y el desarrollo de patologías.

INTRODUCCIÓN

1.1- Polaridad Celular.

Actualmente, una de las temáticas más estudiadas en el campo de la biología celular lleva el nombre de “polaridad celular”, término que se refiere principalmente a la distribución asimétrica de proteínas y lípidos dentro de una célula. Este concepto, a su vez, puede extrapolarse a estructuras de gran complejidad y a procesos sub-celulares, incluyendo, por ejemplo, al citoesqueleto, organelas, vías de transducción de señales y de tráfico vesicular. Así, la polaridad permite definir zonas de distinta composición y funcionalidad que, en algunos casos, puede reflejarse incluso en la morfología celular (Orlando & Guo, 2009; Rodriguez-boulan & Macara, 2014)

La polaridad celular fue descrita inicialmente como una propiedad característica de células epiteliales. Las mismas exhiben una polaridad de tipo ápico-basal, refiriéndose a la presencia de dos dominios diferentes dentro de la misma célula: *i*) el dominio apical en contacto con el lumen exterior o con las células de la capa epitelial más superficial, en caso de tratarse de un tejido estratificado; y *ii*) el dominio basolateral en contacto con las células adyacentes y con el tejido conectivo (Dow and Humbert, 2007). El límite que separa estos dominios viene dado por las uniones intercelulares de tipo *tight* (UT) y de tipo adherente (UA). Las UT forman un cinturón estrecho entre células vecinas que funciona como una barrera esencial para el epitelio, mientras que las UA permiten mantener la adhesividad entre células en contacto. Ambos tipos de uniones están compuestas por proteínas transmembrana que interaccionan con proteínas similares de las células adyacentes (Yap et al., 2015; Zihni et al., 2016). En la Figura 1.1 se representan las uniones intercelulares y sus componentes más destacados. La formación de las uniones intercelulares es esencial ya que permite definir la localización y sitio de acción de determinados factores celulares encargados de mantener la identidad de los dominios apical y basolateral.

Posteriormente, el término polaridad celular fue extendido a células muy alejadas de la estirpe epitelial. En este contexto se encuentran, por ejemplo, las células del sistema inmune. Las mismas poseen un importante repertorio de moléculas transmembrana que actúan como sensores de señales que estimulan distintas actividades, como la migración o la activación por estimulación antigénica. Durante estos procesos es notable la redistribución asimétrica de diversas proteínas y lípidos (Krummel and Macara, 2006; Pham et al., 2014).

De esta manera, en la actualidad se considera a la polaridad celular como una propiedad presente en la mayoría de tipos celulares. Debido a su importancia para la

homeostasis celular, uno de los principales desafíos que se ha planteado consiste en la identificación de los mecanismos comunes de polarización, así como también de los factores celulares que intervienen.

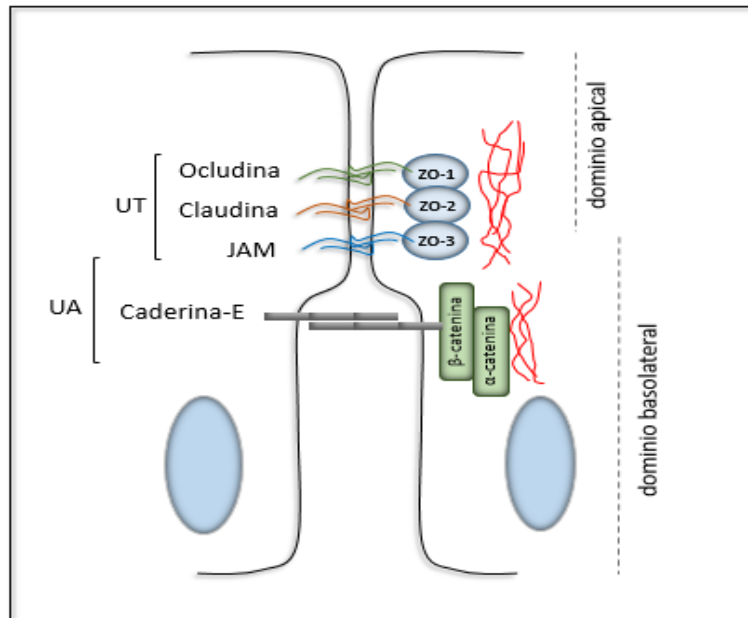


Figura 1.1: Representación esquemática de las uniones intercelulares en células epiteliales. Las UT se encuentran en la zona apical y sus componentes son proteínas transmembrana pertenecientes a la familia de las Ocludinas, Claudinas y JAM (del inglés *Junctional adhesión molecule*). Sus dominios citoplasmáticos interaccionan con proteínas de la familia ZO (del inglés *Zonula occludens*) las cuales a su vez interaccionan con componentes del citoesqueleto. Las UA se localizan por debajo de las UT siendo sus componentes transmembrana proteínas de tipo Caderina. Las mismas se asocian a proteínas periféricas de tipo Catenina que por otro lado interaccionan con el citoesqueleto cortical. Figura adaptada de Coradini y col (Coradini et al., 2011).

1.1.2- Complejos de polaridad.

Existen tres complejos proteicos muy importantes en el mantenimiento de la polaridad, descubiertos en células epiteliales: el complejo “PAR” (del inglés *Partitioning defective*) formado por las proteínas PAR3, PAR6 y aPKC (del inglés *Atypical protein kinase C*); “CRUMBS” formado por CRUMBS, PALS1 (del inglés *mLin-2 and protein associated with Lin-7 1*) y PATJ (del inglés *PALS1-associated tight junction protein*) (ambos complejos ubicados en las UT); y el complejo “SCRIB” formado por hSCRIB, LGL (del inglés *Lethal giant larvae*) y DLG1 (del inglés *Disc Large 1*), ubicado en las UA (Assemat et al., 2008). La correcta disposición de estos complejos contribuye a definir la identidad de los dominios apical y basolateral. De manera interesante, dicha disposición se encuentra establecida principalmente por eventos sinérgicos y antagonistas entre los mismos. En

este contexto, se ha descrito que CRUMBS y PAR cooperan entre sí para establecer la identidad del dominio apical y ensamblar las UT (Coradini et al., 2011). Por otro lado, SCRIB define el dominio basolateral y contribuye a estabilizar las UA. Este último adquiere su localización mediante la fosforilación de uno de sus miembros, LGL, mediada por aPKC perteneciente al complejo PAR, y por otros procesos de exclusión proteica estimulados en forma conjunta por los complejos PAR y CRUMBS (Coradini et al., 2011). Así, los tres complejos de polaridad se interconectan de distintas maneras, lo que puede afectar las funciones de un componente sobre otro (Figura 1.2.A) (Pieczynski and Margolis, 2011).

La detección de estos tres complejos en otros tipos celulares, como linfocitos y neuronas, constituyó un gran avance hacia la identificación de mecanismos generales de polaridad. Más aun, el hecho de que también exista sinergia entre CRUMBS y PAR así como exclusión para con SCRIB, contribuyó a clasificar a estos complejos como reguladores universales de polaridad celular (Figura 1.2.B) (Krummel and Macara, 2006; Ludford-Menting et al., 2005).

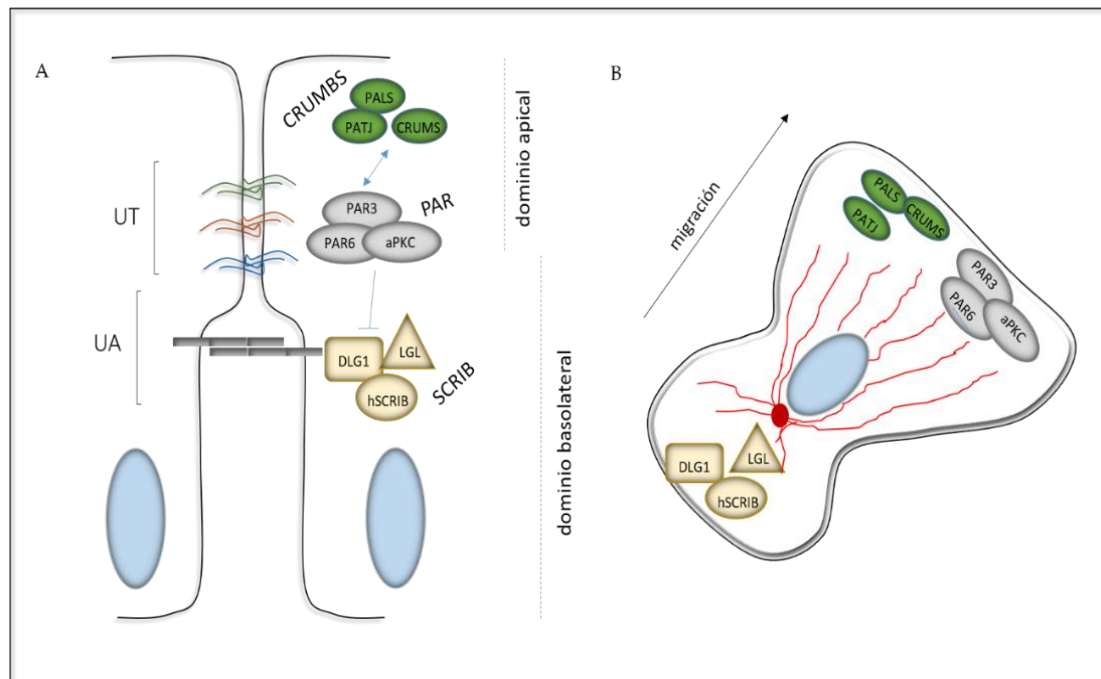


Figura 1.2: Complejos proteicos reguladores de polaridad en distintos tipos celulares. **A)** Células epiteliales. Los complejos PAR y CRUMBS están localizados en la zona apical, regulando las UT. El complejo SCRIB se ubica en el dominio basolateral de las células, estabilizando a las UA a través de su asociación con la proteína Caderina-E. **B)** Linfocitos T. Se muestra la disposición de los complejos de polaridad durante la migración linfocitaria. Los complejos CRUMBS y PAR se ubican en el frente de avance mientras que el complejo SCRIB se localiza en el polo opuesto. (Krummel and Macara, 2006; Pieczynski and Margolis, 2011).

1.1.3-Mecanismo de acción de las proteínas de los complejos de polaridad.

Una temática interesante consiste en entender cómo funcionan las proteínas de los complejos de polaridad, considerando que la mayoría no posee actividad enzimática. Estas proteínas, en cambio, disponen de una variedad de dominios proteicos en una configuración modular que les permiten interactuar con una gran cantidad de ligandos celulares. Los dominios más abundantes en las proteínas de polaridad se denominan PDZ, nombre derivado de las tres primeras proteínas donde se los identificó: PSD-95 (del inglés *Postsynaptic density protein 95*), DLG1, ZO-1 (del inglés *Zonula Occludens-1*). Estos son dominios estructuralmente conservados de 80-90 aminoácidos que funcionan como módulos específicos de reconocimiento proteína-proteína que permiten el reclutamiento de péptidos y la formación de complejos multiproteicos (Fanning and Anderson, 1999; Lee and Zheng, 2010; Subbaiah et al., 2011). Los mismos reconocen secuencias cortas carboxilo terminales X-S/T-X-V/L, denominadas motivos de unión a PDZ (PBM, del inglés *PDZ binding motif*), presentes en sus ligandos proteicos (Lee and Zheng, 2010). Además, los dominios PDZ pueden interactuar con lípidos de tipo fosfatidilinosítidos (PIP) de membrana, lo que favorece el reclutamiento de proteínas de polaridad en zonas de la membrana plasmática enriquecidas en estos tipos de lípidos (Wawrzyniak et al., 2013). Por lo tanto, a través de dichos dominios, las proteínas de polaridad se encargan de ensamblar complejos intracelulares y definir su correcta localización dentro de la célula.

1.1.4-Proteínas de polaridad DLG1 y PAR3.

Dentro de las proteínas de polaridad más estudiadas se puede destacar a DLG1, perteneciente al complejo SCRIB, y a PAR3, miembro del complejo PAR.

DLG1 pertenece a la familia de proteínas MAGUK (del inglés *membrane associated guanylate kinase*), los cuales poseen dominios de reconocimiento e interacción proteica característicos, entre los que sobresalen tres dominios PDZ, un dominio de interacción SH3 (del inglés *Src homology 3*) y una región carboxilo-terminal enzimáticamente inerte homóloga a la enzima guanilato quinasa de levaduras (GUK) (Oliva et al., 2012). Esta organización modular permite su función como proteína de andamiaje, orquestando el ensamblado de complejos multiproteicos con funciones en los mecanismos de señalización celular, o bien estructurales (Figura 1.3, panel superior).

Las funciones de DLG1 fueron estudiadas mayoritariamente en células epiteliales. Aquí, DLG1 co-localiza con Caderina-E en las UA en asociación con el citoesqueleto,

desarrollando actividades estructurales y de transmisión de señales importantes para el control de la proliferación (Laprise et al., 2004; Reuver and Garner, 1998). Dicha distribución y sus niveles proteicos se encuentran normalmente regulados por un complejo patrón de eventos, que incluyen su fosforilación y ubiquitinación. Específicamente, se ha demostrado que DLG1 es hiperfosforilada como resultado de un mayor nivel de contacto celular, siendo reclutada hacia dichos contactos, donde además sería estabilizada (Mantovani et al., 2001). Asimismo, durante procesos de estrés osmótico y en relación al ciclo celular, la inducción específica de distintas quinasas celulares modifican el patrón de fosforilación de DLG1, con importantes consecuencias en su localización y, por ende, en su función (Inesta-Vaquera et al., 2010; Massimi et al., 2006; Narayan et al., 2009; Sabio et al., 2005). Es importante destacar que DLG1 interacciona mediante sus dominios PDZ con los oncosupresores PTEN (del inglés *phosphatase and tensin homologue*) y APC (del inglés *Adenomatous Polyposis Coli*) (Ishidate et al., 2000; Sotelo et al., 2012; Valiente et al., 2005). En este sentido, se ha demostrado que el complejo DLG1-APC es importante en el mecanismo de transmisión de señales para la inhibición del ciclo celular, lo que ocurre durante la formación de las uniones celulares. En concordancia con esto, la sobre-expresión de DLG1 provoca un bloqueo de la progresión del ciclo celular de G₀/G₁ a S indicando su participación en la regulación negativa de la proliferación (Ishidate et al., 2000).

Reportes más recientes empleando distintos tipos celulares señalan además la participación de DLG1 en vías de tráfico endocíticas y exocíticas (Walch, 2013). Se ha sugerido que proteínas a ser transportadas por dichas vías pueden reclutar a DLG1 en vesículas nacientes o pre-existentes a nivel del post-Golgi y de endosomas (Chetkovich et al., 2002; Jeyifous et al., 2009; Komada and Kitamura, 2005; Lee et al., 2003). Así, DLG1 jugaría distintos roles durante el tráfico vesicular. En primer lugar, se la ha visto involucrada en el transporte de vesículas a lo largo de los microtúbulos del citoesqueleto (Asaba et al., 2003). Además, se ha sugerido la participación de DLG1 durante la fusión de las vesículas con la membrana plasmática o con otras vesículas precedentes (Massimi et al., 2008).

Por otro lado, la proteína PAR3 perteneciente al complejo de polaridad PAR, es una proteína de andamiaje asociada a membrana plasmática que presenta también múltiples dominios. Principalmente PAR3 posee: i) tres dominios PDZ; ii) un dominio de interacción con aPKC (aPKCBD) (Tabuse et al., 1998); iii) un sitio a través del cual

interacciona con distintas proteínas, denominado 4N1/2/3; y *iv*) un dominio CR1 por el cual es capaz de formar homodímeros (Chen and Chen, 2013) (Figura 1.3 panel inferior).

PAR3 en mamíferos presenta 3 isoformas mayoritarias provenientes de eventos de *splicing* alternativo que sufre el transcripto correspondiente, las cuales difieren en su peso molecular (180, 150, y 100 kDa) pero comparten el dominio de oligomerización (CR1) y los dominios PDZ (Figura 1.3, panel inferior) (Gao et al., 2002; Macara, 2004). La expresión de las distintas isoformas es diferente en los diversos tejidos, lo que genera múltiples patrones de interacción y, en consecuencia, diversas actividades (Gao et al., 2002). La interacción de PAR3 con distintas proteínas y/o lípidos contribuyen en su localización asociada a membrana plasmática, donde desarrolla funciones importantes para la formación de las UT. En dicho sitio, PAR3 facilita la correcta localización de otras proteínas que regulan la polaridad, por ejemplo PTEN, siendo ésta una fosfatasa que mantiene el gradiente de lípidos de tipo PIP de membrana necesario para mantener la identidad de los dominios apical y basolateral, y para regular la proliferación celular (Wu et al., 2000).

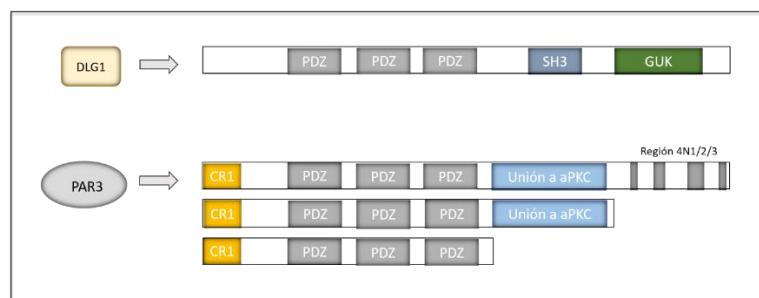


Figura 1.3: Esquema estructural de DLG1 y PAR3. En colores se muestran los distintos tipos de dominios de interacción proteica. En el caso de PAR3, se muestran las tres isoformas proteicas más abundantes producto de eventos de *splicing* alternativo en la región codificante de su ARN mensajero (Roberts et al., 2012; Sfakianos et al., 2007).

En otros tipos celulares, las funciones de DLG1 y PAR3 se encuentran menos estudiadas. Para células del sistema inmune, se han comenzado a conocer las funciones de las mismas en linfocitos T. Aquí, DLG1 participaría en el ensamblaje de complejos multiproteicos asociados al receptor de células T (TCR) necesarios para la transmisión de señales generadas a partir de células presentadoras de antígenos durante la sinapsis inmunológica (Xavier et al., 2004). Luego, DLG1 participaría en la regulación negativa de la proliferación estimulada por dichas vías de señalización. Por estas razones se ha propuesto que en este tipo celular DLG1 tendría funciones oncosupresoras, al igual que

en modelos epiteliales. En cuanto a PAR3, esta proteína localiza en la membrana plasmática durante la polarización inducida por la activación de citoquinas. Además, se ha reportado su importancia en la migración linfoide, contribuyendo a la polarización del citoesqueleto en respuesta a la estimulación por quimioquinas (Gerard et al., 2007).

1.1.5-Alteración de la expresión de proteínas de polaridad celular durante el desarrollo oncogénico.

Dada la variedad de *partners* celulares y de procesos regulados por las proteínas de polaridad, no resulta difícil imaginar las consecuencias que genera una alteración en la expresión de las mismas. En este sentido, la pérdida de polaridad celular es una característica distintiva de los procesos carcinogénicos. Así, se ha demostrado que DLG1 presenta cambios en su distribución en diversos tumores (Facciuto et al., 2012). Según se señaló en distintos estudios utilizando muestras derivadas de biopsias humanas, en los estadios intermedios de las progresiones carcinogénicas, DLG1 se pierde gradualmente de las zonas de contacto célula-célula, mientras que se observa un aumento en sus niveles de expresión junto a una mayor distribución hacia el citoplasma (Facciuto et al., 2012). Sin embargo, dicha proteína está ausente o muy disminuida en su expresión en los focos invasivos, por lo que su ausencia se ha asociado a eventos tardíos del desarrollo tumoral. Este patrón de expresión característico se observó en estudios independientes de nuestro laboratorio y de otros autores utilizando muestras derivadas de carcinoma cervical, cáncer de mama y carcinoma de colon (Cavatorta et al., 2004; Fuja et al., 2004; Gardiol et al., 2006; Watson et al., 2002)

Por otro lado, existen cada vez más evidencias indicando que otras proteínas de polaridad se expresan diferencialmente en ciertas patologías (Aranda et al., 2008; Facciuto et al., 2012). En este sentido, se encontró que la región genómica que contiene al gen codificante para PAR3 se encuentra truncada en algunas líneas celulares derivadas de carcinomas de cabeza y cuello, pulmón y esófago (Rothenberg et al., 2010; Zen et al., 2009). Notablemente, el análisis de la expresión de PAR3 en biopsias de cáncer de mama evidenció una disminución de PAR3 en los bordes celulares o bien deslocalización de dicha proteína (Xue et al., 2013).

En conjunto, lo comentado anteriormente señala la implicancia de las proteínas de polaridad en los procesos oncogénicos y resalta la necesidad de un control estricto que

asegure la correcta expresión de estas proteínas en términos de localización, y más aún, de niveles de expresión. A pesar de esto, al momento es escaso e incierto el conocimiento de los mecanismos que definen sus niveles de expresión. Un entendimiento claro de estos aspectos sería de gran valor a la hora de establecer patrones predictivos de malignidad en diversos tumores. En especial, muy poco se conoce acerca de los mecanismos de regulación transcripcional y post-transcripcional de las proteínas de polaridad, y de sus roles durante los distintos procesos celulares que involucran una correcta expresión de estas proteínas. Probablemente alteraciones en estos mecanismos podrían contribuir a los cambios observados en sus niveles de expresión durante los procesos tumorales.

1.2-Mecanismos de regulación de la proteína de polaridad DLG1.

1.2.1-Características de la transcripción y de eventos post-transcripcionales de DLG1.

Según lo comentado en la sección anterior y considerando las variaciones en los niveles de DLG1 observadas en estudios con muestras tumorales, en nuestro laboratorio surgió la inquietud de estudiar la regulación de esta proteína de polaridad (Cavatorta et al., 2004; Gardiol et al., 2006).

En primer lugar, se estudiaron los mecanismos que regulan la transcripción enfocándose sobre la región promotora de su gen codificante. Para ello, se clonó y caracterizó funcionalmente dicha región determinando las secuencias con actividad transcripcional (Cavatorta et al., 2008). Mediante un análisis informático se pudo identificar la presencia de una variedad de sitios probables de unión para factores transcripcionales, dentro de los cuales resaltaron los factores de la familia Snail. Estos factores reprimen de una manera programada la transcripción de marcadores de polaridad durante el desarrollo embrionario. A partir de esto fue posible demostrar que los factores Snail reprimen efectivamente la transcripción de DLG1 *in vitro* y también *in vivo*, lo cual resultó muy relevante ya que se había reportado que la expresión de dichos factores se encuentra muy aumentada en procesos tumorales (Cavatorta et al., 2008; Facciuto et al., 2012; Peinado et al., 2007).

Posteriormente se investigaron los sitios de iniciación de la transcripción de *dlg1* utilizando la técnica de Amplificación Rápida de los Extremos del ADNc (RACE). De este modo, se identificaron varios sitios de iniciación alternativos ubicados en una región de unos 100 pb inmediatamente *upstream* del sitio de inicio reportado previamente por Lue y colaboradores (Figura 1.4.A) (Cavatorta et al., 2011; Lue et al., 1994). Sin embargo,

un dato interesante arrojado por estos experimentos fue el hallazgo de que la región 5' no traducible (5'UTR) del ARNm para DLG1 puede sufrir un evento de *splicing* alternativo (Cavatorta et al., 2011). Si bien eventos de este tipo fueron reportados para la región codificante de DLG1, su ocurrencia en la 5'UTR no había sido reportada hasta el momento. De esta manera, en relación a la 5'UTR, el *pool* de transcritos para DLG1 estaría formado por dos isoformas distintas llamadas *Short* y *Large*, que difieren en una secuencia o exón no codificante de 116 bases (Exón B) presente en la forma *Large* y ausente en la forma *Short* debido al evento de *splicing* (Figura 1.4.A). Dicho exón, como se muestra en la Figura 1.4.B, se encuentra flanqueado por los dinucleótidos GT y AG, consensos para sitios de *splicing* dadores y aceptores, respectivamente. Dentro de esta región existe un marco abierto de lectura pequeño (uORF, del inglés *upstream open reading frame*), elemento que, interesantemente, se encuentra generalmente en genes que deben ser regulados de manera precisa, como proto-oncogenes y genes supresores de tumores (Figura 1.4.B) (Cavatorta et al., 2011). Análisis bioinformáticos posteriores arrojaron que el Exón B además contribuye firmemente a la formación de estructuras secundarias estables en el ARN (Figura 1.4.C).

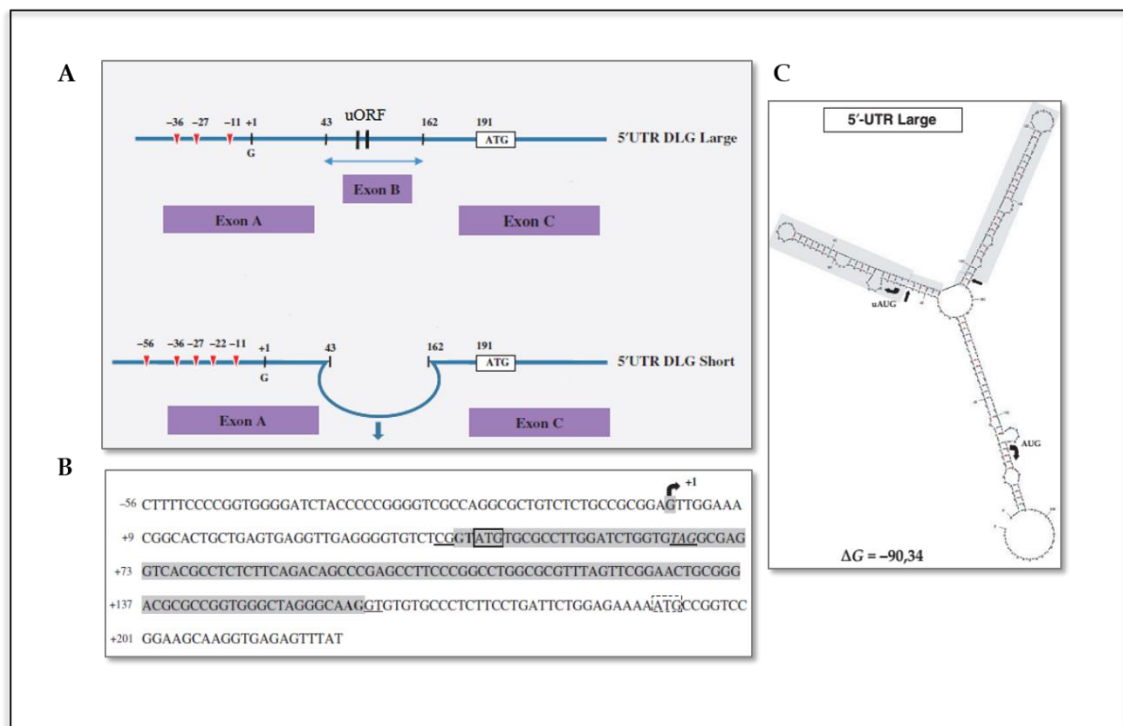


Figura 1.4: Regiones 5'UTR del ARNm para DLG1. **A)** Representación esquemática de la 5' UTR de DLG1 que sufre un *splicing* alternativo para dar lugar a la isoforma transcripcional *Short*. El exón no codificante, alternativamente eliminado ha sido nombrado Exón B y dentro de él se ha representado el elemento uORF. Los sitios alternativos de inicio de la transcripción se denotan

como triángulos rojos invertidos, además se detalla el sitio de inicio de la transcripción (G+1) reportado inicialmente por Lue y colaboradores (Lue et al., 1994). **B)** Secuencia nucleotídica de la región 5'UTR de DLG1. La secuencia coloreada en gris constituye el Exón B, donde se resaltan el sitio de inicio (ATG) y de terminación (TAG) de la traducción del uORF. Delimitando al Exón B se encuentran los sitios de *splicing* GT y AG resaltados en negrita. **C)** Estructura secundaria de la 5'UTR *Large*. En gris se denota la región del Exón B. Figura adaptada de Cavatorta y col (Cavatorta et al., 2011).

1.2.2- Regiones 5'UTR y su asociación con la carcinogénesis.

Distintos estudios analizando el transcriptoma de mamíferos han revelado que una gran parte de los genes permiten la expresión alternativa de diferentes 5'UTR, y dicha variabilidad puede generarse de diversas maneras (Carninci et al., 2005; Smith, 2008; Trinklein et al., 2003; Zhang, 2003). En primer lugar, pueden existir distintos promotores definiendo cada uno el inicio de la transcripción en diferentes exones (Figura 1.5.A). En segundo lugar, un mismo promotor puede inducir el inicio de la transcripción en sitios diferentes dentro del mismo exón lo que da lugar a regiones 5'UTR más cortas o más largas (Figura 1.5.B). Por último, puede ocurrir la transcripción a partir de un único promotor, seguido de eventos de *splicing* alternativo entre exones no codificantes presentes en estas regiones (Figura 1.5.C) (Smith, 2008). Así, al no restringirse solamente a regiones codificantes, los eventos de *splicing* alternativo pueden generar isoformas con 5'UTR diferentes y propiedades regulatorias distintas.

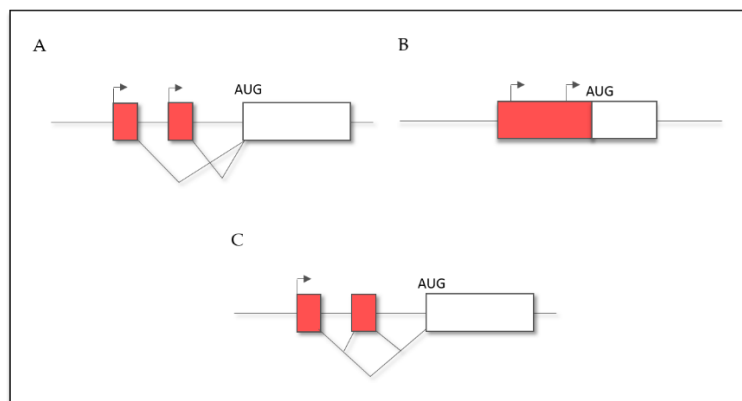


Figura 1.5: Mecanismos para generar transcritos que difieren en su región 5'UTR. **A)** Uso de promotores múltiples. **B)** Inicio de la transcripción en diferentes sitios controlado por un único promotor. **C)** Eventos de *splicing* alternativo entre exones no codificantes de la región 5'UTR. Figura adaptada de Smith L y col (Smith, 2008).

Las 5'UTR cumplen una función determinante en la regulación post-transcripcional y traduccional de los genes eucariotas (Hughes, 2006; Jansen, 2001). Estas

regiones llevan a cabo sus funciones gracias a una serie de elementos presentes en ellas, pudiéndose encontrar secuencias de unión para proteínas encargadas de transportar el ARNm, de ensamblar complejos proteicos necesarios para eventos de *splicing* y de regular la eficiencia de traducción. Otras secuencias en las 5'UTR adoptan estructuras secundarias muy estables que interfieren con la unión a la maquinaria de traducción, disminuyendo marcadamente la eficiencia de traducción. Además, se encuentran sitios de unión para ARN regulatorios, tales como ARN de interferencia (siARN), que por apareamiento de bases influyen en la estabilidad del transcripto. Por último, existen elementos llamados uORF que consisten en secuencias cortas de ribonucleótidos que codifican para péptidos pequeños. Si bien las funciones de los uORFs no se encuentran aún del todo caracterizadas, se ha comprobado que poseen un impacto negativo sobre la eficiencia de traducción del transcripto (Figura 1.6) (Ruiz-Echevarria and Peltz, 2000). De esta manera, los elementos regulatorios presentes en estas regiones actúan en forma conjunta para definir la tasa de traducción, estabilidad y localización de un ARNm.

Resaltando la importancia de la correcta expresión de las diversas 5'UTR de un transcripto, ha sido establecido que una inapropiada expresión alternativa de estas regiones, debido a errores en los mecanismos que generan la variabilidad, conducen a la expresión alterada en diversas proteínas. Esto fue reportado para proteínas con funciones oncosupresoras, contribuyendo así al desarrollo de distintas patologías incluyendo procesos tumorales (Romeo et al., 1993; Smith et al., 2010; Sobczak and Krzyzosiak, 2002).

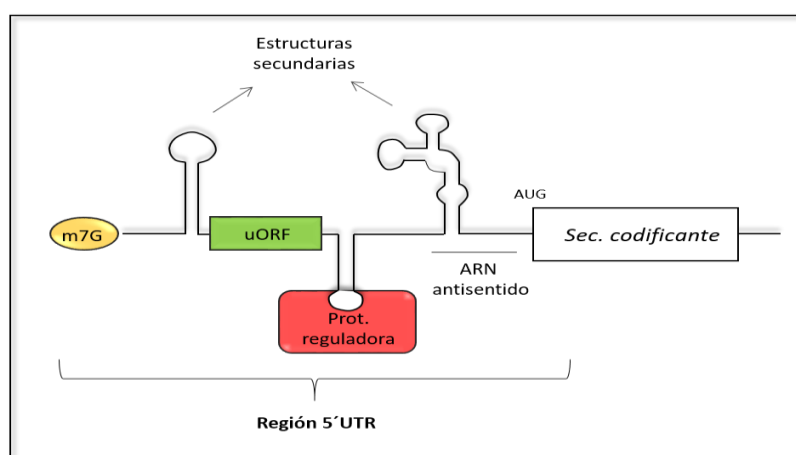


Figura 1.6: Elementos presentes en las regiones 5'UTR involucrados en la regulación de la traducción de los ARNm. Se distinguen los sitios de unión para proteínas reguladoras, uORF, estructuras secundarias y sitios de unión para ARN antisentido. Además, se incluye la representación de la región codificante y la 7-metil guanosina de la caperuza 5' característica de los ARNm de mamíferos. Figura adaptada de Mignone y col (Mignone et al., 2002).

1.2.3-Influencia de las formas alternativas de la 5'UTR del ARNm de DLG1 en la eficiencia de la traducción.

Considerando la importancia de las 5'UTR en la regulación génica, en el laboratorio se llevaron a cabo experimentos para evaluar el impacto del *splicing* alternativo de la 5'UTR de DLG1 en el proceso de traducción. Así, se pudo demostrar que las 5'UTR *Short* y *Large* influyen diferencialmente sobre la eficiencia de traducción utilizando como modelo el gen reportero Luciferasa, clonado corriente abajo de las mismas. La eficiencia de traducción resultó ser mayor para la 5'UTR *Short* en comparación con la 5'UTR *Large* (Figura 1.7). Mediante el uso de mutantes derivadas, se observó que dicha diferencia se debía en parte a la presencia del uORF dentro del Exón B de la 5'UTR *Large*, que no se encuentran en la forma corta (Figura 1.7) (Cavatorta et al., 2011). Esto concordó con trabajos de otros autores que sostenían que los ARNm que presentan regiones 5'UTR largas y estructuradas, conteniendo uORF, son traducidos menos eficientemente (Smith, 2008).

De dichas observaciones se desprendió que un cambio en la proporción de las isoformas *Short* y *Large* en distintas condiciones, proporcionaría un potencial mecanismo de control de la expresión de DLG1 con cambios rápidos en sus niveles proteicos. Por esta razón, la incumbencia de este evento de *splicing* alternativo en distintos contextos biológicos como mecanismo para regular niveles proteicos de DLG1 constituye un interesante tema de estudio.

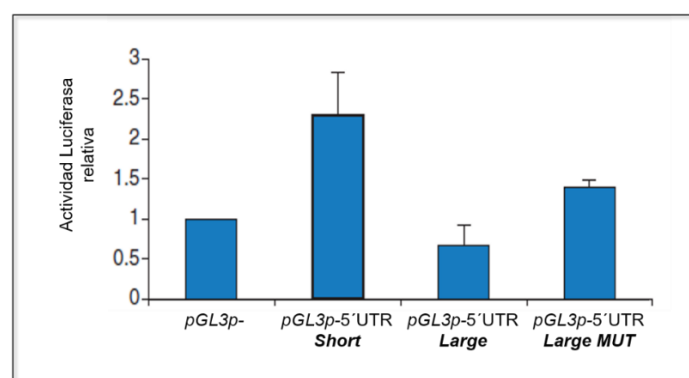


Figura 1.7: Efecto de las distintas 5'UTR del ARNm para DLG1 en la eficiencia de traducción del gen reportero Luciferasa. Las regiones 5'UTR *Short*, *Large* y *Large MUT* (mutación que implica la abolición del uORF) fueron clonadas corriente arriba del gen reportero luciferasa en el vector pGL3p. Los vectores resultantes fueron transfectados en células epiteliales y se ensayó la actividad reportera luciferasa relativa al vector vacío pGL3p. La actividad luciferasa es un índice de la eficiencia de traducción para cada caso. Figura adaptada de Cavatorta y col (Cavatorta et al., 2011).

1.3- Interferencia de virus humanos sobre la expresión de proteínas de polaridad celular.

Un hecho que hace más interesante el estudio de las proteínas de polaridad, consiste en que su expresión o actividades pueden ser alteradas por agentes infecciosos, entre ellos diversos virus patogénicos humanos. En este sentido, se ha encontrado que virus pertenecientes a familias diferentes y con ciclos de replicación totalmente distintos siguen esta misma estrategia. Para ello, codifican en sus genomas proteínas virales con motivos PBM (sección 1.1.3) que les confieren la capacidad de interactuar con dominios PDZ presentes en las proteínas de polaridad, interfiriendo con sus funciones. Interesantemente, la presencia de un PBM es considerada como un marcador de patogenicidad viral, detectándose en los tipos virales que producen las patologías más severas (Bouvard et al., 2009; James and Roberts, 2016; Javier, 2008). En la Tabla 1.1 se muestran distintas proteínas virales pertenecientes a diferentes virus y sus correspondientes blancos PDZ de polaridad. Como se puede apreciar, entre las mismas existen determinados blancos comunes, lo que sugiere que los procesos regulados por estos blancos serían de alta importancia para la replicación de los distintos virus (Javier, 2008). Si bien estas interacciones pueden tener consecuencias funcionales diferentes de acuerdo al virus en cuestión, es posible hipotetizar patrones comunes como pérdida de la polaridad, disrupción de las uniones intercelulares, e inhibición de la apoptosis. Así, la alteración de estos procesos celulares podría favorecer la replicación y diseminación viral con consecuencias en el desarrollo de patologías.

Sin embargo, la presencia de un PBM parece ser especialmente relevante para algunos virus relacionados a la formación de tumores, también conocidos como virus oncogénicos. En este sentido, la interferencia de proteínas de polaridad por parte de sus oncoproteínas con PBM fue postulada como un mecanismo que contribuye significativamente a la transformación celular siempre en conjunto con otras actividades importantes de las mismas, como la desregulación del ciclo celular, estimulación de la proliferación e inhibición de la apoptosis. En este contexto, se ha propuesto que estas oncoproteínas actuarían anulando las funciones de las proteínas de polaridad. Sin embargo, es posible que estas proteínas sean utilizadas por el virus para formar complejos proteicos que promuevan activamente mecanismos de traducción de señales importantes para la proliferación celular y desarrollo de patologías (Kong et al., 2014; Krishna Subbaiah et al., 2012). Por otro lado, es incierto si al mismo tiempo las proteínas

de polaridad podrían modular funciones de las oncoproteínas virales cumpliendo un rol importante durante el ciclo de replicación viral. Teniendo en cuenta esto, es importante analizar en profundidad estas interacciones proteicas y sus consecuencias biológicas.

En las siguientes secciones se introducirán a dos virus oncogénicos: el Virus del Papiloma humano (HPV) de alto riesgo oncogénico, y el Virus Linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), y en cada caso se comentará el conocimiento actual de la relación entre sus oncoproteínas centrales y proteínas de polaridad de sus células blanco.

Prot. viral con motivo PBM	Virus	Blancos con dominios PDZ
E6	HPV de alto riesgo	DLG1, SCRIB, PAR3, MAGI-1, MAGI-2, MAGI-3, PATJ, PTPN3, etc
Tax1	HTLV-1	DLG1, SCRIB, MAGI-1, MAGI-3, Pro-IL6
Env	HTLV-1	DLG1
E4 ORF1	Adenovirus-9	DLG1, MAGI-1, MUPP1, PATJ, ZO-2
Core	HBV	GIPC1, PTPN3
NS5	West Nile virus	SCRIB, MAGI-3, PAR3, ZO-1
NS1	Influenza A	SCRIB, DLG1

Tabla 1.1: Principales blancos PDZ de distintos virus patogénicos humanos. HBV, Hepatitis B virus; MAGI, *membrane associated guanylate kinase WW and PDZ containing protein*; PTPN3, *protein tyrosine phosphatase non receptor type 3*; IL6, *interleukine 6*; MUPP1, *multi-PDZ domain protein 1*; GIPC1, *GIPC PDZ domain containing protein 1*. Tabla adaptada de James y col (James and Roberts, 2016).

1.3.1-HPV de alto riesgo y cáncer cervical.

Los HPV son un grupo de virus con genoma ADN doble hebra circular que infectan epitelios cutáneos (HPV cutaneotrópicos) y de mucosas (HPV mucosotrópicos) de una gran variedad de sitios anatómicos (Syrjänen, 1999a). Los HPV mucosotrópicos que infectan mucosas genitales son los más estudiados y caracterizados, constituyendo cerca de 40 tipos distintos clasificados en dos grupos según las manifestaciones clínicas que provocan sus infecciones: los de alto y los de bajo riesgo oncogénico (Munoz et al., 2003). Los de alto riesgo, tales como HPV-16 y -18, entre otros, se consideran importantes agentes carcinogénicos, dado que son causantes de lesiones que pueden progresar a carcinoma. En cambio, los de bajo riesgo, como HPV-6 y -11, inducen principalmente la formación de verrugas genitales benignas y están raramente asociados con malignidad (Munoz et al., 2003).

La infección por HPV se inicia a través de microlesiones del epitelio que exponen a sus células basales y permiten el ingreso del virus a las mismas. La infección persistente en el tiempo, con uno o más tipos de HPV de alto riesgo, está ligada al desarrollo del cáncer cervical. Ésta es una de las neoplasias más comunes que afecta a la mujer, siendo el cuarto cáncer más frecuente a nivel mundial luego del de mama, y ocupando el primer lugar en Latinoamérica (Ferlay et al., 2015). De acuerdo al Ministerio de Salud de nuestro país, cada año se diagnostican 5000 nuevos casos de carcinoma cervical y mueren aproximadamente 2700 mujeres a causa de esta enfermedad (<http://www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer>).

El proceso hacia el desarrollo final de esta patología es gradual y su primera manifestación consiste en la aparición de Lesiones Escamosas Intraepiteliales (SIL, del inglés *Squamous Intraepithelial Lesion*) en la mucosa del cuello uterino (Syrjänen, 1999b). La severidad de estas lesiones se clasifica en grados, de acuerdo a la extensión del epitelio normal diferenciado que es reemplazado por células no diferenciadas, de tipo basal. Dicha clasificación distingue entre lesiones de bajo grado (LSIL, del inglés *low-grade SIL*) y de alto grado (HSIL, del inglés *high-grade SIL*) (Figura 1.8) (Doorbar et al., 2012; Shah P.M., 1996; Syrjänen, 1999b). En LSIL ocurre el ciclo viral productivo, permitiendo la liberación de viriones de HPV. Las HSIL surgen como resultado de infecciones abortivas, en las cuales se desregula la expresión génica viral y el virus no puede completar su ciclo de vida. Por lo tanto, a nivel de displasias moderadas a severas ya no existe producción de viriones. Durante la etapa final estas lesiones pueden evolucionar a carcinoma cervical de tipo invasivo, donde las células anormales traspasan la membrana basal e invaden el tejido circundante, pudiendo eventualmente provocar metástasis (Figura 1.8) (zur Hausen, 1996). Muchas infecciones, sin embargo, cursan en sentido contrario gracias a la respuesta inmune del hospedador, lo que conduce a la eliminación espontánea de la infección, pudiendo ocurrir incluso la regresión de las lesiones (Schiffman and Kjaer, 2003).

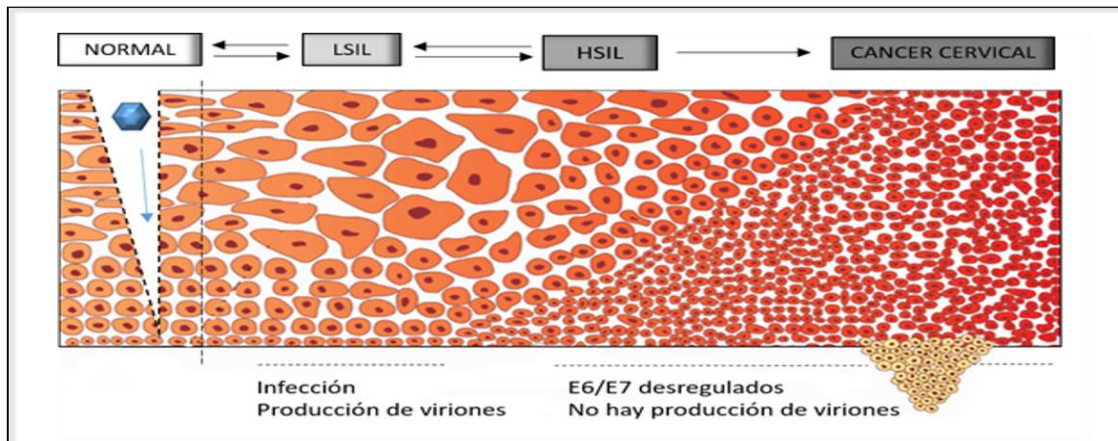


Figura 1.8: Lesiones cervicales asociadas a infecciones por HPV de alto riesgo. Se representa la infección por HPV iniciada a partir de microlesiones del epitelio estratificado del cérvix exponiendo a las células basales al contacto con el virión. Luego se representan esquemáticamente las lesiones precursoras LSIL y HSIL, y finalmente el estadio de carcinoma cervical invasor donde las células anormales traspasan la membrana basal invadiendo el tejido circundante. Figura adaptada de Lowy y col (Lowy and Schiller, 2006).

1.3.1.1-Oncogénesis asociada a HPV de alto riesgo.

El ciclo de vida de HPV se encuentra estrechamente relacionado al programa de diferenciación de las células epiteliales (Doorbar et al., 2012). A medida que las células se diferencian en el epitelio estratificado normal y migran desde la capa basal para convertirse en células suprabasales, se produce una inhibición de la proliferación, arresto en el estadio G₁ del ciclo celular y diferenciación terminal. Sin embargo, este proceso se encuentra alterado en las infecciones asociadas a HPV, induciéndose el pasaje a fase S fuera de programa. Este evento es imprescindible para el ciclo viral, ya que el virus necesita de la maquinaria de replicación del ADN celular para su propia replicación genómica, y esto se produce gracias a la actividad de dos oncoproteínas virales llamadas E6 y E7 (Freije et al., 2012; Kubben et al., 1994; Sherr and Roberts, 1999).

1.3.1.1.1-Oncoproteína viral E7 de HPV.

La proteína E7 no posee actividad enzimática ni es capaz de unirse al ADN, sin embargo, lleva a cabo sus funciones interaccionando con factores celulares fundamentales para el control del ciclo celular. En este sentido, las interacciones mejor caracterizadas de E7 involucran a supresores de tumores, como p107, p130 y en especial pRb (del inglés *Retinoblastome protein*) (Munger et al., 2001; Zhang et al., 2006). Esta última proteína secuestra e inhibe las actividades de los factores transcripcionales de la familia E2F (del inglés *E2 factor*), esenciales para la entrada a fase S del ciclo celular. Así,

el secuestro de pRb por parte de E7 posee un gran impacto sobre la célula infectada ya que promueve fuertemente la progresión del ciclo celular y posterior replicación celular, incluso en ausencia de factores de crecimiento y demás señales extracelulares (Doorbar et al., 2012; Munger et al., 2001).

Por otro lado, E7 tiene la habilidad de unirse e inhibir la función de otros reguladores de la proliferación celular tales como histonas desacetilasas y factores transcripcionales de la familia AP1 (Antinore et al., 1996; Nguyen et al., 2002). Finalmente, se ha comprobado que contribuye a la inestabilidad genética observada en carcinomas, ya que induce la síntesis de múltiples centrosomas en la fase S, a través de la formación de centriolos inmaduros (Duensing and Münger, 2002).

1.3.1.1.2-Oncoproteína viral E6 de HPV.

Las proteínas E6 derivadas de HPV de alto riesgo poseen aproximadamente 150 aminoácidos y contienen dos motivos dedos de zinc en su estructura, esenciales para su actividad (Barbosa et al., 1989). Esta proteína tiene una localización sub-celular preferencialmente nuclear; sin embargo, también se la ha detectado en citoplasma y en membrana plasmática (Dreier et al., 2011; Mesplede et al., 2012).

La función más estudiada de E6, y quizás la más importante, consiste en la degradación del oncosupresor p53. Para ello, E6 recluta a la ubiquitin ligasa E6AP (del inglés *E6 associated protein*) y a p53, formándose un complejo tripartito que estimula la degradación de p53 a través del mecanismo proteolítico dependiente de ubiquitina (Huibregtse et al., 1991). De esta manera, E6 promueve la inhibición de la apoptosis mediada por dicho oncosupresor. La importancia de p53 como blanco de E6 se enfatiza además por el descubrimiento de que E6 puede unirse directamente al sitio de unión al ADN de p53, bloqueando así su actividad como factor transcripcional (Lechner and Laimins, 1994). Considerando las funciones de p53 relacionadas a la reparación del ADN, estos eventos permiten indirectamente la acumulación de mutaciones en genes supresores de tumores y oncogenes, favoreciendo a un ambiente de inestabilidad génica que contribuye fuertemente a la transformación celular.

1.3.1.1.2.1-Interferencia de E6 con proteínas de polaridad celular.

El alineamiento de las secuencias de las proteínas E6 derivadas de HPV de alto riesgo reveló una región conservada en el sitio carboxilo terminal representando motivos PBM a través de los cuales pueden interactuar con dominios PDZ De manera

interesante, dicho motivo se encuentra ausente en las proteínas E6 de los HPV de bajo riesgo, lo que fue propuesto como una diferencia fundamental que justificaría en parte la distinta patogenicidad entre los dos tipos de HPV (Figura 1.9) (Ganti et al., 2015).

La mayoría de proteínas PDZ con las cuales E6 interacciona pertenecen a miembros de la familia MAGUK, importantes para el control de la polaridad celular y la formación de las UA y UT (ver Tabla 1.1, sección 1.3). En este contexto, DLG1 representa el primer blanco de polaridad reportado para la oncoproteína E6 (Kiyono et al., 1997). Estudios bioquímicos utilizando como modelo células epiteliales en cultivo permitieron descubrir una interacción entre las dos proteínas, que se encontraría mediada por el PBM de E6 y los dominios PDZ de DLG1 (Kiyono et al., 1997). Estudios posteriores en modelos de sobre-expresión sugirieron que una sobre-abundancia de E6 respecto DLG1 conduciría además a la degradación proteolítica de DLG1 por proteosomas (Gardiol et al., 1999). De este modo, fue propuesto inicialmente que E6 ejerce una interferencia sobre la polaridad promoviendo la degradación proteolítica de DLG1, lo que favorecería el aumento en la proliferación celular. Estos estudios fueron extendidos hacia otros blancos PDZ de E6 cuyas interacciones habían sido puestas en evidencia y efectivamente se observó el mismo fenómeno (Banks et al., 2001; Nakagawa and Huibregtse, 2000).

	Secuencia C-terminal de E6:	
HPV de alto riesgo	HPV18	A G H Y R G Q C H S C C N R A R Q E R L Q R R R E T Q V
	HPV16	R G R W T G R C M S C C R S S R T R R E T Q L
	HPV31	G G R W T G R C I A C W R R P R T E T Q V
	HPV33	S G R W A G R C A A C W R S R R R E T A L
HPV de bajo riesgo	HPV11	C W T T C M E D L L P
	HPV6	C W T T C M E D M L P
		<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> PBM (X-T/S-X-V/L) </div>

Figura 1.9: Alineamiento del extremo C-terminal de distintas proteínas E6 de HPV de alto y bajo riesgo. Se resalta en rosa los motivos PBM en las proteínas E6 de los HPV de alto riesgo, ausente en los de bajo riesgo. Figura adaptada de Nagasaka y col (Nagasaka et al., 2013)

Dichas observaciones alentaron a nuestro laboratorio a analizar la expresión de DLG1 en las lesiones cervicales asociadas a HPV, tanto en las intraepiteliales precursoras como en el carcinoma cervical. En este contexto, el análisis por inmunohistoquímica en muestras de pacientes reveló un dato muy interesante: en las lesiones precursoras los niveles de DLG1 se encontraron muy incrementados en comparación al epitelio normal y al mismo tiempo la localización celular y tisular se vio alterada. Sin embargo, en el estadio de carcinoma invasor los niveles de DLG1 fueron muy bajos o bien casi indetectables (Figura 1.10) (Cavatorta et al., 2004).

Posteriormente, haciendo uso de cultivos organotípicos tipo *raft* (que mimetizan el ambiente natural de la infección por HPV, o sea el epitelio estratificado) a partir de queratinocitos humanos expresando las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-18 (E618 y E718), nuestro grupo de trabajo pudo demostrar que la expresión de dichas oncoproteínas es capaz de reproducir el aumento y deslocalización de DLG1, fenotipo observado en las lesiones intraepiteliales precursoras (Valdano et al., 2016). Además, estudios de *microarrays* sugirieron que los niveles transcripcionales de DLG1 podrían variar por la expresión diferencial de proteínas de HPV (Doorbar et al., 2015). En concordancia, otros experimentos desarrollados por nuestro grupo arrojaron que la expresión de E7 es capaz de aumentar significativamente la actividad del promotor para DLG1, fenómeno que, interesantemente, puede incrementarse en presencia de la oncoproteína E6. Por otro lado, contribuyendo a la importancia de las proteínas PDZ de polaridad para la biología de los HPV, otro grupo de trabajo demostró que la replicación del genoma de HPV-16 es altamente dependiente de su oncoproteína E6 y más precisamente de su motivo PBM (Lee and Laimins, 2004). Así, una delección del PBM conduce a la integración del genoma viral circular en el genoma celular, lo cual es en detrimento del ciclo de replicación del virus. Más aun, de manera interesante, en este modelo el silenciamiento de proteínas de polaridad con dómicos PDZ, como hSCRIB, llevó a una disminución en los niveles de E6. Esto sugiere una función importante de este tipo de proteínas para la correcta expresión de E6 y muy probablemente en el ciclo de HPV-16 (Nicolaidis et al., 2011).

Estas observaciones en conjunto señalan que la relación entre E6 y proteínas de polaridad podría ser más compleja que la sugerida inicialmente. Así, la consecuencia de la interacción E6-DLG1 podría no derivar en todos los casos en la degradación de DLG1, sino que dicha interacción podría tener una función distinta durante las distintas etapas del ciclo viral y durante el desarrollo oncogénico. Por estas razones es necesario estudiar más profundamente la relación entre E6 y DLG1, a fin de comprender mejor el papel real que juega DLG1 en el ciclo de HPV y en la carcinogénesis cervical, lo cual además podría ser extrapolable a otras proteínas de polaridad celular.

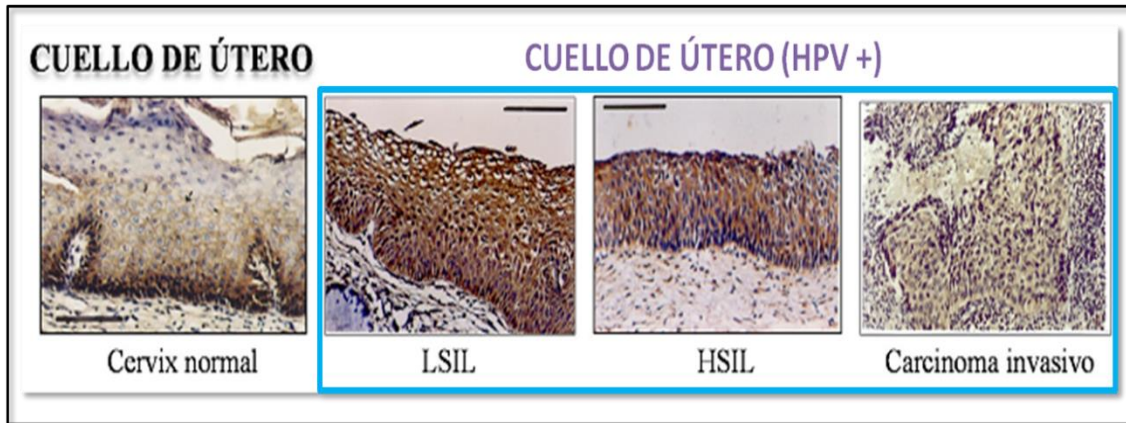


Figura 1.10: Expresión diferencial de DLG1 durante la progresión maligna cervical. En el epitelio cervical estratificado normal, DLG1 se expresa en el núcleo y citoplasma de las células basales, mientras que en los estratos superiores su expresión disminuye y se observa principalmente en la zona de contactos celulares. En las LSIL (donde el ciclo viral es productivo) ocurre un evidente aumento en los niveles de expresión y un cambio de localización de DLG1 hacia citoplasma. En las HSIL no existe diferenciación celular terminal y el epitelio se constituye casi totalmente de células tipo basales. Aquí la expresión de DLG1 es todavía elevada. Finalmente, en el estadio de carcinoma invasivo la expresión de DLG1 cae abruptamente. En marrón se aprecia la expresión de DLG1. Tomado de Cavatorta y col (Cavatorta et al., 2004)

1.3.2-Virus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1).

Los HTLV son retrovirus distribuidos en todo el mundo con un número estimado entre 15-20 millones de personas infectadas y con regiones de alta prevalencia donde la infección tiende a concentrarse dentro de una población contenida geográficamente (Gessain and Cassar, 2012; Proietti et al., 2005). Los HTLV se clasifican en cuatro tipos, el HTLV-1, -2, -3 y -4, siendo los más caracterizados al momento el tipo 1 y el 2 (Mahieux and Gessain, 2009; Manns and Blattner, 1991). El HTLV-1 está asociado al desarrollo de la leucemia a células T del adulto (ATL) y de la mielopatía asociada al HTLV/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), mientras que el HTLV-2 no se ha asociado consistentemente con ninguna patología (Ishitsuka and Tamura, 2014; Roucoux and Murphy, 2004). La ATL es una neoplasia linfoproliferativa agresiva asociada a una corta sobrevida en su forma aguda, mientras que la HAM/TSP es una enfermedad neurológica crónica y debilitante (Gessain et al., 1985; Levin and Jacobson, 1997). Las células blanco del HTLV-1 son principalmente los linfocitos T y las vías de contagio abarcan el contacto sexual, la transfusión sanguínea y el trasplante de órganos. Además, es posible la transmisión de madre a hijo durante el amamantamiento, siendo esta vía muy efectiva en la transmisión del HTLV-1 (Gross and Thoma-Kress, 2016).

A diferencia de otros virus, el HTLV-1 no se propaga principalmente a través de la liberación de viriones al medio extracelular, ya que los mismos presentan una baja capacidad infectiva. En cambio, el principal mecanismo de transmisión de este virus se basa en el contacto celular entre un linfocito T HTLV-1 + y un linfocito no infectado (Gross and Thoma-Kress, 2016). Más específicamente, el virus promueve activamente la formación de un contacto, llamado sinapsis virológica, a través del cual es posible la transferencia del genoma viral de ARN y de otras proteínas virales hacia el linfocito no infectado. Luego de dicha transferencia ocurre la transcripción y traducción de proteínas virales que aseguran la retro-transcripción del genoma de ARN a ADN, para luego darse la integración del mismo en el genoma celular quedando establecido así de manera permanente (Gross and Thoma-Kress, 2016).

Sin embargo, estudios *in vitro* más recientes han demostrado que los viriones de HTLV-1 pueden ser infectivos para células dendríticas, siendo estas últimas capaces además de transmitir la infección a los linfocitos T (Jain et al., 2009). Este modelo explicaría la transmisión viral de madre a hijo durante el amamantamiento. En este proceso, los escasos viriones de HTLV-1 serían capaces de traspasar la barrera de enterocitos por transitocis y luego infectar células dendríticas ubicadas por debajo de dicha barrera epitelial, las cuales a su vez serían capaces de transmitir el virus a linfocitos T propagando la infección. (Martin-Latil et al., 2012).

1.3.2.1-Expresión de la oncoproteína Tax1 y funciones.

Las propiedades oncogénicas del HTLV-1 pueden explicarse en gran parte por el accionar de una proteína viral denominada Tax1. Las funciones patogénicas de Tax1 se basan en su accionar en distintos compartimientos subcelulares (Figura 1.11). Inicialmente, esta proteína fue reportada como un factor nuclear, actuando como un potente activador transcripcional de genes virales y a su vez de genes celulares necesarios para la progresión del ciclo celular. Tax1 inhibe la respuesta apoptótica interfiriendo con las funciones del oncosupresor p53, no estimulando su degradación sino compitiendo por ligandos importantes (Ariumi et al., 2000). Al mismo tiempo, Tax1 interfiere con el regulador pRb estimulando eventos de fosforilación sobre la misma que se traducen en la inhibición de sus funciones como regulador negativo de la entrada a fase S del ciclo celular (Haller et al., 2002). Dichas funciones se asemejan a las llevadas a cabo por E6/E7 de HPV de alto riesgo creando un ambiente propenso a la acumulación de mutaciones necesarias para la inmortalización celular. Sin embargo, a diferencia de

otros virus tumorales (que generalmente requieren la expresión continua de las oncoproteínas transformantes), la expresión de Tax1 es detectada solamente en un porcentaje de células transformadas provenientes de ATL (Chlichlia and Khazaie, 2010). Esto sugiere que Tax1 cumpliría un rol principal en la inducción del proceso de immortalización, pero luego sería dispensable para el mantenimiento del fenotipo transformado.

Posteriormente fue demostrado que Tax1 es capaz de expresarse también en citoplasma, lo que fue respaldado por el descubrimiento de señales de exportación nuclear en su secuencia aminoacídica (Tsuji et al., 2007). En este compartimiento celular, Tax1 interfiere negativamente con reguladores de distintas vías de señalización que regulan la proliferación linfoide, como la vía NF- κ B (del inglés *Nuclear factor kappa B*) y PI3K/AKT (del inglés *Phosphatidylinositol-3 kinase/akt*) contribuyendo así a la immortalización (Cherian et al., 2015; Grassmann et al., 2005; Huang et al., 2009). Por otro lado, se ha reportado la expresión de Tax1 en diferentes organelas citoplasmáticas (Figura 1.11). En este sentido, se ha detectado a Tax1 en centrosoma, con una función importante para la polarización del mismo hacia la sinapsis virológica durante la transmisión viral hacia una célula no infectada (Nejmeddine et al., 2005; Nejmeddine et al., 2009). Además, una fracción de Tax1 participaría en vías de tráfico intracelular. En este sentido, se ha encontrado a Tax1 co-localizando con marcadores del retículo endoplasmático así como también con marcadores del aparato de Golgi, sugiriendo su transporte por la vía secretoria clásica (Alefantis et al., 2005; Alefantis et al., 2007). En relación a esto, experimentos en células vivas, han permitido observar que vesículas post-Golgi conteniendo Tax1 pueden dirigirse hacia la membrana plasmática, lo que serviría para liberar a Tax1 al medio extracelular (Alefantis et al., 2005). Sumado a esto, se ha reportado además la presencia de Tax1 en exosomas (Jaworski et al., 2014). Los mismos son vesículas producidas por la invaginación de endosomas tempranos, que pueden liberarse al medio extracelular por la fusión de los mismos durante las vías de reciclado de endosomas (Mathivanan et al., 2010). De esta manera se facilitarían aún más a la expresión de Tax1 en el medio extracelular, donde jugaría un rol importante en el desarrollo de patologías neurológicas relacionadas a HAM/TSP (Alefantis et al., 2005). Por último, se reportó la expresión de Tax1 en autofagosomas, aumentando el número de ellos y desregulando la autofagia para promover la supervivencia y transformación de células infectadas (Ren et al., 2015).

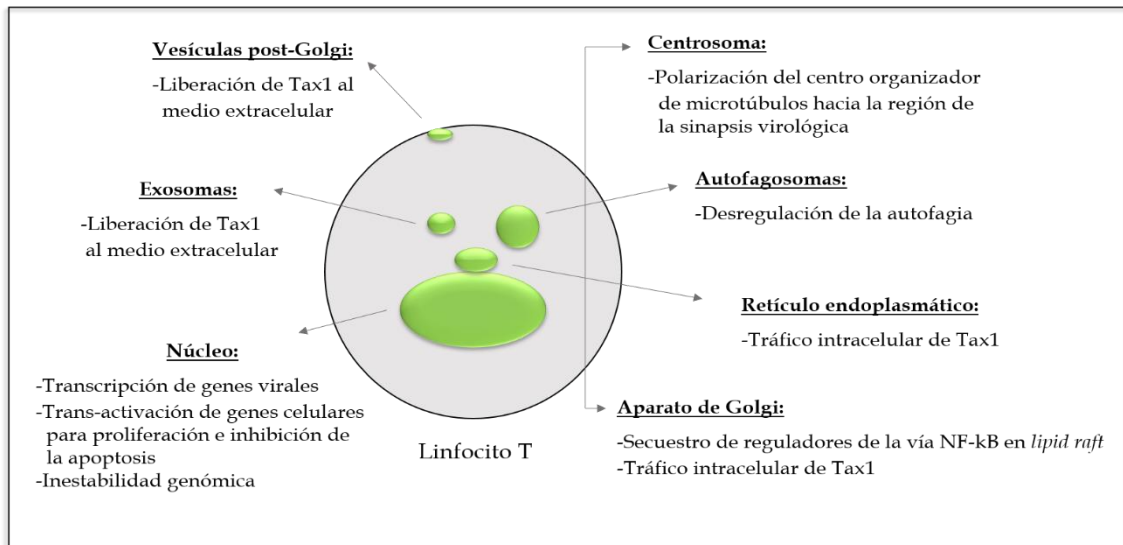


Figura 1.11: Funciones de Tax1 en distintos compartimientos subcelulares. En verde se representa la expresión de Tax1 y las flechas señalan los compartimientos subcelulares.

1.3.2.2-Interferencia de Tax1 con proteínas de polaridad.

En linfocitos T, muchas de las actividades biológicas, como migración, proliferación, y activación por estimulación antigénica, requieren una polaridad celular determinada, la cual se debe en parte, a la correcta distribución de proteínas de polaridad con dominios PDZ, pertenecientes a los complejos mencionados en la sección 1.1.2. La proteína Tax1, al igual que E6 de HPV de alto riesgo, presenta un motivo PBM en su extremo carboxilo terminal, con el cual puede interactuar con dominios PDZ (Figura 1.12) (Rousset et al., 1998). Así, es lógico pensar que Tax1 tome ventaja de estas proteínas para desregular estos procesos, estimulando la proliferación celular y favoreciendo el ciclo de replicación viral. La importancia de dichas interacciones se puso en evidencia trabajando con una mutante de Tax1 delecionada en el PBM. En este sentido, dicha mutante pierde significativamente su potencial oncogénico y provoca un retraso en la immortalización de los linfocitos (Xie et al., 2006). Además, en el contexto del genoma viral completo, la deleción en el PBM conduce a un detrimento de la persistencia viral, indicando que la interacción de Tax1 con proteínas con dominios PDZ no sólo es importante para la immortalización de la célula infectada sino también para el ciclo de vida del HTLV-1. Por último, lo que enfatiza aún más la importancia de estas interacciones es el hecho de que el PBM no se encuentre en Tax de HTLV-2. En relación a esto se ha propuesto que dicha diferencia contribuiría en gran medida a explicar la diferencia en la patogenicidad del HTLV-1 respecto del HTLV-2, lo cual es semejante a

lo ocurrido entre las proteínas E6 de los HPV de alto y bajo riesgo oncogénico (Higuchi and Fujii, 2009).

Secuencia C-terminal de Tax:	
HTLV-1	A D D N D H E P Q I S P G G L E P L S E K H F R E T E V
HTLV-2	P V S I L F N K E E R D D N C D
	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">E T E V</div> PBM

Figura 1.12: Alineamiento de la secuencia C-terminal de Tax de HTLV-1 y HTLV-2. En rosa se resalta el motivo PBM de Tax1.

Dentro de los blancos PDZ para Tax1, se ha reportado a la proteína DLG1, la cual fue descrita como un regulador negativo de la proliferación de linfocitos T. En este sentido, se ha demostrado que el silenciamiento de DLG1 puede causar hiperproliferación luego de la estimulación de TCR, y, por otro lado, su sobre-expresión induce el arresto del ciclo celular en fase G₁ (Swat Ana Miletic et al., 2007; Xavier et al., 2004). La expresión de Tax1 puede revertir este último proceso mediante un mecanismo no completamente entendido (Suzuki et al., 1999). Al momento, se ha reportado que la interacción de Tax1 con DLG1 provocaría una redistribución de esta última a estructuras insolubles no identificadas, conduciendo simplemente a la inactivación de sus funciones oncosupresoras (Hirata et al., 2004). Sin embargo, un aspecto que resulta interesante es que el silenciamiento de DLG1 no recupera la capacidad transformante de una mutante de Tax1 delecionada en su PBM (Higuchi and Fujii, 2009). Así, esto puede indicar que los complejos de Tax1-DLG1 no sólo tengan una función relacionada a la inactivación de las funciones de DLG1, sino que posean una función adicional en el proceso de immortalización celular. Por ello, es interesante continuar caracterizando la función biológica de los complejos Tax1-DLG1 indagando las posibles estructuras celulares donde puede ocurrir esta asociación. De este modo sería posible conocer más profundamente el rol de las proteínas de polaridad durante la immortalización y transmisión del HTLV-1.

Por lo tanto, de los datos presentados en esta sección se desprende la necesidad de un estudio más profundo acerca de la proteína de polaridad celular DLG1, abarcando desde los mecanismos moleculares que regulan sus niveles de expresión hasta su caracterización como ligando de las oncoproteínas de HPV de alto riesgo y de HTLV-1 y su incumbencia en el ciclo viral y el desarrollo de patologías.

OBJETIVOS

2.1- Objetivo general.

El mantenimiento de la polaridad celular es clave para la homeostasis celular y la integridad de los tejidos. La alteración en proteínas que regulan esta propiedad es una característica distintiva de los procesos de transformación celular. En este marco, la expresión de la proteína de polaridad DLG1 se encuentra realmente afectada durante la progresión maligna de diversos tumores de origen epitelial, y de manera interesante, también en tumores asociados a infecciones con virus oncogénicos, como es el caso de los HPV de alto riesgo y el HTLV-1. El hecho de que estos virus posean proteínas con capacidad de interactuar con DLG1 hace interesante el estudio de esta última como factor importante en la promoción de la transformación maligna inducida por los virus, así como también su posible rol como regulador de las actividades de las proteínas virales durante el ciclo de replicación viral.

De esta forma se desprendió el objetivo general de esta Tesis Doctoral, que consiste principalmente en el estudio de los mecanismos de regulación que controlan los niveles proteicos de DLG1, y, además, en la profundización del significado biológico de DLG1 como blanco de los virus oncogénicos HPV y HTLV-1.

Así, en este trabajo indagamos la implicancia de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales en la definición de los niveles de expresión de DLG1 en distintos tipos celulares y, a su vez, en contextos biológicos en los cuales las actividades de DLG1 son relevantes. Particular atención se prestó al mecanismo de *splicing* alternativo en la 5'UTR del ARNm descubierto por nuestro grupo de trabajo que posee la potencialidad de regular los niveles proteicos de DLG1.

Luego, con el fin último de entender posibles funciones de las asociaciones proteína viral-proteína de polaridad en la transformación celular y replicación viral, estudiamos como la proteína DLG1 se ve influenciada por la oncoproteína viral E6 de los HPV de alto riesgo oncogénico y la oncoproteína Tax de HTLV-1. En esta última parte cabe destacar la aplicación de la técnica de microscopía de fluorescencia FRET (del inglés *Fluorescence resonance energy transfer*) que permitió detectar interacciones directas entre proteínas en el contexto de células intactas, lo cual no había sido reportado hasta el momento para las asociaciones entre proteínas de polaridad y proteínas virales.

Además, quisimos analizar el impacto que posee la pérdida de expresión de DLG1 sobre otros reguladores de la polaridad celular con el fin último de desentrañar mecanismos de pérdida de polaridad durante procesos oncogénicos.

2.2- Objetivos específicos.

2.2.1- Estudio de la implicancia de mecanismos transcripcionales y post transcripcionales en la regulación de la expresión de la proteína de polaridad DLG1 en distintos contextos biológicos.

- I) *Análisis de la presencia de las isoformas Short y Large en distintos tipos celulares*
- II) *Regulación de la expresión de DLG1 durante:*
 - i) *-el aumento de la confluencia celular epitelial*
 - ii) *-la progresión del ciclo celular epitelial*
 - iii) *-la diferenciación celular*

2.2.2- Rol de DLG1 en los procesos tumorales asociados a infecciones por HPV de alto riesgo oncogénico.

- I) *Análisis de la expresión subcelular de la proteína de polaridad DLG1 y la oncoproteína E618 en células epiteliales*
- II) *Análisis de la expresión diferencial de DLG1 y E618 según la abundancia relativa de las mismas*
- III) *Estudio de la interacción entre DLG1 y E618 por microscopía FRET*
- IV) *Influencia de la pérdida de DLG1 en la expresión de otras proteínas de polaridad*

2.2.3- Rol de DLG1 en los procesos tumorales asociados a infecciones por HTLV-1.

- I) *Análisis de la expresión subcelular de la oncoproteína viral Tax1*
- II) *Análisis de la co-expresión de Tax1 y la proteína de polaridad DLG1*
- III) *Estudio de la interacción entre Tax1 y DLG1 por técnicas de FRET*
- IV) *Identificación de estructuras sub-celulares donde tiene lugar la interacción Tax1-DLG1*

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1-Cepas bacterianas y vectores de expresión.

En la Tabla 3.1 se detalla el genotipo de la cepa bacteriana y las características de los vectores de expresión utilizados:

Cepas bacterianas	Genotipo	Origen
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, (Φ80lacZ ΔAM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1</i>	Colección laboratorio
Plásmidos	Características relevantes	Referencia u origen
pcDNA3	Vector de expresión de proteínas recombinantes en células animales. Ori (colE1), Amp ^r , Neo ^r , CMVp, MCS.	Invitrogen (EE. UU.)
pegfp	Vector de expresión de proteínas recombinantes en células animales fusionadas al extremo C-terminal de la proteína verde fluorescente (egfp, del inglés <i>enhanced Green fluorescent protein</i>). Ori (colE1), Kan ^r , Neo ^r , CMVp, MCS.	Clontech (EE. UU.)
pmTurquoise2	Vector de expresión de proteínas recombinantes en células animales fusionadas al extremo C-terminal de la proteína fluorescente mTurquoise2 (mTurq2). Ori (colE1), Kan ^r , Neo ^r , CMVp, MCS.	(Goedhart et al., 2012)
pseyfp2	Vector de expresión de proteínas recombinantes en células animales fusionadas al extremo C-terminal de la proteína fluorescente seyfp2. Ori (colE1), Kan ^r , Neo ^r , CMVp, MCS.	(Kremers et al., 2006)
pseyfp2-mTurq2	Vector que permite la expresión de las proteínas seyfp2 y mTurq2 fusionadas entre sí. Ori (colE1), Kan ^r , Neo ^r , CMVp. Control positivo para experimentos de FRET.	(Goedhart et al., 2012)
pGEX2T	Vector de clonado que permite la expresión de proteínas fusionadas a la proteína glutatión S transferasa (GST). Ori (pBR322), MCS, GST, lac I, Amp ^r , tacP	(Smith and Johnson, 1988)
pGEM-T-Easy	Vector de clonado de productos de PCR generados con Taq polimerasa. Ori (colE1), MCS Amp ^r	Promega (EE. UU.)
pGEX2T-E618	pGEX-2T conteniendo la secuencia codificante de la proteína E6 de HPV-18.	(Thomas and Banks, 1998)
pGEX2T-Tax1	pGEX-2T conteniendo la secuencia codificante de la proteína Tax de HTLV-1.	Este trabajo de Tesis
pseyfp2-E618	pseyfp2 conteniendo la secuencia codificante de la proteína E6 de HPV-18	Este trabajo de Tesis
pseyfp2-E618ΔPBM	pseyfp2 conteniendo la secuencia codificante de la proteína E6 de HPV-18 delecionada en su motivo PBM.	Este trabajo de Tesis
pmTurq2-Tax1	pmTurquoise2 conteniendo la secuencia codificante de la proteína Tax de HTLV-1	Este trabajo de Tesis

pseyfp2-Tax1	pseyfp2 conteniendo la secuencia codificante de la proteína Tax de HTLV-1	Este trabajo de Tesis
pGW1-HA-Tax1	Vector de expresión en células animales conteniendo la secuencia codificante de Tax de HTLV-1 fusionada al epítipo HA (HA, del inglés <i>hemagglutinin</i>)	Este trabajo de Tesis
pseyfp2-Tax1Mut	pseyfp2 conteniendo la secuencia codificante de la proteína Tax de HTLV-1 mutada en su motivo PBM	Este trabajo de Tesis
pcDNA3-HA-DLG1	pcDNA3 conteniendo las secuencias codificantes de la proteína DLG1 de rata fusionada al epítipo HA.	(Gardiol et al., 1999)
pmTurq2-DLG1	pmTurquoise2 conteniendo las secuencias codificantes de la proteína DLG1 de rata	Este trabajo de Tesis
pegfp-DLG1	pegfp conteniendo las secuencias codificantes de la proteína DLG1 de rata	Este trabajo de Tesis
pseyfp2-PAR3	pseyfp2 conteniendo la secuencia codificante de la proteína PAR3 de ratón	Colección del laboratorio
pgfp-Rab5	Vector que permite la expresión de la proteína RAB5 fusionada a GFP	Cedido por el Dr. Phillip D Stahl. (Barbieri et al., 1998)
pgfp-Rab7	Vector que permite la expresión de la proteína RAB7 fusionada a GFP	Cedido por el Dr. Bo van Deurs. (Bucci et al., 2000)
prfp-LC3	Vector que permite la expresión en células animales de la proteína LC3 fusionada a la proteína roja fluorescente (rfp, del inglés <i>red fluorescent protein</i>)	Cedido por la Dra. Maria Isabel Colombo. (Fader et al., 2009)
pcDNA3-p53	pcDNA3 conteniendo las secuencias codificantes de la proteína p53.	Cedido por el Dr. Lawrence Banks. (Thomas et al., 1999)
LacZ	Vector que permite la expresión de la proteína β -galactosidasa (β Gal), proteína no presente naturalmente en células de mamífero. Se utiliza para control de transfección.	Colección del laboratorio

Tabla 3.1: Cepas bacterianas y vectores utilizados.

3.2-Células animales utilizadas.

En la Tabla 3.2 se detalla las líneas celulares utilizadas y sus características:

Línea celular	Descripción	Referencia
HEK293	Línea celular epitelial transformada derivada de células de riñón de embrión humano	ATCC CRL-1573
Caco-2	Línea celular epitelial derivada de adenocarcinoma de colon humano	ATCC HTB-37
HaCat	Línea celular epitelial inmortalizada derivada de queratinocitos de piel humana	(Boukamp et al., 1988)
H1299	Línea celular epitelial derivada de carcinoma de pulmón humano	ATCC CRL-5803
HepG2	Línea celular derivada de hepatocarcinoma humano	ATCC CRL-10741
SH-SY5Y	Línea celular derivada de neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266
THP-1	Línea celular derivada de una leucemia mielode monocítica humana	ATCC TIB-202
K562	Línea celular humana transformada derivada de leucemia mieloide aguda	ATCC CCL 243
Jurkat	Línea celular humana inmortalizada derivada de leucemia aguda de células T	ATCC TIB-152

Tabla 3.2: Líneas celulares empleadas. ATCC, del inglés *American type culture collection*.

3.3-Condiciones y medios de cultivo.

3.3.1-Medios de cultivo para células bacterianas.

El medio utilizado para el cultivo y mantenimiento de las cepas bacterianas fue Luria Bertani (LB) (Sambrook Fritsch, E. E., Maniatis, R, 1989), cuya composición es: Peptona de caseína 10 g/l, Extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l. Cuando este medio se requirió en estado sólido, se le agregó agar-agar a una concentración de 1,5%. Cuando fue necesario se usó el antibiótico Ampicilina (Amp) o Kanamicina (Kan) en una concentración final de 100 µg/ml o 50 µg/ml, respectivamente.

3.3.2-Medio de crecimiento, mantenimiento y soluciones utilizadas para el cultivo de las células animales.

Se utilizaron las siguientes soluciones:

*Solución amortiguadora de fosfatos (PBS): NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; Na₂HPO₄ 1,15 g/l; KH₂PO₄ 0,2 g/l; pH=7,2;

*Solución de tripsina/EDTA: tripsina (GIBCO, EE.UU.) 0,05% y EDTA 0,02%, en solución PBS (esterilizada a través de filtros de 0,22 μm).

*Solución de Azul de Tripan/NaCl 4,5% en una relación 4:1.

Las líneas celulares HEK293, Caco-2, HaCat y HEPG2 fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium) (Gibco, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (PAA Laboratories, Alemania), 2mM L-Glutamina (PAA Laboratories, Alemania) y los antibióticos penicilina y estreptomina (Sigma Aldrich, EE. UU) en una concentración final de 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. Para la línea Caco-2 se realizó, además, el agregado de aminoácidos no esenciales (Gibco, EE. UU) al 1% v/v. Por otro lado, las líneas celulares THP-1, K562 y Jurkat se cultivaron en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco, EE. UU) con el agregado de SFB, antibióticos y aminoácidos no esenciales en las mismas cantidades utilizadas para las líneas antes mencionadas. Todos los medios de cultivos fueron llevados a $\text{pH}=7,2$.

3.4-Cultivo celular.

3.4.1-Cultivo bacteriano.

Los cultivos de *E.coli* se crecieron en medio LB líquido a 37°C con agitación, en presencia del antibiótico correspondiente. Los medios sólidos se cultivaron en estufa a 37 °C.

3.4.2-Mantenimiento de las células animales.

Todos los cultivos se realizaron en estufa a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5%. En el caso de las líneas adherentes HEK293, Caco-2, H1299, HepG2 y HaCat, cuando las mismas llegaron a un grado de confluencia donde cubrían un alto porcentaje de la superficie de los frascos donde se estaban cultivando, se les retiró el sobrenadante del cultivo y se lavó la monocapa celular con PBS. Después de eliminar la solución de lavado, se agregó cantidad adecuada de la solución de tripsina/EDTA, dejándola actuar por unos minutos hasta lograr el desprendimiento de las células adheridas. Luego se adicionó medio de cultivo, neutralizando la acción de la tripsina, y se homogenizó la suspensión celular. Una alícuota adecuada de esta suspensión se continuó cultivando en un frasco nuevo con el agregado de medio de cultivo completo fresco. En el caso de líneas celulares en suspensión THP-1, K562 y Jurkat, las células fueron diariamente contadas utilizando una solución de Azul de Tripan/NaCl 4,5% (4:1) que permite diferenciar células vivas de muertas. Cuando el cultivo llegó a una densidad celular de

10^6 células/ml, se tomó una alícuota de cultivo y se procedió a diluirla en medio de cultivo fresco de manera tal que el número de células sea no menor a 2×10^5 células /ml.

3.5-Transformación de células de *E. coli*.

-Inducción del estado de competencia por el método de CaCl_2

Las células bacterianas a transformar fueron crecidas hasta fase estacionaria en medio LB, se diluyeron 1:50 en el mismo medio y se cultivaron hasta llegar a fase exponencial, evaluado por medida de absorbancia a 595 nm hasta alcanzar una DO de aproximadamente 0,6. Luego de dejar reposar en hielo por 10 min, las células se cosecharon por centrifugación durante 5 min a 6000 rpm y a 4 °C en una centrífuga Hettich universal 32R (Hettich, Alemania), y se resuspendieron en CaCl_2 50 mM frío. Tras volver a enfriar y cosechar las células, las mismas se resuspendieron en una solución fría de CaCl_2 50 mM al 15% de glicerol. Se trabajó siempre en esterilidad y las células se conservaron a -70 °C hasta su utilización.

-Transformación de células competentes

Alícuotas de 50 μL de bacterias en estado competente debido al tratamiento descrito previamente fueron incubadas durante 1 hora con una cantidad adecuada de plásmidos o mezclas de ligación. Luego fueron sometidas a un *shock* térmico de 42°C durante 2 min e incubadas inmediatamente en hielo unos minutos. Posteriormente se les adicionó 1 ml de medio LB fresco y se las incubó durante 45 min en agitación a 37°C. Finalmente, se recuperaron las células por centrifugación a 8000 rpm en microcentrífuga MiniSpin (rotor F-45-12-11) (Eppendorf, Alemania), se resuspendieron en un mínimo volumen de medio LB y se sembraron en placas de Petri conteniendo medio LB-agar suplementado con antibióticos correspondientes y en concentraciones adecuadas. Las placas se incubaron durante 16 hs a 37°C para permitir el crecimiento de bacterias transformantes.

3.6-Transfección de células animales.

Esta técnica permite la transferencia de ácidos nucleicos (AN) a células animales en cultivo. Se sembraron 4×10^5 células HEK293 o 2×10^5 células HaCat en placas de Petri tipo cultivo celular (60 mm de diámetro) de manera de alcanzar una confluencia del 75% o 20% a las 24 hs, respectivamente. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB en una estufa gaseada a 37°C y se transfectaron según la técnica elegida:

-*Transfección por el método de precipitación con fosfato de calcio* (Scholat, 1997).

Se preparó una solución compuesta por el ADN plasmídico a transfectar, 22 μ l de CaCl_2 2,5 M y 190 μ l de tampón Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 7,9; 1 mM EDTA). Esta mezcla se agregó gota a gota sobre 200 μ l de solución HBS 2x (Hepes 50 mM; NaCl 0,28 M; $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM; pH=7,12), y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla final se agregó a las células sembradas el día anterior a las cuales se les había adicionado 3 ml de medio fresco y se dejó precipitando el ADN durante 24 a 48 hs. Esta técnica se utilizó para la línea HEK293.

- *Transfección con el método de la Lipofectamina RNAiMax*

Este método se utilizó para transfectar ARN pequeño de interferencia (siARN, del inglés *small interfering ARN*) en células HaCat. Se preparó una solución conteniendo siARN en cantidades adecuadas en 100 μ l de medio de cultivo sin SFB, sobre la cual se agregó gota a gota una segunda mezcla conteniendo 12 μ l de Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, EE. UU.) en 100 μ l de medio de cultivo sin suero. La mezcla resultante se mezcló vigorosamente y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la misma se agregó a las células sembradas el día anterior a las que se le habían agregado 3 ml de medio fresco sin suero, y se incubó por 5 hs en estufa gaseada. Al cabo de este tiempo, se extrajo el medio conteniendo la mezcla adicionada previamente y se reemplazó por 3 ml de medio fresco suplementado con SFB al 10%, pero sin antibióticos. Finalmente, las células fueron incubadas en estufa gaseada por 72 hs y luego procesadas para fraccionamiento subcelular (sección 3.12).

3.7-Diferenciación de la línea THP-1 a macrófagos.

Para la diferenciación de los monocitos que constituyen la línea THP-1 en macrófagos, se empleó el reactivo Forbol- 1,2-miristato- 1,3-acetato (PMA) (Daigneault et al., 2010). Se sembraron un millón de células THP-1 en placas, se agregó PMA a una concentración de 100 ng/ml en medio de cultivo y luego se incubaron las placas durante 48 hs en estufa a 37°C y en oscuridad. La diferenciación se evaluó mediante observación de la adherencia y de los cambios morfológicos usando microscopio invertido.

3.8-Técnicas concernientes a la manipulación de ácidos nucleicos (AN)

3.8.1-Aislamiento y purificación de ADN plasmídico.

Para la preparación de ADN plasmídico se utilizaron los equipos comerciales: NucleoSpin® Plasmid Miniprep Kit (Macherey-Nagel, Alemania), Axyprep plasmid miniprep kit (Axygen, EE.UU.) y High Pure Plasmid isolation kit (Sigma, EE.UU.) En cada caso se siguieron las instrucciones del proveedor. El ADN plasmídico se resuspendió en H₂O estéril y se conservó a -20 °C hasta su utilización. Para el análisis de las construcciones realizadas se utilizó el método de extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de Birnboim (Birnboim and Doly, J., 1979).

3.8.2-Extracción de ARN y transcripción reversa (RT).

Para llevar a cabo la extracción del ARN total se utilizó el reactivo Trizol (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y se procedió según el protocolo recomendado por el proveedor. El ADNc se sintetizó a partir de 2 µg ARN total. Se preparó una mezcla de reacción que contenía el volumen adecuado de ARN, 5 µM del cebador oligodT y agua libre de nucleasas, y se incubó durante 5 minutos a 65°C de manera de inducir la desnaturalización del ARN. Posteriormente se enfrió 1 minuto en hielo, y se agregaron los restantes componentes de la retro-transcripción: 0,5 mM de cada dNTP; solución tampón (50 mM Tris pH=8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 5 mM DTT); 100 U de MMuLV-RT (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y 10 U de inhibidor de ribonucleasa, en un volumen final de 20 µl. Para la reacción de RT, la mezcla final se incubó a 42°C durante 60 min. Como paso final, se incubó a 72°C durante 10 min para inactivar la enzima transcriptasa reversa y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

3.8.3-Estimación de la concentración y calidad de AN.

La cuantificación de los AN obtenidos se realizó por medidas espectrofotométricas a 260 nm y se calculó la concentración según el valor leído, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 µg/ml de ADN doble hebra y a 40 µg/ml en el caso de ARN. Para esto se utilizó una dilución adecuada del AN y se midió en un espectrofotómetro Genova de Jenway (Jenway-Bibby Scientific Limited, Reino Unido). Además, la integridad del AN se corroboró mediante corrida y visualización en geles de agarosa. También se determinaron los índices de Absorbancia a 260 nm/Absorbancia a 280 nm, de manera de detectar contaminaciones con proteínas y con sustancias orgánicas (Sambrook Fritsch, E. E., Maniatis, R, 1989).

3.8.4-Digestión de ADN con enzimas de restricción.

En términos generales, las condiciones de corte usadas fueron las recomendadas por los proveedores de las distintas endonucleasas de restricción. Se utilizó aproximadamente 1 U de las enzimas correspondientes en cada caso por μg de ADN plasmídico. Los resultados de los cortes con enzimas de restricción se verificaron mediante electroforesis de los productos obtenidos en geles de agarosa, estimando el tamaño de los fragmentos generados por comparación con marcadores de peso molecular adecuados. Para el caso de los vectores digeridos, los mismos fueron, además, tratados con fosfatasa alcalina para disminuir la probabilidad de religado en la reacción de ligación.

3.8.5-Electroforesis de AN en geles de agarosa.

Los geles se prepararon en solución tampón TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 10 mM; pH= 8). Para la visualización del AN se procedió al agregado de bromuro de etidio en una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las concentraciones de agarosa utilizadas variaron entre el 0,8 y el 2% según el tamaño de las moléculas de AN a resolver. Las muestras de AN se sembraron utilizando solución de siembra 6X (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno-cianol; 30% de glicerol, en agua estéril) en proporción 6:1 (muestra de ADN: solución de siembra). Como marcadores de peso molecular se utilizaron Marcadores de ADN Ladder 1Kb de 1.000 a 10.000 pb o Marcadores de ADN Ladder 100 de 100 a 2.080 pb (Productos Bio-Lógicos, Argentina). Las corridas electroforéticas se realizaron a 50-90 mA en solución tampón TAE. Los geles fueron observados en transiluminador de luz UV.

3.8.6-Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa.

Para aislar fragmentos de ADN para su posterior clonado, las muestras de ADN digeridas con enzimas de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa en las condiciones señaladas anteriormente. El ADN se purificó utilizando el equipo comercial NucleoSpin gel and PCR Clean Up (Macherey-Nagel, Alemania), basado en la adsorción del ADN a membrana de sílica-gel. El sistema fue utilizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y resuspendiendo el ADN aislado en H_2O estéril.

3.8.7-Ligado de moléculas de ADN.

Las reacciones de ligado en las cuales se utilizó el vector pGEM-T-Easy se llevaron a cabo según las indicaciones del manual del laboratorio comercial proveedor (Promega,

EE.UU.), utilizando una relación 1:5 (vector: inserto). Las demás reacciones de ligación en las que no se utilizó este vector, se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l, utilizando 1 U de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Promega, EE.UU.), en la solución tampón adecuada para la enzima y con las cantidades necesarias de inserto y de vector para cada caso (aproximadamente en una relación 4:1 inserto: vector). La mezcla de ligado se incubó a 4 °C durante toda la noche.

3.8.8-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo final y PCR en tiempo real (qPCR).

En todas las reacciones de amplificación por PCR en tiempo final se utilizó un termociclador Mastercycler 5333 (Eppendorf, Alemania). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l conteniendo 2,5 μ l de solución *buffer* 10X (100 mM Tris-HCl pH= 8,8, 500 mM KCl, 0,8 % NP-40), 2,5 μ l de MgCl₂ 25 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmoles de cebadores sentido y reverso, y 1U de ADN polimerasa Taq (Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Como molde se utilizaron entre 2-5 ng de ADN plasmídico o 100 ng de ADN complementario proveniente de reacciones de RT.

Esta metodología se llevó a cabo para la amplificación de las secuencias codificantes de E618, E618 Δ PBM, Tax1 y Tax1Mut. Para ello se diseñaron y emplearon los cebadores mostrados en la Tabla 3.3. Las secuencias de E618 y E618 Δ PBM fueron amplificadas utilizando como molde al vector plasmídico pGEX2T-E618 disponible en el laboratorio. Las secuencias de Tax1 y Tax1Mut, a partir de ADN genómico proveniente de la línea HTLV-1 + MT2. En ambos casos el perfil térmico utilizado fue 5 min a 95°C seguidos de 40 ciclos de: 30 seg a 95°C, 30 seg a 58°C y 30 seg a 72°C. Finalmente se calentó a 72°C durante 10 min.

Frag. amplificado	Dirección	Secuencia
E618	sentido	TTAT AGATCT ATGGCGCGCTTTGAGGATCCAAC
	reverso	TTATGAATTCCTATACTTGTGTTTCTCTGCGT
E618ΔPBM	sentido	TTAT AGATCT ATGGCGCGCTTTGAGGATCCAAC
	reverso	TTATGCGGCCGCTTATCTGCGTCGTTGGAG
Tax1	sentido	TTAT GAATCC ATGGCCACTTCCCAGGGTTTG
	reverso	ACACGAATTCGTCAGAGCCTTATTCTGGG
Tax1Mut	sentido	TTAT GAATCC ATGGCCACTTCCCAGGGTTTG
	reverso	TTATGAATTCCTTCTCAGGCTTCATCTCCACGGAAATG

Tabla 3.3: Cebadores utilizados para la amplificación de la secuencia codificante completa de E618, E618 Δ PBM, Tax1 y Tax1Mut. En negrita y subrayado se muestran sitios para enzimas de restricción.

La misma metodología se llevó a cabo para evaluar la existencia de las isoformas *Short* y *Large* en las líneas celulares empleadas, a partir de muestras de ADNc. En estos ensayos se amplificaron las dos isoformas en el mismo medio de reacción. Para ello se empleó el cebador sentido F4 para *Short* ubicado a lo largo de la unión entre los exones A y C; el cebador sentido F3 para *Large*, ubicado a lo largo de la unión entre los exones A y B, y el cebador reverso O2, ubicado dentro del exón C. En la Figura 3.1, **panel superior**, se pueden observar esquemáticamente la ubicación de estos pares de cebadores y sus secuencias. Las condiciones de reacción utilizadas en este caso fueron: 5 min a 95°C seguidos de 30 ciclos de: 30 seg a 95°C, 30 seg a 58°C y 30 seg a 72°C. Finalmente se calentó a 72°C durante 10 min.

Las reacciones de qPCR fueron realizadas en termociclador Step One (Applied Biosystem, EE. UU). Se llevaron a cabo empleando la mezcla de reacción comercial Mezcla Real (Biodynamics, Argentina), adicionando 5 μ l de una dilución 1/10 del ADNc y 20 pmoles de cada cebador correspondiente, en un volumen final de 20 μ l. Esta metodología se aplicó para cuantificar los niveles de las isoformas *Short*, *Large* y transcriptos totales para DLG1. La isoforma *Short* fue amplificada utilizando el mismo juego de cebadores F4 y O2 mencionados anteriormente. Sin embargo, para la amplificación de la isoforma *Large* se utilizó el cebador sentido *Fbig* (que hibridiza en la unión del Exón A y Exón B) y el reverso O2 (ver Figura 3.1, **panel superior**). Este último par de cebadores permite la amplificación de un amplicón de menor tamaño molecular que el obtenido por el par F3 - O2, lo que es más adecuado para experimentos de qPCR.

Además, se amplificaron los transcriptos totales para DLG1 cuya secuencia de amplificación se encuentra en la región del ARNm codificante para la proteína. Se utilizó en este caso el juego de cebadores F2 (sentido) y R2 (reverso). Con el propósito de realizar una cuantificación relativa, se determinaron además los niveles de transcriptos del gen de referencia interna Succinato deshidrogenasa (SDH). El juego de cebadores fue SDH Fw (sentido) y SDH Rv (reverso).

Las condiciones de las reacciones de qPCR fueron: 5 min iniciales a 95°C seguidos de 40 ciclos de: 15 seg a 95°C, 15 seg a 60°C, 20 seg a 72°C y 8 seg a 78°C en donde se realiza lectura de intensidad de fluorescencia. El valor del C_q (ciclo umbral) se obtuvo durante la fase exponencial de la reacción de PCR. Una vez finalizados los 40 ciclos se realizó una curva de *melting* para determinar la temperatura de fusión de los productos obtenidos durante la reacción y controlar su especificidad. Para más seguridad, los amplicones obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa, y fue confirmada la presencia de un solo producto específico del tamaño esperado.

La optimización de las reacciones que se detallan en esta sección fue llevada a cabo en nuestro laboratorio previamente como parte de mi Tesina de Licenciatura en Biotecnología (Cavatorta et al., 2011).

Las secuencias de los cebadores utilizados tanto en los experimentos de PCR en tiempo final y en tiempo real se muestran en la tabla ubicada en la parte inferior de la Figura 3.1. El análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de los ensayos de qPCR fue realizado aplicando el test no paramétrico de Mann-Whitney para el caso de comparaciones de dos grupos independientes. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

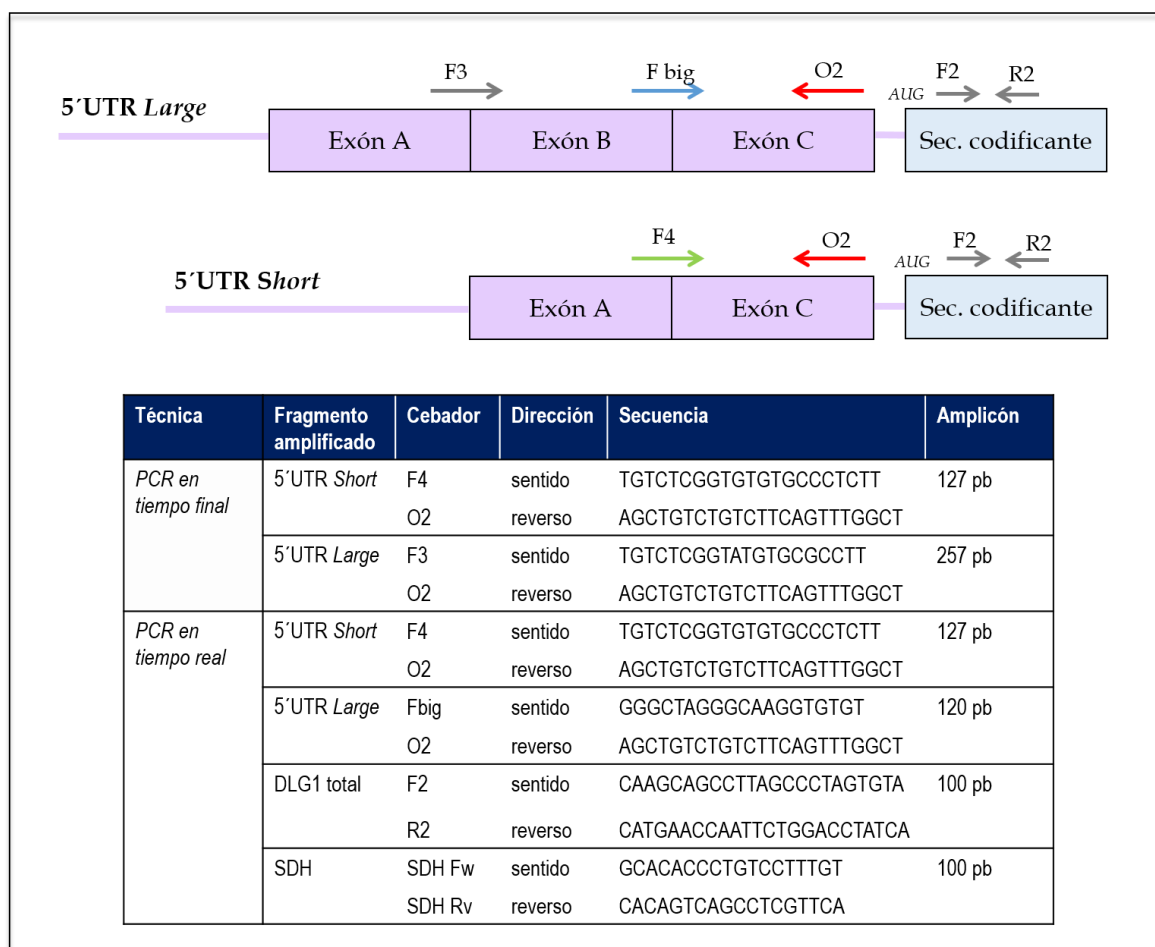


Figura 3.1: Cebadores utilizados para la amplificación de *Short*, *Large* y transcritos totales de **DLG1**. En la parte superior se muestran los sitios de hibridación de los cebadores F3, F4, Fbig y O2 ubicados dentro de la región 5'UTR del transcrito (violeta). Además, se muestra al par F2-R2 hibridizando dentro de la secuencia codificante del ARNm para DLG1 (celeste). AUG, sitio de inicio de la traducción. En la tabla se muestran las secuencias de los cebadores, el tamaño del amplicón obtenido y en qué tipo de metodología de PCR fueron utilizados

3.8.9-Secuenciación de ADN.

Las construcciones derivadas de PCR fueron confirmadas por secuenciación del ADN. Los vectores de expresión correspondientes fueron purificados y secuenciados por electroforesis capilar con el secuenciador Applied Biosystem modelo 3730 en el servicio de secuenciación de la Universidad de Maine (EE.UU.).

3.9-Técnicas concernientes a la manipulación de proteínas.

3.9.1-Preparación de los extractos proteicos.

Para obtener extractos proteicos totales, las células adheridas a la superficie de las placas se lavaron con PBS frío y se incubaron durante 10 min con volúmenes adecuados de solución de siembra 2X (125mM Tris/HCl pH=6,8; 20% glicerol; 4% SDS; 0.004% Azul

de bromofenol; 10% β -mercaptoetanol), despegando luego por raspado y arrastre. Este lisado se calentó a 95°C durante 5 min y se conservó a -20°C hasta su uso. En el caso de células en suspensión, las mismas fueron recolectadas en tubos de centrifuga, lavadas con PBS y el *pellet* obtenido post-centrifugación fue incubado con la solución de siembra 2X.

Alternativamente se obtuvieron extractos proteicos incubando las células 10 min con la solución de lisis de astringencia moderada RIPA (50mM Tris HCl [pH 7,4], 150mM NaCl, 1% deoxicolato, 1mM EDTA, 0,5 % NP40) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas al 1% (Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Este lisado se conservó a -70°C hasta su posterior uso.

3.9.2-Cuantificación de extractos proteicos.

La concentración de proteínas en los extractos obtenidos con la solución de lisis RIPA se determinó por el método del ácido bicinconínico (Sigma Aldrich, EE.UU.). A 5 μ l de muestra se agregaron 200 μ l de reactivo conteniendo CuSO_4 y solución de ácido bicinconínico en una proporción 1:50 v/v. Se incubó a 37°C durante 30 min y posteriormente se midió absorbancia a 630 nm en un lector de microplacas Dynatech Laboratories (EE.UU.) modelo MRX. Como testigo se utilizó una curva de calibración de albúmina sérica bovina.

3.9.3-Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las muestras proteicas se analizaron mediante SDS-PAGE. Antes de la siembra las muestras se calentaron 5 min a 95°C en solución de siembra [120 mM Tris-HCl (pH= 6,8), 0,5% (v/v) β -mercaptoetanol, 2% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, y 0,002% (p/v) azul de bromofenol]. Las corridas electroforéticas se realizaron en una solución compuesta por 3 g/l Tris-base, 14,4 g/l glicina, y 0,1% (p/v) SDS, a una intensidad de corriente constante de 25 mA. La concentración de acrilamida:bisacrilamida (30:0.8) utilizada en los geles de separación fue del 10% o 12% según el caso.

3.9.4-Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Western Blot, WB) e inmunodetecciones.

Se siguió la técnica descrita por Towbin y colaboradores (Towbin et al., 1979). Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel de poliacrilamida y la membrana de

nitrocelulosa fueron colocados en el *cassette* de transferencia. La electrotransferencia se realizó durante 4 hs a 250 mA en una solución compuesta por 6 g/l de Tris-base; 28,8 g/l de glicina y 20% metanol. La correcta transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se corroboró por tinción con el colorante Rojo Ponceau. La membrana fue pre-incubada en una solución conteniendo 5% de leche descremada en PBS, durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. A continuación, se realizó una incubación durante 16 hs, con una dilución adecuada del anticuerpo primario correspondiente (Tabla 3.4). Posteriormente, se realizó la incubación con una dilución adecuada del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo (Amersham, General Electric, Alemania) según correspondía, ambos conjugados con peroxidasa de rabano picante (HRP), durante 2 hs a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 min con 0,1% de Tween 20 en PBS y uno con PBS. La membrana se incubó durante 5 min con la reacción de revelado para peroxidasa con el equipo de quimioluminiscencia *SuperSignal West Pico Trial Kit* (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y finalmente, se realizó la exposición de la señal a placas fotográficas (General Electric, Alemania) en oscuridad, durante tiempos variables.

Anticuerpo	Dilución	Medio de dilución	Fabricante
a- DLG1 (2D11)	1/200	PBS/Leche 5%	SantaCruz Biotech. (EE.UU.)
a- PAR3 (07-330)	1/500	PBS/Leche 5%	Millipore (EE.UU.)
a- gfp	1/5000	PBS/Leche 5%	ThermoFisher Scientific (EE.UU.)
a- γ Tub (GTU-88)	1/5000	PBS/Leche 5%	Sigma-Aldrich (EE. UU.)
a- β Gal	1/3000	PBS/Leche 5%	Abcam (Reino Unido)
a- TR	1/500	PBS/Leche 5%	SantaCruz Biotech. (EE.UU.)
a- p84	1/1000	PBS/Leche 5%	Abcam (Reino Unido)
a- α Tub	1/3000	PBS/Leche 5%	Sigma-Aldrich (EE. UU.)

Tabla 3.4: Anticuerpos y diluciones correspondientes usadas en ensayos de WB. *gfp*, del inglés Green fluorescent protein; γ Tub, γ - tubulina; β Gal, β -Galactosidasa; TR, receptor de transferrina; α Tub, α - tubulina.

3.9.5- Expresión de proteínas transgénicas en *E. coli* como producto de fusión con la proteína glutatión-S-transferasa (GST).

Se utilizó el vector de expresión pGEX2T que contiene un promotor *tac* inducible por isopropil-D-1 tiogalactopiranosido (IPTG). Este sistema permite la expresión de

proteínas fusionadas a la proteína GST y la posterior purificación utilizando una resina de afinidad de glutatión agarosa (Sigma Aldrich, EE. UU). Volúmenes pequeños de 3 ml de cultivo de *E. coli* transformadas con los vectores pGEX2T y pGEX2T-Tax1 fueron inducidos mediante el agregado de 1.5 mM de IPTG y luego de 3 hs a 30°C, las células fueron cosechadas por centrifugación. Luego, se obtuvo el lisado correspondiente disolviendo el *pellet* en volúmenes apropiados de solución de siembra 2X (125 mM Tris/HCl pH=6,8; 20% glicerol; 4% SDS; 0,004% Azul de bromofenol; 10% β -mercaptoetanol), calentando a 95°C durante 5 min y conservando a -20°C hasta su uso. Estos extractos se resolvieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, detectándose las proteínas por tinción con Coomassie Brilliant Blue y permitieron optimizar las condiciones de inducción.

- *Purificación a mayor escala*

Se realizó una dilución 1:50 del cultivo mencionado anteriormente en 200 ml de medio fresco suplementado con Amp y se creció hasta alcanzar la fase exponencial (DO de 0,6) durante aproximadamente 2 hs. A continuación, se indujo la expresión de las proteínas mediante la adición de IPTG en una concentración final de 1,5 mM, y se continuó el crecimiento por 3 hs a 30°C. Los cultivos se centrifugaron 10 min a 4500 g en centrífuga Hettich Universal 32 R (Hettich, Alemania) y las células cosechadas fueron conservadas a -70°C. Al día siguiente las células fueron resuspendidas en solución de ruptura PBS 1,5% Tritón, ditioneitol (DTT) 5 mM e inhibidor de proteasas PMSF (del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*) 0,1 mM. Dichas suspensiones fueron sometidas a 3 pulsos de ultrasonido de 10 seg a 30 mA de potencia en un sonicador, con intervalos de enfriamiento de 10 seg. El lisado celular se centrifugó por 10 min a 7500 rpm a 4°C y las proteínas de interés presentes en el sobrenadante se purificaron por interacción con 700 μ l de una suspensión de la resina de glutatión agarosa (Sigma Aldrich, EE. UU) equilibrada con PBS, por un período de 45 min en frío y con agitación. Se realizaron 3 lavados de la resina con solución PBS/Tritón 1,5 % y 3 lavados con PBS, incubando en agitación y en frío de 5 a 10 min cada vez. Por último, para evaluar la purificación y estimar la concentración proteica, las muestras se resolvieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Las proteínas fueron detectadas mediante tinción con Coomassie Brilliant Blue.

3.9.6- Co-Inmunoprecipitación (IP).

Células HEK293 adheridas a la superficie de las placas se lavaron con PBS frío y se incubaron durante 10 min en hielo con la solución de lisis de astringencia moderada RIPA conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas al 1% (Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Una fracción del extracto fue guardado a -80°C (fracción Input, extracto total antes del agregado del anticuerpo). Para la IP de HA-Tax1 el extracto fue incubado con 2 µg del anticuerpo a-HA, en rotación a 4°C durante 16 hs. Posteriormente, se incubó con Proteína A Sefarosa CL-4B 50% en PBS (Sigma Aldrich, EE.UU.) durante 3 hs, en rueda giratoria a 4°C. Luego, se lavó 4 veces con la solución RIPA durante 5 min en rueda giratoria a 4°C y, posteriormente, se centrifugaron los extractos a 8000 rpm a 4°C por 10 min, descartándose el sobrenadante. Finalmente, el *pellet* conteniendo la resina de Sefarosa con los inmunocomplejos precipitados se resuspendió en solución de siembra 2X y se incubaron a 90°C durante 2 min. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su siembra.

3.10-Inmunofluorescencia (IF).

Células HEK293 y HaCat transfectadas previamente o no, fueron cultivadas adheridas a cubreobjetos, posteriormente lavadas con PBS y fijadas con una solución de 4% paraformaldehído en PBS, durante 15 min a temperatura ambiente. Luego de dos lavados con PBS, fueron permeabilizadas con una solución de 0,1% de TritónX-100 en PBS por 5 min, a temperatura ambiente, tras lo cual se realizaron tres lavados con PBS. La marcación de las proteínas a estudiar se realizó con anticuerpos primarios comerciales en una dilución adecuada en PBS (Tabla 3.5). El tiempo de incubación de los anticuerpos primarios fue de 2 hs a 37°C en cámara húmeda. Luego de tres lavados con PBS, se agregó el anticuerpo secundario correspondiente a dilución adecuada en PBS. Las células fueron incubadas 1 h a 37°C en cámara húmeda. Se lavaron tres veces con PBS y un último lavado con agua destilada. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados sobre porta-objetos usando el líquido de montaje *SlowFade* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EE UU). La expresión de las proteínas fue analizada con un microscopio láser confocal de barrido invertido Zeiss LSM 880 (Zeiss, Alemania).

Anticuerpo primario	Dilución	Medio de dilución	Fabricante
a- DLG1 (2D11)	1/20	PBS	Santa Cruz Biotechnology (EE. UU.)
a- HA (12CA5)	1/70	PBS	Sigma Aldrich (EE. UU.)
a- GM130 (EP892Y)	1/100	PBS	Abcam (Reino Unido)
a- γ Tub (GTU-88)	1/100	PBS	Sigma Aldrich (EE. UU.)

Tabla 3.5: Anticuerpos y diluciones correspondientes usadas en IF. GM130, del inglés *Golgi matrix 130*.

3.11-Silenciamiento de la expresión proteica por técnicas que utilizan siARN.

Células HaCat fueron transfectadas utilizando en método de la Lipofectamina RNAiMax (sección 3.6) con siARN para DLG1 (siDLG1) y Luciferasa (siLuci) (relevant Dharmacon Smart pools, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). siLuci se utilizó como control negativo de silenciamiento génico. Para la optimización se probaron distintas cantidades de siARN y distintos tiempos de incubación de las células con la mezcla de transfección. La condición óptima fue de 72 hs post transfección observándose una drástica reducción en los niveles proteicos de DLG1 cuando se ensayó por WB en comparación con la condición control.

3.12- Fraccionamiento subcelular.

El fraccionamiento celular de células HaCat fue llevado a cabo con el equipo comercial *ProteoExtract Fractionation Kit* (Calbiochem, Alemania). Para dicho objetivo las células fueron tratadas con cantidades adecuadas de Tripsina/EDTA por unos minutos hasta lograr el desprendimiento de las células adheridas, tras lo cual se adicionó medio de cultivo, y se centrifugó a 900 g por 10 min. El *pellet* obtenido conteniendo las células fue resuspendido en 1 ml de solución de lavado provista por el proveedor (Calbiochem, Alemania), e incubado en agitación a 4°C por 5 min. Posteriormente se centrifugó a 300 g durante 10 min, repitiéndose esta operación dos veces. El *pellet* obtenido fue resuspendido e incubado a 4°C durante 10 min en agitación, en 80 μ l de solución de extracción 1, que permite la extracción de las proteínas del citosol. Luego de dicha incubación los extractos fueron centrifugados a 1000 g durante 10 min y a 4°C, obteniéndose un sobrenadante correspondiente a la fracción 1, la cual fue conservada a -20°C. Por otro lado, el *pellet* obtenido fue resuspendido en 80 μ l de solución de extracción 2, incubado a 4°C por 30 min en agitación y centrifugado a 6000 g. Así se obtuvo el sobrenadante correspondiente a la fracción 2, constituida por proteínas de las membranas celulares, el cual fue conservado a -20°C hasta su posterior utilización. Por

otro lado, el *pellet* obtenido luego de la centrifugación, fue resuspendido en 50 μ l de solución de extracción 3 suplementado con benzonasa (endonucleasa que forma parte del equipo comercial), tras lo cual fue incubado durante 10 min a 4°C en rotación. Luego de dicha incubación, se centrifugó el extracto a 6800 g a 4°C y el sobrenadante de esta operación correspondió a la fracción 3 que contiene la fracción nuclear. Para corroborar la identidad de las fracciones de citosol, membrana y núcleo se detectó la expresión de α -tubulina (α Tub), receptor de transferrina (TR) y p84, respectivamente, con anticuerpos específicos por WB.

3.13-Obtención de muestras y tratamiento para análisis del contenido de ADN por citometría de flujo.

En el análisis del ciclo celular, los núcleos fueron marcados con un fluoróforo que se une estequiométricamente con los ácidos nucleicos, siendo la intensidad de fluorescencia directamente proporcional a la cantidad de ADN. El fluoróforo utilizado fue yoduro de propidio (IP) (Sigma Aldrich, EE. UU), el cual se excita en el visible a una longitud de onda de 488 nm y emite fluorescencia de longitud de onda de 535 nm. El IP tiene avidéz tanto por el ARN como por el ADN, por lo que es necesario eliminar las cadenas de ARN para evitar posibles interferencias en la muestra. Para obtener la muestra final a ser analizada por el citómetro, se llevó a cabo un protocolo de fijación de células seguido de marcación con una solución conteniendo IP y RNasa.

Para comenzar con la fijación, las células adheridas fueron desprendidas con Tripsina/EDTA y contadas para tomar un volumen correspondiente a un millón de células. Luego, fueron lavadas con PBS frío y el *pellet* resultante fue resuspendido en 300 μ l de PBS frío. Éste fue agregado gota a gota a 8 ml de etanol 70% frío, mezclando suavemente al mismo tiempo para evitar la formación de agregados celulares. Estas muestras fueron conservadas a 4°C por un tiempo variable entre 24-72 hs. Luego de la fijación de las células, se procedió a la marcación con PI. Las células fijadas se centrifugaron, fueron lavadas con PBS frío y el *pellet* fue resuspendido en 200 μ L de PBS frío. Se agregaron 800 μ l de Buffer K (citrato de sodio 0,1%; RNasa A 0,02 mg/ml; NP-40 0,3%; PI 0,05 mg/ml; solvente PBS pH= 7,4), se incubó 1 h a 4°C en oscuridad y posteriormente, las muestras fueron analizadas con el citómetro de flujo (FACSAriaII, Becton-Dickinson, EE. UU). Una vez obtenidos los histogramas correspondientes, estos fueron analizados con el programa de computación Cylchred (Terry Hoy, Cardiff

University, Cardiff, Reino Unido), y se obtuvieron los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo celular.

3.14-Detección de eventos de transferencia de energía resonante fluorescente (FRET, del inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) por fotoblanqueo del aceptor.

-Breve fundamento de la técnica

FRET es un proceso por el cual la energía de excitación de un fluoróforo dador es transferida a una molécula aceptora por un acoplamiento dipolo-dipolo. La eficiencia de este proceso depende críticamente de la cercanía entre las moléculas ocurriendo a distancias entre 5-10nm. Por esta razón la detección de FRET es una excelente técnica para detectar interacciones directas entre proteínas (Snapp and Hegde, 2006).

De las diversas técnicas para detectar FRET, la más utilizada es el fotoblanqueo del aceptor (FB-FRET). Aquí, básicamente, se analiza la emisión de fluorescencia de la molécula dadora antes y luego de la fotodestrucción de la molécula aceptora por irradiación con luz de alta potencia. De no existir FRET entre las moléculas, la intensidad de emisión de dador permanecerá invariante. De modo contrario, se observará un aumento. En la práctica, es posible realizar este procedimiento a nivel celular utilizando microscopia de fluorescencia confocal.

-Protocolo utilizado

Se trabajó con el par mTurquoise2 (dador, de aquí en adelante mTurq2)/seyfp2 (aceptor, del inglés *super enhanced yellow fluorescencet protein 2*) (Goedhart et al., 2012). Ambas proteínas son mutantes monoméricas mejoradas en rendimiento cuántico de las proteínas fluorescentes CFP (del inglés, *cyan fluorescent protein*) e YFP (del inglés, *yellow fluorescent protein*), respectivamente. Vectores de expresión conteniendo secuencias que codifican para las diferentes proteínas de interés fusionadas a dichas proteínas fluorescentes fueron transfectados en células HEK293 y la expresión fue analizada luego de 24 hs. Para la adquisición de imágenes se utilizó un microscopio confocal de barrido laser Zeiss LSM 880. Las imágenes de emisión del dador y aceptor PRE y POST fotoblanqueo fueron tomadas en modo secuencial bajo las siguientes condiciones:

- mTurq2 λ_{exc} 458/ λ_{em} 470–490nm

- seyfp2 λ_{exc} 514/ λ_{em} 520-600 nm

El fotoblanqueo de seyfp2 se realizó en una región de interés (RI) excitando con 100 pulsos de luz de longitud de onda de 514 nm y de potencia del 50%. Para calcular la Eficiencia FRET entre proteínas fusionadas a mTurq2 y seyfp2, en primer lugar, se calculó la intensidad media de fluorescencia de mTurq2 para la RI previo y posterior al fotoblanqueo de seyfp2 en dicha región. Luego, se aplicó la fórmula previamente reportada por Karpova y colaboradores: Eficiencia FRET = $(Intensidad\ post - Intensidad\ pre) \times 100 / Intensidad\ post$ (Karpova and McNally, 2006).

Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el programa gratuito FIJI (del inglés *Fiji Is Just Image*) (Schindelin et al., 2012). Para el análisis estadístico de los datos en primer lugar se confirmó la normalidad de los mismos aplicando el test de Shapiro-Wilk. Posteriormente para corroborar la significancia estadística de las diferencias observadas en los valores promedios de Eficiencia FRET se aplicó una T de Student de una cola. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Estudio de la implicancia de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales en la regulación de la expresión de la proteína de polaridad DLG1 en distintos contextos biológicos.

En los últimos años ha avanzado notablemente el entendimiento de las funciones de DLG1 y de la regulación de su actividad a través de modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación y ubiquitinación. A pesar de esto, y como expresado en la Introducción, el conocimiento de los mecanismos de regulación de su niveles de expresión es escaso hasta el momento.

En este sentido hemos aportado con el clonado y caracterización funcional de su región promotora (Cavatorta et al., 2008). Sin embargo, resulta necesario explorar el escenario completo de los mecanismos transcripcionales y post-transcripcional que contribuyan a regular los niveles de DLG1. En base a esto, y como fuera comentado anteriormente, en nuestro laboratorio estudios previos permitieron descubrir un evento de *splicing* alternativo en la 5'UTR del ARNm para DLG1, que daba como resultado a dos isoformas transcripcionales, denominadas *Short* y *Large*, con diferentes eficiencias de traducción y potencial impacto sobre los niveles de DLG1 (ver Figura 1.4, sección 1.2.1 y Figura 1.7, sección 1.2.3, Introducción) (Cavatorta et al., 2011). Durante mi trabajo de Tesina de Lic. En Biotecnología optimizamos los parámetros experimentales para indagar en este mecanismo.

Así, el estudio de la influencia de este *splicing* y de los patrones transcripcionales en diferentes contextos biológicos donde la proteína DLG1 cumple funciones importantes es relevante, ya que puede sentar las bases para entender los mecanismos que se encuentran detrás de las variaciones en los niveles de DLG1 que frecuentemente se observan en distintos tipos de tumores (Cavatorta et al., 2004; Fuja et al., 2004; Gardiol et al., 2006).

4.1.1-Análisis de la presencia de las isoformas *Short* y *Large* en distintos tipos celulares.

A partir de la identificación del evento de *splicing* alternativo y la expresión simultánea de las isoformas transcripcionales *Short* y *Large*, en primer lugar quisimos estudiar el fenómeno en una batería de células de distinto linaje para evaluar si el mismo era conservado. Para ello, realizamos extracciones de ARN de líneas epiteliales que expresan altos niveles de DLG1, como Caco-2 y HaCat, y de otros tipos celulares en donde se conoce la expresión de DLG1 como neuronas (línea SHSY-5Y), hepatocitos (línea HepG2), monocitos (línea THP-1), progenitores mieloides (líneas K562) y linfocitos T (línea Jurkat). Luego de la retro-transcripción, realizamos una reacción de PCR multiplex que permite la amplificación de ambas isoformas transcripcionales en la

misma reacción (Figura 4.1.1, parte superior). Pudimos apreciar que evidentemente ambas isoformas se encuentran presentes en los distintos tipos celulares ensayados (Figura 4.1.1, parte inferior). Por esto fue posible concluir que el mecanismo de *splicing* estudiado probablemente es un fenómeno conservado entre células de distintos linajes y que probablemente se produzca con una eficiencia diferencial en los distintos tejidos regulando la abundancia de DLG1.

El siguiente paso consistió en estudiar algunos procesos biológicos donde este mecanismo de *splicing*, con generación de ARNm con distintas eficiencias de traducción, podría estar involucrado contribuyendo así a la definición de los niveles de DLG1. Asimismo, evaluamos los patrones de transcripción globales en los mismos contextos celulares.

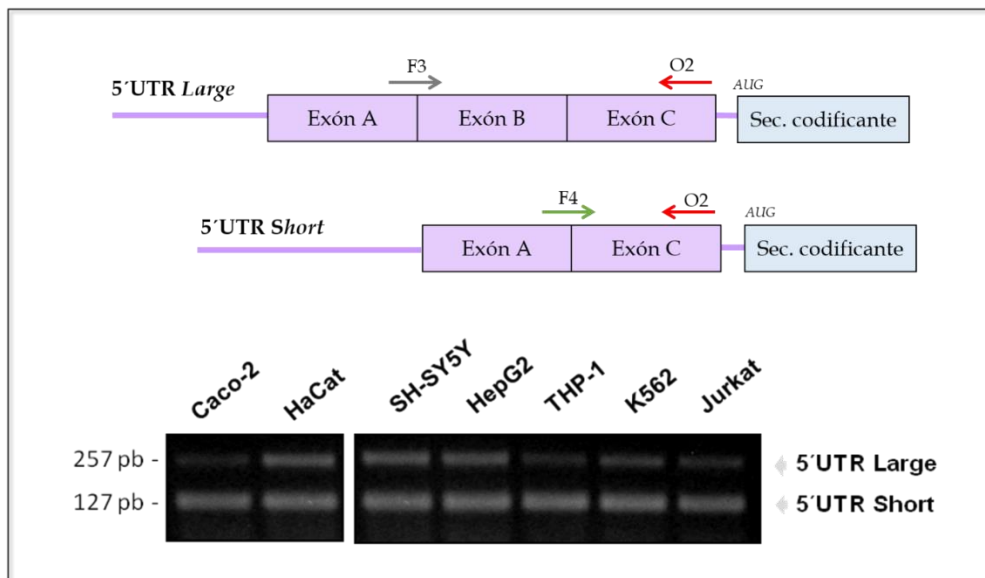


Figura 4.1.1: Expresión de las isoformas *Short* y *Large* del ARNm de DLG1 en diferentes líneas celulares. En la parte superior se muestra un esquema de las 5'UTR *Short* y *Large* (violeta) y la ubicación de los pares de cebadores para la amplificación de las mismas por PCR en tiempo final. Se utilizó el par F3-O2 para *Large* y el par F4-O2 para *Short*. En la parte inferior se muestra la amplificación de *Short* y *Large* en diferentes líneas celulares a partir de su ADNc obtenido por RT del ARNm.

4.1.2- Regulación de la expresión de DLG1 durante el aumento de la confluencia celular epitelial.

Diversos estudios empleando células epiteliales en cultivo han demostrado variaciones en el estado de fosforilación y localización de DLG1 según el grado de confluencia celular. En células aisladas, DLG1 posee expresión citoplasmática, pero a medida que la confluencia celular aumenta, la misma se concentra en los bordes

celulares (Laprise et al., 2004; Mantovani et al., 2001). Allí, forma un complejo con Caderina-E y a través de sus dominios PDZ interacciona con proteínas del citoesqueleto confiriendo estabilidad a las uniones adherentes en formación (Laprise et al., 2004; Reuver and Garner, 1998). Estas funciones de DLG1 se reproducen en epitelios polarizados como el epitelio columnar de colon y el epitelio estratificado cervical y de la piel. La importancia de DLG1 para el mantenimiento de la arquitectura epitelial se pone en evidencia al observar su disminución y pérdida en los contactos celulares durante la transformación maligna de dichos epitelios (Cavatorta et al., 2004; Gardiol et al., 2006). Teniendo en cuenta esto, encontramos interesante estudiar los mecanismos regulatorios de expresión de DLG1 durante el aumento de la confluencia celular y formación de las uniones intercelulares, con especial énfasis en la transcripción y expresión diferencial de las isoformas *Short* y *Large*.

En este sentido y de acuerdo a las optimizaciones previas, utilizamos células epiteliales Caco-2, que presentan una expresión elevada de DLG1 y poseen la capacidad de formar uniones intercelulares consistentes. Colocamos cantidades adecuadas de células Caco-2 en placas para que, luego de 24 hs de crecimiento celular, se pudieran obtener cultivos de baja (25%) o de alta (80%) confluencia, de acuerdo a la superficie del soporte ocupado por la masa celular. Pasado dicho tiempo, procesamos las células obteniendo ARN y extractos totales de proteínas, y a continuación realizamos ensayos de WB y de RT-qPCR con el fin de evaluar posibles cambios en los niveles proteicos y en los niveles de transcritos para DLG1 en relación a la confluencia.

Como se puede apreciar en la Figura 4.1.2.A, los niveles proteicos de DLG1 aumentaron considerablemente con el aumento de la confluencia celular, concordando con reportes de otros autores para otras líneas epiteliales (Mantovani et al., 2001). Al mismo tiempo, pudimos detectar un evidente aumento de aproximadamente tres veces en la abundancia de transcritos totales para DLG1 cuando se utilizan cebadores que hibridan con la región codificante del ARNm (ver sección 3.8.8, Materiales y métodos) (Figura 4.1.2.B). De manera concordante, los niveles de las isoformas *Short* y *Large* aumentaron junto con la confluencia, no obstante, los incrementos observados no fueron equivalentes para ambas variantes. La isoforma *Short*, presentó en proporción un aumento mayor (tres veces) que el de la forma *Large* (dos veces), lo que se vio reflejado en un cambio de la relación entre transcritos *Short/Large* (Figura 4.1.2.C).

Estos resultados indican que las isoformas transcripcionales *Short* y *Large* aumentan diferencialmente ante el cambio de la confluencia celular junto a un

incremento global en la transcripción del gen para DLG1. De este modo podría sugerirse un incremento en la frecuencia del *splicing* alternativo estudiado dentro de la 5'UTR, que probablemente contribuya al aumento de los niveles proteicos observados para DLG1.

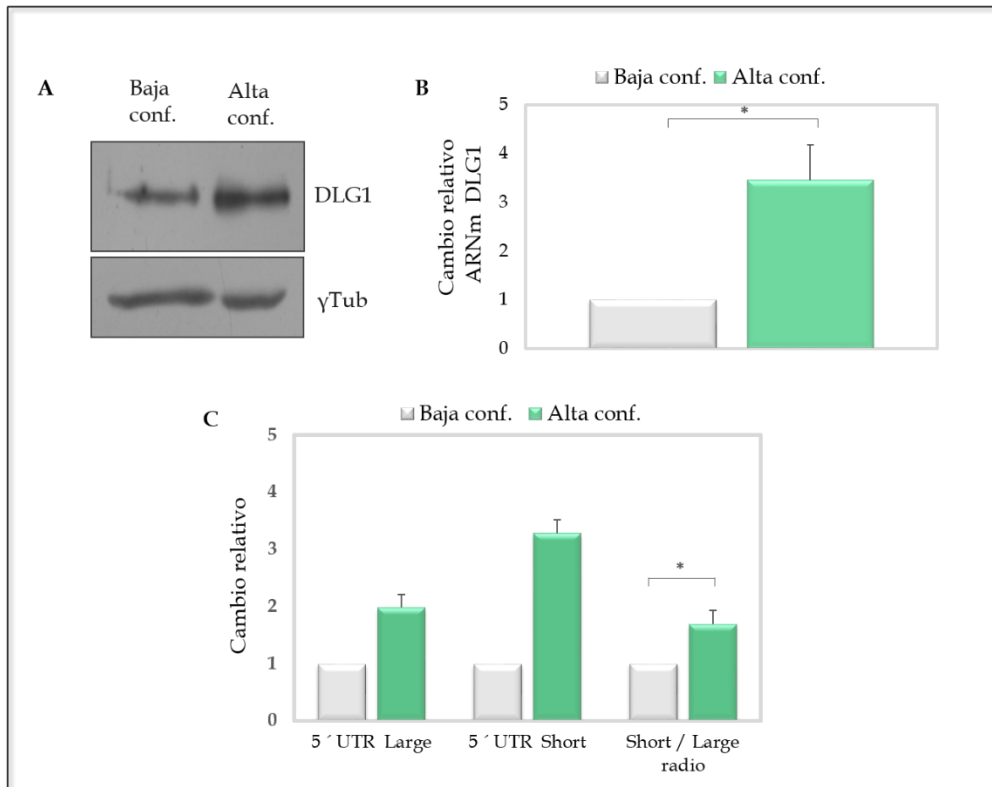


Figura 4.1.2: Expresión de DLG1 durante el aumento de la confluencia celular. A) Comparación de los niveles proteicos de DLG1 en baja y alta confluencia celular por WB. Se muestra la expresión de γ Tub como control de siembra de cantidades equivalentes de extractos proteicos en cada condición. B y C) Cambio en los niveles de transcritos totales para DLG1, de las isoformas *Short* y *Large*, y de la relación *Short/Large* al aumentar la confluencia celular. Los niveles fueron cuantificados por RT-qPCR. La cantidad de transcritos en la condición de baja confluencia celular fue considerada arbitrariamente como 1. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes y representan la media \pm SD. Se indican con asteriscos resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

4.1.3- Regulación de la expresión de DLG1 durante la progresión del ciclo celular epitelial.

El aumento de DLG1 durante el aumento de la confluencia podría llevar a un arresto en la proliferación celular. En relación a esto se ha reportado que una sobreexpresión de DLG1 en células epiteliales conduce a un bloqueo de la población celular en fase G_0/G_1 (Ishidate et al., 2000). Al mismo tiempo, la inhibición de su expresión promueve el ingreso a fase S y concomitante proliferación celular (Subbaiah

et al., 2012; Swat Ana Miletic et al., 2007). A raíz de esto y otras evidencias, se ha propuesto a DLG1 como una proteína con funciones oncosupresoras.

No obstante, muy poco se conoce acerca de la regulación de la expresión de DLG1 durante la progresión del ciclo celular. El interrogante que surgió fue si existen cambios en sus niveles durante el pasaje de fase G₁ a S, y de haberlos, cuáles serían los mecanismos involucrados. Esto último resulta interesante dado que la desregulación de dichos mecanismos de control podría conducir al desarrollo de patologías neoplásicas. Para contribuir al estudio de esta problemática, como primera medida trabajamos con cultivos de células epiteliales sincronizadas en fase G₁ y en fase S del ciclo celular.

-Sincronización de células epiteliales en fase G₁ y S del ciclo celular

Normalmente las células en cultivo no se dividen de forma sincronizada por lo que es imposible determinar en qué fase del ciclo se encuentra la mayoría de ellas en un tiempo determinado. Por ello, utilizamos la estrategia optimizada previamente de “hambre celular” (Marziali F, Tesina de Licenciatura en Biotecnología). Brevemente, se cultivaron células CaCo-2 en medio de cultivo privado de suero para lograr que, tras un determinado tiempo, la mayoría se arreste en fase G₀/G₁ como consecuencia de la ausencia de los factores de crecimiento. El posterior agregado de suero, estimula a las células a retomar el ciclo celular de una manera sincronizada permitiendo obtener una población mayoritaria en fase S. Se utilizó el protocolo de marcación de células con el fluoróforo IP, el cual se intercala estequiométricamente en el ADN nuclear y su intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad del mismo. Dicha cantidad es característica de cada fase del ciclo celular y las poblaciones en cada fase se determinan examinando a cada célula individualmente mediante citometría de flujo.

Las condiciones óptimas, esquematizadas en la Figura **4.1.3.A** fueron: 48 hs de cultivo en medio privado de suero (al 0,1%) para obtener una población mayoritaria en fase G₀/G₁ y seguido de 24 hs de cultivo en medio con 10% de suero para obtener una población con células sincronizadas mayoritariamente en fase S. En la Figura **4.1.3.B**, se muestran los histogramas para cada condición y los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo celular.

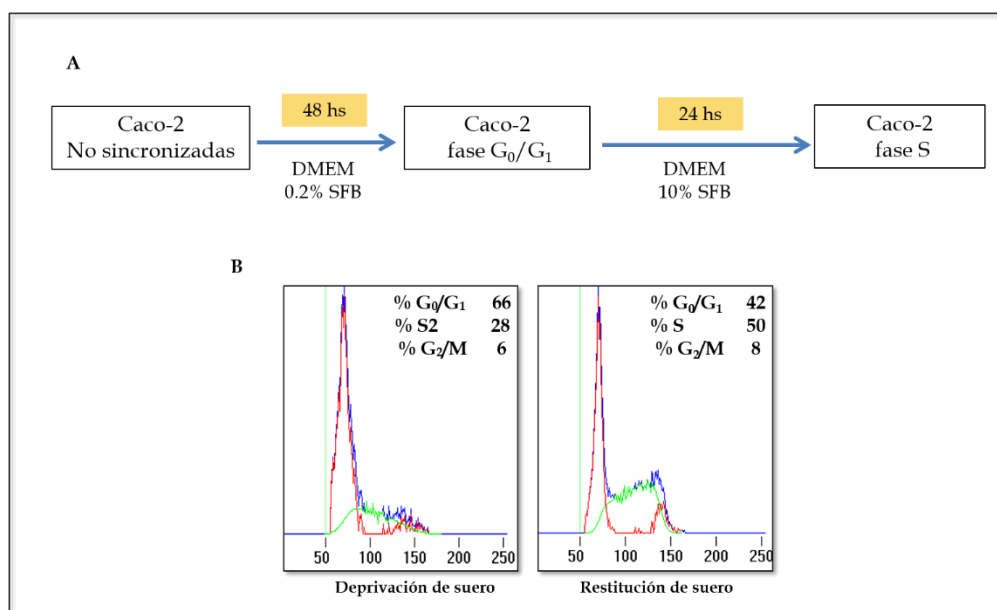


Figura 4.1.3: Sincronización de células Caco-2. A) Protocolo utilizado para obtener poblaciones en fase G₀/G₁ y en fase S del ciclo celular. B) Histogramas obtenidos por citometría de flujo para el protocolo explicado anteriormente. El área debajo de la curva de color rojo, a la izquierda de cada histograma, representa la población en fase G₀/G₁ y la correspondiente a la curva verde representa la población en fase S.

-Regulación de DLG1 en la progresión a fase S

Una vez obtenidos los cultivos de células Caco-2 sincronizados en fase G₀/G₁ y S, analizamos la expresión de DLG1 por WB y, además, incluimos la detección de Ciclina E, un marcador de fase S como control del experimento. Aquí encontramos que evidentemente existe una disminución en los niveles de DLG1 para el cultivo con población mayoritaria en fase S respecto al cultivo en fase G₀/G₁, al mismo tiempo que un aumento en el marcador Ciclina E como era esperado (Figura 4.1.4.A) (Woo and Poon, 2003). Estos resultados se encuentran en concordancia con reportes previos indicando una función de DLG1 en el control negativo de la entrada a fase S (Ishidate et al., 2000).

Para estudiar los mecanismos implicados, en primer lugar, analizamos si existen variaciones en los niveles de transcritos totales codificantes para DLG1. Llevando a cabo RT-qPCR, detectamos menores cantidades relativas (aproximadamente la mitad) de transcritos para fase S en comparación con G₀/G₁, sugiriendo que la disminución en los niveles proteicos de DLG1 podría deberse al menos a mecanismos transcripcionales (Figura 4.1.4.B). Luego, recordando que la población de transcritos estaría constituida por las isoformas transcripcionales *Short* y *Large*, quisimos investigar si el fenómeno de *splicing* podría variar durante este proceso. Los resultados mostraron que al pasar a fase S, los niveles de ambas isoformas disminuyen en la misma proporción (Figura 4.1.4.C) y

no existe variación estadísticamente significativa en la relación *Short/Large*. Esto nos indicaría que la frecuencia del *splicing* alternativo en la 5'UTR de *Large* no se vería afectada durante la progresión a fase S del ciclo celular, por lo que dicho mecanismo en este caso no jugaría un rol sinérgico en la definición de los niveles de DLG1. Esto último considerando la diferencia entre las eficiencias de traducción de las isoformas. Cabe aclarar que en cada fase *Short* se encontró en mayor proporción que *Large* (relación *Short/Large* mayor a uno).

De esta manera pudimos concluir que en un modelo de células epiteliales Caco-2, durante la proliferación existe una disminución en los niveles proteicos de DLG1 muy probablemente debida a mecanismos que reprimen la transcripción de su gen.

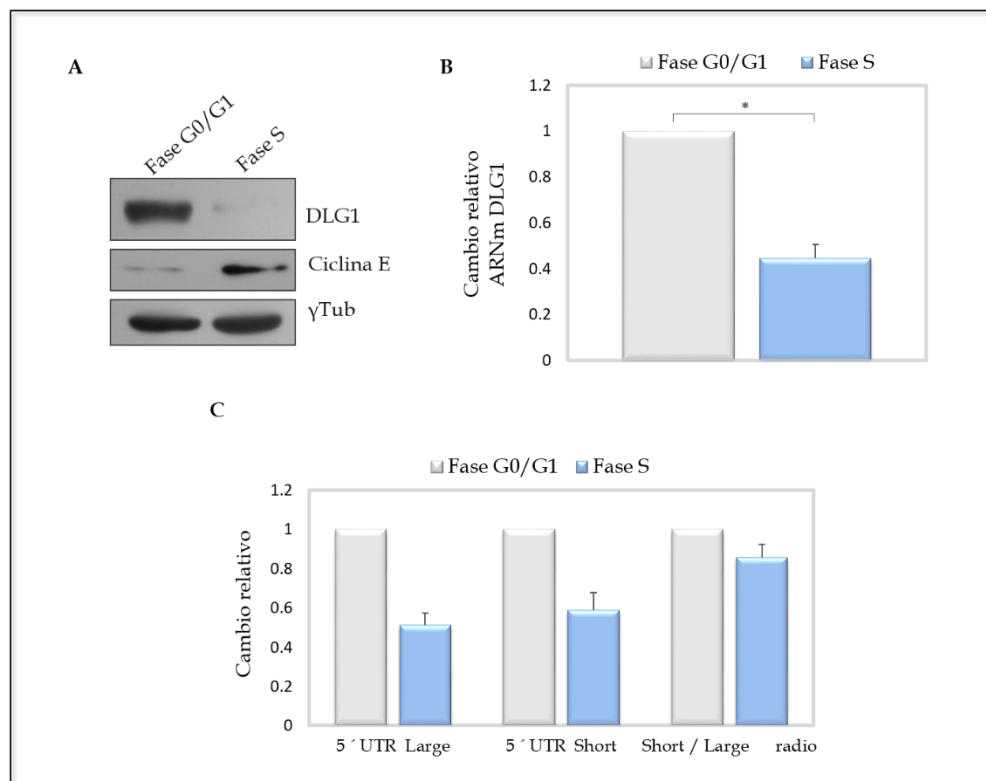


Figura 4.1.4: Expresión de DLG1 durante la progresión del ciclo celular. A) Comparación de los niveles proteicos de DLG1 en fase G₀/G₁ y fase S por WB. Se muestra la expresión de la ciclina de fase S, Ciclina E. Se muestra la expresión de γTub como control de siembra de cantidades equivalentes de extractos proteicos en cada condición. B y C) Cambio en los niveles de transcritos totales para DLG1, de las isoformas *Short* y *Large*, y de la relación *Short/Large* al progresar a fase S del ciclo celular. Los niveles fueron cuantificados por RT-qPCR. La cantidad de transcritos en la condición G₀/G₁ celular fue considerada arbitrariamente como 1. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes y representan la media ± SD. Se indican con asteriscos resultados estadísticamente significativos (p<0.05).

4.1.4-Regulación de la expresión de DLG1 durante la diferenciación celular.

Durante la diferenciación de las células epiteliales en el contexto de un epitelio escamoso se han observado importantes variaciones en la expresión de DLG1 dependiendo del grado de diferenciación de las células que componen los diferentes estratos (Cavatorta et al., 2004). Por otro lado, muy poco se conoce acerca de la expresión de esta proteína en procesos de diferenciación de otros tipos celulares. Considerando esto y para comenzar nuestros estudios en otros modelos, resultó de nuestro interés investigar la expresión de DLG1 en el proceso de diferenciación monocito-macrófago. Elegimos este sistema ya que permite analizar el fenómeno realizando un ensayo relativamente sencillo de diferenciación, empleando los monocitos que constituyen la línea celular THP-1 (ver sección 3.7, Materiales y métodos). Durante estos experimentos, llevamos a cabo la misma metodología de detección proteica y de transcritos explicada en las secciones anteriores, pero aplicada a monocitos y monocitos diferenciados a macrófagos.

Los resultados mostraron una marcada disminución proteica de DLG1 y de transcritos totales, para macrófagos en comparación con monocitos (Figura 4.1.5.A y 4.1.5.B). Al mismo tiempo detectamos la presencia de las isoformas *Short* y *Large* en estos tipos celulares y pudimos determinar cómo varían sus niveles, encontrando una disminución significativamente mayor de *Short* con respecto a la disminución de *Large* (Figura 4.1.5.C). Esto sugiere que, durante este proceso de diferenciación, además de existir una menor transcripción del gen, la frecuencia del *splicing* (el cual da lugar a la isoforma *Short*) se ve reducida, favoreciendo un aumento relativo de la forma *Large* que tiene una menor eficiencia de traducción, contribuyendo probablemente a la disminución de DLG1 detectada. Esto se vio reflejado en una disminución relativa de la relación *Short/Large* (Figura 4.1.5.C). Otra observación realizada consistió en que la proteína DLG1 detectada en macrófagos por WB, posee una migración electroforética menor que en monocitos. Cambios en la migración de DLG1 han sido relacionados a cambios en los patrones de fosforilación sugiriendo entonces que mecanismos de regulación post-traduccionales para DLG1, que podrían modificar sus actividades, también podrían estar involucrados (Suzuki et al., 1999).

Estos resultados resaltan la existencia de mecanismos transcripcionales, post-transcripcionales y post-traduccionales implicados en la regulación de esta proteína durante este proceso de diferenciación en monocitos. Es importante mencionar que

nuestros estudios son los primeros realizados para DLG1 en este tipo celular y serían necesarios otros estudios para determinar cuál es su función en estos sistemas.

De este modo, los resultados de esta primera parte de la Tesis Doctoral permiten, en primer lugar, demostrar la existencia de las isoformas transcripcionales *Short* y *Large* en células provenientes de distintos tejidos humanos. Asimismo, los datos sugieren que las proporciones relativas de las isoformas pueden variar en diferentes procesos celulares y esto podría contribuir a definir los niveles proteicos de DLG1 siempre en conjunto a mecanismos transcripcionales. Esto pone a la luz la necesidad de un estudio profundo en los mecanismos que regulan el *splicing* alternativo en la 5'UTR de DLG1, así como también de la transcripción de su gen. De esta manera, se podrían comprender los cambios en la abundancia de DLG1 en diferentes patologías, y como los mecanismos regulatorios de su expresión podrían ser manipulados como posibles blancos terapéuticos (Facciuto et al., 2012).

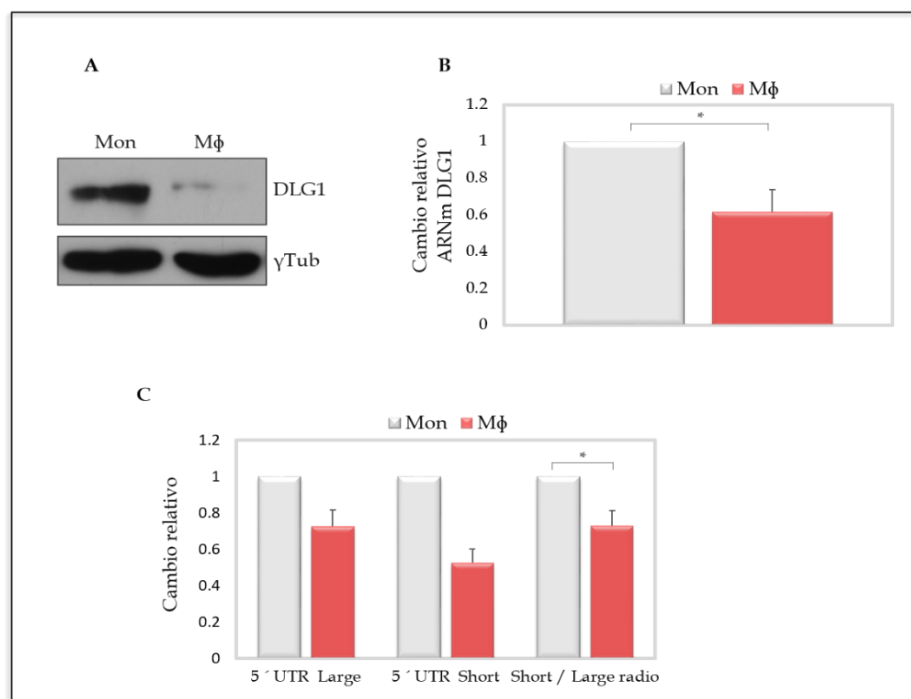


Figura 4.1.5: Expresión de DLG1 durante la diferenciación de monocito a macrófago. A) Comparación de los niveles proteicos de DLG1 para monocitos y macrófagos por WB. Se muestra la expresión de γ Tub como control de siembra de cantidades equivalentes de extractos proteicos en cada condición. B y C) Cambio en los niveles de transcritos totales para DLG1, de las isoformas *Short* y *Large*, y de la relación *Short/Large* durante la diferenciación a macrófago. Los niveles fueron cuantificados por RT-qPCR. La cantidad de transcritos en monocitos fue considerada arbitrariamente como 1. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes y representan la media \pm SD. Se indican con asteriscos resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 2

Rol de DLG1 en los procesos tumorales asociados a infecciones por HPV de alto riesgo oncogénico.

Como se ha comentado anteriormente, DLG1 es una proteína cuya expresión se ve muy afectada durante distintos procesos tumorales. En general, en los estadios neoplásicos de menor severidad sobresale su pérdida gradual desde los contactos célula-célula junto a un aumento de su expresión citoplasmática. Sin embargo, en estadios neoplásicos tardíos, sobre todo en los focos invasivos, su expresión es casi indetectable (Cavatorta et al., 2004; Fuja et al., 2004; Gardiol et al., 2006). En nuestro laboratorio, nos hemos abocado a estudiar el rol de las proteínas de polaridad en los procesos oncogénicos asociados a infecciones virales. Dentro de esto, nos propusimos indagar la incumbencia de DLG1 durante el proceso de carcinogénesis cervical, proceso asociado a la infección con HPV de alto riesgo y en donde la expresión de DLG1 varía del modo mencionado anteriormente.

Inicialmente se había identificado la interacción de E618 (E6 de HPV-18) con DLG1, y por modelos de sobre-expresión de ambas proteínas se había demostrado que E618 promueve la degradación proteolítica de la proteína de polaridad, sugiriendo una función oncosupresora de la misma (Gardiol et al., 1999). A pesar de esto, estudios llevados a cabo por nuestro grupo utilizando muestras con diagnóstico LSIL (lesiones donde el virus lleva a cabo su ciclo replicativo) demostraron que DLG1 se encuentra deslocalizada e incrementada respecto de sus niveles normales no obstante la expresión de E618 (ver Figura 1.10, sección 1.3.1.1.2.1, Introducción). Sumado a esto, evidencias aportadas por nuestro grupo y por otros (comentadas en dicha sección) indican que cambios en la localización y niveles de DLG1 podrían ser promovido por proteínas de HPV. En relación a esto, en cultivos tipo *raft* que mimetizan fehacientemente el contexto natural de la infección por HPV, la expresión conjunta de E618 y E718 a partir de su promotor natural reproduce el fenotipo observado para DLG1 en LSIL (Valdano et al., 2016).

Además, se ha sugerido la posibilidad de un rol de DLG1 durante el ciclo replicativo de HPV. En concordancia con esta hipótesis, estudios de otros grupos mostraron la necesidad del PBM en E6, y por lo tanto de su interacción con dominios PDZ, para establecer el ciclo replicativo de HPV (Delury et al., 2013; Lee and Laimins, 2004).

De esta manera se desprendieron algunas cuestiones a dilucidar. Por un lado, y de acuerdo a los datos en muestras histológicas asociadas a HPV y cultivos *raft* es evidente que la asociación de E618 y DLG1 podría no resultar siempre en la degradación de la proteína celular (Cavatorta et al., 2004; Valdano et al., 2016). Por ello resulta interesante

investigar si la interacción E618-DLG1 desarrollaría otra función, dependiente del contexto celular y relacionada a regular las funciones de E618. Asimismo, ya en el contexto del carcinoma cervical invasor (donde la expresión de E618 es muy elevada y se ha visto ausencia de DLG1, Figura 1.10) conocer qué impacto tendría la pérdida de expresión de DLG1 sobre la polaridad epitelial (Cavatorta et al., 2004). Por lo tanto, en nuestro laboratorio nos propusimos desarrollar experimentos que nos permitan dilucidar más fehacientemente la relación entre estas proteínas.

4.2.1-Análisis de la expresión subcelular de la proteína de polaridad DLG1 y la oncoproteína E6 de HPV-18 en células epiteliales.

Para comenzar consideramos necesario construir vectores plasmídicos que permitan la expresión de E618 y DLG1 fusionadas a proteínas fluorescentes, considerando la utilidad de estas últimas para su detección directa por distintas metodologías, como microscopía de fluorescencia y WB. A tal fin, por metodologías convencionales de biología molecular, introdujimos las secuencias codificantes de DLG1 y E618 en los vectores pmTurquoise2 y pseyfp2, respectivamente (para una descripción de dichos vectores ver sección 3.1 y 3.14 de Materiales y métodos). Así, obtuvimos los vectores pmTurq2-DLG1 y pseyfp2-E618, que permiten la expresión de las proteínas de interés fusionadas en extremo C-terminal de las proteínas fluorescentes reporteras mTurq2 y seyfp2 (Figura 4.2.1.A). Esto fue particularmente importante para E618, ya que de esta forma su motivo PBM C-terminal permanece libre y por lo tanto se encuentra accesible para establecer interacciones con dominios PDZ (Doyle et al., 1996; Ramirez et al., 2015). De esta manera este vector sería útil para analizar posibles asociaciones con la proteína PDZ de polaridad DLG1.

Luego, habiendo confirmado por secuenciación la identidad de los vectores obtenidos, en primer lugar procedimos a evaluar la expresión proteica a partir de los mismos. Para ello, llevamos a cabo transfecciones transientes en células epiteliales HEK293, preparamos extractos proteicos totales y analizamos la expresión de las proteínas por WB. Así, empleando un anticuerpo anti-gfp (que permite la detección de las proteínas fluorescentes mTurq2 y seyfp2) pudimos detectar bandas inmunoreactivas del tamaño molecular esperado, pertenecientes a las proteínas de fusión deseadas (Figura 4.2.1.B).

En segundo lugar, quisimos estudiar la funcionalidad de seyfp2-E618, para lo cual realizamos un ensayo de degradación de p53, uno de los blancos mejores estudiados de

E618. En este sentido, co-transfectamos células epiteliales p53 negativas de la línea H1299 con pseyfp2-E618 y pcDNA3-p53, un vector que permite la expresión de la proteína p53. Como se puede observar en la Figura 4.2.1.C, la expresión de seyfp2-E618 produjo una drástica disminución de los niveles de p53 comparando con células transfectadas con el vector vacío pcDNA3. Incluso observamos un efecto mayor que para un plásmido control denominado pCDA-E618, que permite la expresión de E618 no fusionada a proteína fluorescente. De esta manera pudimos confirmar la correcta funcionalidad de la proteína de fusión seyfp2-E618, descartando además una interferencia de la proteína reportera fluorescente seyfp2.

Una vez confirmado esto, analizamos la expresión de las proteínas de interés por microscopia de fluorescencia directa confocal. En estos casos, luego de transfectar células HEK293 individualmente con los vectores, pudimos observar que mTurq2-DLG1 se expresaba principalmente a nivel de los bordes celulares y en menor extensión en el citoplasma (Figura 4.2.1.D), de acuerdo a reportes previos (Frese et al., 2006; Oliveria et al., 2003). Por el lado de seyfp2-E618, observamos una localización principalmente nuclear y en una pequeña fracción en citoplasma, en concordancia con la localización reportada para E618 (Guccione et al., 2004; Mesplede et al., 2012). Así, los datos obtenidos nos alentaron a utilizar estos vectores para continuar nuestros estudios.

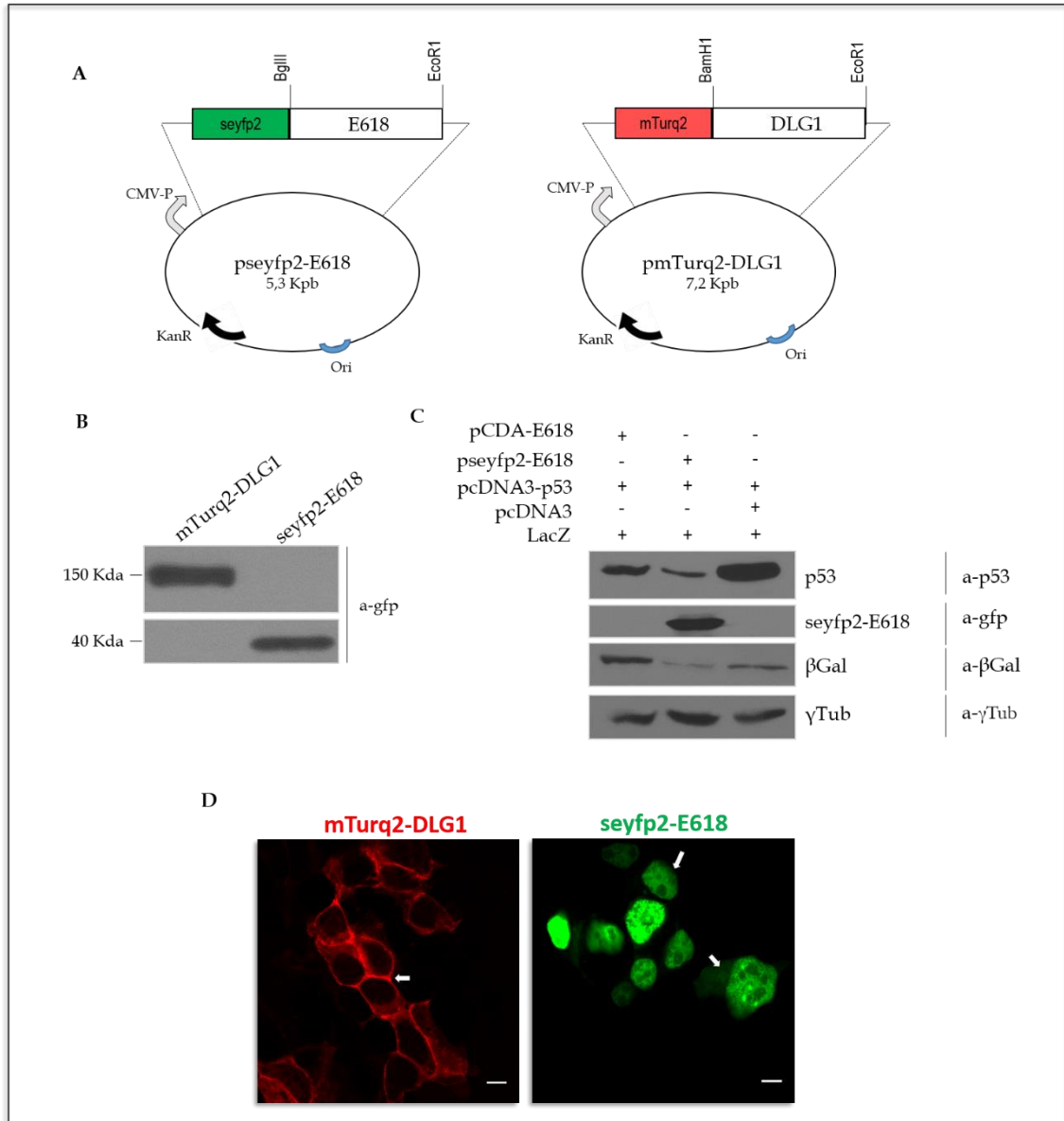


Figura 4.2.1: Análisis funcional de los vectores de expresión para las proteínas *seyfp2-E618* y *mTurq2-DLG1*. **A)** Representación esquemática de los vectores *pseyfp2-E618* y *pmTurq2-DLG1*. Se indican los sitios de restricción utilizados durante el clonado. **B)** Detección de la expresión de ambas proteínas por WB. Se transfectaron células epiteliales HEK293 y se detectó la expresión proteica utilizando un anticuerpo anti-gfp. **C)** Ensayo de degradación de p53 por parte de *seyfp2-E618*. Se transfectaron células H1299 con los vectores de expresión indicados en la figura y se detectaron los niveles proteicos con anticuerpos específicos correspondientes. Se utilizó el vector *pCDA-E618* como control positivo de degradación de p53 y el vector vacío *pcDNA3* como control negativo. En todas las condiciones se co-transfectó el vector *LacZ* codificante para β Gal y se detectó su expresión como control de eficiencia de transfección equivalente. Los niveles de γ Tub se detectaron como control de siembra de cantidades equivalentes de proteínas en todos los casos. **D)** Análisis de la localización subcelular de las proteínas *mTurq2-DLG1* y *seyfp2-E618*. Se transfectaron células HEK293 y se analizó la expresión proteica de *mTurq2-DLG1* (rojo) y *seyfp2-E618* (verde) por microscopía de fluorescencia confocal directa. Las flechas blancas señalan la expresión de cada proteína. Barra de tamaño 10 μ m.

4.2.2-Análisis de la expresión diferencial de DLG1 y E618 según la abundancia relativa de las mismas.

A continuación, nos dedicamos a profundizar en la relación entre DLG1 y E618. Como expresado anteriormente, los niveles de DLG1 cambian durante el desarrollo de lesiones asociadas a HPV (Figura 1.10, sección 1.3.1.2, Introducción), y además se ha reportado que las proteínas virales como E618 también varían en su expresión durante el desarrollo y evolución del proceso neoplásico (Cavatorta et al., 2004; Doorbar et al., 2012). Así, resultó interesante indagar como cambios en los niveles de cada una de estas proteínas (E618 y DLG1) podría influenciar sobre la expresión de la otra. Dentro de este escenario consideramos importante conocer qué efecto puede tener la sobreabundancia de DLG1 en la expresión de E618 (situación observada en las lesiones intraepiteliales cervicales), y de manera recíproca como E618 podría influenciar en la expresión de DLG1. Así, tratamos de mimetizar distintos niveles relativos de cada una de las proteínas en estudio, transfectando con cantidades variables (μg de ADN) de los respectivos vectores de expresión generados anteriormente.

Para esto, llevamos a cabo ensayos de co-transfección transiente respetando las siguientes relaciones de μg de vector **pseyfp2-E618**/pmTurq2-DLG1: **5/1**, **1/2** y **1/1**. Luego de 24 hs de cultivo celular post-transfección procedimos a obtener los extractos proteicos totales y a detectar los niveles de ambas proteínas por WB. Los resultados se muestran en la Figura 4.2.2.

En la condición **5/1**, donde los niveles de seyfp2-E618 son elevados, observamos una disminución marcada en los niveles de mTurq2-DLG1 en comparación a una condición sin expresión de la proteína viral donde utilizamos como control el vector vacío pcDNA3 (Figura 4.2.2.A, **izquierda**). Es probable que este fenómeno refleje la degradación de DLG1 estimulada por E618 a través de proteosomas, como fuera reportado previamente en condiciones experimentales similares (Gardiol et al., 1999). Sin embargo, esta disminución no fue observada para la condición **1/1**, indicando que este efecto dependería de los niveles relativos de E618 (Figura 4.2.2.A, **derecha**). Por otro lado, para la condición **1/2**, de manera interesante, pudimos observar que la abundancia de mTurq2-DLG1 se correlaciona con aumentos evidentes en los niveles de seyfp2-E618 (Figura 4.2.2.B).

Estos resultados enfatizan en primer lugar la precaución a tener en cuenta al revisar trabajos relacionados a DLG1 y E618 en forma conjunta, ya que distintos desenlaces biológicos podrían obtenerse según las condiciones de trabajo empleadas.

Así, en este marco, pusimos en evidencia que para E618 y DLG1, la expresión relativa de cada proteína condiciona los niveles de la otra, pudiendo en parte explicar lo observado en biopsias asociadas a HPV. En este sentido, estos experimentos sugieren que el aumento de DLG1 en LSIL podría constituir un posible mecanismo que regule los niveles de E618. Además, sugieren que la expresión elevada de E618, como ocurre en el estadio de carcinoma cervical, podría ser uno de los mecanismos que contribuya a los bajos niveles de DLG1 en dicho estadio.

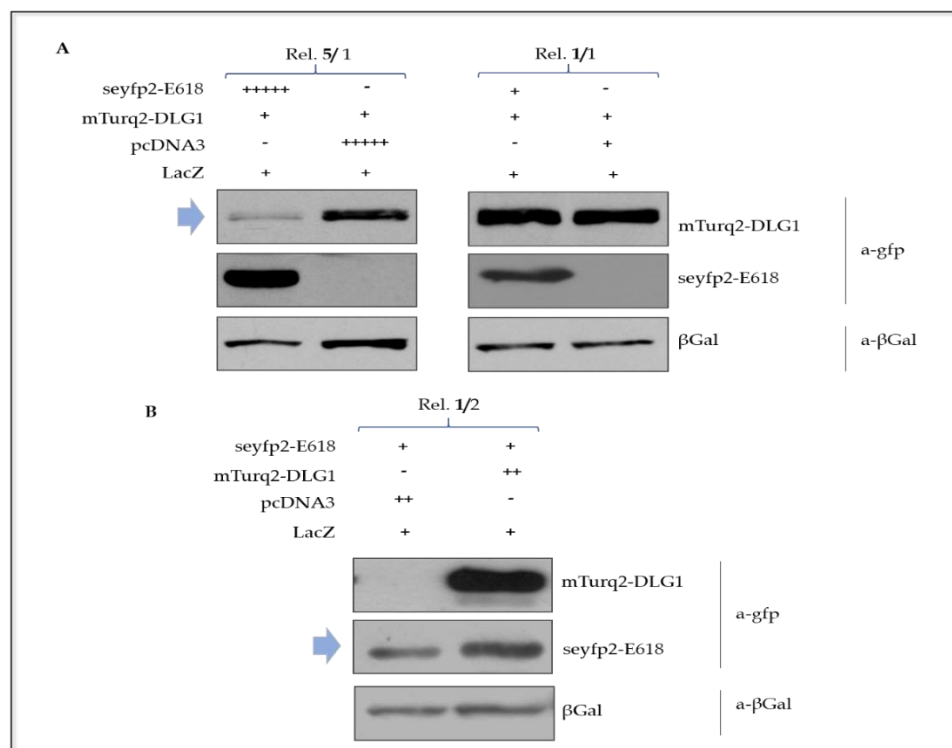


Figura 4.2.2: Análisis de la expresión diferencial de DLG1 y E618 según la abundancia relativa.

A) Efecto de un incremento de los niveles de E618 sobre la expresión de DLG1. **B)** Efecto de un incremento de los niveles de DLG1 sobre la expresión de E618. En ambos casos células epiteliales HEK293 fueron transfectadas transitoriamente con los vectores mTurq2-DLG1 y seyfp2-E618 en una relación (Rel.) específica informada de μg de seyfp2-E618/ μg de mTurq2-DLG1. Luego de 24hs se prepararon los extractos proteicos totales y se detectaron los niveles de ambas proteínas con un anticuerpo anti-gfp. En todas las condiciones se co-transfectó el vector LacZ y se detectó la expresión de β Gal como control de eficiencia de transfección equivalente entre las condiciones ensayadas.

4.2.2.1-Análisis de la interferencia en la localización subcelular de E618 por DLG1

El siguiente paso fue estudiar si los cambios en los niveles de las proteínas de interés observados anteriormente se podían también visualizar en la distribución subcelular de las mismas. Para ello seguimos el mismo protocolo descrito anteriormente en cuanto a las condiciones de co-transfección, y analizamos la

localización sub-celular de ambas proteínas por microscopia de fluorescencia confocal directa aprovechando la diferencia espectral de las proteínas de fusión. En estos experimentos, en el caso de la relación 5/1 (**seyfp2-E618/mTurq2-DLG1**), la cantidad de células co-expresando ambas proteínas fue muy baja siendo mayoritaria la población de células expresando exclusivamente seyfp2-E618. Así, esto podría reflejar la degradación de DLG1 antes comentada. Sin embargo, más relevantes fueron los resultados obtenidos para la relación 1/2, donde observamos que en la mayoría de células la localización de seyfp2-E618 cambió ante la presencia de niveles aumentados de mTurq2-DLG1. Pudimos detectar claramente una disminución de su expresión nuclear, en concomitancia con un aumento en su expresión en el citoplasma, así como también en las regiones de los bordes celulares (Figura 4.2.3) en comparación con células expresando solamente seyfp2-E618 (ver Figura 4.2.1.D, sección 4.2.1, este capítulo). Al mismo tiempo observamos un evidente patrón de co-localización de la proteína viral con mTurq2-DLG1, la cual no mostró cambios significativos en su localización subcelular (Figura 4.2.3).

De este modo, los resultados sugieren que, al menos en esta última condición (E618/DLG1, 1/2), seyfp2-E618 no interfiere significativamente con la localización de mTurq2-DLG1. Sin embargo, resaltan la posibilidad de que el aumento en los niveles proteicos de seyfp2-E618 observado anteriormente por WB en dicha condición, ocurra efectivamente en el citoplasma y en los bordes celulares, y que probablemente pueda involucrar una interacción con DLG1. Por estas razones es posible hipotetizar que el aumento en los niveles de DLG1 en lesiones HPV positivas pueda representar un mecanismo que contribuya a regular la localización subcelular de la oncoproteína E618.

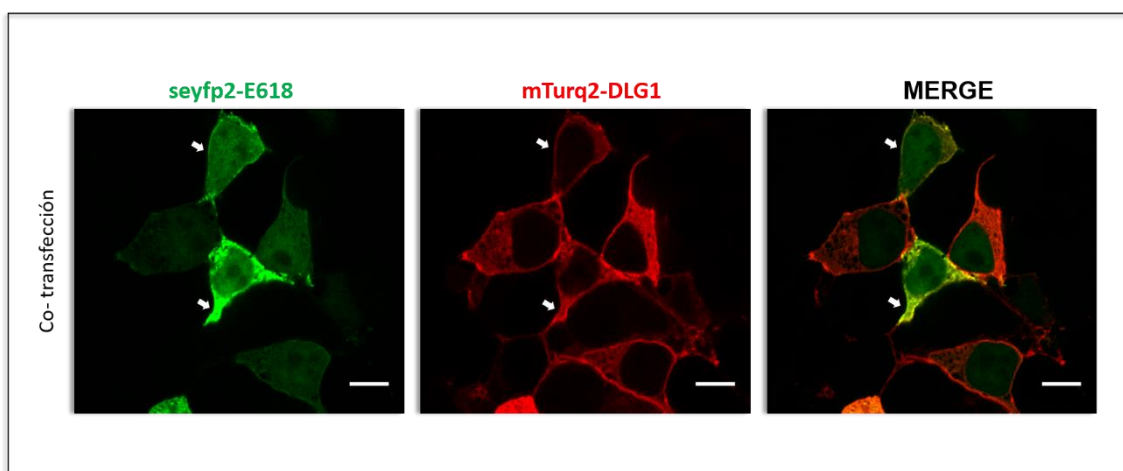


Figura 4.2.3: Análisis de la expresión subcelular de E618 en presencia de DLG1. Células HEK293 fueron co-transfectadas utilizando una relación 1/2 en μg de pseyfp2-E618/pmTurq2-

DLG1. La expresión de seyfp2-E618 (verde) y mTurq2-DLG1 (rojo) fue detectada por microscopía de fluorescencia confocal directa. Las flechas blancas señalan la localización de cada proteína. Barra de tamaño: 10µm.

4.2.3-Estudio de la interacción entre DLG1 y E618 por microscopía FRET.

De acuerdo a los resultados presentados anteriormente, donde se pudo evidenciar patrones de co-localización subcelular de ambas proteínas, investigamos una posible interacción directa entre E618-DLG1. Si bien distintos estudios bioquímicos (como unión de proteínas *in vitro*, co-IP) demostraron la interacción entre ambas proteínas por un mecanismo PDZ-PBM dependiente, hasta el momento dicha interacción no había sido demostrada con técnicas de microscopía de alta *performance* dentro de la célula (Kiyono et al., 1997).

Para esto, tomamos ventaja de las características espectrales de las proteínas fluorescentes reporteras seyfp2 y mTurq2 que se encontraban fusionadas a E618 y DLG1 respectivamente. Estas representan un par dador-aceptor óptimo para experimentos de FRET por fotoblanqueo del aceptor (FB-FRET), siendo la misma una técnica de referencia para detectar interacciones intermoleculares directas con resolución espacial y en el contexto de una célula intacta (ver sección 3.14 de Materiales y métodos para una explicación breve de la técnica).

En primer lugar, nos abocamos a optimizar esta metodología utilizando un vector de expresión denominado pmTurq2-seyfp2, control positivo que permite la expresión de mTurq2 y seyfp2 fusionados y en gran cercanía para asegurar el desarrollo de eventos FRET (Figura 4.2.4.A). Este vector fue transfectado en células epiteliales HEK293 y luego de 24hs ensayado el fenómeno FRET. Seguimos la siguiente metodología: primero procedimos al fotoblanqueo del aceptor seyfp2, seleccionando una región de interés (RI) dentro de la célula e irradiándola con luz láser de alta potencia y de longitud de onda correspondiente a la excitación de seyfp2 (514nm). Así, pudimos determinar que luego de 100 iteraciones de pulsos laser, la intensidad de emisión de fluorescencia de seyfp2 se redujo considerablemente (Figura 4.2.4.B, izquierda, panel superior, círculo discontinuo). Luego analizamos las variaciones de intensidad de fluorescencia del dador mTurq2 post fotoblanqueo. Bajo estas condiciones pudimos observar con exactitud la existencia de un evidente incremento en la intensidad de fluorescencia de mTurq2, lo que puso en evidencia la existencia de procesos FRET entre dador y aceptor.

De esta manera, quedó optimizada la técnica de FB-FRET (Figura 4.2.4.B, derecha, magnificación).

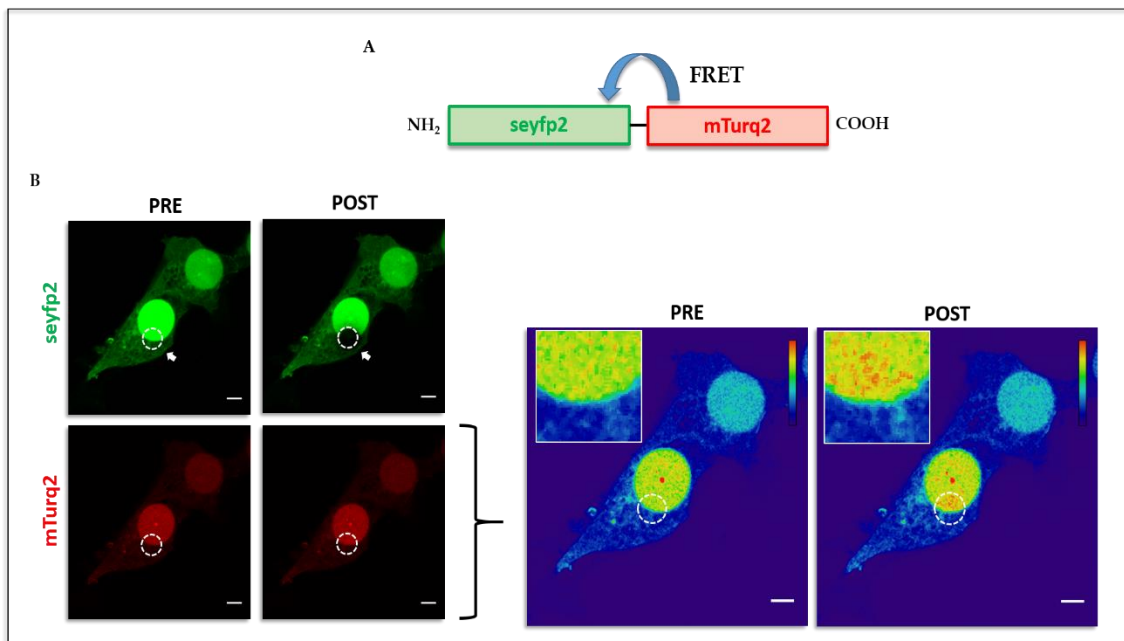


Figura 4.2.4: Optimización de la técnica FB-FRET. A) Representación esquemática de la proteína de fusión seyfp2-mTurq2 utilizada como control positivo de FRET. B) Células HEK293 fueron transfectadas con el vector pseyp2-mTurq2 y sometidas a un protocolo de FB-FRET. La expresión de seyfp2 se muestra en verde y la de mTurq2 en rojo. El círculo blanco discontinuo muestra la RI sometida al fotoblanqueo del aceptor seyfp2. En la parte derecha se muestran las mismas imágenes de expresión de mTurq2 (PRE-POST) en una escala multicolorada que permite apreciar de una manera más clara los cambios en la intensidad de fluorescencia. La escala comprende desde el violeta (menor intensidad) a rojo (mayor intensidad). PRE, pre-fotoblanqueo de seyfp2. POST, post-fotoblanqueo de seyfp2. Barra de tamaño: 5µm.

Posteriormente aplicamos esta metodología en células HEK293 sobre-expresando mTurq2-DLG1 y seyfp2-E618, en las condiciones donde se apreciaron los cambios en la localización de seyfp2-E618. Como se puede observar en la Figura 4.2.5, luego del fotoblanqueo de seyfp2-E618 en una RI que involucra citoplasma y membrana plasmática, pudimos detectar un aumento en la intensidad de fluorescencia de mTurq2-DLG1 en dicha región. Esto nos permite sugerir que los cambios en la expresión de seyfp2-E618 estimulados por mTurq2-DLG1 efectivamente involucrarían una interacción directa entre ambas proteínas. Además, estos resultados son relevantes ya que por primera vez se ponen en evidencia interacciones directas entre proteínas virales y proteínas PDZ de polaridad *in vivo* en el contexto de la célula intacta, y utilizando la tecnología de FB-FRET.

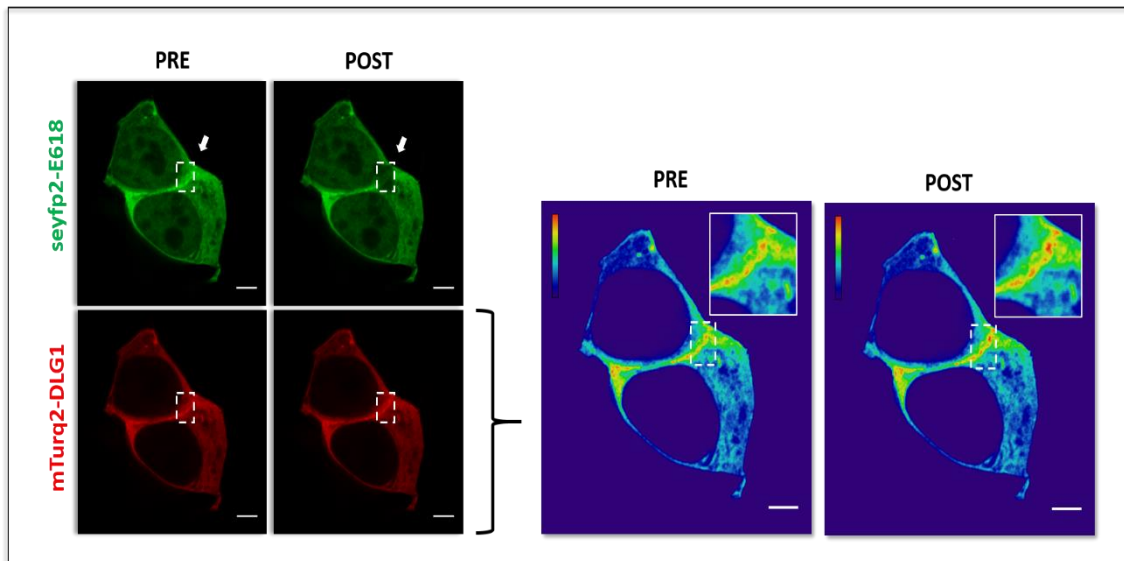


Figura 4.2.5: Ensayo de FB-FRET para E618-DLG1. Células HEK293 fueron co-transfectadas con los vectores pmTurq2-DLG1 y pseyp2-E618 y sometidas al protocolo de FB-FRET optimizado previamente. La expresión de seyfp2-E618 se muestra en verde y la de mTurq2-DLG1 en rojo. El cuadrado blanco discontinuo señalado por la flecha blanca muestra la RI sometida al fotoblanqueo de seyfp2-E618. En la parte derecha se muestra la expresión de mTurq2-DLG1 en escala multicolorada para apreciar de una manera más clara los cambios en su intensidad de fluorescencia. PRE, pre-fotoblanqueo de seyfp2-E618. POST, post-fotoblanqueo de seyfp2-E618. Barra de tamaño: 5 μ m.

Por último, para analizar la incumbencia del motivo PBM de E618 en los resultados obtenidos y confirmar la dependencia de interacción a PDZ, procedimos a construir una versión mutante de E618 delecionada en el PBM (E618 Δ PBM) (Figura 4.2.6.A, izquierda). Para ello, diseñamos cebadores adecuados y amplificamos por PCR en tiempo final la secuencia codificante para E618 Δ PBM a partir del vector pseyp2-E618. Dicho fragmento fue finalmente clonado en el vector pseyp2, permitiéndonos obtener el vector pseyp2-E618 Δ PBM. A partir del mismo pudimos observar que la versión mutante seyfp2-E618 Δ PBM posee una expresión principalmente nuclear, al igual que la versión salvaje de dicha proteína (Figura 4.2.6.A, derecha). Por lo tanto, el paso siguiente fue analizar su expresión sub-celular en presencia de mTurq2-DLG1 en la proporción 1/2 (seyfp2-E618 Δ PBM/mTurq2-DLG1). En este caso seyfp2-E618 Δ PBM mutante permaneció mayoritariamente en núcleo, no observándose redistribuciones hacia el citoplasma y membrana, así como tampoco patrones de co-localización con la proteína celular (Figura 4.2.6.B). De este modo, pudimos concluir que la interacción directa entre E618 y DLG1 estaría mediada por el PBM, y que dicho motivo estaría realmente involucrado en los cambios observados en la localización sub-celular de seyfp2-E618.

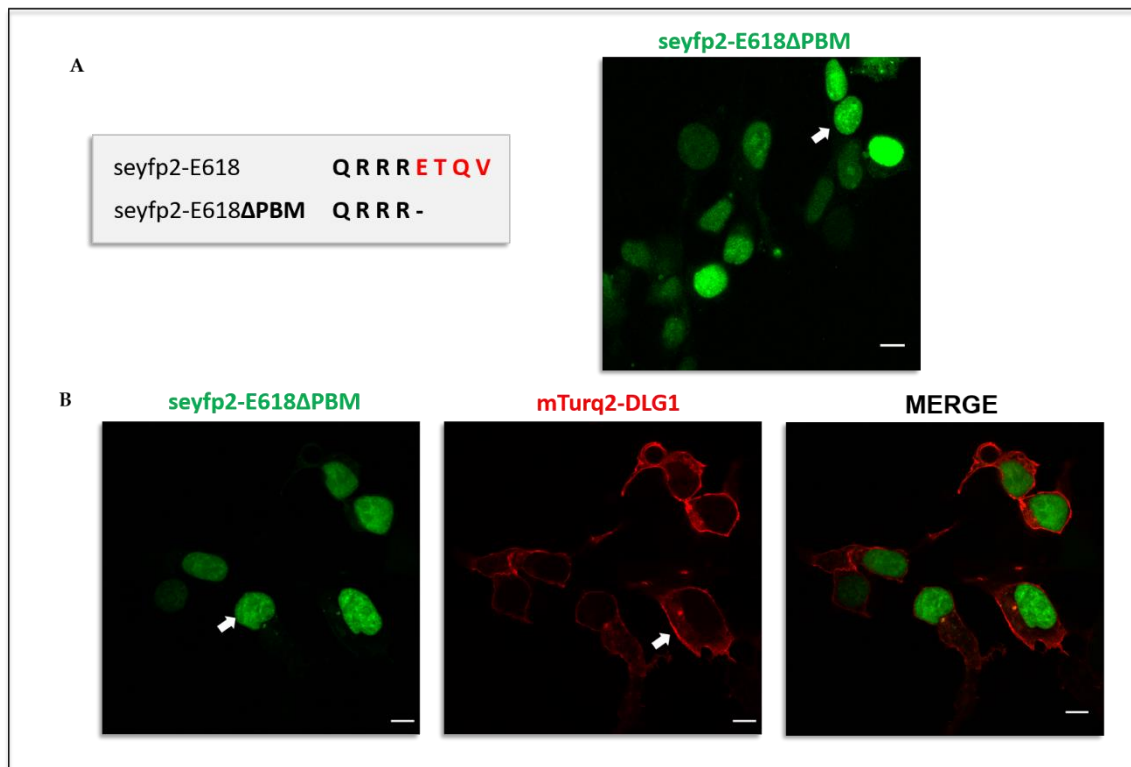


Figura 4.2.6: A) Expresión de seyfp2-E618 Δ PBM. A la izquierda se muestra la delección carboxilo terminal de la versión mutante E618 Δ PBM en comparación con la versión salvaje, cuyo motivo PBM se marca en rojo. A la derecha se muestra la expresión de seyfp2-E618 Δ PBM en células HEK293. B) Análisis de la expresión celular de E618 Δ PBM en presencia de mTurq2-DLG1. Células HEK293 fueron co-transfectadas utilizando una relación 1/2 en μ g de vector pseyp2-E618 Δ PBM/pmTurq2-DLG1. La expresión de seyfp2-E6 Δ PBM (verde) y la de mTurq2-DLG1 (rojo) fue analizada por microscopia de fluorescencia confocal directa. Las flechas blancas señalan la localización de cada proteína. Barra de tamaño 10 μ m.

En resumen, los resultados hasta el momento ponen en evidencia una relación compleja entre E618 y DLG1. Los mismos señalan hacia la construcción de una hipótesis general que plantee distintas consecuencias para la relación E618-DLG1 según los niveles de expresión de ambas proteínas. Los datos aquí presentados podrían servir como punto de partida para explicar el significado de la expresión diferencial de DLG1 en biopsias de lesiones asociadas a HPV y en cultivos organotípicos tipo *raft* expresando las oncoproteínas virales tal como se discutirá en la sección discusión.

4.2.4-Influencia de la pérdida de DLG1 en la expresión de otras proteínas de polaridad.

A pesar de la incertidumbre en los mecanismos que provocan la pérdida de expresión de DLG1 durante la carcinogénesis cervical y en los últimos estadios de otros

tipos de tumores (ver sección 1.1.5, Introducción), es interesante indagar en las consecuencias que podría traer dicha pérdida. Esto permitiría desentrañar mecanismos oncogénicos que contribuirían a entender de una manera más precisa la biología molecular de los carcinomas. Así, en esta parte el objetivo fue estudiar qué consecuencias puede traer la pérdida de DLG1 sobre la polaridad epitelial, especialmente sobre proteínas que conforman los complejos de polaridad antes descritos (sección 1.1.2, Introducción). Esto considerando que, como fue comentado en la sección 1.1.2, la expresión de estas proteínas se encuentra inter-regulada por procesos de sinergia y exclusión que aseguran su correcta localización intracelular (Coradini et al., 2011). En este contexto es notable la exclusión que existe entre el complejo SCRIB (al cual pertenece DLG1) y el complejo PAR durante la polarización de células epiteliales (Coradini et al., 2011; Pieczynski and Margolis, 2011).

En trabajos anteriores de nuestro grupo obtuvimos indicios de una posible relación entre DLG1 y la proteína de polaridad PAR3 (complejo PAR). Pudimos observar que la expresión en altos niveles de la proteína E618 inducía la deslocalización de la proteína de polaridad PAR3 (Facciuto et al., 2014). Al no poder confirmar que dicho fenómeno se debiera a una interacción directa entre las mismas, consideramos la incumbencia de efectos indirectos provenientes de la interferencia de E618 con otros blancos de polaridad. En este sentido, experimentos preliminares por IF presentados en la Tesis Doctoral de la Dra. Florencia Facciuto, arrojaron que la ablación de DLG1 inducía un cambio en la marcación de PAR3 disminuyendo su expresión en los bordes celulares con un incremento en la zona del citoplasma y núcleo. De este modo obtuvimos una primera evidencia de relación funcional entre DLG1 y PAR3.

Por lo tanto, decidimos profundizar en este hallazgo realizando experimentos que permitan definir de una manera más precisa lo observado. Esta parte del trabajo fue llevada a cabo gracias a una Beca Jorge Oster 2015 otorgada por la Fundación Bunge y Born, que me permitió trabajar por un período de cuatro meses en el laboratorio de Virología Tumoral liderado por el Dr. Lawrence Banks en el *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology* (ICGEB), Trieste, Italia. El laboratorio del Dr. Banks cuenta con líneas epiteliales caracterizadas por una expresión muy baja o casi nula de determinadas proteínas de polaridad debido a mecanismos de silenciamiento génico por siARN (Massimi et al., 2012). De especial interés nuestro fue una línea de queratinocitos inmortalizados HaCat transfectados establemente con un vector expresando ARN de interferencia para DLG1 (siDLG1). Haciendo uso de esta línea planeamos ensayos de

fraccionamiento sub-celular para obtener las fracciones proteicas correspondientes al citosol, membrana y núcleo, y luego por WB detectar la expresión de PAR3 y analizar si la misma se ve afectada ante la ausencia de DLG1. A modo de control decidimos realizar este procedimiento además empleando una línea de queratinocitos (denominado siTR2) transfectado establemente con un vector vacío no codificante para siARN.

Como se puede observar en la Figura 4.2.7 a la izquierda, los resultados mostraron que la ablación permanente de DLG1 provocó una disminución de PAR3 en la fracción de membranas. Al mismo tiempo apreciamos un incremento de PAR3 en la fracción citosólica y en la fracción correspondiente al núcleo. Esto siempre en comparación con la línea control siTR2. Estos resultados coinciden con nuestros hallazgos previos en los que la expresión de E618 promovía una redistribución de PAR3 desde su localización normal en los contactos celulares asociada a membrana (UT) hacia núcleo y citoplasma (Facciuto et al., 2014).

Para confirmar los resultados mostrados en Figura 4.2.7 izquierda, realizamos una trasfección transiente en células HaCat con siDLG1 o ARN de interferencia para Luciferasa (siLuci). Esta última como control negativo de silenciamiento funcionando de manera homologa a siTR2. En este caso obtuvimos resultados similares a los arrojados por silenciamiento estable (Figura 4.2.7, derecha).

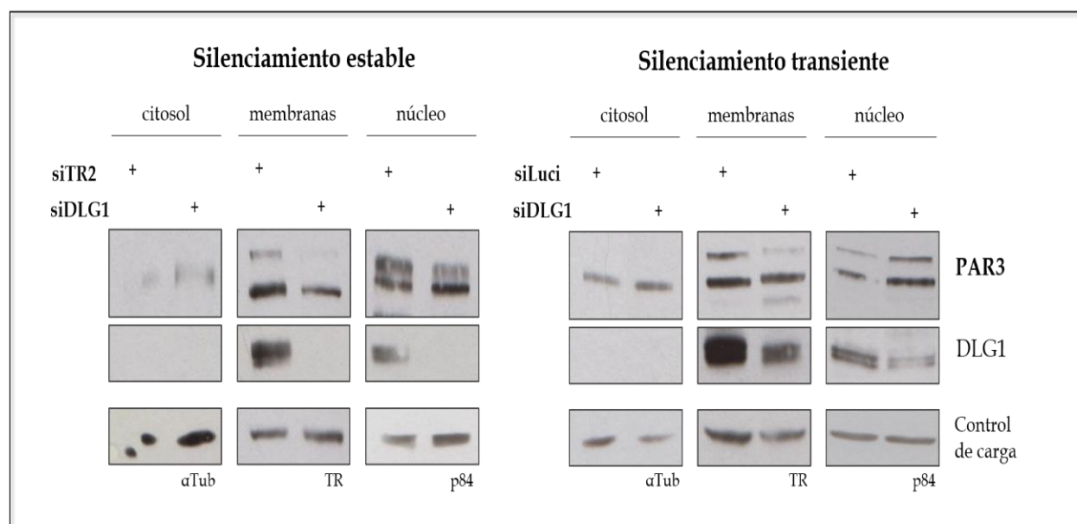


Figura 4.2.7: Efecto de silenciamiento de DLG1 sobre la distribución subcelular de PAR3. Análisis de la redistribución de PAR3 entre distintas fracciones subcelulares de células HaCat silenciadas para DLG1 de manera estable (panel de la izquierda, control siTR2) o transiente (panel de la derecha, control siLuci). La inmunodetección de los niveles de expresión de PAR3 y DLG1 en las distintas fracciones se realizó con anticuerpos específicos. Se detectó la expresión de marcadores específicos de las distintas fracciones como control de cantidades equivalente de proteínas. La detección se realizó utilizando los siguientes anticuerpos: a-αTub (fracción citosólica), a-TR (fracción de membrana) y a-p84 (fracción nuclear).

Por lo tanto, estos resultados confirman los datos obtenidos anteriormente por la Dra. Facciuto, sugiriendo así una implicancia de la expresión de DLG1 en la regulación de la distribución subcelular de PAR3. En este contexto, si bien es interesante la disminución de PAR3 en membranas considerando sus funciones oncosupresoras en dicho contexto, es más llamativa aun su acumulación en núcleo. Esto considerando que se han reportado funciones nucleares de PAR3 relacionadas a la estimulación de la proliferación celular (Nakamura et al., 2016; Zhang et al., 2016). En conclusión, si bien son necesarios más estudios que permitan conocer el mecanismo implicado, estos datos contribuyen a descifrar el impacto que tendría la pérdida de expresión de DLG1 en los estadios más avanzados del desarrollo de distintos tumores malignos, incluido el carcinoma cervical.

CAPÍTULO 3

Rol de DLG1 en los procesos tumorales asociados a infecciones por HTLV-1

Las propiedades oncogénicas y la persistencia del HTLV-1 requieren en gran parte de la expresión de la oncoproteína Tax1. Dentro sus blancos celulares, como se ha expresado en la sección 1.3.2.2, se encuentran las proteínas con dominios PDZ y dentro de ellas, las pertenecientes al complejo de polaridad SCRIB, fenómeno compartido con E6 de HPV de alto riesgo.

Así, DLG1, miembro del complejo SCRIB, fue reportada como un blanco de Tax1 tanto en modelos de células epiteliales como en células linfoides (Suzuki et al., 1999). Más aún, y como fue comentado en la sección 1.3.2.2, la expresión de Tax1 provoca una redistribución de DLG1 desde la fracción celular soluble hacia la insoluble, proponiéndose la formación de agregados tipo vesiculares a lo largo del citoplasma con un impacto negativo en el control de la proliferación celular (Aoyagi et al., 2010). Sin embargo, no se ha estudiado la naturaleza de dichos agregados ni tampoco si los mismos involucran estructuras subcelulares u organelas definidas donde la interacción Tax1-DLG1 podría tener un rol más activo en la inmortalización celular, así como en la replicación y transmisión viral. Esto es importante ya que se ha demostrado que Tax1 se relaciona con el tráfico intracelular y, además, puede localizar en distintos compartimientos celulares lo cual es importante para sus funciones oncogénicas y en la replicación viral.

Asimismo, existen trabajos que han reportado que una ablación de DLG1, además de afectar el control de proliferación celular, conduce a una reducción en la formación de uniones entre células linfoides infectadas y no infectadas, lo cual es esencial para la transmisión del genoma viral (Yoshida et al., 2008). Esto sugiere que DLG1 sería necesaria para regular procesos intracelulares durante el ciclo de replicación del HTLV-1.

Dicho esto, en esta última parte de la Tesis doctoral quisimos estudiar más profundamente la relación entre DLG1 y la proteína patogénica Tax1 tratando de comprender la función biológica de la asociación de estas dos proteínas y su potencial incumbencia en el ciclo viral y el desarrollo de patologías.

4.3.1-Análisis de la expresión subcelular de la oncoproteína viral Tax1.

Para comenzar a estudiar la relación entre las proteínas comentadas, en primer lugar, construimos un vector que permite la expresión de Tax1 fusionada a la proteína fluorescente *seyfp2*, utilizada con éxito en los experimentos comentados en el capítulo anterior. Para ello, amplificamos la secuencia de Tax1 por PCR en tiempo final utilizando

como molde ADN genómico de la línea celular linfóide MT2 que posee el genoma de HTLV-1 integrado. Los cebadores usados en esta reacción fueron diseñados conteniendo sitios de corte para enzimas de restricción lo que nos permitió luego el clonado direccional del amplicón en el vector pseyfp2 (Figura 4.3.1.A). Finalmente, confirmamos la identidad del constructo pseyfp2-Tax1 por secuenciación nucleotídica.

A continuación, transfectamos el vector obtenido en células HEK293 y luego ensayamos la expresión de seyfp2-Tax1 por WB y por microscopía de fluorescencia confocal directa. Así, utilizando un anticuerpo anti-gfp detectamos una banda única de peso molecular esperado (60 Kda) y con respecto a su expresión subcelular, pudimos observar que se expresó preferentemente en núcleo y también en forma de puntos en zonas cercanas al mismo, así como en zonas más alejadas (Figura 4.3.1.B). Esto último tiene sentido considerando que fue reportada la co-localización de Tax1 con marcadores de distintos compartimientos subcelulares como núcleo, endosomas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, vesículas exocíticas, centrosoma e incluso autofagosomas (Alefantis et al., 2005; Alefantis et al., 2007; Huang et al., 2009; Jaworski et al., 2014; Nejmeddine et al., 2005; Ren et al., 2015). La expresión observada de seyfp2-Tax1 coincide con la bibliografía reportada, la cual estableció a su vez que la expresión de esta proteína viral no se ve afectada por la fusión de ningún *tag* o proteína fluorescente y que en modelos epiteliales es similar a la expresión detectada en modelos linfocitos (Meertens et al., 2004).

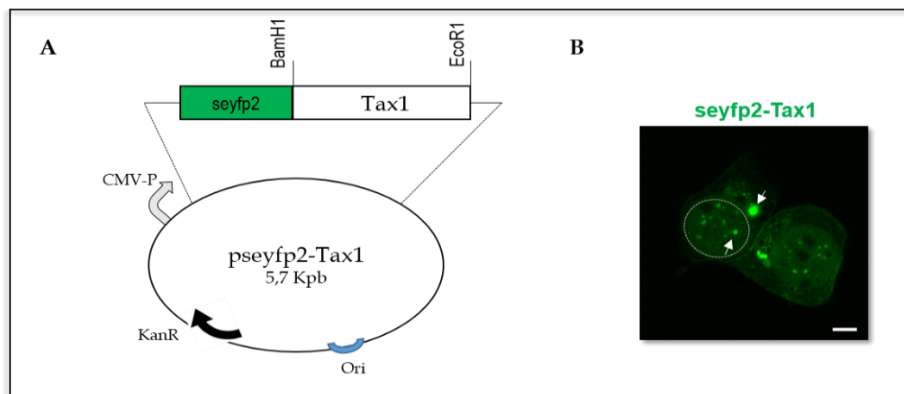


Figura 4.3.1: Expresión de seyfp2-Tax1. A) Representación esquemática del vector pseyfp2-Tax1. Se indican los sitios de restricción utilizados para el clonado B) Expresión subcelular de seyfp2-Tax1. Se transfectaron células HEK293 con el vector pseyfp2-Tax1 y la expresión proteica fue analizada por microscopía confocal directa. Las flechas blancas señalan la expresión de seyfp2-Tax1. El círculo de líneas discontinuas indica el núcleo celular. Barra de tamaño: 5 μ m.

4.3.2-Análisis de la co-expresión de Tax1 y la proteína de polaridad DLG1.

Asegurada la identidad del vector pseyfp2-Tax1 obtenido, procedimos a su transfección en células HEK293 junto al vector pmTurq2-DLG1 descrito en el capítulo 2 y analizamos la expresión subcelular de ambas proteínas de interés. De manera interesante, la localización de mTurq2-DLG1 se vio considerablemente alterada, observándose claramente la pérdida de su expresión en los bordes celulares y al mismo tiempo un patrón de co-localización de señales con seyfp2-Tax1 (Figura 4.3.2.A, **panel inferior**). El mismo fue consistente en todas las células co-transfectadas, observándose en estructuras cercanas al núcleo, así como en menor medida en zonas cercanas a los bordes celulares y en la zona media del citoplasma. En tanto, la expresión de seyfp2-Tax1 también se vio alterada, perdiendo su expresión nuclear. En este punto, no observamos cambios en los niveles proteicos de mTurq2-DLG1 en presencia de seyfp2-Tax1, descartando así eventos de degradación de la proteína de polaridad (Figura 4.3.2.B). Cabe mencionar además que en estos experimentos no detectamos variaciones en los niveles de la proteína viral. Estos resultados, en comparación a los obtenidos para E618-DLG1, indican una significancia diferente de DLG1 como blanco de Tax1 (ver sección 4.2.2, Capítulo 2). Así, en conjunto, los datos presentados sugieren que Tax1 interfiere con la localización de DLG1, pero al mismo tiempo esta última cuando sobre-expresada podría modular la localización de la proteína viral dirigiéndola posiblemente hacia alguna estructura citoplasmática.

Posteriormente quisimos indagar la incumbencia del motivo PBM de Tax1 en este fenotipo, considerando que había sido reportado que la asociación entre las proteínas era PBM-PDZ dependiente. Para ello, construimos una versión de Tax1 mutada en su PBM por PCR en tiempo final utilizando un cebador reverso que introdujo dos mutaciones puntuales en el mismo. En la Figura 4.3.3.A pueden observarse los cambios aminoacídicos introducidos, los cuales fueron escogidos según reportes de otros autores sugiriendo su utilidad para abolir interacciones con dominios PDZ (Doyle et al., 1996). Obtenido el vector pseyfp2-Tax1Mut, analizamos su expresión subcelular y luego repetimos el mismo experimento llevado a cabo con la versión salvaje de la proteína viral. Así, si bien la expresión de la versión mutante fue similar a la proteína salvaje (Figura 4.3.3.A, **a la derecha**), al co-expresarse con mTurq2-DLG1 no detectamos ningún cambio significativo en sus respectivas localizaciones ni co-localización de señales (Figura 4.3.3.B). Por lo tanto, pudimos concluir que la interferencia recíproca entre

seyfp2-Tax1 y mTurq2-DLG1 observada anteriormente es altamente dependiente del motivo PBM presente en extremo carboxilo terminal de Tax1, como era esperado.

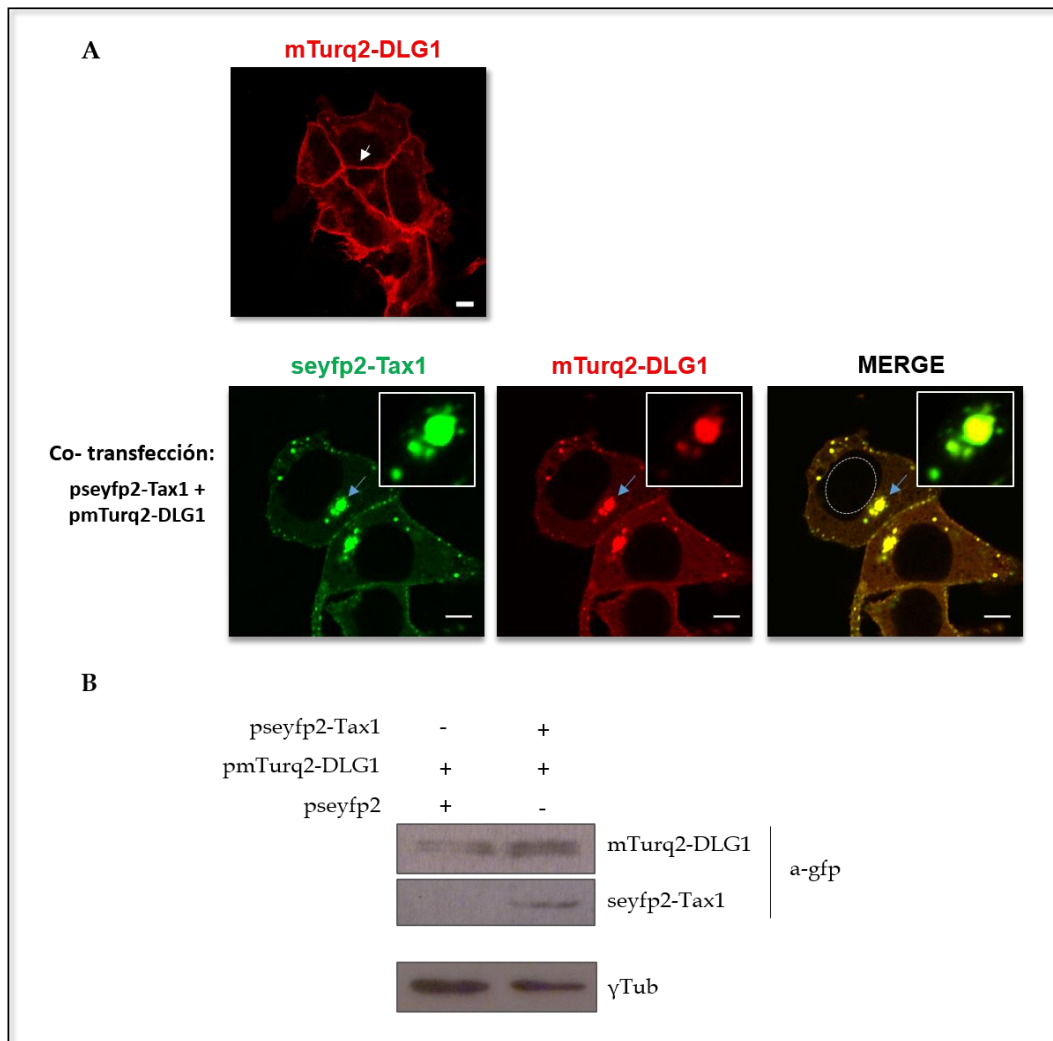


Figura 4.3.2: Análisis de la co-expresión de seyfp2-Tax1 y mTurq2-DLG1 en células epiteliales. **A)** Expresión subcelular de mTurq2-DLG1 y seyfp2-Tax1 en experimentos de co-expresión. En la parte superior se muestra la expresión normal de mTurq2-DLG1 (rojo) en células HEK293. En la parte inferior, este vector fue co-transfectado junto a pseyfp2-Tax1 (verde) y la expresión proteica fue analizada por microscopia confocal. Las flechas azules señalan la zona de co-localización magnificada en la parte superior derecha de cada imagen. El círculo de líneas discontinuas indica el núcleo celular. Barra de tamaño: 5 μ m. **B)** Análisis de los niveles de mTurq2-DLG1 en presencia de seyfp2-Tax1. Células HEK293 fueron co-transfectadas con los vectores pseyfp-Tax1 y pmTurq2-DLG1. Luego de 24hs se prepararon los extractos proteicos totales y se detectaron los niveles de ambas proteínas con un anticuerpo anti-gfp. Como control se realizó el mismo procedimiento utilizando el vector pseyfp2 en lugar de pseyfp2-Tax1. Se muestra la expresión de γ Tub como control de siembra de cantidades equivalentes de extractos proteicos en cada condición.

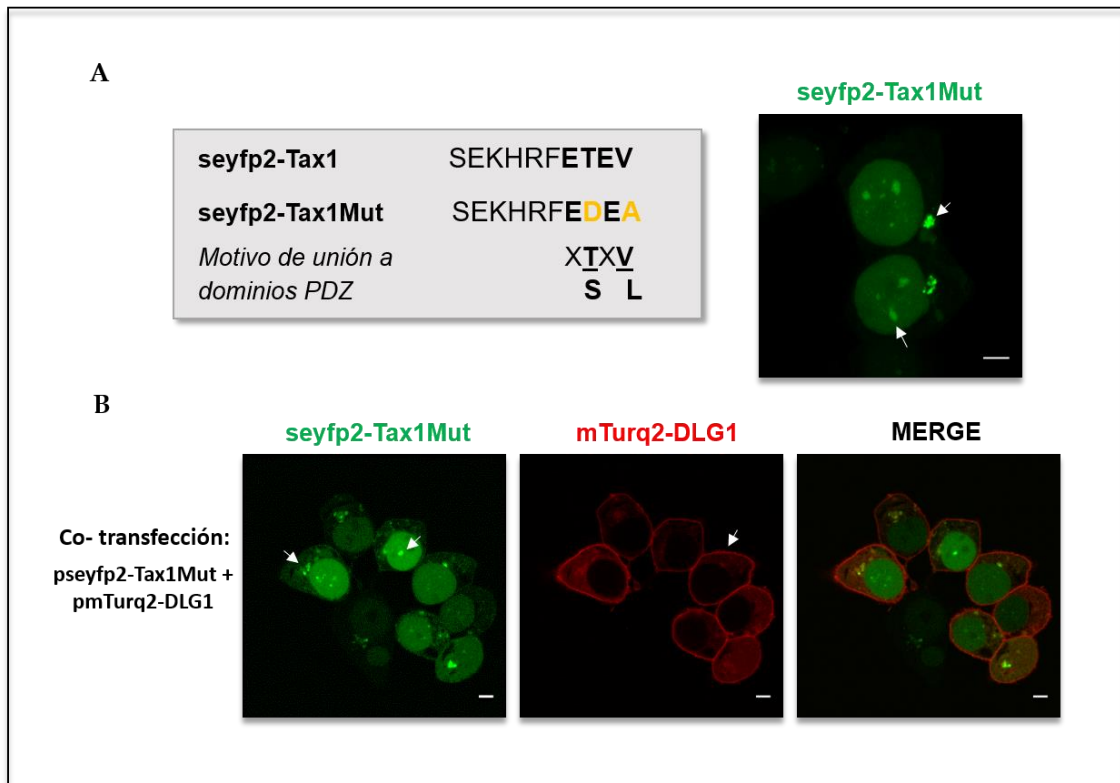


Figura 4.3.3: A) Expresión de seyfp2-Tax1Mut. A la izquierda se muestra una representación esquemática del extremo C-terminal de Tax1. En negrita se resalta el motivo PBM de Tax1 y debajo se aprecia en naranja las mutaciones puntuales introducidas en la versión mutante, seyfp2-Tax1Mut. Además, se muestra el motivo consenso de unión a dominios PDZ, donde X representa a cualquier aminoácido. A la derecha se muestra la expresión de la mutante seyfp2-Tax1Mut. B) Análisis de la co-expresión de seyfp2-Tax1Mut (verde) y mTurq2-DLG1 (rojo) en células epiteliales. Las flechas blancas señalan la expresión de cada proteína. Barra de tamaño: 5 µm.

4.3.2.1- Ensayos para analizar la especificidad de la asociación Tax1-DLG1

Antes de continuar con nuestros estudios surgió el interrogante de si el patrón de co-localización obtenido era específico o podría ser en realidad un artefacto debido a la sobre-expresión de mTurq2-DLG1, y por lo tanto de dominios PDZ. Esto último teniendo en cuenta, que se había reportado que otras proteínas con dominios PDZ, como hSCRIB y MAGI-I, etc, también sufrían una alteración de su localización con la formación de agregados en presencia de Tax1. Para dilucidar esto, investigamos si lo mismo podría ocurrir con la sobre-expresión de proteínas PDZ no reportadas previamente como blancos de Tax1 hasta el momento. Consideramos así a la proteína PAR3, factor importante en la polarización requerida para la migración y activación antigénica de linfocitos (Gerard et al., 2007; Ludford-Menting et al., 2005). Convenientemente esta proteína posee tres dominios PDZ de alta homología a los

presentes en DLG1, sin embargo, al fin de nuestro propósito, primero fue necesario comprobar si en verdad esta proteína PDZ no era un blanco de Tax1.

4.3.2.1.1-Estudio de PAR3 como blanco de Tax1

En primer lugar, llevamos a cabo experimentos de interacción *in vitro* enfrentando la proteína Tax1 purificada a un extracto de células epiteliales HEK293 para analizar luego si existía interacción entre Tax1 y PAR3. Para ello, clonamos la secuencia codificante de Tax1 amplificada por PCR en el vector pGEX2T, que permite su expresión como fusión a la GST, útil para su posterior purificación utilizando una resina de glutatión agarosa (Figura 4.3.4.A). El vector pGEX2T-Tax1 fue transformado en bacterias y procedimos a evaluar la expresión proteica empleando una concentración estándar de 1,5 mM de IPTG (inductor necesario para la expresión a partir de pGEX2T). Así, pudimos observar luego de la inducción una banda diferencial de tamaño esperado y correspondiente a GST-Tax1 (Figura 4.3.4.B). Utilizamos el mismo protocolo con el vector pGEX2T para obtener la proteína GST libre utilizada como control negativo en nuestros ensayos.

Luego desarrollamos este protocolo a mayor escala y llevamos a cabo la purificación utilizando la resina de glutatión agarosa (ver sección 3.9.5, Materiales y métodos). Esta resina enriquecida con GST-Tax1 fue incubada con un extracto proteico de células HEK293 y sometida a sucesivos lavados para eliminar interacciones inespecíficas. Finalmente ensayamos la presencia de PAR3 y DLG1 (control positivo) en la fracción proteica que interaccionó con GST-Tax1. Así, no pudimos detectar bandas correspondientes a PAR3, como sí ocurrió para DLG1, concordando con reportes previos (Figura 4.3.4.C) (Suzuki et al., 1999). Esto indicó *i*) la funcionalidad del ensayo al poder detectar la unión Tax1-DLG1 y, *ii*) que en este modelo *in vitro* Tax1 no sería capaz de interaccionar con PAR3.

A continuación, consideramos que quizás podrían requerirse procesos intracelulares para establecerse una interacción entre Tax1 y PAR3, siendo favorecida la interacción *in vivo*. Para indagar en esto planeamos ensayos de co-IP a partir de células HEK293 transfectadas con el vector pGW1-HA-Tax1, que permite la expresión de Tax1 fusionada al epítipo HA de la hemaglutinina del virus de la influenza A. A partir de las mismas preparamos extractos proteicos y utilizamos el anticuerpo a-HA para la IP de HA-Tax1. Como control negativo realizamos el mismo procedimiento, pero transfectando con el vector vacío pcDNA3 en lugar de pGW1-HA-Tax1. Luego, incubamos los extractos con Proteína A Sefarosa para separar los inmunocomplejos, y

lavamos extensamente para eliminar las interacciones inespecíficas. Las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron de la resina y se resolvieron en SDS-PAGE. En todos los casos separamos una parte del extracto previo a la IP, como control de expresión de PAR3 en cada una de las muestras (Inputs). Los resultados, mostrados en la Figura 4.3.5, no arrojaron la presencia de bandas inmunoreactivas de PAR3 en los inmunocomplejos obtenidos luego de la IP de HA-Tax1. Por lo tanto, al menos en este modelo celular usado previamente para demostrar otros blancos PDZ de Tax1, es poco probable la existencia de una interacción consistente entre Tax1 y PAR3.

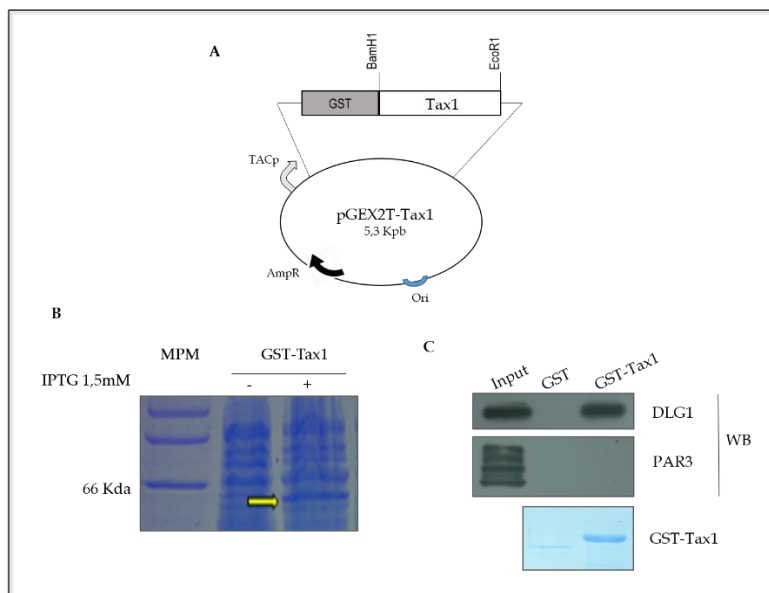


Figura 4.3.4: Ensayo de interacción Tax1-PAR3 *in vitro*. **A)** Representación esquemática del vector pGEX2T-Tax1 construido. Se muestran los sitios de restricción utilizados durante el clonado de Tax1. **B)** Inducción de la expresión de GST-Tax1 en *E. coli DH5a*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% y posterior teñido con azul de Coomassie. Se observan las proteínas de los extractos totales obtenidos a partir de cultivos bacterianos de 3 ml, previamente inducidos con IPTG 1,5mM. Se señala con flecha amarilla la expresión de la proteína GST-Tax1. **C)** Ensayo de interacción de GST-Tax1 a PAR3. La fracción proteica unida a la resina enriquecida en GST-Tax1 o GST (control negativo), luego del ensayo de unión usando extractos celulares de HEK293, fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida, y a posteriori se evaluó la presencia de DLG1 y PAR3 por WB. La calle denominada Input representa el control de expresión de DLG1 o PAR3 en el extracto proteico empleado en el ensayo.

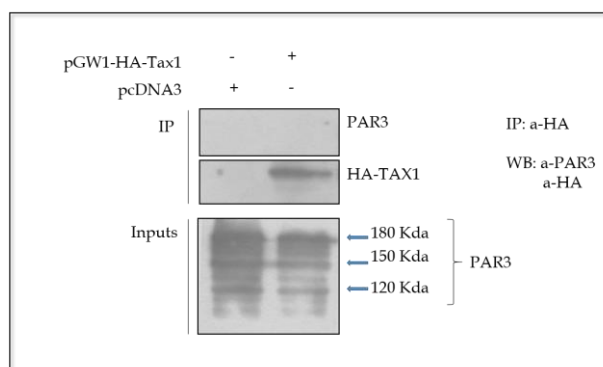


Figura 4.3.5: Ensayo de interacción Tax1-PAR3 *in vivo* por co-IP. Células HEK293 fueron transfectadas con un vector de expresión para la proteína HA-Tax1. La IP se llevó a cabo con un anticuerpo a-HA y la inmunodetección de la expresión endógena de PAR3 se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal a-PAR3.

Corroborado que Tax1 no interacciona con PAR3 por técnicas bioquímicas, consideramos apropiado desarrollar experimentos por microscopia de fluorescencia sobre-expresando la proteína de polaridad PAR3 y Tax1 a fin de analizar finalmente si se formaba una asociación inespecífica Tax1-PAR3 debido a la abundancia de dominios PDZ presentes en la proteína de polaridad.

A tal fin, en el laboratorio disponemos del vector pseyfp2-PAR3, el cual consideramos como el más apropiado para nuestro estudio, ya que permite la expresión de PAR3 fusionada a una proteína fluorescente (seyfp2), aproximándose así lo más posible a la versión mTurq2-DLG1 empleada anteriormente (Figura 4.2.1.A, sección 4.2.1). Sin embargo, esto significó no poder utilizar el vector pseyfp2-Tax1 en el ensayo, debido a la presencia de la misma proteína fluorescente reportera. Para solucionar esto, clonamos la secuencia de Tax1 en el vector pmTurq2 obteniéndose el vector pmTurq2-Tax1. Luego, para corroborar su funcionalidad, co-transfectamos al vector en células HEK293 junto a pseyfp2-Tax1 y analizamos la expresión proteica por microscopia confocal. De esta manera pudimos observar un alto grado de co-localización entre las proteínas mTurq2-Tax1 y seyfp2-Tax1, confirmándose así la utilidad del vector pmTurq2-Tax1 para nuestros experimentos (Figura 4.3.6.A). Por otro lado, transfectamos el vector pseyfp2-PAR3 y ensayamos la localización subcelular de seyfp2-PAR3, la cual mostró una expresión principalmente en los bordes celulares, como descrito previamente por otros autores y de acuerdo a sus funciones (Figura 4.3.6.B) (Coureuil et al., 2009; Xue et al., 2013).

El próximo paso consistió en la transfección simultánea de pseyfp2-PAR3 y pmTurq2-Tax1 y el análisis de la expresión de ambas proteínas. **En este punto, para una**

mejor comprensión de las imágenes, consideramos conveniente continuar mostrando la expresión de Tax1 en color verde y la expresión de proteínas de polaridad (sea DLG1 o PAR3) en rojo, independientemente de la proteína fluorescente reportera o el *tag* utilizado. Esto último también fue tenido en cuenta para los experimentos posteriores de esta Tesis Doctoral.

Los resultados de este experimento no mostraron variación alguna en la expresión de ambas proteínas, mostrando la permanencia de Tax1 en el núcleo celular y PAR3 en los bordes celulares (Figura 4.3.6.C). De este modo pudimos concluir por un lado que PAR3 muy probablemente no represente un blanco de la oncoproteína Tax1, y por el otro, que el fenotipo observado para Tax1-DLG1 (Figura 4.3.2.A) se debe a una asociación específica entre las dos proteínas con significancia biológica y no debido a una sobre-abundancia de dominios PDZ.

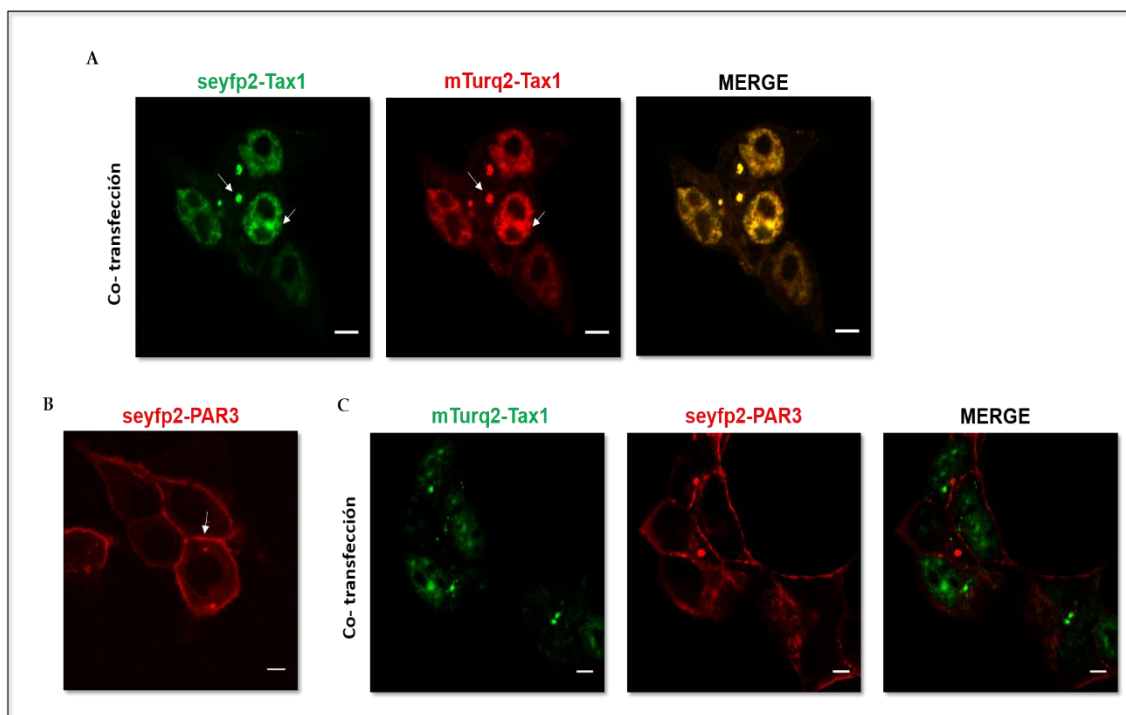


Figura 4.3.6: Análisis de la co-expresión de PAR3 y Tax1 en células epiteliales. **A)** Co-expresión de seyfp2-Tax1 (verde) y mTurq2-Tax1 (rojo) por ensayos de transfección transiente de sus respectivos vectores en células HEK293. **B)** Expresión de seyfp2-PAR3. **C)** Co-expresión de mTurq2-Tax1 (verde) y seyfp2-PAR3 (rojo). En todos los casos la expresión proteica fue detectada por microscopia confocal directa. Las flechas blancas señalan la expresión de cada proteína. Barra de tamaño: 5 μm .

4.3.3- Estudio de la interacción de Tax1 y DLG1 por técnicas de FRET.

Por último, para completar esta parte del estudio, quisimos analizar si existe una interacción directa entre Tax1 y DLG1. Esto considerando que hasta el momento la bibliografía disponible ha estudiado esta asociación mediante técnicas bioquímicas, y no en el contexto de una célula intacta. Para esto decidimos aplicar la metodología de FB-FRET optimizada en el laboratorio y comentada en el capítulo anterior (ver sección 4.2.3, Capítulo 2).

En este sentido, los vectores pseyfp2-Tax1 y pmTurq2-DLG1 fueron co-transfectados en células HEK293, y obtenido el patrón de co-localización comentado anteriormente (ver Figura 4.3.2.A), seleccionamos distintas RI para llevar adelante el FB-FRET. En la Figura 4.3.7.A se muestran los resultados obtenidos cuando se seleccionó una RI correspondiente a una zona de co-localización perinuclear. Como se puede observar, luego del fotoblanqueo del aceptor seyfp2-Tax1 en dicha región, la emisión de fluorescencia del donador mTurq2-DLG1 aumentó considerablemente evidenciado la presencia de FRET. Para analizar esto de una manera más confiable realizamos un estudio cuantitativo de la eficiencia FRET (ver fórmula en sección 3.14, Materiales y métodos) en las zonas analizadas. Como se puede observar en la Figura 4.3.7.B (barra verde, serie de la izquierda), la eficiencia FRET tuvo un valor cercano al 9%, encontrándose dentro del rango de valores reportados normalmente para el uso de esta técnica (5-15%) (Grecco et al., 2013; Karpova and McNally, 2006). Además, para analizar la real incumbencia de DLG1 en este fenómeno llevamos a cabo un control expresando el aceptor seyfp2-Tax1 junto al dador mTurq2 (a partir del vector pmTurq2 vacío, el cual expresa solo la proteína fluorescente). Este último se expresa normalmente a lo largo de toda la célula y por lo tanto muestra co-localización con seyfp2-Tax1 en todas las zonas (Figura 4.3.7.C). En este caso, el valor obtenido de eficiencia FRET fue alrededor del 1,5% (Figura 4.3.7.B, barra verde, serie de la derecha). Dicho valor fue similar al obtenido al llevar a cabo la cuantificación en zonas nos sometidas a fotoblanqueo en ambas condiciones estudiadas (Figura 4.3.7.B, barras azules), lo cual fue utilizado como control adicional. De esta manera, estos resultados demostraron por primera vez la interacción directa entre Tax1 y DLG1 en el contexto de una célula entera al menos en la zona analizada.

Por lo tanto, el próximo paso que decidimos abordar fue finalmente la identificación de las estructuras sub-celulares en donde dicha interacción tendría lugar, con el fin de obtener más información acerca de los procesos en los cuales sería

importante. Esto último considerando que la sobre-expresión de estas proteínas podría exacerbar mecanismos en los cuales participan, constituyendo un modelo adecuado para nuestros estudios.

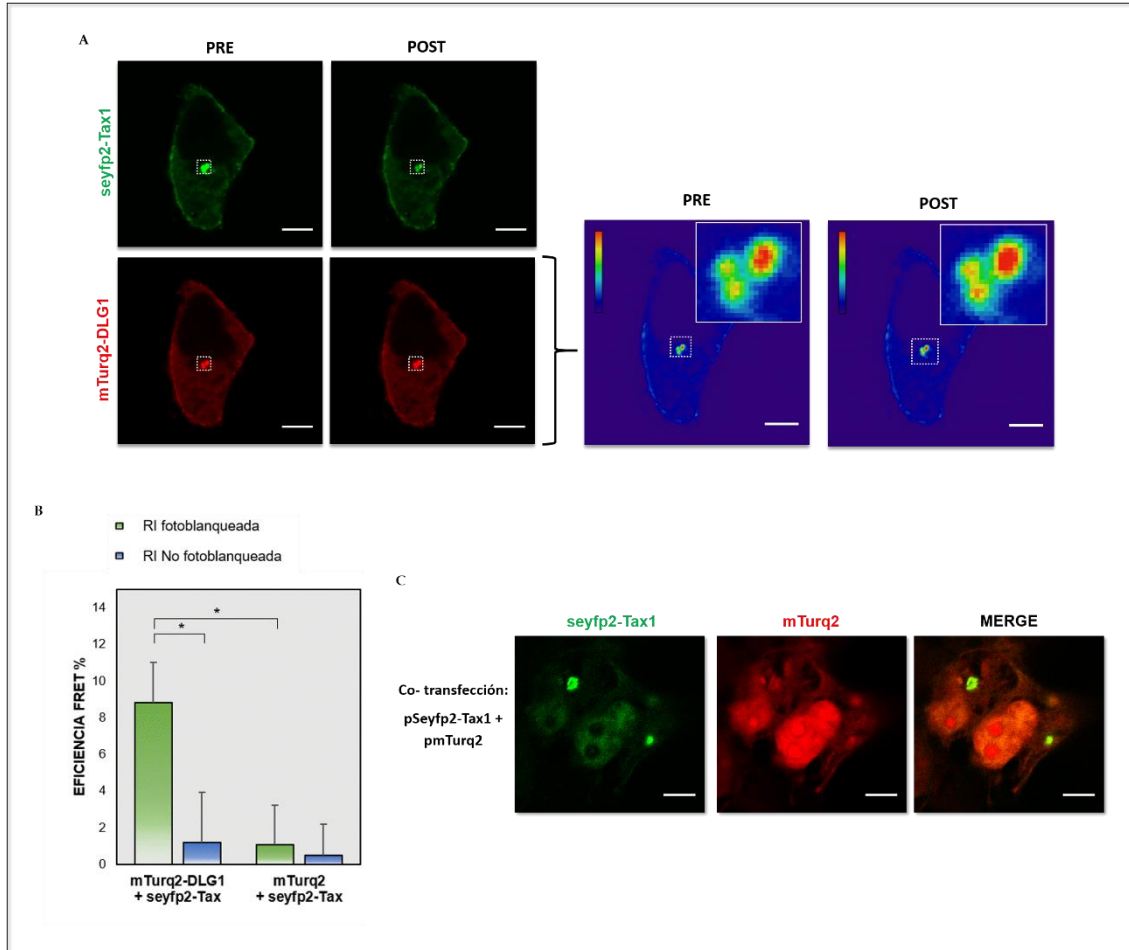


Figura 4.3.7: Ensayo de FB-FRET para Tax1-DLG1. A) Protocolo de FB-FRET. Células HEK293 fueron co-transfectadas con los vectores pmTurq2-DLG1 y pseyp2-Tax1 y sometidas a FB-FRET. El cuadrado blanco discontinuo muestra la RI sometida al fotoblanqueo del aceptor seyfp2-Tax1. En la parte derecha se muestra la expresión del dador mTurq2-DLG1 en escala de pseudocolor multicolorada que permite apreciar de una manera más clara los cambios en su intensidad de fluorescencia (violeta, intensidad mínima; rojo, intensidad máxima) antes y luego del fotoblanqueo. PRE, pre-fotoblanqueo de seyfp2-Tax1. POST, post-fotoblanqueo de seyfp2-Tax1. Barra de tamaño 5 μ m. B) Cuantificación de Eficiencia FRET. En verde se muestra el valor obtenido para RI sometidas el fotoblanqueo y en azul el valor obtenido para RI no sometidas al mismo. (* $p < 0,05$). La ecuación para la obtención de la Eficiencia FRET se presentó en la sección 3.14, Materiales y métodos. C) Co-expresión de seyfp2-Tax1 y mTurq2 en células HEK293. Esta condición utilizada como control negativo en los experimentos de FB-FRET. Barra de tamaño 5 μ m.

4.3.4-Identificación de estructuras subcelulares donde tiene lugar la interacción Tax1-DLG1.

Como observamos anteriormente, la co-localización de Tax1-DLG1 da lugar a un patrón consistente de estructuras de tipo vesicular alrededor del núcleo y que parece extenderse hacia la periferia celular. En efecto, consideramos posible la participación de ambas proteínas en vías de tráfico intracelular, de acuerdo a algunas actividades descritas para ambas proteínas en tal proceso celular (secciones **1.1.4** y **1.3.2.1**, Introducción). Para estudiar esto, comenzamos analizando la expresión de ciertos marcadores Rab (del inglés *Ras-associated binding*). Las proteínas Rab son pequeñas GTPasas que interaccionan con proteínas importantes presentes en vesículas intracelulares regulando la fusión de las mismas a sitios blancos (Corbeel and Freson, 2008). En este sentido gracias a la colaboración de la Dra. María Isabel Colombo (Instituto de Histología y Embriología "Dr. Mario H. Burgos", Mendoza, Argentina) pudimos trabajar con vectores que codifican para las proteínas Rab5 (marcador de endosomas tempranos) y Rab7 (marcador de endosomas tardíos) fusionados a la proteína fluorescente Gfp (Barbieri et al., 1998; Bucci et al., 2000). De manera interesante, trabajos recientes demostraron la expresión de la proteína viral Tax1 en exosomas, estructuras vesiculares que residen en el interior de los endosomas tempranos y provienen de la invaginación de los mismos (Jaworski et al., 2014; Mathivanan et al., 2010). En el contexto de la patogénesis viral esta sería una estrategia utilizada para la secreción de Tax1 al medio extracelular, donde tendría funciones patogénicas (Jaworski et al., 2014). Por otro lado, estudios *in vitro* sugirieron que DLG1 formaría parte de un complejo multiproteico que selecciona proteínas a ser transportadas por endosomas (Chetkovich et al., 2002; Komada and Kitamura, 2005). De ahí nació el interés de investigar si la interacción de Tax1-DLG1 podría tener lugar en dichos compartimientos.

Entonces, como primer paso, analizamos la expresión de las proteínas gfp-Rab5 y gfp-Rab7 llevando a cabo la transfección de sus vectores codificantes en células HEK293 y detectando la expresión por microscopia confocal directa. Así, pudimos observar que gfp-Rab5 se expresaba en una forma puntillada similar a vesículas a lo largo de todo el citoplasma celular (Figura **4.3.8.A, izquierda**) mientras que la expresión de gfp-Rab7 fue más concentrada en regiones cercanas al núcleo celular (Figura **4.3.8.A, derecha**). Esto coincidió con la bibliografía actual para la expresión de estos marcadores de endosomas tempranos y tardíos (Barbieri et al., 1998; Bucci et al., 2000). Por lo tanto, luego procedimos a transfectar los vectores pgfp-Rab5 o pgfp-Rab7 junto a los vectores de

expresión pmTurq2-Tax1 y el vector pcDNA-HA-DLG1 en células HEK293. Este último vector permite la expresión de DLG1 fusionada a HA, y su detección por IF a partir del anticuerpo primario de ratón anti-HA y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado al fluoróforo Cy3. La necesidad de utilizar este último vector fue simplemente una cuestión de compatibilidad espectral de los fluoróforos empleados para la detección simultánea de las tres proteínas dentro de la misma célula. Los resultados obtenidos en este experimento no permitieron detectar co-localización o co-distribución de señales del marcador gfp-Rab5 y gfp-Rab7 (azul) con las zonas de co-localización Tax1-DLG1 (amarillo) (Figura 4.3.8.B y C). De este modo, desestimamos una ocurrencia de la interacción entre Tax1 y DLG1 en endosomas tempranos y tardíos.

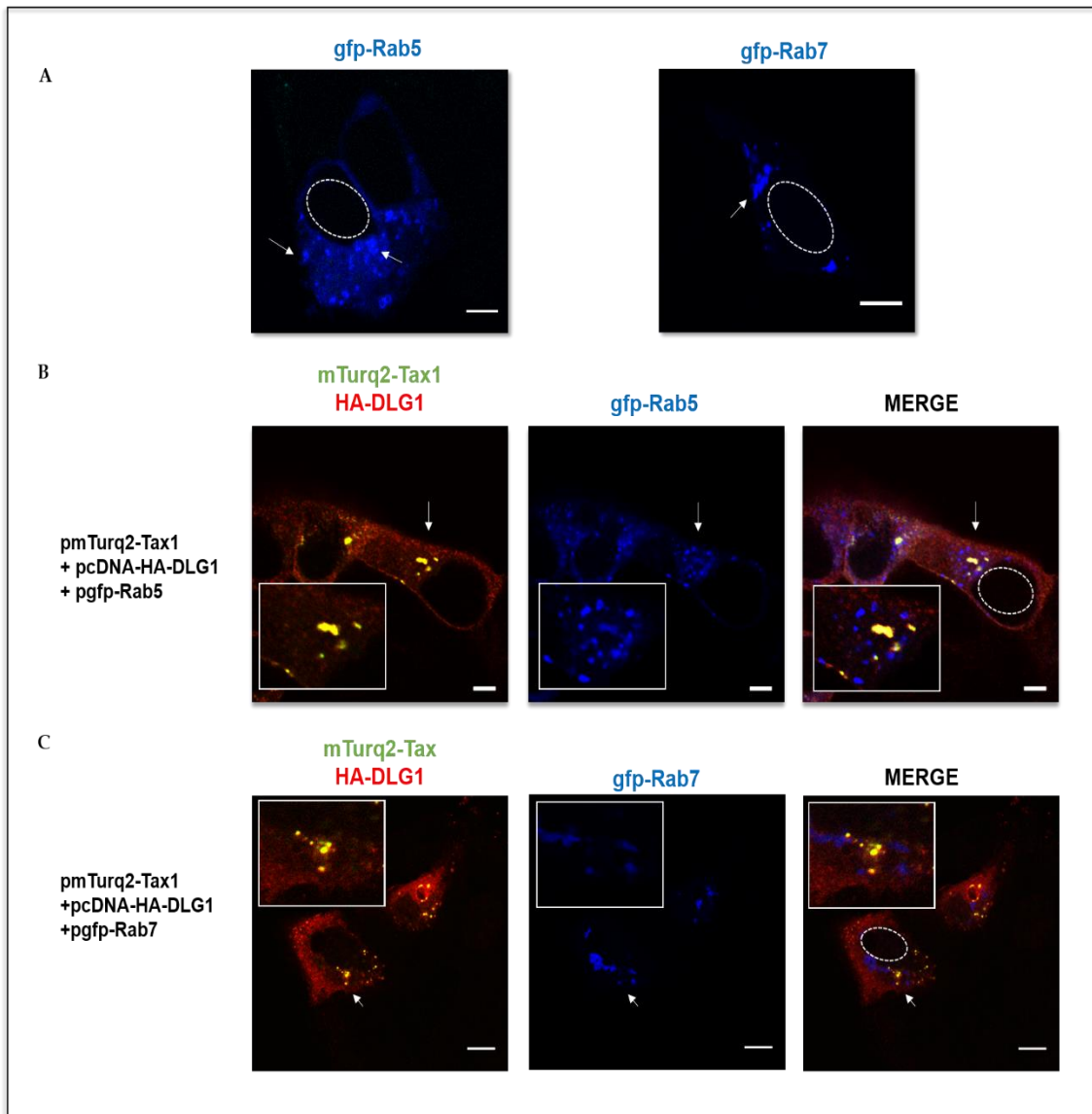


Figura 4.3.8: Análisis de la asociación de los complejos Tax1-DLG1 con endosomas. A) Expresión del marcador de endosomas tempranos gfp-Rab5 y de endosomas tardíos gfp-Rab7.

Células HEK293 fueron transfectadas con los vectores codificantes de dichos marcadores y la expresión fue detectada por microscopia de fluorescencia (azul). **B y C)** Análisis de co-localización de complejos Tax1-DLG1 con los marcadores de endosomas. Células HEK293 fueron co-transfectadas con los vectores pmTurq2-Tax1, pcDNA-HA-DLG1 y vector codificante para gfp-Rab5 (**B**) o para gfp-Rab7 (**C**). La expresión de HA-DLG1 fue detectada por IF empleando un anticuerpo primario a-HA y anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Cy3. La expresión de las proteínas mTurq2-Tax1, gfp-Rab5 y gfp-Rab7 fue detectada por emisión de fluorescencia directa. En ambas partes de la figura se muestra directamente la imagen superposición de mTurq2-Tax1 (verde) y HA-DLG1 (rojo), cuya co-localización se muestra en amarillo. En azul se muestra la expresión de gfp-Rab5 y gfp-Rab7. Las flechas blancas señalan la región celular amplificada en los recuadros situados en los extremos de las imágenes. El círculo de líneas discontinuas indica el núcleo celular. Barra de tamaño: 5 μ m.

Otros estudios han demostrado que Tax1 puede estimular la desregulación de la autofagia celular, promoviendo la supervivencia y persistencia viral. Esto se ve reflejado en el aumento en el número de autofagosomas presentes debido a la expresión de Tax1 (Ren et al., 2015). De acuerdo a esto, nos preguntamos si la interacción de Tax1 con DLG1 podría derivar al complejo proteico a estructuras autofágicas como mecanismo de eliminación de agregados proteicos. Para ello, empleamos como marcador de autofagosomas a la proteína LC3, la cual se expresa en la membrana de los mismos (Tanida et al., 2008). Para llevar a cabo estos experimentos pudimos trabajar con el vector prfp-LC3 cedido gentilmente por la Dra. María Isabel Colombo (Fader et al., 2009). Previamente, el mismo fue transfectado en células HEK293 para analizar la expresión característica de rfp-LC3 por microscopia confocal. Así, pudimos detectar la expresión de rfp-LC3 en estructuras de tipo vesicular a lo largo del citoplasma, pero más frecuentes en la zona cercana al núcleo (Figura 4.3.9.A). Además, observamos expresión nuclear de rfp-LC3, fenómeno que se ha reportado para LC3 en condiciones de abundancia de nutrientes (Huang et al., 2015). Luego, este vector fue co-transfectado en células HEK293 junto al pmTurq2-Tax1 y a un vector que permite la expresión de DLG1 fusionada a Gfp (pegfp-DLG1). En este caso, nuevamente no encontramos co-localización de Tax1-DLG1 con el marcador utilizado (Figura 4.3.9.B). Sin embargo, este resultado es importante ya que señala que dichos complejos no estarían siendo sometidos a degradación por autofagosomas sugiriendo que tendría una función biológica específica.

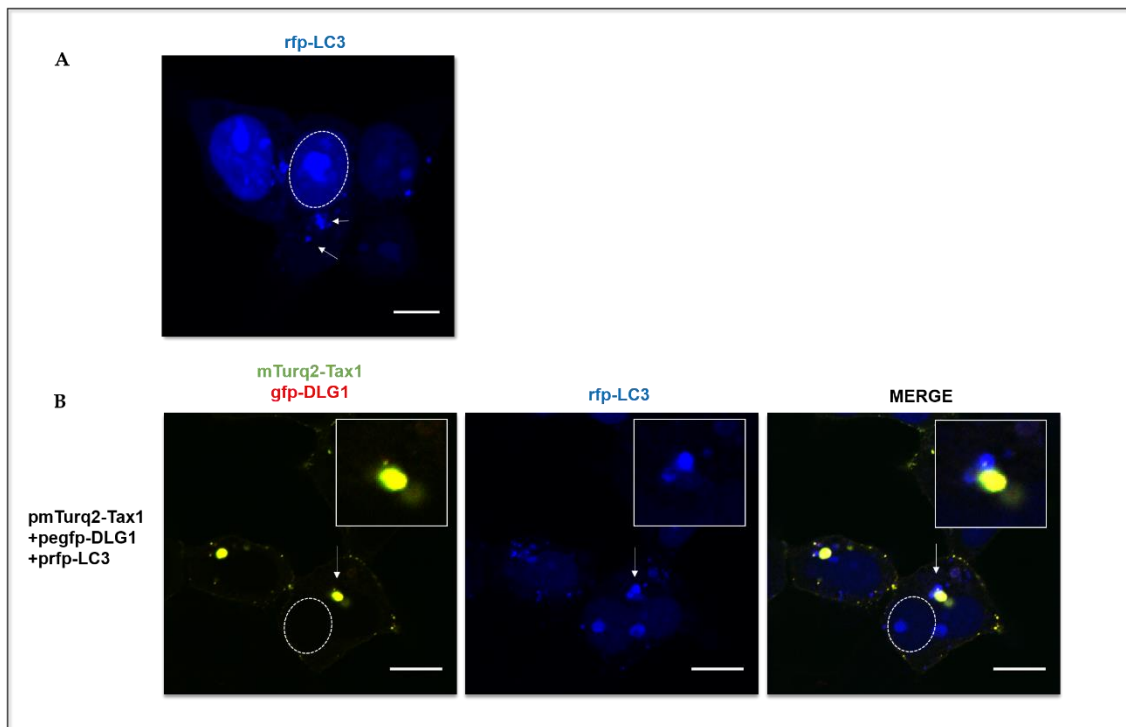


Figura 4.3.9: Análisis de la asociación de los complejos Tax1-DLG1 con autofagosomas. **A)** Expresión del marcador de autofagosomas rfp-LC3. **B)** Análisis de co-localización de complejos Tax1-DLG1 con rfp-LC3. En todos los casos células HEK293 fueron transfectadas con los vectores indicados y la expresión de las respectivas proteínas fue detectada por microscopia de fluorescencia directa confocal. La expresión de rfp-LC3 se muestra en azul. En **B** se muestra directamente la imagen de co-localización de mTurq2-Tax1 y gfp-DLG1, la cual se aprecia en amarillo. Las flechas blancas señalan la expresión de cada proteína y eventualmente la región celular amplificada en los recuadros situados en el extremo de cada imagen. Los círculos discontinuos indican el núcleo celular en las distintas imágenes. Barra de tamaño: 10 μm .

Además de las estructuras comentadas, Tax1 también se expresa en el aparato de Golgi, donde ejercería funciones oncogénicas, ya que en dicho sitio es capaz de reclutar reguladores de vías de transducción de señales involucradas en el control de la proliferación (Huang et al., 2009). Más aún, se ha propuesto que Tax1 se expresa en dicho compartimiento como una etapa del mecanismo de secreción mediado por la vía secretoria clásica (Alefantis et al., 2005). De manera interesante, DLG1 también fue reportada en el aparato de Golgi, en cis Golgi y en vesículas post-Golgi, probablemente con funciones en el tráfico intracelular de proteínas (Walch, 2013). Dadas estas dos observaciones se desprendió nuestro interés de estudiar la ocurrencia de la interacción Tax1-DLG1 en este compartimiento celular.

En este sentido, realizamos experimentos similares a los anteriores llevando a cabo además la inmunomarcación de una proteína de la matriz del cis-Golgi, GM130. La expresión de dicho marcador se observó en zonas muy cercanas al núcleo como era

esperado (Figura 4.3.10.A) (Nejmeddine et al., 2005). Sorprendentemente, esta vez observamos una clara y estrecha co-distribución entre Tax1-DLG1 con este marcador en especial en la región perinuclear (Figura 4.3.10.B). Por lo tanto, el próximo paso fue evaluar de manera más fehaciente este fenómeno analizando esto para la expresión endógena de DLG1. En este caso, transfectamos células HEK293 solo con el vector pmTurq2-Tax1 y detectamos la expresión endógena de DLG1, al igual que del marcador GM130, con anticuerpos específicos mediante IF indirecta. De esta manera, pudimos en primer lugar confirmar que Tax1 puede formar agregados con DLG1 endógena, aunque en menor extensión que en modelos de sobre-expresión y siendo evidente, en todas las células analizadas, la co-localización Tax1-DLG1 en estructuras cercanas al núcleo (Figura 4.3.10.C, **panel superior**). Más importante aún, pudimos apreciar que se mantuvo la co-distribución de Tax1-DLG1 con el marcador GM130, confirmando el resultado obtenido en modelos de sobre-expresión (Figura 4.3.10.C, **panel inferior**).

Esto sugiere que la interacción entre estas proteínas podría interferir en el tráfico intracelular produciéndose una retención de las mismas en el aparato de Golgi como se discutirá en la sección Discusión.

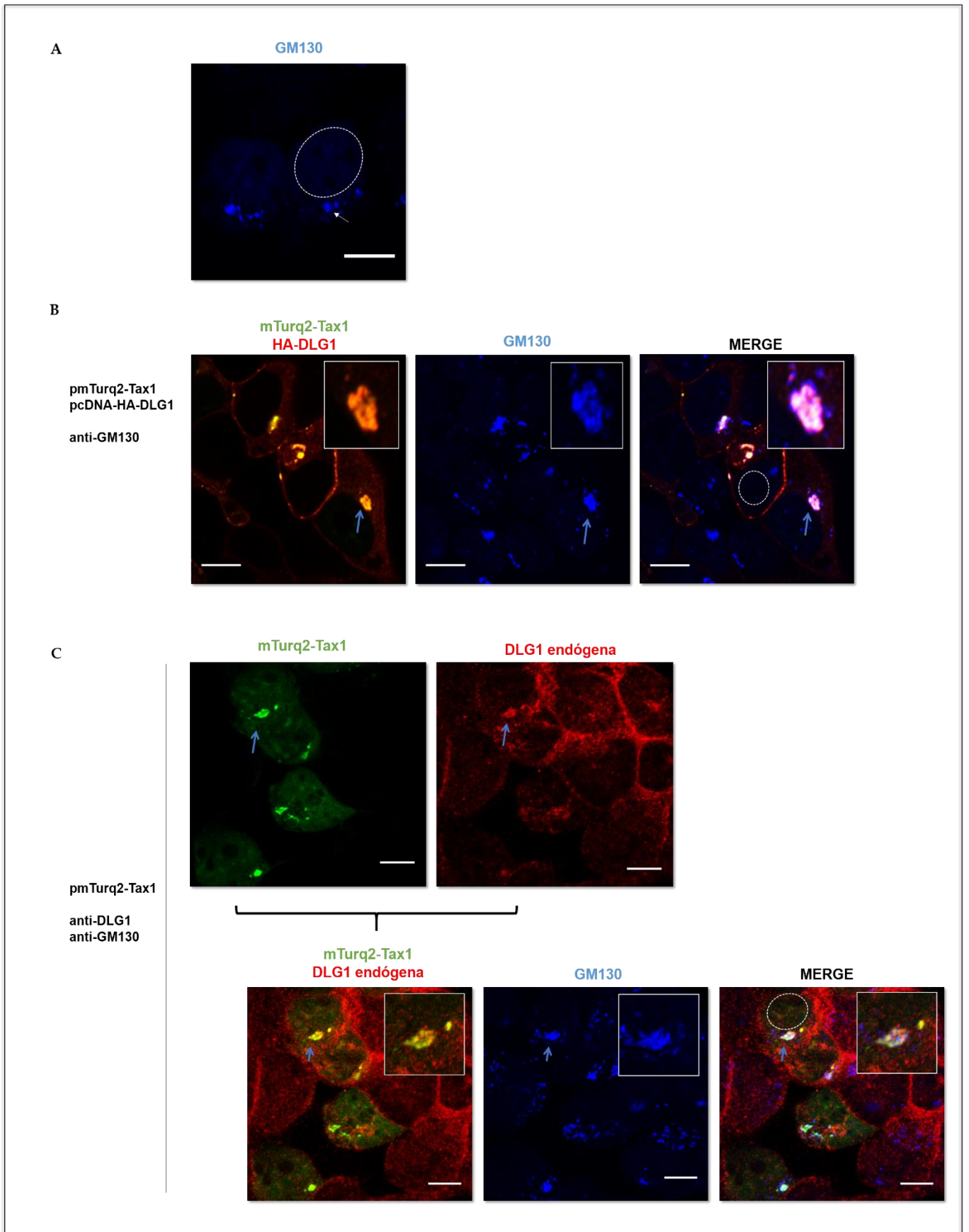


Figura 4.3.10: Análisis de la asociación de los complejos Tax1-DLG1 con el aparato de Golgi. **A)** Expresión del marcador GM130. Se muestra la expresión de GM130 detectada por IF indirecta utilizando un anticuerpo a-GM130 mediante microscopia de fluorescencia confocal. La flecha blanca señala la expresión del marcador. **B)** Análisis de la co-localización de Tax1-DLG1 con GM130. Células HEK293 fueron co-transfectadas con los vectores pmTurq2-Tax1 y pcDNA-HA-DLG1 y el patrón Tax1-DLG1 resultante (amarillo) fue testeado para co-localización con el marcador de aparato de Golgi GM130 (azul). La expresión de HA-DLG1 y de GM130 fueron detectadas por IF indirecta con anticuerpos a-HA y a-GM130 y anticuerpos secundarios adecuados. **C)** Análisis de la asociación de Tax1 con DLG1 endógena y su co-localización con GM130. Se transfectaron células HEK293 con mTurq2-Tax1 (verde) y se realizó la inmunodetección de la expresión endógena de DLG1 (rojo) utilizando un anticuerpo a-DLG1 de ratón y un anticuerpo a-ratón conjugado a Cy3. GM130 se detectó como explicado anteriormente. En cada parte de la figura la flecha azul muestra la zona de co-localización tripartita siendo magnificada en el extremo superior derecha de cada imagen. Los círculos discontinuos indican el núcleo celular en las distintas imágenes. Barra de tamaño: 10 μ m.

En estrecha cercanía con el cis-Golgi se encuentra normalmente el centrosoma celular, estructura donde se ha reportado la expresión de Tax1. Como se ha comentado en la sección 1.3.2.1 (Introducción), el centrosoma cumple un rol durante la transmisión viral hacia una célula no infectada (Grassmann et al., 2005; Nejmeddine et al., 2005). El mismo se polariza hacia el contacto celular (sinapsis virológica) siendo importante para la transmisión del genoma viral. En relación a esto, se ha observado que dicho proceso requiere de la expresión de Tax1 asociada al mismo (Nejmeddine et al., 2005; Nejmeddine et al., 2009). Por otro lado, un trabajo publicado recientemente ha reportado en células epiteliales la reclusión de DLG1 en centrosomas durante la mitosis y ha demostrado una función de esta proteína para la polarización y movimiento de los mismos durante la división celular (van Ree et al., 2016). Por lo tanto, considerando estas funciones de ambas proteínas, nos preguntamos si la interacción Tax1-DLG1 podría tener lugar en dicha estructura en concomitancia con el aparato de Golgi.

Para analizar esto, utilizamos como marcador de centrosoma a la proteína γ -tubulina, habiéndose reportado a la misma como parte del centro de nucleación de microtúbulos que caracteriza a los mismos (O'Toole et al., 2012). Así, realizamos en primer lugar una inmunomarcación de esta proteína en células HEK293 observando que γ -tubulina se expresa a lo largo de todo el citoplasma en concordancia con su rol como proteína componente del citoesqueleto. Sin embargo, detectamos una acumulación en una zona muy cercana al núcleo lo que correspondería muy probablemente al centrosoma celular (Figura 4.3.11.A). Luego transfectamos las células con el vector pmTurq2-Tax1 y, además de γ -tubulina, realizamos la inmunomarcación de DLG1 endógena. Los resultados de este experimento arrojaron una co-localización entre las tres

proteínas sugiriendo la ocurrencia de la interacción Tax1-DLG1 en centrosomas (Figura 4.3.11.B). De esta manera, los datos presentados, si bien preliminares, podrían indicar además un rol de esta interacción en procesos que involucren la expresión de Tax1 en centrosoma, como por ejemplo en la polarización del mismo, necesaria para la transmisión viral.

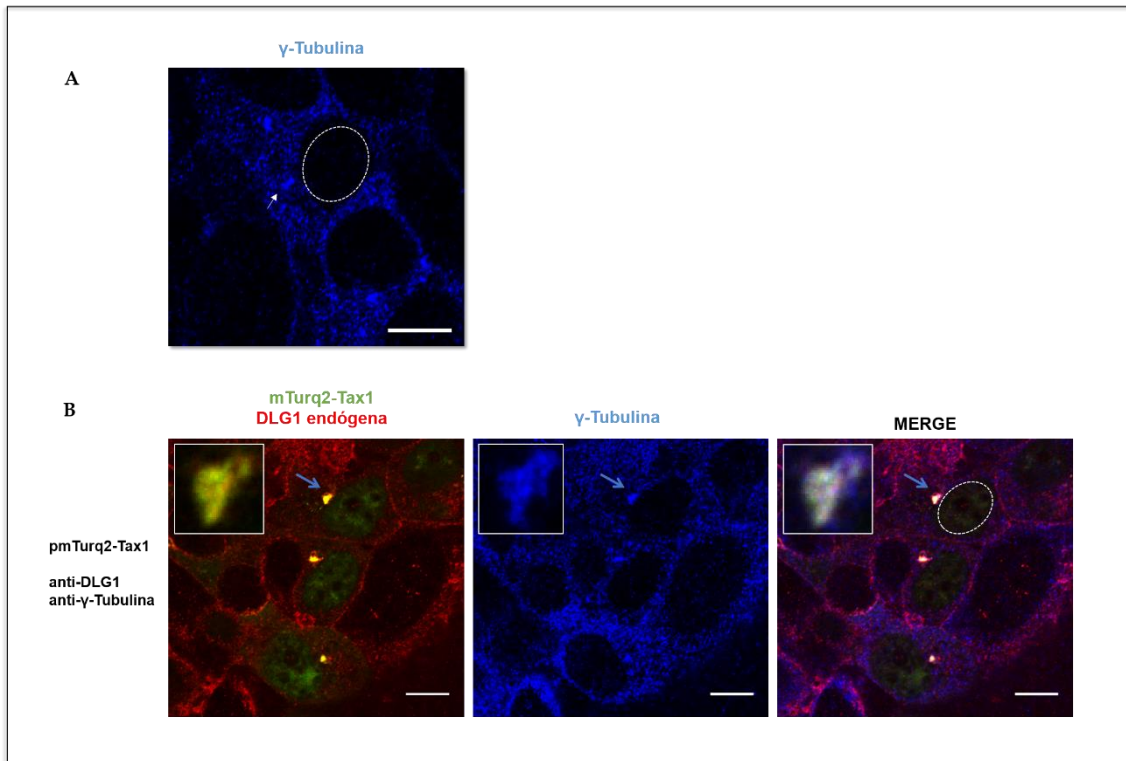


Figura 4.3.11: Análisis de la asociación de los complejos Tax1-DLG1 con el centrosoma. **A)** Expresión del marcador γ -tubulina. Se muestra la expresión de γ -tubulina detectada por IF indirecta utilizando un anticuerpo α - γ Tub mediante microscopia de fluorescencia confocal. La flecha blanca señala la expresión del marcador. **B)** Análisis de co-localización de Tax1-DLG1 endógena con γ -tubulina. Se transfectaron células HEK293 con pmTurq2-Tax1 (verde) y se realizó la inmunomarcación de DLG1 endógena (rojo) y de γ -tubulina (azul) con anticuerpos específicos. Las flechas azules señalan zonas de co-localización tripartita magnificadas en el extremo superior izquierdo de cada imagen. El círculo discontinuo señala el núcleo de la célula correspondiente. Barra de tamaño: 10 μ m.

En resumen, según lo desarrollado en el presente capítulo, estos resultados constituyen un aporte importante en el entendimiento de la interacción de Tax1 con proteínas PDZ de polaridad. En particular para DLG1, pusimos en evidencia que la interacción con Tax1 muy probablemente tenga una función en procesos celulares que se desarrollan a nivel del aparato de Golgi y del centrosoma. De esto se desprende, que dicha interacción podría no tener únicamente un rol relacionado a la inactivación de las funciones oncosupresoras de DLG1 como fuera postulado inicialmente. Es por ello que más estudios son necesarios para confirmar estas cuestiones y aportar nueva información acerca del rol de DLG1 y otras proteínas PDZ en la infección por HTLV-1.

En su conjunto, este trabajo de Tesis Doctoral aporta al entendimiento de los mecanismos que definen los niveles de expresión de DLG1 en distintos contextos biológicos. Esto es relevante porque sienta las bases para indagar la incumbencia de dichos mecanismos en proceso tumorales donde se han observado cambios importantes en los niveles de expresión de dicha proteína. Además, los resultados presentados contribuyen a definir de una manera más precisa las funciones de DLG1 como blanco de las oncoproteínas de los HPV de alto riesgo oncogénico y del HTLV-1. De este modo es posible comprender con mayor claridad las funciones de las proteínas de polaridad durante las infecciones con dichos virus oncogénicos

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis Doctoral el objetivo general consistió en un mejor entendimiento de los mecanismos que regulan la expresión de la proteína de polaridad DLG1, así como también de su significancia biológica como blanco de los virus oncogénicos HPV de alto riesgo y HTLV-1. La importancia de estos estudios radica en que, si bien las funciones de DLG1 se han estudiado extensamente, los mecanismos que definen sus niveles de expresión aún no se han caracterizado. A través de tal conocimiento sería posible comprender cómo ocurren los cambios frecuentemente observados en la expresión de esta proteína durante la progresión maligna de distintos tumores. Por otro lado, estudiando la asociación de DLG1 con las oncoproteínas de HPV de alto riesgo y HTLV-1, este trabajo contribuiría a descubrir posibles nuevas funciones de DLG1 en estos contextos de transformación celular, y además, a entender como los virus oncogénicos pueden hacer uso de reguladores de polaridad para favorecer su replicación.

Como fue comentado en la sección 1.1.5, cambios en la distribución y abundancia de DLG1 fueron observados durante la progresión de tumores humanos de mama, colon, gástrico y cervical (Cavatorta et al., 2004; Fuja et al., 2004; Gardiol et al., 2006; Watson et al., 2002). Según un repaso de la bibliografía disponible, pueden ocurrir grandes incrementos en los niveles de DLG1 en los estadios pre-neoplásicos junto a cambios en su localización celular, desconociéndose la causa y la función de ello. Interesantemente, es común la ausencia de expresión de DLG1 en los últimos estadios de la progresión maligna de estos tumores. Así, este fenómeno se encuentra estrechamente relacionado a la pérdida total de polaridad celular y la arquitectura de los tejidos. Sumado a esto, la importancia de DLG1 comienza a ser evidente para otros tumores no provenientes de tejidos epiteliales. En este sentido, en tejidos linfoides, más precisamente en linfocitos B, la pérdida de expresión de DLG1 se ha relacionado con la aparición de poblaciones en fase de pre-leucemia (Sandoval et al., 2013).

Ante tales evidencias, se hizo muy clara la importancia de una correcta expresión de DLG1 y la necesidad de un entendimiento completo de los eventos que llevan a la pérdida o alteración en los niveles y localización de DLG1. Es por ello que en este trabajo de Tesis doctoral comenzamos estudiando los mecanismos que pueden controlar la expresión de esta proteína en los distintos contextos biológicos donde se han reportado funciones relevantes de la misma.

Así, abordamos la implicancia de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales, dentro de estos, el *splicing* alternativo en la 5'UTR del ARNm de DLG1

que había sido descubierto en nuestro laboratorio. Este mecanismo daba como resultado que los transcriptos totales para DLG1 estén conformados por dos isoformas transcripcionales diferentes según la 5'UTR (ver sección 1.2.1). La isoforma *Short*, resultante de *splicing* de la isoforma *Large*, presentaba una eficiencia de traducción considerablemente mayor. Por lo tanto, la regulación del *splicing* podía representar un mecanismo que regule los niveles proteicos de DLG1 a través del cambio en las proporciones de *Short* y *Large* dentro del *pool* total de transcriptos. Lo que hacía aún más interesante a este mecanismo fue que un estudio profundo del transcriptoma humano había revelado que aproximadamente un 20% de los genes dan lugar a transcriptos con regiones 5'UTR variables, y que dicho porcentaje estaba constituido por genes que deben ser regulados de manera precisa, como oncogenes, genes para factores de transcripción, receptores, reguladores de vías de transducción de señales y oncosupresores (Hughes, 2006). En este contexto, por ejemplo, se puede mencionar al receptor β del estrógeno, el cual posee funciones oncosupresoras. Mediante el uso de promotores alternativos, su gen puede generar dos clases de transcriptos (UTRa y UTRb) que difieren en su eficiencia de traducción debido a los elementos de control presentes en sus 5'UTR. La forma UTRa debido a que contiene seis uORF y estructuras secundarias muy estables promueve una traducción menos eficiente que la forma UTRb. Interesantemente, la forma UTRa se encontró aumentada en tejidos tumorales respecto de tejidos normales, dando una explicación a la disminución observada de los niveles proteicos de dicho oncosupresor durante la carcinogénesis (Smith, 2008; Smith et al., 2010). Casos similares a éste fueron reportados por los oncosupresores BRCA1, PTEN y TGF- β , lo que enfatiza la necesidad de una correcta expresión diferencial de 5'UTR para estos tipos de genes (Han et al., 2003; Romeo et al., 1993; Sobczak and Krzyzosiak, 2002). Así, teniendo en cuenta estas evidencias, las isoformas transcripcionales *Short* y *Large* de DLG1 constituyeron un tema de estudio interesante.

En primer lugar, indagamos la presencia de estas isoformas (y por lo tanto del *splicing*) en células provenientes de diversos tipos de tejidos abarcando el epitelial, hepático, linfoide, mieloide y nervioso. Si bien las funciones de DLG1 fueron extensamente estudiadas en células epiteliales, también se habían reportado funciones relevantes en estos otros tipos celulares. Por esta razón consideramos apropiado extender el estudio a dichos tipos. En relación a esto, DLG1 fue reportada como un factor relevante, junto a otras proteínas de polaridad, en la proliferación y en la activación antigénica de linfocitos T (Swat Ana Miletic et al., 2007; Xavier et al., 2004). En células

neuronales había sido reportada una función de DLG1 en el ensamblaje de la sinapsis nerviosa, siendo su pérdida asociada a desórdenes neurológicos como esquizofrenia y autismo (Facciuto et al., 2012). DLG1 también se reportó en altos niveles en hepatocitos cumpliendo funciones relacionadas al manteniendo de la polaridad ápico-basal y control de la proliferación (Duffy et al., 2007). Los resultados mostraron la presencia de las dos isoformas en todos los casos, lo que indicó la conservación del mecanismo de *splicing*. Además, la isoforma *Short* fue mayoritaria en todos los casos, lo que reveló un posible rol activo del *splicing* en la contribución de niveles proteicos de DLG1 necesarios para las funciones estos tipos celulares (Figura 4.1.1). En este punto, es importante mencionar que nuestros estudios fueron realizados empleando células tumorales y, por lo tanto, sería necesario un estudio comparativo empleando células normales provenientes del cultivo primario de distintos tejidos. Esto último considerando que los patrones de *splicing* de diversos genes que regulan el crecimiento celular pueden verse afectados durante los procesos oncogénicos (Oltean, 2015; Oltean and Bates, 2014).

A continuación, nos propusimos indagar la implicancia de este mecanismo de regulación en contextos biológicos donde se habían reportado cambios en los niveles proteicos de DLG1 sin información de los mecanismos involucrados. Así, comenzamos con el proceso de formación de las uniones intercelulares de células epiteliales.

La alta confluencia de células epiteliales se caracteriza por altos niveles de DLG1 y su reclusión hacia la región de los contactos celulares (Mantovani et al., 2001; Reuver and Garner, 1998). En cambio, células aisladas en crecimiento exhiben bajos niveles de la misma, lo que sugiere la existencia de mecanismos que controlan el aumento de DLG1 en respuesta a la adhesión celular (Mantovani et al., 2001). Así, la caracterización de dichos mecanismos era interesante, considerando además que los tumores epiteliales indiferenciados poseen niveles muy bajos de DLG1 y presentan una baja capacidad de formar uniones intercelulares (Facciuto et al., 2012; Mantovani et al., 2001). Entonces, para estudiar la incumbencia de mecanismos transcripcionales y del *splicing* en la 5'UTR de DLG1 en este proceso de adhesión y formación de uniones, utilizamos la línea epitelial Caco-2. La misma representó un modelo adecuado, ya que proviene de un adenocarcinoma de colon semi-diferenciado conservando la capacidad de formar de uniones celulares. Mediante el uso de cultivos de diferente densidad celular corroboramos que efectivamente los niveles de DLG1 se incrementan con la confluencia celular, y, por lo tanto, con la adhesión celular (Figura 4.2.1.A). A la par, pudimos observar que la cantidad de transcriptos totales codificantes para DLG1 también se

incrementaban, lo que sugirió un aumento en la tasa de transcripción del gen (Figura 4.2.1.B). Sin embargo, más llamativo fue no observar un incremento equivalente en los niveles de las isoformas *Short* y *Large*. En cambio, evidenciamos un incremento mayor para *Short* que para *Large*, lo cual sugirió que el mecanismo de *splicing* en la 5'UTR se vería estimulado durante el proceso estudiado (Figura 4.1.2.C). De este modo, obtuvimos por primera vez una evidencia contundente de la implicancia del *splicing* alternativo en la 5'UTR durante un proceso biológico. En relación a esto último, la expresión de DLG1 es realmente importante para la formación de las UA. Se ha reportado que células epiteliales de colon depletadas en DLG1 por silenciamiento génico fallan en reclutar a la quinasa PI3K hacia la zona de la membrana celular donde se concentra Caderina-E, componente esencial de las UA (Laprise et al., 2004). En dicha región, la activación de la quinasa estimula vías que desembocan en la reorganización del citoesqueleto cortical de actina favoreciendo la formación de uniones intercelulares estables (Cain et al., 2010; Laprise et al., 2002; Laprise et al., 2004). Por lo tanto, una desregulación en los mecanismos identificados en nuestros experimentos tendría la potencialidad de interferir con el proceso comentado.

Durante la formación de las uniones celulares es característico el arresto del ciclo celular. En el mismo DLG1 también cumpliría funciones importantes, ya que existen reportes señalando su interacción directa con oncosupresores necesarios para dicho arresto. Por ejemplo, DLG1 se une directamente al supresor de tumores APC, un inhibidor del pasaje a fase S (Ishidate et al., 2000). A su vez el complejo APC-DLG1 puede unirse a la fosfatasa PTEN, otro factor con funciones en la regulación negativa del ciclo celular (Sotelo et al., 2012). Por lo tanto, nos preguntamos acerca de los niveles de DLG1 durante la progresión del ciclo celular, teniendo en cuenta además que reportes mostraban que el silenciamiento de dicha proteína promovía el ingreso a fase S (Swat Ana Miletic et al., 2007). Así, nos planteamos que sus niveles efectivamente podrían variar durante dicho proceso.

A tal fin, en el laboratorio trabajamos con cultivos de células Caco-2 arrestadas en fase G_1/G_0 y en fase S del ciclo celular, aplicando un protocolo de sincronización de células optimizado previamente durante mi Tesina de Licenciatura en Biotecnología. Los resultados de estos experimentos mostraron una marcada disminución en los niveles proteicos de DLG1 para cultivos en fase S en comparación con los arrestados en fase G_1/G_0 (condición de referencia) (Figura 4.1.4.A). Estos estudios mostraron que al mismo tiempo ocurre una disminución en la cantidad de transcritos totales codificantes

(Figura 4.1.4.B). Esto fue concordante con estudios realizados para la proteína LGL perteneciente al mismo complejo de polaridad que DLG1 (Complejo SCRIB), donde su transcripción se redujo ante la presencia de estimuladores de la proliferación (Zimmermann et al., 2008). De este modo, estos resultados mostraron que DLG1 y otras proteínas del Complejo SCRIB, podrían ser reguladas negativamente al menos a nivel transcripcional con el objetivo de permitir la proliferación celular.

Por otro lado, en este proceso probablemente el *splicing* no se vea involucrado en la regulación de los niveles de DLG1, ya que las correspondientes isoformas presentaron una disminución equivalente en sus niveles (Figura 4.1.4.C). Sin embargo, ese resultado fue importante porque nos permitió concluir que el mecanismo de *splicing* podría ser relevante en ciertos contextos biológicos y en otros no.

En este punto es interesante discutir la forma en que se regularía la transcripción del gen para DLG1 en el pasaje a fase S. En este sentido los factores transcripcionales Snail regulan negativamente marcadores de polaridad, entre ellos Caderina-E, y, según se comentó en la sección 1.2.1, también podían reprimir la transcripción a partir del promotor de DLG1 (Cavatorta et al., 2008). Experimentos realizados en nuestro laboratorio por la Dra. Bugnon Valdano sugirieron la implicancia de dichos factores en la expresión de DLG1 durante la proliferación. En estos experimentos, células epiteliales mostraron un descenso gradual de transcritos para DLG1 a medida que eran sometidas a dosis crecientes de factores de crecimiento epidérmico. Llamativamente, durante este proceso los niveles de transcritos para Snail aumentaban de manera significativa, señalando así su posible incumbencia en la represión de DLG1 durante la estimulación de la proliferación epitelial. Un hecho que refuerza esta hipótesis proviene del análisis de tumores más indiferenciados de colon, donde la expresión de DLG1 es realmente baja (Gardiol et al., 2006). En ellos se ha demostrado que Snail se encuentra sobre-expresado contribuyendo a un fenotipo invasivo y metastático que se relaciona una elevada proliferación celular (Fan et al., 2012; Roy et al., 2005).

Según lo comentado hasta el momento, es posible proponer que una disfuncionalidad en la regulación de los mecanismos transcripcionales y del *splicing* alternativo en la 5'UTR del ARNm para DLG1 pueden tener un efecto directo en la habilidad de formar uniones intercelulares, así como también en controlar la proliferación celular epitelial. Esto abre la posibilidad a que dichos fenómenos realmente ocurran durante la progresión maligna de diversos tumores epiteliales. Por lo tanto, sería muy interesante recolectar tejidos normales y tejidos tumorales (de diferente grado de

malignidad) provenientes del mismo sitio anatómico, y realizar un estudio comparativo evaluando la transcripción de DLG1 y el *splicing* alternativo a través del análisis de las isoformas *Short* y *Large*. En este sentido, la existencia de novedosos kits de extracción de ARN capaces de una purificación superadora a partir muestras de tejidos frescos, así como también de tejidos parafinados, supone una real posibilidad para extender nuestros estudios en esa dirección.

Por último, para esta parte del trabajo, expandimos nuestros estudios a procesos de diferenciación celular, empleando el modelo bien establecido de diferenciación monocito-macrófago. Este sistema permitía analizar el fenómeno realizando un ensayo relativamente sencillo de diferenciación, empleando los monocitos que constituyen la línea celular THP-1. En ello, pudimos detectar claras disminuciones en los niveles de DLG1 justificadas en parte por la regulación negativa de la transcripción y del *splicing* alternativo del ARNm de DLG1 en su 5'UTR (Figura 4.1.5). Además, pusimos en evidencia cambios en la fosforilación de DLG1 resaltando la implicancia de este mecanismo de regulación post-traducciona durante este proceso de diferenciación. Así, nuestros trabajos fueron los primeros en analizar la expresión de DLG1 en estos tipos celulares y durante el proceso de diferenciación comentado.

Hasta el momento las funciones de DLG1 en dichas células es totalmente desconocida. Más precisamente, la expresión y el conocimiento general de las funciones de las proteínas PDZ de polaridad en estos tipos celulares es realmente muy pobre. El único reporte existente ha implicado a la proteína PAR3 en los procesos de migración de los monocitos en los vasos sanguíneos (Tamehiro et al., 2009). Así, es posible que DLG1 también pueda estar involucrada en la migración, asemejándose a lo que ocurre en linfocitos donde su expresión es marcadamente polarizada (Krummel and Macara, 2006; Ludford-Menting et al., 2005). Por otro lado, aunque su expresión proteica sea baja, es muy probable que DLG1 tenga funciones relevantes en macrófagos. Los mismos dependen de complejas reorganizaciones del citoesqueleto y de moléculas transmembrana durante la fagocitosis. En este sentido, si bien en otros modelos celulares, se han reportado funciones de DLG1 en la polarización de los microtúbulos del citoesqueleto (Manneville et al., 2010). Además, lo que enfatiza la importancia del estudio de las funciones de DLG1 en macrófagos es el hecho de que sufra evidentes cambios en su fosforilación, proceso que se ha relacionado a cambios en su localización celular y probablemente al patrón de interacciones con ligandos celulares (Narayan et al., 2009).

Por último, es interesante estudiar qué mecanismos se verían involucrados en la regulación negativa de la transcripción en este proceso de diferenciación. Un rol lo podría jugar el factor NF- κ B cuya expresión nuclear se incrementa considerablemente durante procesos de diferenciación monocítica (Healy and O'Connor, 2009). Esto considerando que en nuestro laboratorio hemos descubierto cuatro sitios consenso de unión a dicho factor en el promotor de *dlg1* (Cavatorta et al., 2008). Por lo tanto, estas observaciones nos incentivan a estudiar una posible implicancia de NF- κ B en la transcripción de *dlg1*.

En la siguiente parte de esta Tesis Doctoral analizamos la significancia biológica de DLG1 en el contexto de infecciones con virus oncogénicos, como HPV de alto riesgo y el HTLV-1. Esto resultaba atractivo ya que dichos virus cuentan con proteínas capaces de interactuar con dominios PDZ presentes en DLG1, y la función de esto al momento no se había entendido completamente.

En este sentido comenzamos estudiando el HPV-18, virus considerado como verdadero agente carcinogénico cuyas funciones transformantes se deben en gran parte a su oncoproteína E618. Como se comentó en la sección 1.3.1.1.2.1, distintos estudios habían generado controversias en relación a la función real de las interacciones PBM-PDZ entre E618 y sus *partners* celulares. Por un lado, varios reportes empleando modelos de sobre-expresión señalaban que E618 a través de su PBM estimula la degradación proteolítica de sus blancos PDZ de polaridad. Esto podía ser importante para la biología del virus considerando que genomas de HPV-18 delecionados en el PBM eran incapaces de completar su ciclo replicativo y producir progenie viral (Delury et al., 2013; Lee and Laimins, 2004). Sin embargo, trabajos analizando las lesiones cervicales que albergan la infección productiva de HPV mostraban resultados contradictorios a esto, ya que la inmunomarcación de los *partners* PDZ reportados para E618 se encontraban notablemente incrementados en comparación a tejidos normales, siendo este el caso frecuentemente observado para la proteína DLG1 (Figura 1.10) (Cavatorta et al., 2004; Watson et al., 2002). Esto ocurría además en cultivos organotípicos *raft* expresando conjuntamente E618 y E718 (la otra oncoproteína de HPV-18), indicando la incumbencia de las proteínas virales. Por otro lado, DLG1 se veía muy disminuida en el estadio de carcinoma invasor, donde la expresión de E618 junto a E718 es muy elevada (Cavatorta et al., 2004). Así, ante tales observaciones, fue evidente la necesidad de un mejor entendimiento de la relación entre E618 y DLG1.

En tal dirección, como aproximación experimental llevamos adelante ensayos de transfección transiente en células epiteliales con vectores de expresión para DLG1 y E618, a modo de poder definir distintas abundancias relativas de cada proteína. Construimos vectores para la expresión de E618 y DLG1 fusionadas a las novedosas proteínas fluorescentes seYfp2 y mTurq2, útiles para metodologías de WB y, más importante aún, con características espectrales deseables para realizar distintas técnicas de microscopía de fluorescencia confocal, como por ejemplo FRET (Figura 4.2.1.A).

Nuestros experimentos por WB mostraron que la abundancia de DLG1 generaba un impacto positivo en los niveles de E618 (Figura 4.2.2.B). Esto fue interesante considerando que para HPV-16 había sido descubierto que el silenciamiento de ciertos blancos de polaridad de su oncoproteína E616, como hSCRIB, provocaba una caída en los niveles de dicha oncoproteína (Nicolaidis et al., 2011). Así, estas evidencias señalarían hacia una estabilización de E618 basada en niveles elevados de DLG1, como ocurriría con hSCRIB en HPV-16. Los autores del trabajo mencionado plantearon el interrogante de cómo hSCRIB, un blanco de degradación de E616, podría contribuir a la estabilización de la misma (Nakagawa and Huibregtse, 2000). Como nuestros experimentos arrojaron además que un aumento en la expresión de E618 conducía a la degradación proteolítica de DLG1 (Figura 4.2.2.A), nos encontrábamos ante el mismo dilema. Así, en resumen, nuestros datos mostraron que las condiciones experimentales empleadas podían exacerbar dos posibles relaciones biológicas entre E618 y DLG1.

Hasta el momento no existe un modelo que explique en qué ocasión E618 puede optar por la degradación proteolítica de sus blancos PDZ de polaridad en el contexto de una infección viral productiva. Es probable que sea un fenómeno regulado de manera precisa y transitoria por distintos factores celulares y virales, y que estimule la proliferación celular expandiendo el número de células infectadas. Esto último considerando que la disminución de proteínas PDZ en presencia de E618 es evidente en el contexto del carcinoma cervical invasor. En este sentido, en líneas epiteliales provenientes de carcinoma cervical, como HeLa (HPV-18), SiHa y Caski (HPV-16), es notable como los niveles y la localización de proteínas de polaridad como hSCRIB, DLG1, MAGI-I, etc, se ven restituidos al silenciar E6 y E7 (Kranjec and Banks, 2011; Massimi et al., 2004). Esto hace que el estudio de la degradación de blancos de polaridad por parte de E618 siga estando aun en el foco de la atención.

A pesar de las incertezas comentadas arriba, nos inclinamos a profundizar en el impacto de DLG1 sobre la expresión de E618 realizando experimentos de microscopía

confocal. En este marco, pudimos apreciar que la localización mayoritaria de E618 cambiaba ante la abundancia de DLG1 (Figura 4.2.3). Más precisamente, la expresión nuclear de E618 disminuía y se hacía evidente su co-localización con DLG1 en los bordes celulares y en la región citoplasmática, donde además observamos una interacción directa entre las dos proteínas que dependía del PBM de E618 (Figura 4.2.5). Para esto, utilizamos la tecnología de FB-FRET, metodología que permite la detección de interacciones directas entre proteínas en el contexto de una célula intacta. Cabe resaltar que hasta el momento no existen reportes utilizando esta técnica para el estudio de interacciones de proteínas virales con proteínas de polaridad, por lo tanto, nuestros estudios son pioneros en el uso de esta técnica para esta temática de estudio. Además, tampoco ha sido utilizada aun por grupos de investigación de nuestra comunidad. Así contribuimos a innovar en las metodologías de estudio aplicadas en nuestro entorno.

En esta parte, un hecho que nos sorprendió fue que la localización de DLG1 no se vio evidentemente afectada por la expresión de E618. Esto considerando que los cultivos organotípicos tipo *raft* (que representan el modelo más aproximado del tejido blanco de la infección viral) expresando las oncoproteínas E618 y E718 habían arrojado una disminución de DLG1 de los bordes celulares junto a una redistribución al citoplasma (Valdano et al., 2016). Aquí, si bien es razonable pensar que E618 sea la responsable principal de dicho fenómeno, la expresión de E718 podría también tener una función importante. En este sentido, se ha reportado que la proteína E7 de HPV de alto riesgo es capaz de reprimir la transcripción de Caderina-E, esencial para la formación de UA y del reclutamiento de DLG1 hacia los bordes celulares (Caberg et al., 2008; D'Costa et al., 2012). Así, es probable la necesidad de la expresión conjunta de E718 y E618 para afectar la distribución subcelular de DLG1.

De todas maneras, nuestros resultados mostraron que la interacción E618-DLG1 en un modelo de abundancia de DLG1 podría representar un mecanismo para regular negativamente las funciones nucleares de E618 y al mismo tiempo direccionar sus actividades al citoplasma. Sin embargo, este mismo mecanismo podría continuar teniendo una significancia oncogénica si se pone la atención en DLG1, ya que se ha propuesto que la misma desarrollaría funciones oncogénicas cuando forma complejos con ciertas oncoproteínas virales. En este sentido, la agregación de complejos con DLG1 en la región del citoplasma inhibiría sus funciones oncosupresoras al impedir la interacción con sus correspondientes *partners* a nivel de membrana (Garcia-Mata et al., 2007). Se han detectado niveles significativos de DLG1 en el citoplasma de líneas

celulares tumorales HPV positivas a pesar de la expresión continua de E6 y E7 (Krishna Subbaiah et al., 2012). Subbaiah y colaboradores demostraron que formas residuales de DLG1 unidas al citoesqueleto modifican la actividad de la proteína G pequeña RhoG, proteína traductora de señales importante en procesos de proliferación y diferenciación. DLG1 logra dicha alteración formando complejos con el factor regulador de RhoG, SGEF (del inglés *SH3- domain-containing RhoG guanine nucleotide exchange factor*), en presencia de las oncoproteínas de HPV. Por lo tanto, estas funciones cooperativas de E6 y E7, promoviendo las funciones de RhoG a través de DLG1, podrían ser de relevancia para la replicación viral en el contexto tisular, y consecuentemente contribuirían con las características invasivas de las células tumorales (Krishna Subbaiah et al., 2012). Por otro lado, otro trabajo mostró la existencia de complejos tripartitos entre E6, la proteína estructural de uniones tipo Gap Conexina 43 (Cx43), y DLG1 en una línea epitelial HPV 16+ llamada W112T. Esta asociación interfiere en el reciclado de Cx43 a la membrana plasmática y por lo tanto en la formación de las uniones tipo Gap, lo cual puede tener implicancias oncogénicas ya que bajos niveles de esta proteína se han observado en distintos tumores (Macdonald et al., 2012; Sun et al., 2015). Por otro lado, aun el mantenimiento de DLG1 en las membranas podría tener un rol oncogénico cuando se encuentra unida a proteínas virales. Se ha reportado que la oncoproteína E4ORF1 de Adenovirus tipo 9 puede secuestrar isoformas citoplasmáticas de DLG1 junto a la quinasa PI3K, y el complejo tripartito podría reubicarse en los bordes celulares y activar la vía PI3K/ Akt, lo cual tendría funciones oncogénicas (Kong et al., 2014). De este modo, eventos como los mencionados podrían tener parte en la formación de complejos con E618 favoreciendo así la estimulación de la proliferación necesaria para la replicación viral.

En base a lo presentado en esta fase del trabajo, se podría postular una hipótesis esquematizada en la Figura 5.1: E618 y E718 (junto a otros mecanismos) producirían un incremento en los niveles de DLG1 y deslocalización, lo que promovería un aumento en la expresión de E618 en la región del citoplasma (condición correspondiente a SIL). Luego, un aumento de E618 podría estimular la degradación de DLG1 como un mecanismo de autorregulación de los niveles de la proteína viral. Esta última parte del mecanismo podría encontrarse exacerbada en el carcinoma cervical siempre en conjunto a otros mecanismos posibles (epigenéticos, transcripcionales y post-transcripcionales) que conduzcan a la baja expresión de DLG1 característica de este estadio (Figura 5.1).

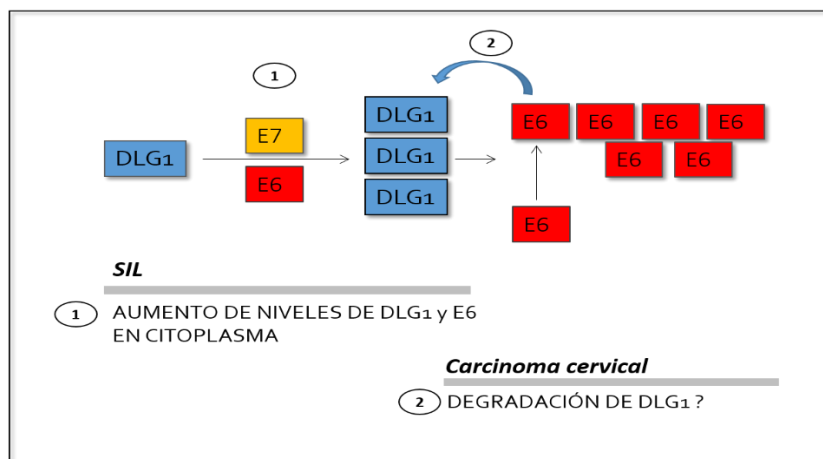


Figura 5.1: Representación esquemática de distintos mecanismos que pueden explicar los cambios en niveles de expresión de DLG1 y E6.

Para finalizar esta parte del trabajo, profundizamos en la significancia de la pérdida de expresión de DLG1 en los últimos estadios de la carcinogénesis cervical y otros tipos de tumores malignos donde sus niveles se encuentran muy disminuidos. Esto en relación a la expresión de otras proteínas de polaridad y con el fin último de encontrar mecanismos oncogénicos que involucren interconexiones entre este tipo de proteínas. Así, continuamos con estudios previos de nuestro laboratorio que indicaban una potencial implicancia de DLG1 sobre la proteína de polaridad PAR3 en relación a la restricción espacial de la misma. Estas proteínas habían mostrado ser excluyentes en su expresión en diversos estudios contribuyendo al mantenimiento de la polaridad celular (Coradini et al., 2011; Ludford-Menting et al., 2005).

Utilizamos queratinocitos deficientes en DLG1 por silenciamiento transiente o estable por tecnología de ARN de interferencia, y estudiamos la expresión de PAR3. Así, la ausencia de DLG1 se relacionó con una reducción de PAR3 en membranas y un aumento de su expresión nuclear (Figura 4.2.7). Estos resultados concordaron con los de otros autores que indicaban que DLG1 es importante en la formación de las UT en células epiteliales de colon (Stucke et al., 2007). En este punto, vale la pena discutir las consecuencias de estos cambios en la expresión de PAR3. Por un lado, una disminución de la misma en membrana presupone consecuencias negativas en la formación de las UT y en la adherencia celular (Hirose et al., 2002). En este contexto PAR3 es necesaria para regular el sitio de acción y actividad de diversas quinasas y fosfatasa importantes. Una de ellas es aPKC, quinasa del componente del complejo PAR, que restringe la localización espacial del complejo SCRIB hacia la zona basolateral (Coradini et al., 2011).

Otro *partner* regulado por PAR3 es la fosfatasa PTEN, involucrada en la regulación negativa de la vía PI3K/akt relacionada a la estimulación de la proliferación celular (Feng et al., 2008; Wu et al., 2007). Por lo tanto, todos estos procesos podrían verse afectados por pérdida de expresión de DLG1. Por el lado de la expresión nuclear de PAR3, en los últimos años se ha comenzado a estudiar su significado. Dicha expresión se ha observado en células epiteliales aisladas en crecimiento, en células sometidas a factores de crecimiento específicos, y además en líneas epiteliales de alto grado de transformación provenientes de cérvix y ovario (Nakamura et al., 2016; Zhang et al., 2016). Además, trabajos anteriores de nuestro grupo mostraron que células epiteliales HaCat que expresan E6 de HPV de alto riesgo presentan una mayor expresión de PAR3 en núcleo (Facciuto et al., 2014). Con respecto a sus funciones en este compartimiento, Fang y colaboradores demostraron la asociación de PAR3 con las subunidades regulatorias Ku70 y Ku80 de la quinasa DNA-PK (del inglés *DNA-dependent protein kinase*), importante para el mecanismo de reparación del ADN por daños doble hebra (Fang et al., 2007). Sin embargo, estudios más recientes de este mismo grupo han asociado la expresión de PAR3 nuclear con la estimulación de la proliferación celular. En este sentido, se ha demostrado que PAR3 nuclear puede estimular factores transcripcionales de genes para la proliferación e inhibición de la apoptosis (Zhang et al., 2016).

De esta manera, a través de estos experimentos pusimos de manifiesto la importancia de la correcta expresión de DLG1 y su relación con PAR3. Para poder confirmar la relevancia de esto y de la redistribución de PAR3 observada en modelos de células en cultivo se desprende la necesidad de analizar los patrones de expresión de PAR3 en biopsias derivadas de carcinomas cervicales y otros tumores. Más aún sería interesante analizar en las mismas muestras la expresión conjunta de PAR3 y DLG1 para poder analizar más certeramente la relación entre distintos efectores de polaridad.

A continuación, habiendo analizado la relevancia biológica de DLG1 en el marco de la infección por HPV-18 en relación a su oncoproteína E618, como parte final de esta Tesis Doctoral expandimos nuestros estudios al virus oncogénico HTLV-1. Dicho virus también se encontraba asociado a procesos de transformación maligna, siendo el agente etiológico de ATL (Ishitsuka and Tamura, 2014). Nuestro interés radicaba en la oncoproteína Tax1, ya que la misma posee propiedades similares a E618, en cuanto a su

interacción con proteínas PDZ de polaridad sin haberse investigado completamente el rol de tales uniones proteicas (ver sección 1.3.2.2) (Rousset et al., 1998) .

Tax1 comparte muchos de los blancos celulares con E618, sin embargo, la evidencia hasta el momento señalaba diferencias en las consecuencias de dichas interacciones. En este contexto, por ejemplo, Tax1 no es capaz de estimular bajo ningún contexto reportado la degradación proteolítica de sus blancos PDZ de polaridad. En cambio, produce una interferencia en la distribución normal de los mismos, relocalizándolos hacia estructuras no identificadas a lo largo del citoplasma (Hirata et al., 2004). Si bien esto estimula la promoción de la proliferación celular, todavía el mecanismo no se ha descrito y, además, no se han explorado otras implicancias biológicas. Esto resultaba interesante, ya que se ha comenzado a conocer recientemente la asociación de Tax1 con procesos de tráfico vesicular importantes para las funciones de Tax1 (Alefantis et al., 2005; Alefantis et al., 2007; Huang et al., 2009). Por lo tanto, quisimos indagar la incumbencia de la asociación Tax1-proteínas PDZ de polaridad, sobre todo con DLG1, en dichos procesos.

Para comenzar evaluamos el escenario obtenido al co-expresar seyfp2-Tax1 junto a mTurq2-DLG1. Acorde a reportes previos, observamos co-localización entre ambas proteínas siendo el patrón obtenido PBM dependiente y con una distribución en estructuras perinucleares, así como en zonas cercanas a la membrana plasmática y en citoplasma (Figura 4.3.2.A y Figura 4.3.3). En este contexto, fue llamativa además la ausencia de expresión nuclear de Tax1, indicando que la asociación con DLG1 significaba una retención de la proteína viral en la región citoplasmática, asemejándose al fenómeno observado entre E618 y DLG1. En relación a esto, Tsuji y colaboradores mostraron que mutantes de Tax1 delecionadas en sus últimos 13 aminoácidos (donde se localiza el PBM) adquieren una expresión puramente nuclear (Tsuji et al., 2007). Por otro lado, un estudio mostró que la retención citoplasmática de Tax1 se debe en parte a interacciones con proteínas aun no identificadas, pero normalmente sometidas a degradación por proteosomas (Meertens et al., 2004). De manera interesante, existen reportes indicando que las proteínas PDZ de polaridad muestran incrementos en sus niveles de expresión como respuesta al tratamiento con inhibidores de proteosomas (Mantovani et al., 2001). Por lo tanto, es posible especular que los blancos PDZ de polaridad de Tax1, entre ellos DLG1, podrían contribuir al desarrollo de actividades citoplasmáticas de Tax1.

Al mismo tiempo, fue llamativa la gran diferencia entre el patrón de co-localización de Tax1-DLG1 con respecto al obtenido para E618-DLG1 (Figura 4.3.2.A y

Figura 4.2.3). Este último era continuo a lo largo del citoplasma y se acentuaba en los bordes celulares, mientras que el correspondiente a Tax1-DLG1 fue discontinuo, con apariencia vesicular como comentado más arriba. Esto nos lleva a sugerir una gran diferencia entre las funciones de estas interacciones.

En este punto surgió la necesidad de aseverar la especificidad de los resultados, descartando artefactos debido a la abundancia de dominios PDZ. Para ello, la proteína PAR3 representaba un buen control debido a sus dominios PDZ de alta homología a DLG1, sin embargo, fue necesario ensayar previamente su incumbencia como blanco de Tax1. En el marco de estos experimentos pudimos comprobar que PAR3 no se asociaba a Tax1 (Figura 4.3.4.C y Figura 4.3.5) y más aún, la sobre-expresión de la misma no generaba ningún patrón de co-localización con la proteína viral, como el caso de DLG1 y de otros blancos PDZ ya reportados (Figura 4.3.6.C). Esto señaló que la presencia de motivos PBM y dominios PDZ en dos proteínas no implica indefectiblemente una interacción entre las mismas, siendo necesario probablemente otros factores, como por ejemplo una disposición espacial adecuada o bien secuencias por fuera de tales dominios. De este modo pudimos demostrar que PAR3 no sería un blanco PDZ de la proteína Tax1, lo cual fue importante ya que no existían reportes previos indagando la asociación entre estas dos proteínas. Por lo tanto, los procesos regulados por PAR3, como migración y activación antigénica, probablemente no se verían afectados por la expresión de Tax1. A partir de estos resultados, finalmente pudimos asegurar la especificidad de la asociación de Tax1-DLG1 estableciendo de este modo que el patrón de expresión en estudio probablemente refleje algún proceso de significancia biológica en la patología viral. Por último, antes de comenzar con el estudio de dichos procesos, pusimos de manifiesto que la asociación de Tax1 a DLG1 se debe a una interacción directa (Figura 4.3.7.A). En este contexto utilizamos la técnica de FB-FRET previamente optimizada.

En el próximo paso de nuestro estudio investigamos la significancia biológica de la interacción demostrada analizando su ocurrencia en distintos compartimientos subcelulares donde se había reportado expresión de cada proteína. Como se comentó en la sección 1.1.4, en el caso de DLG1 se había reportado que era capaz de expresarse en vesículas endocíticas y también había sido sugerida su expresión en endosomas tempranos (Chetkovich et al., 2002; Komada and Kitamura, 2005). Por el lado de Tax1, ésta había sido reportada en exosomas (producidos a partir de endosomas tempranos) representando un mecanismo para su tráfico hacia el ambiente extracelular (sección

1.3.2.1) (Jaworski et al., 2014). Considerando que las infecciones virales pueden alterar dichas vías de tráfico, era posible que la interacción Tax1-DLG1 estimule su distribución hacia estas estructuras endocíticas. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron co-localización alguna con marcadores endocíticos descartándose esta posibilidad (Figura **4.3.8.B y C**).

Luego estudiamos la posibilidad de la asociación Tax1-DLG1 en autofagosomas. Ren y colaboradores habían reportado que Tax1 aumentaba el número de autofagosomas presentes en células infectadas, y por lo tanto era posible que la unión de Tax1 a DLG1 conduzca a esta última a dichas estructuras como mecanismo para eliminar los agregados (Ren et al., 2015). Al igual que antes, el análisis realizado no arrojó evidencias que asocien a Tax1-DLG1 con el marcador utilizado para la estructura en estudio (Figura **4.3.9.B**)

A continuación, seguimos la misma estrategia de estudio para el aparato de Golgi considerando que para cada proteína se habían reportado funciones en dicho compartimiento (Jeyifous et al., 2009; Lee et al., 2003). En este caso, encontramos una co-distribución muy estrecha de Tax1-DLG1 con el marcador de la matriz del aparato de Golgi GM130 (Figura **4.3.10.B**). Este resultado nos permitió ubicar un compartimiento subcelular donde podría tener lugar la interacción detectada. Habiendo encontrado esta asociación empleando modelos de sobre-expresión, en el siguiente paso de nuestro análisis confirmamos el fenómeno en un modelo más fisiológico. En ese sentido pudimos asegurar en primer lugar que Tax1 formaba agregados a niveles endógenos de DLG1, lo que señaló la gran afinidad de esta interacción. Sin embargo, dichos agregados se observaron solamente en la zona perinuclear resaltando una mayor relevancia de dicha estructura en la interacción Tax1-DLG1. En segundo lugar, y de forma significativa para nuestros análisis, pudimos observar que efectivamente la co-distribución con GM130 se mantuvo (Figura **4.3.10.C**).

El reclutamiento de Tax1 y DLG1 en el aparato de Golgi podría tener distintas implicancias para la patogénesis viral existiendo distintos escenarios posibles. Esta interacción podría representar un mecanismo de retención de Tax1 en el aparato de Golgi. En este sentido se reportó que la acumulación de Tax1 en este compartimiento se debería en parte a una incapacidad de ensamblaje en vesículas post-Golgi dirigidas a membrana plasmática y secreción (Jain et al., 2007). Así, la interacción de DLG1 a Tax1 podría interferir con la unión de esta última a *partners* necesarios para el transporte.

Desde este punto de vista esto podría representar un mecanismo de supresión oncogénica en respuesta a la infección viral.

Por otro lado, el hecho de que en Tax1 no se detecten modificaciones post-traduccionales relacionadas al aparato de Golgi (glicosilaciones) sugiere que la expresión de la misma en este compartimiento tendría otra significancia (Nejmeddine et al., 2005). En este sentido, otros reportes han informado que Tax1 recluta activamente en dominios específicos del Golgi a reguladores importantes de vías de señalización que controlan la proliferación (Huang et al., 2009). Este es el caso de las quinasas IKK α e IKK β , reguladores positivos de la vía NF-kB que se encuentra activada constitutivamente en células HTLV-1+. Tax1 estimula, a través de IKK α e IKK β , la fosforilación de inhibidores de la vía NF-kB sometiéndolos luego a degradación por proteosomas (Grassmann et al., 2005). Por lo tanto, la asociación de Tax1 a DLG1 podría ser un mecanismo oncogénico que reclutaría a la proteína de polaridad, donde DLG1 también participaría de complejos de activación de vías de señalización, tal como lo descripto anteriormente para el modelo HPV (Krishna Subbaiah et al., 2012). Esto último resaltaría la dualidad en las funciones de DLG1 en cuanto a mecanismos oncogénicos (Roberts et al., 2012). De manera interesante, existen reportes que indican que Tax1 induce la fosforilación de DLG1 (Hirata et al., 2004; Suzuki et al., 1999). Dicho evento podría tener lugar efectivamente en el aparato de Golgi, donde se han descripto la estimulación de quinasas por parte de Tax1. Sin embargo, otra hipótesis plausible es que Tax1 induzca la acumulación de DLG1 en Golgi, impidiendo su transporte normal a zonas de la membrana celular donde desarrolla sus funciones oncosupresoras. Así, ante las posibilidades comentadas, se desprende la necesidad de continuar con nuevos estudios para dilucidar la función real de la asociación de Tax1-DLG1 en el aparato de Golgi.

Por otro lado, distintos trabajos habían mostrado que Tax1 puede también expresarse a nivel del centrosoma, el cual normalmente se encuentra en estrecha cercanía al aparato de Golgi. Por ello, finalmente indagamos en esta estructura utilizando como marcador a γ -tubulina. En este análisis existió una contundente co-localización tripartita de Tax1-DLG1- γ -tubulina (Figura 4.3.11.B), lo que postularía al centrosoma como otro probable sitio de interacción de Tax1-DLG1. En este sentido, si bien se conocen funciones de Tax1 en centrosoma, existen muy pocos datos acerca de posibles funciones de DLG1 en dicho compartimiento. Como fue comentado en la sección 1.3.2.1, Tax1 tendría funciones en la polarización del centrosoma durante la transmisión viral hacia otra célula. Así, la sola expresión de Tax1 en un linfocito es suficiente para la polarización de

su centrosoma luego del entrecruzamiento de receptores de membrana que simularía el contacto con un linfocito no infectado (Nejmeddine et al., 2005). El mecanismo utilizado involucraría vías de transducción de señales que desencadenarían el accionar de pequeñas GTPasas cuyas funciones pueden regular la dinámica de los microtúbulos del citoesqueleto (Nejmeddine et al., 2005). Con respecto a DLG1, se la ha identificado en centrosomas pre-mitóticos sirviendo como proteína que permite el reclutamiento de kinesinas (van Ree et al., 2016). Estas últimas son ATPasas que interactúan con los microtúbulos y pueden regular el movimiento de los mismos (Hirokawa et al., 2009). Por lo tanto, podría plantearse una reclusión de DLG1 a centrosomas mediada por Tax1 que mediante el posterior reclutamiento de kinesinas, podría controlar el movimiento de los microtúbulos del centrosoma. De acuerdo a esta hipótesis, sería interesante estudiar la incubencia de DLG1 durante la polarización del centrosoma inducida por Tax1.

A modo de resumen, en la Figura 5.2, se esquematizan las posibles funciones discutidas para la interacción Tax1-DLG1 en la región del cis-Golgi - centrosoma.

Independientemente de las posibilidades discutidas, los resultados obtenidos para esta parte del trabajo son relevantes ya que permiten encuadrar a la interacción en estudio en una región subcelular definida. Esto sienta las bases para expandir nuestros estudios a modelos linfoides y dilucidar el escenario completo que explique la función biológica de la asociación Tax1-DLG1 en un contexto más aproximado a la infección por HTLV-1.

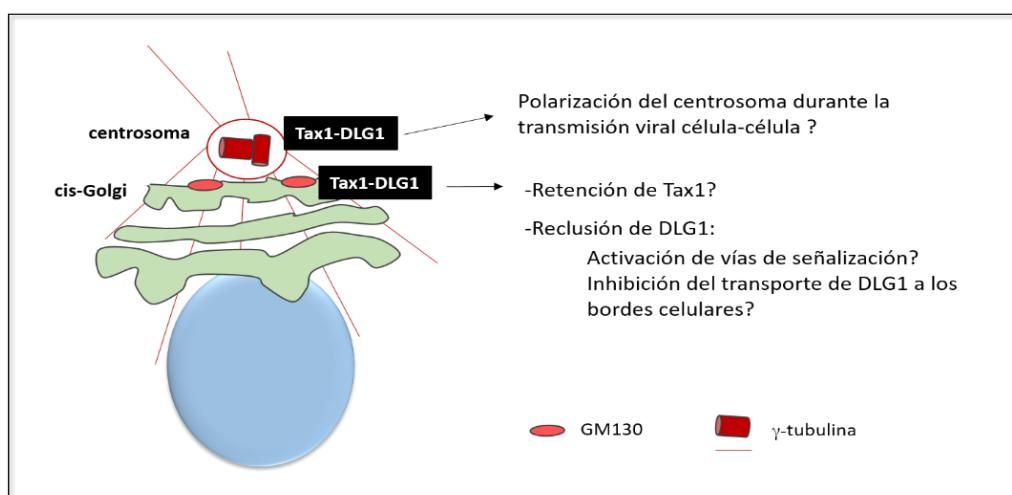


Figura 5.2: Posibles funciones de la interacción Tax1-DLG1 en aparato de Golgi y centrosoma.

CONCLUSIONES

En la primera parte de esta Tesis doctoral el objetivo fue conocer los mecanismos implicados en el control de los niveles de expresión de la proteína de polaridad DLG1 en contextos biológicos relevantes para la misma. Así, indagamos en la relevancia del control de la transcripción y del *splicing* alternativo en la 5'UTR de su ARNm. Por lo desarrollado concluimos que:

- ✱ El mecanismo de *splicing* en la 5' UTR se encuentra conservado entre células provenientes de distintos tipos de tejidos humanos, siendo mayoritaria en todos los casos analizados la isoforma *Short* producto del *splicing*.
- ✱ La frecuencia del *splicing* puede ser regulada en el marco de distintos comportamientos celulares. Junto a mecanismos que regulan la transcripción, este *splicing* contribuiría a proporcionar mayores niveles de DLG1 durante la adhesión celular y formación de uniones. Sin embargo, no sería relevante durante la entrada a fase S y progresión del ciclo celular epitelial. Estaría implicado además en la regulación negativa de los niveles de DLG1 durante la diferenciación monocito a macrófago, siendo desconocida la función de DLG1 en esto.
- ✱ Son necesarios estudios que permitan dilucidar la implicancia de este *splicing* en regular los niveles de DLG1 en los procesos de transformación maligna usando tejidos derivados de diferentes tumores. Asimismo, resulta interesante la posibilidad de determinar qué factores podrían regular la frecuencia de dicho *splicing*, así como la transcripción del gen para *dlg* en diversos contextos.

A continuación, estudiamos los mecanismos que pueden utilizar los virus oncogénicos para interferir activamente con reguladores de polaridad de sus células blanco, un fenómeno que contribuye significativamente a la oncogénesis. De este modo, en la segunda parte de este trabajo profundizamos en la significancia biológica de DLG1 como blanco de los HPV de alto riesgo oncogénico y en el carcinoma cervical. Los avances logrados fueron los siguientes:

- ✱ La oncoproteína E6 de HPV-18 es capaz de establecer una interacción directa con DLG1 en el contexto de una célula intacta. En este sentido, se innovó con el uso de microscopía FRET en el estudio de interacciones entre proteínas virales y

proteínas de polaridad. Esta interacción se detectó en los bordes celulares no viéndose asociada a alguna estructura membranosa específica de la región del citoplasma.

- ✱ Existe una relación dual entre E618 y DLG1 que depende de sus niveles de expresión. Una abundancia de DLG1 conduce a aumentos en los niveles proteicos de E618 junto a una redistribución de su expresión mayoritaria de núcleo a citoplasma. Sin embargo, una abundancia de E618 puede resultar en la degradación de DLG1. Esto pone de manifiesto la posibilidad de distintas consecuencias biológicas para la interacción E618-DLG1 dependiente del contexto celular.
- ✱ La pérdida de expresión de DLG1, frecuentemente observada en carcinomas cervicales y otros tumores, podría tener un impacto en la expresión de la proteína de polaridad PAR3 contribuyendo a una interferencia en su distribución normal. Esto revela la existencia de mecanismos complejos que definen la localización de proteínas de polaridad en relación a la expresión de otros componentes, avalando el concepto de la existencia de una estrecha interrelación entre los distintos efectores de polarización.

Por último, analizamos el papel de DLG1 como blanco de otro virus oncogénico, el HTLV-1. Según los datos obtenidos:

- ✱ Tax1 puede interferir fuertemente en la expresión de DLG1 promoviendo su redistribución a estructuras en la región del citoplasma. En tanto, este mecanismo promueve la retención de Tax1 impidiendo su expresión nuclear. Dichas observaciones dependen de la presencia del sitio de reconocimiento de dominios PDZ en la región C- terminal de Tax1.
- ✱ La proteína de polaridad PAR3, a pesar de poseer tres dominios PDZ, no representa un blanco de la oncoproteína Tax1.
- ✱ Existe una interacción directa entre Tax1 y DLG1 confirmada por microscopía FRET.

- ✱ Un intenso análisis utilizando microscopía confocal permitió investigar en que estructuras subcelulares se localizaban las interacciones Tax1-DLG1. Así, usando una batería de marcadores para los distintos compartimentos, observamos que tales complejos no se distribuyen en endosomas tardíos o tempranos ni en autofagosomas. La misma tiene lugar en una zona perinuclear enmarcada en la región del aparato de Golgi y el centrosoma celular con distintas probables consecuencias para las actividades de ambas proteínas.
- ✱ Estudios ulteriores son necesarios para identificar el efecto de la retención de DLG1-Tax1 en tales estructuras sobre los mecanismos de traducción de señales o de transporte intracelular, así como su rol en el ciclo del virus y en el desarrollo de patologías.

Como conclusión general de este trabajo hemos demostrado la implicancia de mecanismos de regulación de DLG1 no conocidos o no explorados en la definición de sus niveles de expresión sentando las bases para su estudio en el contexto de procesos carcinogénicos. Asimismo, hemos contribuido hacia un mejor entendimiento de DLG1 como blanco de las oncoproteínas virales de HPV de alto riesgo y HTLV-1. En este contexto DLG1 representa un regulador de polaridad muy probablemente utilizado por estos virus para favorecer su replicación generando como efecto secundario un ambiente propicio para el desarrollo tumoral. Así, el desarrollo de esta Tesis Doctoral ha contribuido al entendimiento de mecanismos conservados de patogénesis viral, lo que sirve de base para el entendimiento de la biología de los virus oncogénicos y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. La interacción con dominios celulares PDZ, dada su especificidad y afinidad, se ha definido como excelente candidato para el diseño de drogas o métodos diagnósticos rápidos. Por ello, un mejor entendimiento de la interacción PDZ-proteínas virales contribuiría a concretar tales estrategias.

LENGUAJE ESPECIAL

<i>buffer</i>	solución amortiguadora
curva de <i>melting</i>	curva de fusión del producto de PCR
<i>input</i>	cantidad inicial
<i>in vitro</i>	que tiene lugar en forma aislada del contexto biológico de un organismo
<i>in vivo</i>	que tiene lugar dentro de un organismo
<i>kit</i>	equipo
<i>large</i>	largo
<i>microarrays</i>	circuito integrado (chip) en cuya superficie sólida se une una colección de fragmentos de AN
<i>partners</i>	compañeros asociados
<i>pellet</i>	botón
<i>performance</i>	rendimiento
<i>pool</i>	reservorio
cultivos <i>raft</i>	cultivos tipo balsa
<i>short</i>	corto
<i>shock</i>	golpe
<i>splicing</i>	corte y empalme
<i>tag</i>	etiqueta
<i>tight</i>	estrechas
<i>upstream</i>	corriente arriba

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

µg	Microgramos
µl	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
Amp	Ampicilina
Ampr	Ampicilina resistente
AN	Ácido nucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATL	Leucemia de células T del adulto
BSA	Albúmina sérica bovina
c	Citosina
Cq	Ciclo umbral
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxiribonucleótidos
DO	Unidad de densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamintetra-acético
EE.UU.	Estados Unidos
FB	Fotoblanqueo
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
g	Constante de gravedad
G	Guanina
GUK	Guanilato kinasa
GST	Glutation S transferasa
h/hs	Hora/s
HA	Hemaglutinina
HAM	HTLV-1 associated mielopathy

HPV	Virus del Papiloma Humano
HSIL	Lesiones Escamosas Intraepiteliales de alto grado
HTLV-1	Virus linfotrópico de células T
IF	Inmunofluorescencia
IP	Inmunoprecipitación/Ioduro de propidio
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Dalton
Kan	Kanamicina
LB	Luria Bertani
LSIL	Lesiones Escamosas Intraepiteliales de bajo grado
mA	Miliamperios
MAGUK	Familia de guanilato quinasas asociadas a membrana
MCS	Sitio de múltiple clonado
min	Minuto/s
mM	Milimolar
Neo r	Resistente a neomicina
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nt	Nucleótidos
ORF	Marco abierto de lectura
ori	Origen de replicación
p/v	Peso en volumen
pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
PBM	Motivo de unión a dominios PDZ
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIP	Fosfatidilinositósido
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
pmoles	Picomoles
qPCR	PCR cuantitativa

RACE	Amplificación rápida de los extremos del ADNc
Rb	Proteína del retinoblastoma
RI	Región de interés
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Reacción de retro-transcripción
SD	Desvío estándar
SDH	Enzima Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Seg	Segundo/s
SFB	Suero Fetal Bovino
si	Silenciamiento
SIL	Lesiones Escamosas Intraepiteliales
TAE	Tris-acetato-EDTA
TCR	Receptor de célula T
TSP	Paraparesia espástica tropical
TRIS	N-tris-(hidroximetil) aminometano
U	Unidad
UA	Uniones adherentes
UT	Uniones <i>tight</i>
UTR	Región no traducida
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen en volumen
WB	Western blot

BIBLIOGRAFÍA

- Alefantis, T., Mostoller, K., Jain, P., Harhaj, E., Grant, C. and Wigdahl, B. (2005). Secretion of the human T cell leukemia virus type I transactivator protein tax. *J Biol Chem* 280, 17353–17362.
- Alefantis, T., Flaig, K. E., Wigdahl, B. and Jain, P. (2007). Interaction of HTLV-1 Tax protein with calreticulin: Implications for Tax nuclear export and secretion. *Biomed. Pharmacother.* 61, 194–200.
- Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., Nader, L. and McCance, D. J. (1996). The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J.* 15, 1950–60.
- Aoyagi, T., Takahashi, M., Higuchi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Kiyono, T., Aoyagi, Y. and Fujii, M. (2010). The PDZ domain binding motif (PBM) of human T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation. *Virus Genes* 40, 193–199.
- Aranda, V., Nolan, M. E. and Muthuswamy, S. K. (2008). Par complex in cancer: a regulator of normal cell polarity joins the dark side. *Oncogene* 27, 6878–6887.
- Ariumi, Y., Kaida, A., Lin, J. Y., Hirota, M., Masui, O., Yamaoka, S., Taya, Y. and Shimotohno, K. (2000). HTLV-1 tax oncoprotein represses the p53-mediated trans-activation function through coactivator CBP sequestration. *Oncogene* 19, 1491–1499.
- Asaba, N., Hanada, T., Takeuchi, A. and Chishti, A. H. (2003). Direct interaction with a kinesin-related motor mediates transport of mammalian discs large tumor suppressor homologue in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 8395–400.
- Assemat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A. and Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 1778, 614–630.
- Banks, L., Pim, D., Thomas, M., Coscoy, L., al., et, Harty, R. N., al., et, Winberg, G., al., et, Galinier, R., et al. (2001). Viruses and the 26S proteasome: hacking into destruction. *Trends Biochem. Sci.* 28, 452–459.
- Barbieri, M. A., Kohn, A. D., Roth, R. A. and Stahl, P. D. (1998). Protein Kinase B/akt and Rab5 Mediate Ras Activation of Endocytosis. *J. Biol. Chem.* 273, 19367–19370.
- Barbosa, M. S., Lowy, D. R. and Schiller, J. T. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J. Virol.* 63, 1404–7.
- Birnboim and Doly, J., H. C. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513–1523.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106,.
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Ghissassi, F. El, Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., et al. (2009). A review of human carcinogens – Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 10, 321–322.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. and van Deurs, B. (2000). Rab7: a key

to lysosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell* 11, 467–80.

Caberg, J.-H. D., Hubert, P. M., Begon, D. Y., Herfs, M. F., Roncarati, P. J., Boniver, J. J. and Delvenne, P. O. (2008). Silencing of E7 oncogene restores functional E-cadherin expression in human papillomavirus 16-transformed keratinocytes. *Carcinogenesis* 29, 1441–1447.

Cain, R. J., Vanhaesebroeck, B. and Ridley, A. J. (2010). The PI3K p110 α isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1. *J. Cell Biol.* 188, 863–876.

Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., et al. (2005). The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science* (80-.). 309.

Cavatorta, A. L., Fumero, G., Chouhy, D., Aguirre, R., Nocito, A. L., Giri, A. A., Banks, L. and Gardiol, D. (2004). Differential expression of the human homologue of drosophila discs large oncosuppressor in histologic samples from human papillomavirus-associated lesions as a marker for progression to malignancy. *Int J Cancer* 111, 373–380.

Cavatorta, A. L., Giri, A. A., Banks, L. and Gardiol, D. (2008). Cloning and functional analysis of the promoter region of the human Disc large gene. *Gene* 424, 87–95.

Cavatorta, A. L., Facciuto, F., Valdano, M. B., Marziali, F., Giri, A. A., Banks, L. and Gardiol, D. (2011). Regulation of translational efficiency by different splice variants of the Disc large 1 oncosuppressor 5'-UTR. *FEBS J* 278, 2596–2608.

Chen, H. L. and Chen, X. P. (2013). [Par polarity complex in mammalian neurogenesis]. *Yi Chuan* 35, 281–286.

Cherian, M. A., Baydoun, H. H., Al-Saleem, J., Shkriabai, N., Kvaratskhelia, M., Green, P. and Ratner, L. (2015). Akt Pathway Activation by Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Tax Oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 290, 26270–26281.

Chetkovich, D. M., Bunn, R. C., Kuo, S.-H., Kawasaki, Y., Kohwi, M. and Brecht, D. S. (2002). Postsynaptic targeting of alternative postsynaptic density-95 isoforms by distinct mechanisms. *J. Neurosci.* 22, 6415–25.

Chlichlia, K. and Khazaie, K. (2010). HTLV-1 Tax: Linking transformation, DNA damage and apoptotic T-cell death. *Chem Biol Interact* 188, 359–365.

Coradini, D., Casarsa, C. and Oriana, S. (2011). Epithelial cell polarity and tumorigenesis: new perspectives for cancer detection and treatment. *Acta Pharmacol Sin* 32, 552–564.

Corbeel, L. and Freson, K. (2008). Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. *Eur. J. Pediatr.* 167, 723–729.

Coureuil, M., Mikaty, G., Miller, F., Lecuyer, H., Bernard, C., Bourdoulous, S., Dumenil, G., Mege, R.-M., Weksler, B. B., Romero, I. A., et al. (2009). Meningococcal Type IV Pili Recruit the Polarity Complex to Cross the Brain Endothelium. *Science* (80-.). 325, 83–87.

D'Costa, Z. J., Jolly, C., Androphy, E. J., Mercer, A., Matthews, C. M. and Hibma, M. H. (2012). Transcriptional repression of E-cadherin by human papillomavirus type 16 E6. *PLoS One* 7, e48954.

Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. and Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 5, e8668.

- Delury, C. P., Marsh, E. K., James, C. D., Boon, S. S., Banks, L., Knight, G. L. and Roberts, S. (2013). The role of protein kinase A regulation of the E6 PDZ-binding domain during the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 87, 9463–72.
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R. and Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5, F55–70.
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. and Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.* 25, 2–23.
- Dow, L. E. and Humbert, P. O. (2007). Polarity Regulators and the Control of Epithelial Architecture, Cell Migration, and Tumorigenesis. *Int Rev Cytol* 262, 253–302.
- Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. and MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85, 1067–1076.
- Dreier, K., Scheiden, R., Lener, B., Ehehalt, D., Pircher, H., Müller-holzner, E., Rostek, U., Kaiser, A., Fiedler, M., Ressler, S., et al. (2011). Subcellular localization of the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein in CaSki cells and its detection in cervical adenocarcinoma and adenocarcinoma in situ. *Virology* 409, 54–68.
- Duensing, S. and Münger, K. (2002). Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene* 21, 6241–6248.
- Duffy, H. S., Iacobas, I., Hotchkiss, K., Hirst-Jensen, B. J., Bosco, A., Dandachi, N., Dermietzel, R., Sorgen, P. L. and Spray, D. C. (2007). The gap junction protein connexin32 interacts with the Src homology 3/hook domain of discs large homolog 1. *J. Biol. Chem.* 282, 9789–96.
- Facciuto, F., Cavatorta, A. L., Valdano, M. B., Marziali, F. and Gardiol, D. (2012). Differential expression of PDZ domain-containing proteins in human diseases - challenging topics and novel issues. *FEBS J* 279, 3538–3548.
- Facciuto, F., Bugnon Valdano, M., Marziali, F., Massimi, P., Banks, L., Cavatorta, A. L. and Gardiol, D. (2014). Human papillomavirus (HPV)-18 E6 oncoprotein interferes with the epithelial cell polarity Par3 protein. *Mol Oncol* 8, 533–543.
- Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B. and Colombo, M. I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793, 1901–1916.
- Fan, F., Samuel, S., Evans, K. W., Lu, J., Xia, L., Zhou, Y., Sceusi, E., Tozzi, F., Ye, X.-C., Mani, S. A., et al. (2012). Overexpression of snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Med.* 1, 5–16.
- Fang, L., Wang, Y., Du, D., Yang, G., Tak Kwok, T., Kai Kong, S., Chen, B., Chen, D. J. and Chen, Z. (2007). Cell polarity protein Par3 complexes with DNA-PK via Ku70 and regulates DNA double-strand break repair. *Cell Res* 17, 100–116.
- Fanning, A. S. and Anderson, J. M. (1999). PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 103, 767–

772.

Feng, W., Wu, H., Chan, L. N. and Zhang, M. (2008). Par-3-mediated junctional localization of the lipid phosphatase PTEN is required for cell polarity establishment. *J Biol Chem* 283, 23440–23449.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, 359–386.

Freije, a, Ceballos, L., Coisy, M., Barnes, L., Rosa, M., De Diego, E., Blanchard, J. M. and Gandarillas, a (2012). Cyclin E drives human keratinocyte growth into differentiation. *Oncogene* 31, 5180–5192.

Frese, K. K., Latorre, I. J., Chung, S.-H., Caruana, G., Bernstein, A., Jones, S. N., Donehower, L. A., Justice, M. J., Garner, C. C. and Javier, R. T. (2006). Oncogenic function for the Dlg1 mammalian homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor. *EMBO J.* 25, 1406–1417.

Fuja, T. J., Lin, F., Osann, K. E. and Bryant, P. J. (2004). Somatic mutations and altered expression of the candidate tumor suppressors CSNK1 epsilon, DLG1, and EDD/hHYD in mammary ductal carcinoma. *Cancer Res* 64, 942–951.

Ganti, K., Broniarczyk, J., Manoubi, W., Massimi, P., Mittal, S., Pim, D., Szalmas, A., Thatte, J., Thomas, M., Tomaić, V., et al. (2015). The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy. *Viruses* 7, 3530–3551.

Gao, L., Macara, I. G. and Joberty, G. (2002). Multiple splice variants of Par3 and of a novel related gene, Par3L, produce proteins with different binding properties. *Gene* 294, 99–107.

Garcia-Mata, R., Dubash, A. D., Sharek, L., Carr, H. S., Frost, J. A. and BurrIDGE, K. (2007). The Nuclear RhoA Exchange Factor Net1 Interacts with Proteins of the Dlg Family, Affects Their Localization, and Influences Their Tumor Suppressor Activity. *Mol. Cell Biol.* 27, 8683–8697.

Gardiol, D., Kuhne, C., Glaunsinger, B., Lee, S. S., Javier, R. and Banks, L. (1999). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 18, 5487–5496.

Gardiol, D., Zacchi, A., Petrer, F., Stanta, G. and Banks, L. (2006). Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression. *Int J Cancer* 119, 1285–1290.

Gerard, A., Mertens, A. E., van der Kammen, R. A. and Collard, J. G. (2007). The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. *J Cell Biol* 176, 863–875.

Gessain, A. and Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front. Microbiol.* 3, 388.

Gessain, A., Barin, F., Vernant, J. C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A. and de The, G. (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2, 407–410.

Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M.

- A., van Weeren, L., Gadella Jr., T. W. and Royant, A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat Commun* 3, 751.
- Grassmann, R., Aboud, M. and Jeang, K. T. (2005). Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* 24, 5976–5985.
- Grecco, H. E., Bastiaens, P. I. H., Grecco, H. E. and Bastiaens, P. I. H. (2013). Quantifying Cellular Dynamics by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. In *Current Protocols in Neuroscience*, p. 5.22.1-5.22.14. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Gross, C. and Thoma-Kress, A. K. (2016). Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses* 8, 74.
- Guccione, E., Pim, D. and Banks, L. (2004). HPV-18 E6*I modulates HPV-18 full-length E6 functions in a cell cycle dependent manner. *Int J Cancer* 110, 928–933.
- Haller, K., Wu, Y., Derow, E., Schmitt, I., Jeang, K. T. and Grassmann, R. (2002). Physical interaction of human T-cell leukemia virus type 1 Tax with cyclin-dependent kinase 4 stimulates the phosphorylation of retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 22, 3327–3338.
- Han, B., Dong, Z., Liu, Y., Chen, Q., Hashimoto, K. and Zhang, J.-T. (2003). Regulation of constitutive expression of mouse PTEN by the 5'-untranslated region. *Oncogene* 22, 5325–5337.
- Healy, N. C. and O'Connor, R. (2009). Sequestration of PDLIM2 in the cytoplasm of monocytic/macrophage cells is associated with adhesion and increased nuclear activity of NF-kappaB. *J. Leukoc. Biol.* 85, 481–90.
- Higuchi, M. and Fujii, M. (2009). Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. *Retrovirology* 6, 117.
- Hirata, A., Higuchi, M., Niinuma, A., Ohashi, M., Fukushi, M., Oie, M., Akiyama, T., Tanaka, Y., Gejyo, F. and Fujii, M. (2004). PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein augments the transforming activity in a rat fibroblast cell line. *Virology* 318, 327–336.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 682–696.
- Hirose, T., Izumi, Y., Nagashima, Y., Tamai-Nagai, Y., Kurihara, H., Sakai, T., Suzuki, Y., Yamanaka, T., Suzuki, A., Mizuno, K., et al. (2002). Involvement of ASIP/PAR-3 in the promotion of epithelial tight junction formation. *J Cell Sci* 115, 2485–2495.
- Huang, J., Ren, T., Guan, H., Jiang, Y. and Cheng, H. (2009). HTLV-1 Tax Is a Critical Lipid Raft Modulator That Hijacks I B Kinases to the Microdomains for Persistent Activation of NF- B. *J. Biol. Chem.* 284, 6208–6217.
- Huang, R., Xu, Y., Wan, W., Shou, X., Qian, J., You, Z., Liu, B., Chang, C., Zhou, T., Lippincott-Schwartz, J., et al. (2015). Deacetylation of Nuclear LC3 Drives Autophagy Initiation under Starvation. *Mol. Cell* 57, 456–466.
- Hughes, T. A. (2006). Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends Genet* 22, 119–122.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M. and Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18.

EMBO J. 10, 4129–35.

Inesta-Vaquera, F. A., Campbell, D. G., Arthur, J. S. and Cuenda, A. (2010). ERK5 pathway regulates the phosphorylation of tumour suppressor hDlg during mitosis. *Biochem Biophys Res Commun* 399, 84–90.

Ishidate, T., Matsumine, A., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (2000). The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene* 19, 365–372.

Ishitsuka, K. and Tamura, K. (2014). Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. *Lancet. Oncol.* 15, e517-26.

Jain, P., Mostoller, K., Flaig, K. E., Ahuja, J., Lepoutre, V., Alefantis, T., Khan, Z. K. and Wigdahl, B. (2007). Identification of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Amino Acid Signals and Cellular Factors Involved in Secretion of the Viral Oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 282, 34581–34593.

Jain, P., Manuel, S. L., Khan, Z. K., Ahuja, J., Quann, K. and Wigdahl, B. (2009). DC-SIGN Mediates Cell-Free Infection and Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 by Dendritic Cells. *J. Virol.* 83, 10908–10921.

James, C. D. and Roberts, S. (2016). Viral Interactions with PDZ Domain-Containing Proteins-An Oncogenic Trait? *Pathogens* 5,.

Jansen, R. P. (2001). mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 247–256.

Javier, R. T. (2008). Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses. *Oncogene* 27, 7031–7046.

Jaworski, E., Narayanan, A., Van Duyne, R., Shabbeer-Meyering, S., Iordanskiy, S., Saifuddin, M., Das, R., Afonso, P. V., Sampey, G. C., Chung, M., et al. (2014). Human T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain Tax protein. *J Biol Chem* 289, 22284–22305.

Jeyifous, O., Waites, C. L., Specht, C. G., Fujisawa, S., Schubert, M., Lin, E. I., Marshall, J., Aoki, C., de Silva, T., Montgomery, J. M., et al. (2009). SAP97 and CASK mediate sorting of NMDA receptors through a previously unknown secretory pathway. *Nat. Neurosci.* 12, 1011–1019.

Karpova, T. and McNally, J. G. (2006). Detecting Protein-Protein Interactions with CFP-YFP FRET by Acceptor Photobleaching. In *Current Protocols in Cytometry*, p. Unit12.7. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama, T. and Ishibashi, M. (1997). Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11612–11616.

Komada, M. and Kitamura, N. (2005). The Hrs/STAM complex in the downregulation of receptor tyrosine kinases. *J. Biochem.* 137, 1–8.

Kong, K., Kumar, M., Taruishi, M. and Javier, R. T. (2014). The Human Adenovirus E4-ORF1 Protein Subverts Discs Large 1 to Mediate Membrane Recruitment and Dysregulation of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *PLoS Pathog.* 10,.

- Kranjec, C. and Banks, L. (2011). A Systematic Analysis of Human Papillomavirus (HPV) E6 PDZ Substrates Identifies MAGI-1 as a Major Target of HPV Type 16 (HPV-16) and HPV-18 Whose Loss Accompanies Disruption of Tight Junctions. *J. Virol.* 85, 1757–1764.
- Kremers, G.-J., Goedhart, J., van Munster, E. B. and Gadella, T. W. J. (2006). Cyan and Yellow Super Fluorescent Proteins with Improved Brightness, Protein Folding, and FRET Förster Radius. *Biochemistry* 45, 6570–6580.
- Krishna Subbaiah, V., Massimi, P., Boon, S. S., Myers, M. P., Sharek, L., Garcia-Mata, R. and Banks, L. (2012). The Invasive Capacity of HPV Transformed Cells Requires the hDlg-Dependent Enhancement of SGEF/RhoG Activity. *PLoS Pathog.* 8, e1002543.
- Krummel, M. F. and Macara, I. (2006). Maintenance and modulation of T cell polarity. *Nat Immunol* 7, 1143–1149.
- Kubben, F. J., Peeters-Haesevoets, A., Engels, L. G., Baeten, C. G., Schutte, B., Arends, J. W., Stockbrügger, R. W. and Blijham, G. H. (1994). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut* 35, 530–5.
- Laprise, P., Chailier, P., Houde, M., Beaulieu, J.-F., Boucher, M.-J. and Rivard, N. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* 277, 8226–34.
- Laprise, P., Viel, A. and Rivard, N. (2004). Human Homolog of Disc-large Is Required for Adherens Junction Assembly and Differentiation of Human Intestinal Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 10157–10166.
- Lechner, M. S. and Laimins, L. A. (1994). Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* 68, 4262–73.
- Lee, C. and Laimins, L. A. (2004). Role of the PDZ Domain-Binding Motif of the Oncoprotein E6 in the Pathogenesis of Human Papillomavirus Type 31. *J. Virol.* 78, 12366–12377.
- Lee, H. J. and Zheng, J. J. (2010). PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal* 8, 8.
- Lee, O.-K., Frese, K. K., James, J. S., Chadda, D., Chen, Z.-H., Javier, R. T. and Cho, K.-O. (2003). Discs-Large and Strabismus are functionally linked to plasma membrane formation. *Nat. Cell Biol.* 5, 987–993.
- Levin, M. C. and Jacobson, S. (1997). HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): a chronic progressive neurologic disease associated with immunologically mediated damage to the central nervous system. *J. Neurovirol.* 3, 126–40.
- Lowy, D. R. and Schiller, J. T. (2006). Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 116, 1167–1173.
- Ludford-Menting, M. J., Oliaro, J., Sacirbegovic, F., Cheah, E. T., Pedersen, N., Thomas, S. J., Pasam, A., Iazzolino, R., Dow, L. E., Waterhouse, N. J., et al. (2005). A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity* 22, 737–748.
- Lue, R. A., Marfatia, S. M., Branton, D. and Chishti, A. H. (1994). Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila discs large tumor

- suppressor binds to protein 4.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9818–9822.
- Macara, I. G. (2004). Par proteins: partners in polarization. *Curr Biol* 14, R160-2.
- Macdonald, A. I., Sun, P., Hernandez-Lopez, H., Aasen, T., Hodgins, M. B., Edward, M., Roberts, S., Massimi, P., Thomas, M., Banks, L., et al. (2012). A functional interaction between the MAGUK protein hDlg and the gap junction protein connexin 43 in cervical tumour cells. *Biochem. J.* 446, 9–21.
- Mahieux, R. and Gessain, A. (2009). The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: New members of the HTLV family. *Pathol. Biol.* 57, 161–166.
- Manneville, J.-B., Jehanno, M. and Etienne-Manneville, S. (2010). Dlg1 binds GKAP to control dynein association with microtubules, centrosome positioning, and cell polarity. *J. Cell Biol.* 191, 585–598.
- Manns, A. and Blattner, W. A. (1991). The epidemiology of the human T-cell lymphotropic virus type I and type II: etiologic role in human disease. *Transfusion* 31, 67–75.
- Mantovani, F., Massimi, P. and Banks, L. (2001). Proteasome-mediated regulation of the hDlg tumour suppressor protein. *J Cell Sci* 114, 4285–4292.
- Martin-Latil, S., Gnadig, N. F., Mallet, A., Desdouits, M., Guivel-Benhassine, F., Jeannin, P., Prevost, M.-C., Schwartz, O., Gessain, A., Ozden, S., et al. (2012). Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. *Blood* 120, 572–580.
- Massimi, P., Gammoh, N., Thomas, M. and Banks, L. (2004). HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 23, 8033–8039.
- Massimi, P., Narayan, N., Cuenda, A. and Banks, L. (2006). Phosphorylation of the discs large tumour suppressor protein controls its membrane localisation and enhances its susceptibility to HPV E6-induced degradation. *Oncogene* 25, 4276–4285.
- Massimi, P., Narayan, N., Thomas, M., Gammoh, N., Strand, S., Strand, D. and Banks, L. (2008). Regulation of the hDlg/hScrib/Hugl-1 tumour suppressor complex. *Exp Cell Res* 314, 3306–3317.
- Massimi, P., Zori, P., Roberts, S. and Banks, L. (2012). Differential regulation of cell-cell contact, invasion and anoikis by hScrib and hDlg in keratinocytes. *PLoS One* 7, e40279.
- Mathivanan, S., Ji, H. and Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* 73, 1907–1920.
- Meertens, L., Chevalier, S., Weil, R., Gessain, A. and Mahieux, R. (2004). A 10-amino acid domain within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 tax protein sequences is responsible for their divergent subcellular distribution. *J Biol Chem* 279, 43307–43320.
- Mesplede, T., Gagnon, D., Bergeron-Labrecque, F., Azar, I., Senechal, H., Coutlee, F. and Archambault, J. (2012). p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. *J Virol* 86, 94–107.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. and Pesole, G. (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 3, REVIEWS0004.

- Munger, K., Basile, J. R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S. L., Grace, M. and Zacny, V. L. (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20, 7888–7898.
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V, Snijders, P. J. and Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348, 518–527.
- Nagasaka, K., Kawana, K., Osuga, Y. and Fujii, T. (2013). PDZ domains and viral infection: versatile potentials of HPV-PDZ interactions in relation to malignancy. *Biomed Res. Int.* 2013, 369712.
- Nakagawa, S. and Huibregtse, J. M. (2000). Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 20, 8244–8253.
- Nakamura, H., Nagasaka, K., Kawana, K., Taguchi, A., Uehara, Y., Yoshida, M., Sato, M., Nishida, H., Fujimoto, A., Inoue, T., et al. (2016). Expression of Par3 polarity protein correlates with poor prognosis in ovarian cancer. *BMC Cancer* 16, 897.
- Narayan, N., Massimi, P. and Banks, L. (2009). CDK phosphorylation of the discs large tumour suppressor controls its localisation and stability. *J Cell Sci* 122, 65–74.
- Nejmeddine, M., Barnard, A. L., Tanaka, Y., Taylor, G. P. and Bangham, C. R. (2005). Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem* 280, 29653–29660.
- Nejmeddine, M., Negi, V. S., Mukherjee, S., Tanaka, Y., Orth, K., Taylor, G. P. and Bangham, C. R. M. (2009). HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood* 114, 1016–1025.
- Nguyen, D. X., Westbrook, T. F. and McCance, D. J. (2002). Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest. *J. Virol.* 76, 619–32.
- Nicolaidis, L., Davy, C., Raj, K., Kranjec, C., Banks, L. and Doorbar, J. (2011). Stabilization of HPV16 E6 protein by PDZ proteins, and potential implications for genome maintenance. *Virology* 414, 137–145.
- O'Toole, E., Greenan, G., Lange, K. I., Srayko, M., Müller-Reichert, T., Luders, J., Stearns, T., Greenan, G., Brangwynne, C., Jaensch, S., et al. (2012). The Role of γ -Tubulin in Centrosomal Microtubule Organization. *PLoS One* 7, e29795.
- Oliva, C., Escobedo, P., Astorga, C., Molina, C. and Sierralta, J. (2012). Role of the maguk protein family in synapse formation and function. *Dev. Neurobiol.* 72, 57–72.
- Oliveria, S. F., Gomez, L. L. and Dell'Acqua, M. L. (2003). Imaging kinase--AKAP79--phosphatase scaffold complexes at the plasma membrane in living cells using FRET microscopy. *J. Cell Biol.* 160, 101–12.
- Oltean, S. (2015). Modulators of alternative splicing as novel therapeutics in cancer. *World J. Clin. Oncol.* 6, 92–5.
- Oltean, S. and Bates, D. O. (2014). Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene* 33, 5311–5318.

- Orlando, K. and Guo, W. (2009). Membrane Organization and Dynamics in Cell Polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, 1-18.
- Peinado, H., Olmeda, D. and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* 7, 415-428.
- Pham, K., Sacirbegovic, F. and Russell, S. M. (2014). Polarized cells, polarized views: asymmetric cell division in hematopoietic cells. *Front. Immunol.* 5, 26.
- Pieczynski, J. and Margolis, B. (2011). Protein complexes that control renal epithelial polarity. *AJP Ren. Physiol.* 300, F589-F601.
- Proietti, F. A., Carneiro-Proietti, A. B. F., Catalan-Soares, B. C. and Murphy, E. L. (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24, 6058-6068.
- Ramirez, J., Poirson, J., Foltz, C., Chebaro, Y., Schrapp, M., Meyer, A., Bonetta, A., Forster, A., Jacob, Y., Masson, M., et al. (2015). Targeting the Two Oncogenic Functional Sites of the HPV E6 Oncoprotein with a High-Affinity Bivalent Ligand. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54, 7958-62.
- Ren, T., Takahashi, Y., Liu, X., Loughran, T. P., Sun, S.-C., Wang, H.-G. and Cheng, H. (2015). HTLV-1 Tax deregulates autophagy by recruiting autophagic molecules into lipid raft microdomains. *Oncogene* 34, 334-345.
- Reuver, S. M. and Garner, C. C. (1998). E-cadherin mediated cell adhesion recruits SAP97 into the cortical cytoskeleton. *J Cell Sci* 111 (Pt 8, 1071-1080.
- Roberts, S., Delury, C. and Marsh, E. (2012). The PDZ protein discs-large (DLG): the "Jekyll and Hyde" of the epithelial polarity proteins. *FEBS J* 279, 3549-3558.
- Rodriguez-boulan, E. and Macara, I. G. (2014). Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 225-42.
- Romeo, D. S., Park, K., Roberts, A. B., Sporn, M. B. and Kim, S. J. (1993). An element of the transforming growth factor-beta 1 5'-untranslated region represses translation and specifically binds a cytosolic factor. *Mol. Endocrinol.* 7, 759-766.
- Rothenberg, S. M., Mohapatra, G., Rivera, M. N., Winokur, D., Greninger, P., Nitta, M., Sadow, P. M., Sooriyakumar, G., Brannigan, B. W., Ulman, M. J., et al. (2010). A genome-wide screen for microdeletions reveals disruption of polarity complex genes in diverse human cancers. *Cancer Res* 70, 2158-2164.
- Roucoux, D. F. and Murphy, E. L. (2004). The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev.* 6, 144-54.
- Rousset, R., Fabre, S., Desbois, C., Bantignies, F. and Jalinot, P. (1998). The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. *Oncogene* 16, 643-654.
- Roy, H. K., Smyrk, T. C., Koetsier, J., Victor, T. A. and Wali, R. K. (2005). The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer. *Dig. Dis. Sci.* 50, 42-6.
- Ruiz-Echevarria, M. J. and Peltz, S. W. (2000). The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames. *Cell* 101, 741-751.

- Sabio, G., Arthur, J. S., Kuma, Y., Peggie, M., Carr, J., Murray-Tait, V., Centeno, F., Goedert, M., Morrice, N. A. and Cuenda, A. (2005). p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *EMBO J* 24, 1134–1145.
- Sambrook Fritsch, E. E., Maniatis, R. J. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (NY Cold Spring Harb. Lab.
- Sandoval, G. J., Graham, D. B., Gmyrek, G. B., Akilesh, H. M., Fujikawa, K., Sammut, B., Bhattacharya, D., Srivatsan, S., Kim, A., Shaw, A. S., et al. (2013). Novel Mechanism of Tumor Suppression by Polarity Gene Discs Large 1 (DLG1) Revealed in a Murine Model of Pediatric B-ALL. *Cancer Immunol. Res.* 1, 426–437.
- Schiffman, M. and Kjaer, S. K. (2003). Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 14–19.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682.
- Scholat, U. (1997). Permanent Gene Expression in Mammalian Cells: Gene transfer and selection. *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production. Mamm. Cell Biotechnol. Protein Prod.* Cap 1.2, 33–52.
- Sfakianos, J., Togawa, A., Maday, S., Hull, M., Pypaert, M., Cantley, L., Toomre, D. and Mellman, I. (2007). Par3 functions in the biogenesis of the primary cilium in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 179, 1133–1140.
- Shah P.M., K. V. and H. (1996). Papillomavirinae: Papillomaviruses. *Fields Virol.* Third Edit, 2077–2109 (Philadelphia: Lippincott–Raven publishe.
- Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.
- Smith, L. (2008). Post-transcriptional regulation of gene expression by alternative 5'-untranslated regions in carcinogenesis. *Biochem Soc Trans* 36, 708–711.
- Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31–40.
- Smith, L., Brannan, R. A., Hanby, A. M., Shaaban, A. M., Verghese, E. T., Peter, M. B., Pollock, S., Satheesha, S., Szykiewicz, M., Speirs, V., et al. (2010). Differential regulation of oestrogen receptor β isoforms by 5' untranslated regions in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 2172–2184.
- Snapp, E. L. and Hegde, R. S. (2006). Rational design and evaluation of FRET experiments to measure protein proximities in cells. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 17, Unit 17 9.
- Sobczak, K. and Krzyzosiak, W. J. (2002). Structural Determinants of BRCA1 Translational Regulation. *J. Biol. Chem.* 277, 17349–17358.
- Sotelo, N. S., Valiente, M., Gil, A. and Pulido, R. (2012). A functional network of the tumor suppressors APC, hDlg, and PTEN, that relies on recognition of specific PDZ-domains. *J Cell Biochem* 113, 2661–2670.
- Stucke, V. M., Timmerman, E., Vandekerckhove, J., Gevaert, K. and Hall, A. (2007). The

- MAGUK protein MPP7 binds to the polarity protein hDlg1 and facilitates epithelial tight junction formation. *Mol. Biol. Cell* 18, 1744–55.
- Subbaiah, V. K., Kranjec, C., Thomas, M. and Banks, L. (2011). PDZ domains: the building blocks regulating tumorigenesis. *Biochem. J.* 439, 195–205.
- Subbaiah, V. K., Narayan, N., Massimi, P. and Banks, L. (2012). Regulation of the DLG tumor suppressor by β -catenin. *Int. J. Cancer* 131, 2223–2233.
- Sun, P., Dong, L., MacDonald, A. I., Akbari, S., Edward, M., Hodgins, M. B., Johnstone, S. R. and Graham, S. V (2015). HPV16 E6 Controls the Gap Junction Protein Cx43 in Cervical Tumour Cells. *Viruses* 7, 5243–5256.
- Suzuki, T., Ohsugi, Y., Uchida-Toita, M., Akiyama, T. and Yoshida, M. (1999). Tax oncoprotein of HTLV-1 binds to the human homologue of Drosophila discs large tumor suppressor protein, hDLG, and perturbs its function in cell growth control. *Oncogene* 18, 5967–5972.
- Swat Ana Miletic, W. V., Kloeppel, T., Landry, A., Graham, R., Chan-Wang, J., Brim, K. L., Huett, A. S., Stephenson, L. M. and Sammut, B. (2007). DLGH1 Is a Negative Regulator of T-Lymphocyte Proliferation. *Mol. Cell. Biol* 27, 7574–7581.
- Syrjänen, S. M. (1999a). Molecular Biology of Papillomavirus. Papillomavirus Infections in Human Pathology. *Department Pathol. Univ. Siena, Italy. Department Oral Pathology. Univ. Turku, Finl.* 11–51.
- Syrjänen, S. M. (1999b). Pathogenesis of HPV infections. Papillomavirus Infections in Human Pathology. *Dep. Pathol. Univ. Siena, Italy. Department Oral Pathol. Univ. Turku, Finl.* 52–88.
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempfues, K. J., Miwa, J. and Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125, 3607–3614.
- Tamehiro, N., Mujawar, Z., Zhou, S., Zhuang, D. Z., Hornemann, T., von Eckardstein, A. and Fitzgerald, M. L. (2009). Cell Polarity Factor Par3 Binds SPTLC1 and Modulates Monocyte Serine Palmitoyltransferase Activity and Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 284, 24881–24890.
- Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 77–88.
- Thomas, M. and Banks, L. (1998). Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 17, 2943–2954.
- Thomas, M., Pim, D. and Banks, L. (1999). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 18, 7690–7700.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350–4354.
- Trinklein, N. D., Aldred, S. J. F., Saldanha, A. J. and Myers, R. M. (2003). Identification and Functional Analysis of Human Transcriptional Promoters. *Genome Res.* 13, 308–312.
- Tsuji, T., Sheehy, N., Gautier, V. W., Hayakawa, H., Sawa, H. and Hall, W. W. (2007). The nuclear import of the human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) tax protein is

carrier- and energy-independent. *J Biol Chem* 282, 13875–13883.

Valdano, M. B., Cavatorta, A. L., Morale, M. G., Marziali, F., de Souza Lino, V., Steenbergen, R. D., Boccardo, E. and Gardiol, D. (2016). Disc large 1 expression is altered by human papillomavirus E6/E7 proteins in organotypic cultures of human keratinocytes. *J Gen Virol* 97, 453–462.

Valiente, M., Andrés-Pons, A., Gomar, B., Torres, J., Gil, A., Tapparel, C., Antonarakis, S. E. and Pulido, R. (2005). Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 28936–43.

van Ree, J. H., Nam, H.-J., Jeganathan, K. B., Kanakkanthara, A. and van Deursen, J. M. (2016). Pten regulates spindle pole movement through Dlg1-mediated recruitment of Eg5 to centrosomes. *Nat. Cell Biol.* 18, 814–21.

Walch, L. (2013). Emerging role of the scaffolding protein Dlg1 in vesicle trafficking. *Traffic* 14, 964–973.

Watson, R. A., Rollason, T. P., Reynolds, G. M., Murray, P. G., Banks, L. and Roberts, S. (2002). Changes in expression of the human homologue of the *Drosophila* discs large tumour suppressor protein in high-grade premalignant cervical neoplasias. *Carcinogenesis* 23, 1791–1796.

Wawrzyniak, A. M., Kashyap, R. and Zimmermann, P. (2013). Phosphoinositides and PDZ Domain Scaffolds. In *Advances in experimental medicine and biology*, pp. 41–57.

Woo, R. A. and Poon, R. Y. C. (2003). Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2, 316–24.

Wu, X., Hepner, K., Castelino-Prabhu, S., Do, D., Kaye, M. B., Yuan, X. J., Wood, J., Ross, C., Sawyers, C. L. and Whang, Y. E. (2000). Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4233–4238.

Wu, H., Feng, W., Chen, J., Chan, L.-N., Huang, S. and Zhang, M. (2007). PDZ Domains of Par-3 as Potential Phosphoinositide Signaling Integrators. *Mol. Cell* 28, 886–898.

Xavier, R., Rabizadeh, S., Ishiguro, K., Andre, N., Ortiz, J. B., Wachtel, H., Morris, D. G., Lopez-Illasaca, M., Shaw, A. C., Swat, W., et al. (2004). Discs large (Dlg1) complexes in lymphocyte activation. *J Cell Biol* 166, 173–178.

Xie, L., Yamamoto, B., Haoudi, A., Semmes, O. J. and Green, P. L. (2006). PDZ binding motif of HTLV-1 Tax promotes virus-mediated T-cell proliferation in vitro and persistence in vivo. *Blood* 107, 1980–1988.

Xue, B., Krishnamurthy, K., Allred, D. C. and Muthuswamy, S. K. (2013). Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell-cell cohesion. *Nat Cell Biol* 15, 189–200.

Yap, A. S., Gomez, G. A. and Parton, R. G. (2015). Adherens Junctions Revisualized: Organizing Cadherins as Nanoassemblies. *Dev. Cell* 35, 12–20.

Yoshida, S., Higuchi, M., Shoji, T., Yoshita, M., Ishioka, K., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Uchiyama, M. and Fujii, M. (2008). Knockdown of synapse-associated protein Dlg1 reduces syncytium formation induced by human T-cell leukemia virus type 1. *Virus Genes* 37, 9–15.

- Zen, K., Yasui, K., Gen, Y., Dohi, O., Wakabayashi, N., Mitsufuji, S., Itoh, Y., Zen, Y., Nakanuma, Y., Taniwaki, M., et al. (2009). Defective expression of polarity protein PAR-3 gene (PARD3) in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* 28, 2910–2918.
- Zhang, T. (2003). Multiple Variable First Exons: A Mechanism for Cell- and Tissue-Specific Gene Regulation. *Genome Res.* 14, 79–89.
- Zhang, B., Chen, W. and Roman, A. (2006). The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 437–442.
- Zhang, P., Wang, S., Wang, S., Qiao, J., Zhang, L., Zhang, Z., Chen, Z., Nelson, W., Etemad-Moghadam, B., Guo, S., et al. (2016). Dual function of partitioning-defective 3 in the regulation of YAP phosphorylation and activation. *Cell Discov.* 2, 160–171.
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K. and Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 564–580.
- Zimmermann, T., Kashyap, A., Hartmann, U., Otto, G., Galle, P. R., Strand, S. and Strand, D. (2008). Cloning and characterization of the promoter of Hugl-2, the human homologue of *Drosophila* lethal giant larvae (lgl) polarity gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 1067–1073.
- zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288, F55-78.