



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE CIENCIAS

Tesina de Grado

**LA INTERACCIÓN ENTRE LOS RIBOSOMAS Y EL MOTOR  
MOLECULAR MIOSINA 5a ES REGULADA POR VARIACIONES DE  
CALCIO INTRACELULAR.**

CAMILA BARDIER LUZARDO

Tutor: Dra. Lucía Canclini

Co-tutor: Dr. Aldo Calliari

Departamento de Genética - IIBCE

Montevideo, Uruguay

2018

## **PÁGINA DE APROBACIÓN**

FACULTAD DE CIENCIAS

El tribunal docente integrado por los abajo firmantes aprueba la Tesis de Investigación:

Título: La interacción entre los ribosomas y el motor molecular miosina 5a es regulada por variaciones de calcio intracelular.

Autora: Camila Bardier Luzardo

Tutora: Dra. Lucía Canclini

Co-tutor: Dr. Aldo Calliari

Carrera: Licenciatura en Bioquímica

## **AGRADECIMIENTOS**

A Lulú y Aldo, mis tutores, por guiarme en este camino y por todo el aprendizaje; pero por sobre todas las cosas, por la infinita paciencia que me tuvieron todo este tiempo.

A mi familia, sin quienes no hubiera sido posible llegar hasta acá; por su apoyo constante e incondicional.

A mis compañeros de DGEN y de LEIG, que me recibieron de la mejor manera, siempre dispuestos a ayudarme y a alentarme para que terminara este trabajo.

A Glendas, pilar fundamental durante todos estos años y cuya amistad es el valor más grande que me llevo de fcien. Sin dudas, mi paso por acá no hubiese sido el mismo sin ellas (ni sin sus apuntes).

A Los Pibes, que a pesar de no entender nada de bioquímica se tomaron el tiempo de leer este trabajo y ayudarme en lo que pudieran. Por bancarme la cabeza siempre, por los rezongos y por alegrarse de mis logros como si fueran los suyos propios.

A Las Gurisas, mis amigas de siempre, por estar ahí en mis fracasos y mis victorias.

A Marianita, Flo Mosquillo, Maldini, Carina y J. Peralta, por acompañarme en este proceso y hacerlo más ameno.

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
TABLA DE CONTENIDO .....	iv
RESUMEN.....	vi
PALABRAS CLAVE .....	viii
1. INTRODUCCIÓN .....	9
1.1 Los ribosomas y su biogénesis .....	9
1.2 Transporte citoplasmático de los ribosomas .....	13
1.3 Miosina 5a .....	16
2. HIPÓTESIS.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo general .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1 Cultivo celular.....	26
4.2 Inmunomarcación.....	29
4.3 Microscopía confocal de Transferencia de energía resonante de Förster (FRET) cuantitativa .....	31

4.4 Microscopía confocal y adquisición de imágenes.....	34
4.5 Análisis de FRET cuantitativo.....	35
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Puesta a punto de las condiciones de inmunomarcación con anticuerpos anti-Myo5a y anti-proteína ribosomal P0 en células 3T3-L1 .....	38
5.2 Análisis de la interacción entre los ribosomas y la Myo5a mediante inmunomicroscopía FRET confocal cuantitativa.....	41
5.3 Análisis de los cambios en la interacción entre los ribosomas y la Myo5a en respuesta a KCl mediante inmunomicroscopía FRET confocal .....	44
6. DISCUSIÓN.....	48
7. CONCLUSIONES .....	52
8. PERSPECTIVAS .....	53
9. BIBLIOGRAFÍA .....	54

## RESUMEN

Los mecanismos involucrados en el transporte y localización de los ARN mensajeros (ARNm), de gran relevancia en la localización de proteínas y en el desarrollo e identidad de territorios subcelulares, han sido bastante caracterizados. Sin embargo, cómo se transportan los ribosomas dentro de la célula ha sido menos estudiado. Actualmente sabemos que, en axones, los ribosomas pueden formar complejos de ribonucleoproteína (RNPs) asociados a la miosina 5a (Myo5a), un motor molecular dependiente de microfilamentos, y que algunos de esos ribosomas empaquetados en RNPs se encuentran como polisomas. La Myo5a no parece ser relevante para el transporte de los ribosomas desde el núcleo hacia la periferia celular. Por otra parte, *in vitro* se ha observado que el motor puede separarse de los ribosomas cuando los complejos de RNPs se exponen a calcio. Teniendo en cuenta que dicho ión modula la actividad de diversas moléculas en respuesta a señales extracelulares y genera cambios conformacionales en la Myo5a, se podría pensar que la Myo5a podría comportarse como un interruptor molecular capaz de anclar o liberar ribosomas del citoesqueleto de actina en respuesta a una señal externa específica. En esta tesina de grado se propone, entonces, que los complejos de Myo5a y ribosomas se disocian *in vivo* en respuesta a cambios en la concentración intracelular de calcio. Dichos cambios fueron inducidos por la adición de KCl en el medio extracelular. Se decidió utilizar este compuesto para generar un estímulo extracelular fisiológico (despolarización) y se utilizaron, como modelo,

células de la línea 3T3-L1, que expresan canales de calcio voltaje-dependientes. Para estudiar la asociación Myo5a-ribosomas se realizó inmunomicroscopía FRET confocal cuantitativa, un método sensible y adecuado para estudiar interacciones a nivel molecular *in situ*. De esta manera, en el presente trabajo, se demostró la asociación a nivel molecular de los ribosomas y el motor molecular miosina 5a, pudiéndose demostrar también que dicha interacción es sensible a calcio. Si bien es conocido que el calcio es un elemento esencial para la actividad enzimática de las miosinas, su capacidad para regular la interacción con la carga (y en particular con ribosomas) *in vivo*, constituye un aspecto absolutamente novedoso.

## **PALABRAS CLAVE**

Miosina 5a

Ribosoma

P0

Calcio

Transferencia de Energía Resonante de Förster

Transporte intracelular

Ribonucleopartículas



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Los ribosomas y su biogénesis

Los ribosomas traducen la información genética que está en forma de ARNm, en proteínas; proceso esencial para la fisiología celular. Muchos aspectos de la traducción y su regulación son específicos de eucariotas, cuyos ribosomas son más grandes y complejos que los de bacterias <sup>1</sup>. En eucariotas, los ribosomas están compuestos por dos subunidades: una mayor, denominada 60S, y una menor, 40S. La subunidad mayor está formada por 3 ARN ribosomales (ARNr), sean 28S, 5.8S y 5S, y 47 proteínas ribosomales (proteínas r) diferentes. La subunidad menor, por otro lado, está formada por el ARNr 18S y 33 proteínas ribosomales <sup>2,3</sup>. Ambas subunidades juntas conforman al ribosoma 80S <sup>4</sup>.

La biogénesis de los ribosomas (figura 1) comprende la transcripción y el procesamiento de los ARN pre-ribosomales, su plegamiento y ensamblaje con proteínas ribosomales en el nucléolo; y el transporte del pre-ribosoma resultante al citoplasma, donde se da la maduración final <sup>5,6</sup>. La síntesis del ribosoma es una de las actividades celulares que demandan más energía y tiene un alto grado de complejidad.

El ensamblaje de los ribosomas requiere de más de 200 factores de ensamblaje, conservados a lo largo de la evolución y que se asocian transitoriamente con el pre-ribosoma en estadios de maduración

específicos. Dichos factores pueden tener actividad ATPasa, GTPasa, helicasa, kinasa o nucleasa y son los encargados de orquestrar la modificación ordenada, el plegamiento y el procesamiento del ARNr, así como de reclutar a las proteínas r<sup>4</sup>. Luego de cumplir sus funciones, los factores de ensamblaje de acción temprana son liberados, preparando a los pre-ribosomas para la exportación nuclear, que se da a través del complejo de poro nuclear<sup>2,7</sup>.

En eucariotas los pasos centrales en la biogénesis de los ribosomas están conservados, pero algunos aspectos en eucariotas superiores difieren de su contraparte en levaduras. Estas diferencias surgen por la adquisición de pasos de procesamiento adicionales, la aparición de nuevos factores o la creación de nuevos caminos regulatorios. También se ha visto que la población de ribosomas es más heterogénea de lo que se creía en términos de componentes, lo que le brindaría al ribosoma la capacidad de comportarse como filtro de ARNm, permitiendo la traducción selectiva de ARNm específicos dependiendo del tejido o la condición en la que se encuentra la célula<sup>8,9</sup>. Sólo algunas enfermedades hereditarias raras han sido conectadas a defectos en la biogénesis del ribosoma, generadas por mutaciones en las proteínas r o en factores de la biogénesis. El hecho de que dichas enfermedades sean pocas sugiere que la mayoría de los defectos causan letalidad y por ende, sugieren la esencialidad del proceso<sup>4</sup>.

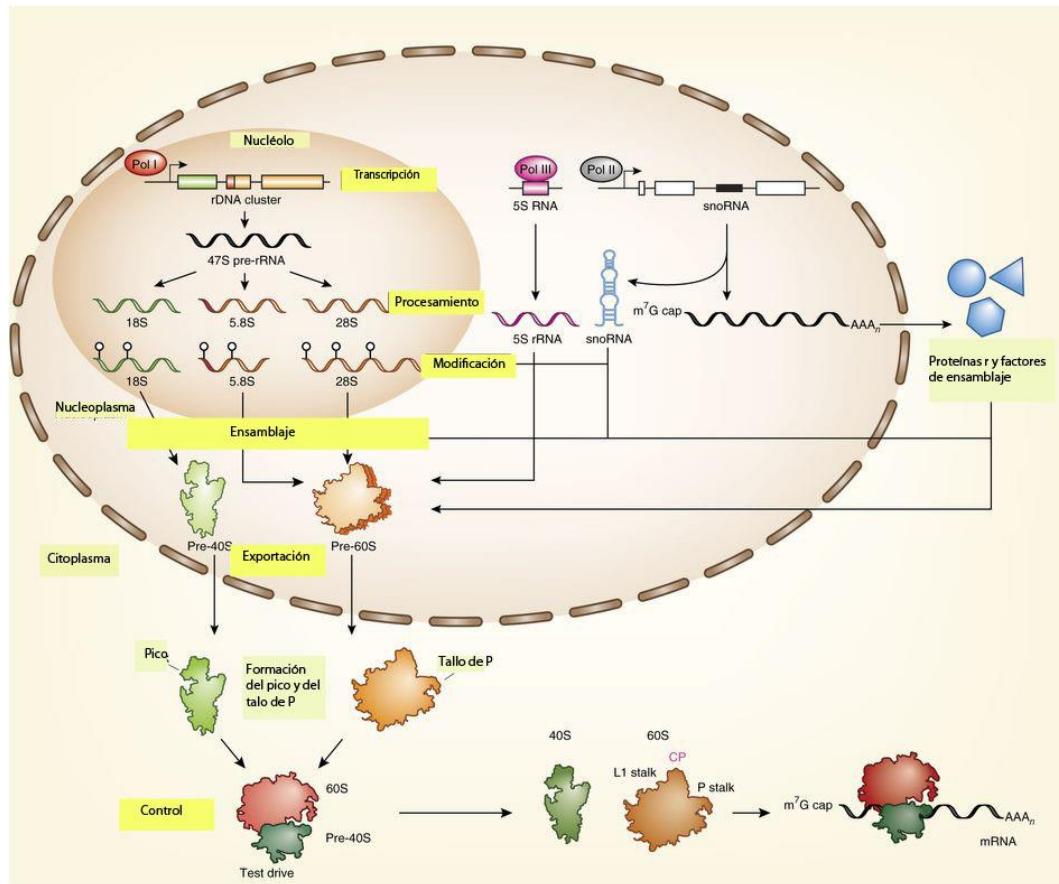
En eucariotas superiores la biogénesis del ribosoma comienza con la síntesis del precursor 47S (pre-47S) por parte de la ARN Polimerasa I (Pol I) en el nucléolo y la síntesis del ARNr 5S en el nucleoplasma, mediante la ARN Polimerasa III (Pol III). Una vez generado, el precursor debe ser procesado para remover las secuencias espaciadoras externas (5' ETS y 3' ETS) e internas (ITS1 e ITS2), dando lugar así a los ARNr 18S, 5.8S y 28S<sup>10-12</sup>. En estos organismos, el procesamiento del pre-ARN ocurre post transcripcionalmente casi exclusivamente<sup>13</sup>. Para su procesamiento, el pre-47S es blanco de unión de cerca de 300 snoARN (*small nucleolar RNAs*)<sup>3</sup> que participan en la modificación, procesamiento y plegamiento del pre-ARNr<sup>14</sup>. Los ARNr son modificados por metilación, acetilación o amino-carboxipropilación de las bases, por formación de isómeros de uridina y por metilación de los azúcares, y se cree que modulan la actividad ribosomal<sup>14,15</sup>. Se ha postulado también que los snoARN juegan roles en el plegamiento de los ARNr<sup>16</sup>.

Antes de asociarse a los ARNr, las proteínas r son sintetizadas en el citoplasma y luego transportadas al núcleo, a través de los complejos del poro nuclear (NPC)<sup>17</sup>. Al parecer, en levaduras, la mayoría de las proteínas r se ensamblan con los ARNr a medida que estos se transcriben<sup>3</sup>. Sin embargo, no todas las proteínas r ingresan al núcleo para incorporarse a las subunidades ribosomales. Por ejemplo, la proteína P0 se incorpora a la subunidad 60S en el citoplasma, como se detallará más adelante. En el núcleo también se incorporan proteínas accesorias (llamadas

*placeholders*), cuya función es enmascarar sitios funcionales importantes para prevenir una actividad prematura del ribosoma <sup>16</sup>. Las proteínas r y accesorias de la subunidad mayor y los ARNr 28S, 5.8S y 5S forman la subunidad pre-60S. Mientras que el conjunto de proteínas r y proteínas accesorias de la subunidad menor y el ARNr 18S se convierten en la subunidad pre-40S <sup>18</sup>.

Las subunidades pre-60S y pre-40S son a continuación exportadas al citoplasma y una vez allí, se completa la maduración de las subunidades ribosomales mediante varios procesos. Las proteínas accesorias se liberan en el citoplasma al parecer siguiendo un proceso jerárquico mediado predominantemente por GTPasas <sup>19</sup> y ATPasas <sup>20</sup>. Algunas de las proteínas accesorias removidas son sustituidas por proteínas r que permanecerán en cada una de las subunidades <sup>21,22</sup>. La maduración de cada subunidad también incluye la formación de estructuras características de cada una de ellas: el “pico” de la subunidad 40S y el “tallo” de la subunidad 60S. Estas estructuras son imprescindibles para el correcto funcionamiento del ribosoma <sup>18,23,24</sup>. En particular, el “tallo” de la subunidad 60S o *P-stalk*, una protuberancia lateral de esta subunidad, recluta GTPasas traduccionales que, mediante la hidrólisis de GTP, brindarán la energía necesaria para la traducción <sup>25</sup>. En eucariotas, el tallo está compuesto por un complejo pentamérico formado por dos heterodímeros de P2 y P1, y una proteína P0 <sup>26</sup>. Para que el *P-stalk* se forme es necesario que la proteína ribosomal P0 se incorpore <sup>27,28</sup>. La incorporación de P0 en

el *P-stalk* es uno de los últimos pasos de la maduración del ribosoma, por lo que esta proteína es un marcador de partículas ribosomales maduras <sup>29</sup>.



**Figura 1. Biogénesis del ribosoma.** Se muestran los diferentes pasos de la biogénesis del ribosoma incluyendo el procesamiento, la modificación, el ensamblaje, la exportación al citoplasma y el control de calidad. Algunos factores claves que intervienen en el proceso también se esquematizan en la figura. Modificado de Lafontaine et al, 2015.

## 1.2 Transporte citoplasmático de los ribosomas

Una vez en el citoplasma, los ribosomas deben alcanzar los sitios donde cumplirán su función, ya sea mediante difusión pasiva o transporte activo a través de componentes del citoesqueleto. Existen dos componentes del citoesqueleto conocidos como mediadores del transporte

intracelular de organelos y complejos macromoleculares: los microtúbulos y los filamentos de actina <sup>30-32</sup>.

La interacción entre los ribosomas y el citoesqueleto fue descrita hace más de 40 años. Inicialmente, la asociación entre los poli-ribosomas y elementos del citoesqueleto se sugirió mediante microscopía electrónica clásica <sup>33,34</sup>, así como también mediante microscopía electrónica de agregados de tubulina generados mediante el uso de vinblastina y vincristina, en los que también se encontró la presencia de ribosomas <sup>35</sup>. Otros trabajos contemporáneos demostraron mediante estudios de bioquímica clásica la presencia de poli-ribosomas en fracciones purificadas de citoesqueleto <sup>36-40</sup>. A través de co-inmunoprecipitación e inmunofluorescencia se observó también la interacción entre proteínas involucradas en la traducción y en la maduración de la subunidad 60S con el citoesqueleto de actina y los microtúbulos <sup>41</sup>.

En neuronas se ha visto que los ribosomas pueden transportarse en forma de gránulos de ARN –compuestos por ARNm, proteínas de unión a ARN, entre otros-, los cuales no serían traduccionalmente activos, funcionarían como formas de almacenamiento <sup>42</sup>. Estos gránulos son transportados por dineínas y kinesinas (KIF) <sup>43</sup>. En este mismo modelo de estudio se observó que el dominio C-terminal de KIF4 interactúa de manera directa con la proteína ribosomal P0, siendo responsable del transporte anterógrado del ribosoma <sup>44</sup>. Otra KIF que podría estar involucrada en el transporte ribosomal es la KIF5B, dado que esta proteína interactúa con

p180, una proteína del retículo endoplasmático que es capaz de unir ribosomas <sup>45</sup>. De manera similar, se ha visto que en el hongo *Ustilago maydis*, los polisomas pueden asociarse a endosomas tempranos que recorren largas distancias asociados a la kinesina 3 (KIF1) y dineínas <sup>46</sup>.

Respecto a los filamentos de actina, se ha encontrado en oocitos de *Xenopus*, que el citoesqueleto de actina provee el andamiaje para la inserción o liberación de proteínas involucradas en la maduración de la subunidad mayor 60S <sup>41</sup>. En fibroblastos y neuronas se ha observado, mediante inmunofluorescencia e inmunoprecipitación, la asociación entre los ribosomas y el motor molecular asociado a la actina, Miosina 5a (Myo5a) <sup>47</sup>. Asimismo, en fibroblastos KO para Myo5a se ha observado que la distribución citoplasmática es esencialmente igual a las de las células de tipo salvaje, por lo que se podría pensar que este motor molecular no es responsable del transporte ribosomal de largas distancias en el citoplasma, sino que se podría comportar como un interruptor molecular capaz de anclar o liberar ribosomas al citoesqueleto de actina en respuesta a una señal externa específica (Calliari, comunicación personal).

Se ha observado que la asociación entre los polisomas y el citoesqueleto puede ser modulada por estímulos fisiológicos como la activación de la vía insulina, por ejemplo. En células en cultivo, la presencia de esta hormona, induce un aumento de poli-ribosomas unidos al citoesqueleto <sup>48</sup>.

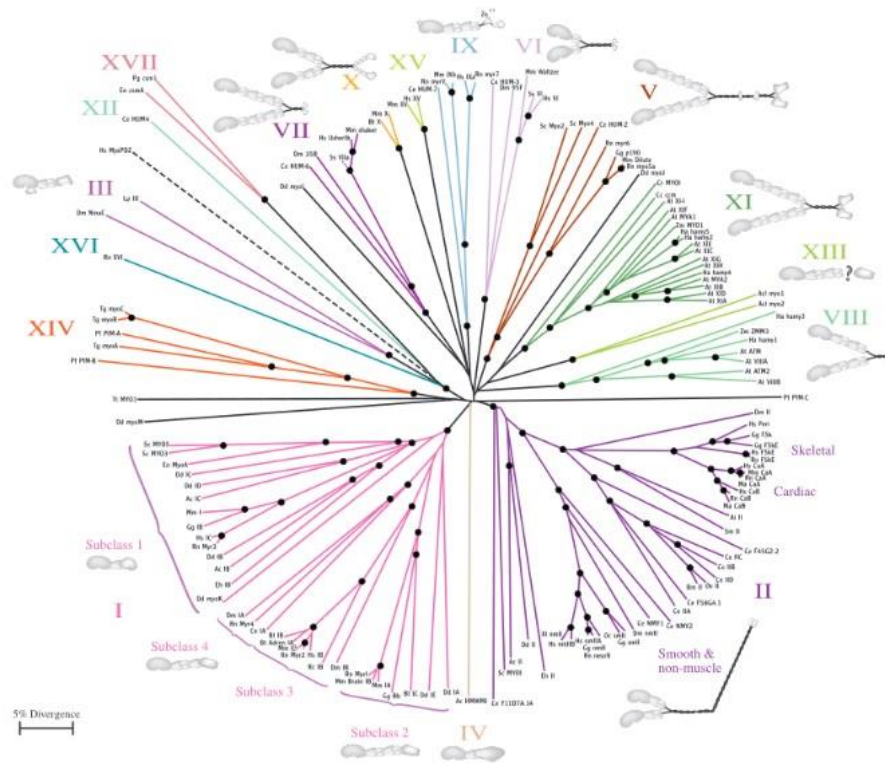
Se ha propuesto, entonces, que la asociación entre la maquinaria traduccional y el citoesqueleto regularía la traducción, en parte interviniendo en la localización citoplasmática de los ribosomas, y restringiendo la síntesis de proteínas a sitios específicos del citoplasma <sup>45,49</sup>.

### **1.3 Miosina 5a**

Las miosinas son proteínas de unión a la actina, que mediante la hidrólisis de ATP generan fuerza motora. Son fundamentales en la citoquinesis, el transporte de organelos, la generación de polaridad celular, el transporte intracelular y la señalización celular <sup>50,51</sup>. Estudios filogenéticos han clasificado a las miosinas en 18 Clases diferentes (figura 2) <sup>52</sup>. Algunas miosinas, sin embargo, no han sido incluidas en ninguna de ellas debido a que su secuencia no alinea lo suficientemente bien con las descritas y por lo tanto, no hay consenso sobre su identidad <sup>53</sup>. Las miosinas de Clase II no musculares – conocidas como convencionales- cumplen funciones en la adhesión celular y la polarización celular <sup>54</sup>. De las miosinas de Clase III –no convencionales- se sabe muy poco <sup>55</sup>. Las miosinas de la Clase V están relacionadas al transporte de organelos y partículas <sup>56</sup>. Las miosinas de la Clase VI están involucradas en el tráfico de membrana <sup>57</sup>, mientras que las de la Clase VII, probablemente estén involucradas en la integridad de las esterocilias de las células del oído

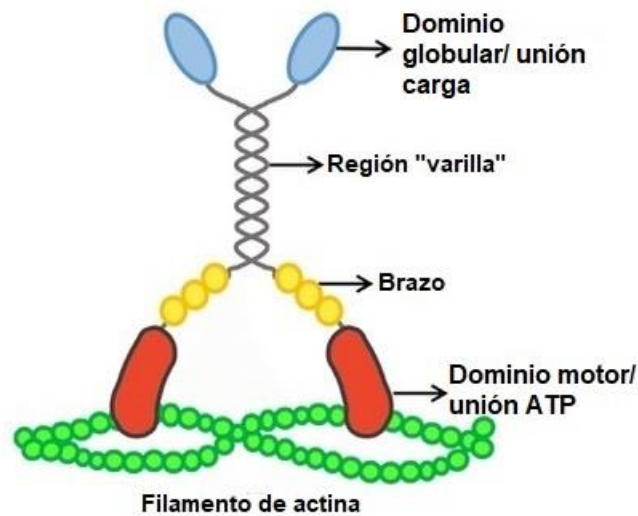


interno y en el tráfico de membrana <sup>53</sup>. Las de las Clases I y X están implicadas en la formación correcta del huso cromático <sup>58,59</sup>; las de la Clase X también están involucradas en la formación de filopodios. Las de la Clase XV son necesarias para la formación de las esterocilias. Aquellas de las Clases VIII, XI y XIII, se encuentran únicamente en plantas y son responsables de los movimientos de organelos y la localización de vesículas <sup>53,60</sup>. Todas las moléculas de miosina están compuestas de una o dos cadenas pesadas y varias cadenas livianas. Las cadenas pesadas están formadas por: a) un dominio motor que contiene la función ATPasa y el sitio de unión a la actina <sup>61</sup>; b) un brazo que contiene una región de motivos IQ de longitud variable y c) un dominio globular. Algunas miosinas tienen una región “varilla” entre el brazo y el dominio globular, cuyas  $\alpha$ -hélices se asocian y forman una  $\alpha$ -hélice súperenrollada. Esta última región puede estar ausente en las miosinas monoméricas.



**Figura 2. Árbol filogenético de la superfamilia de las miosinas.** Se muestran las 18 Clases de miosinas.

Las miosinas de la Clase V forman parte del grupo de miosinas conocidas como “no convencionales”<sup>62</sup>, debido a que las miosinas musculares fueron las únicas conocidas por décadas y por lo tanto, llamadas “convencionales”. Las miosinas de la Clase V presentes en los mamíferos están representados por tres genes diferentes. En el ratón, se denominan “Myo5a”, “Myo5b” y “Myo 5c”, todas con estructura cuaternaria muy similar pero con funciones y distribución tisular diferente. Cada molécula de Myo5a es un homodímero (figura 3), por lo que cada proteína contiene en realidad dos dominios motores y dos dominios globulares<sup>63</sup>.



**Figura 3 Dominios de la Myo5a.** Se observan los cuatro dominios de la Myo5a: dominio motor, brazo, varilla y dominio globular.

La porción N-terminal de la Myo5a comprende, como fue mencionado, el dominio motor que contiene el sitio de unión a la actina y el sitio de unión a ATP. Este dominio, mediante la hidrólisis del ATP unido es responsable de generar la energía necesaria para que se dé el movimiento procesivo <sup>64</sup>. En la porción N-terminal también se encuentra una región con homología a los dominios SH3, cuya función en la Myo5a no está establecida, pero que se sabe en otras miosinas regula la estabilidad y el movimiento <sup>65</sup>.

El brazo, por su parte, es capaz de amplificar pequeños cambios que se originan en el sitio activo, permitiendo de esta manera que se dé un gran impulso luego de la hidrólisis de ATP <sup>66</sup>. Este dominio contiene tiene seis motivos IQ, cada uno con una secuencia consenso IQxxxRGxxxR, siendo

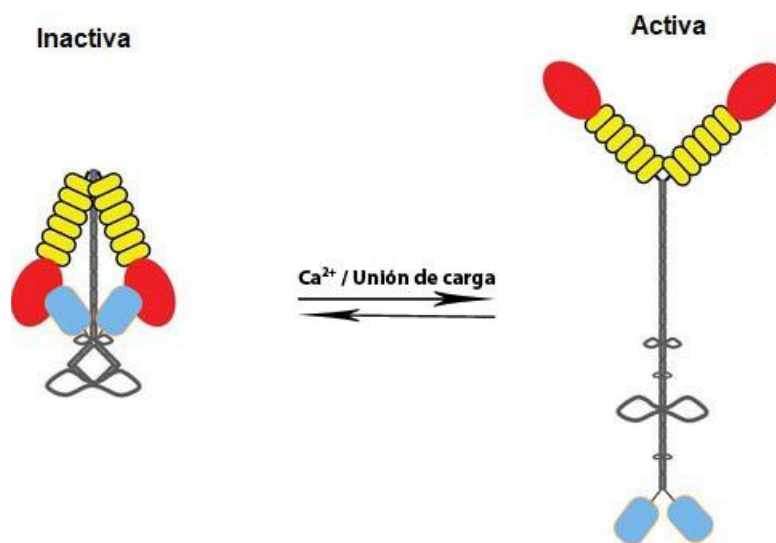
x cualquier aminoácido. Los motivos IQ son sitios de unión a calmodulinas (CaM, del inglés *calcium-modulated protein*), proteínas expresadas en todas las células eucariotas que funcionan como moduladores de respuesta a calcio <sup>67</sup>.

A continuación del brazo, las miosinas de clase V contienen una región de  $\alpha$ -hélice súperenrollada, conocida como región varilla. Esta región es responsable de la dimerización de la molécula <sup>66</sup>. Asimismo, este sitio puede ser clivado por calpainas *in vitro*, aunque su rol *in vivo* no se conoce con exactitud <sup>68</sup>.

Finalmente, unos 400 aminoácidos en el extremo C-terminal de la Myo5a conforman el dominio globular (cola) de la misma. Éste se encarga de unir proteínas adaptadoras capaces de conectar la Myo5a con su carga <sup>69</sup>. Esta región es también responsable de la estabilización de la conformación enrollada e inhibida de la Myo5a mediante una interacción con el dominio motor <sup>63</sup>.

La actividad de la Myo5a está regulada por calcio y la evidencia apunta a la participación de las proteínas CaM asociadas a la miosina, como moduladores de la respuesta a este ión. A partir de concentraciones sub- $\mu$ M de calcio, las proteínas CaM tienden a asociarse de las secuencias IQ de la Myo5a <sup>70</sup>. En estas condiciones, la molécula adopta una conformación desplegada, coincidiendo con su máxima actividad enzimática y motora. Contrariamente, en ausencia de calcio el motor

adopta una conformación triangular inactiva, donde la cola se pliega para unirse al dominio motor (figura 4). En este estado, el sitio activo se encuentra bloqueado y se impide la liberación de los productos de hidrólisis del ATP y por consiguiente la reanudación del ciclo catalítico. Esta interacción región motora-cola no bloquea, sin embargo, el sitio de unión a la actina. De esta forma, en la conformación plegada la proteína se encuentra enzimática y mecánicamente inactiva, aunque fuertemente unida a microfilamentos. La forma plegada de la proteína, prescinde de la interacción con un cargo <sup>71-73</sup>.



**Figura 4. Conformaciones putativas de la Myo5a.** Se muestran los estados inactivo y activo de la Myo5a, regulados por la concentración de calcio.

Inicialmente, se demostró que la Myo5a está involucrada en el transporte de los melanosomas <sup>74,75</sup>, organelos cargados de pigmento que son transferidos desde los melanocitos a los queratinocitos, proveyendo la

pigmentación de la piel. Además del transporte de estas vesículas, la Myo5a está vinculada al transporte de vesículas sinápticas en neuronas <sup>76-82</sup> y vesículas en otros tipos celulares <sup>83,84</sup>. También se ha sugerido que este motor juega un papel en el desensamblaje del huso mitótico, en el movimiento de los cromosomas y en la citoquinesis durante la mitosis, al igual que su papel en la viabilidad y motilidad de células tumorales <sup>85</sup>. Por último, la Myo5a se ha vinculado a la localización subcelular del ARN en levaduras <sup>86</sup> fibroblastos de mamíferos <sup>87,88</sup> y neuronas <sup>79,89</sup>.

El transporte de ARNm hacia regiones específicas de la célula y su posterior traducción es crucial para localizar proteínas y para el desarrollo y la identidad de los territorios subcelulares. Los mecanismos de transporte y localización del ARNm han sido en gran medida caracterizados, pero aquellos responsables del transporte de ribosomas han sido menos estudiados. Considerando la capacidad de la Myo5a de interactuar con los ribosomas y teniendo en cuenta también sus propiedades mecano-enzimáticas, planteamos que la señal específica capaz de generar el anclaje o la liberación de los ribosomas del citoesqueleto de actina podría ser inducida por el calcio. Si bien lo anterior se plantea como un mecanismo general, esto podría ser particularmente relevante en dominios subcelulares como las post sinapsis neuronales, regiones donde se ha verificado intensa actividad de Myo5a asociada al transporte de ARN <sup>90</sup>; en este territorio la señalización por calcio es clave. Allí, el calcio modula la actividad de diversas moléculas, tanto de forma directa como indirecta,

durante la liberación de neurotransmisores, por ejemplo. Asimismo, ha sido postulada la participación de calcio en la síntesis proteica local a nivel post sináptico. Además, dicho ión puede provocar cambios conformacionales en las CaM que se unen a los motivos IQ del brazo de la Myo5a, afectando la actividad motora de la misma. Finalmente, *in vitro*, hemos observado que la Myo5a puede separarse de los ribosomas cuando son expuestos a calcio

47 .

## 2. HIPÓTESIS

Nos planteamos, entonces, la siguiente hipótesis de trabajo: los complejos de Myo5a y ribosomas celulares se disocian *in vivo* en respuesta a cambios en la concentración intracelular de calcio, inducidos por la adición de KCl en el medio extracelular.

Como método experimental para estudiar esta interacción se eligió la microscopía FRET confocal basada en anticuerpos, ya que es una técnica ideal para estudiar procesos celulares y es muy sensible, pudiendo detectar distancias de 1-10 nm entre dos pares de fluoróforos adecuados para FRET.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Estudiar el efecto del calcio sobre la asociación entre la miosina 5a y los ribosomas, utilizando como modelo células de la línea 3T3-L1.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Poner a punto condiciones de inmunomarcación con anticuerpos anti-miosina 5a y anti-proteína ribosomal P0 en células 3T3-L1, que permitan la realización posterior de experimentos de inmunomicroscopía FRET confocal.

2. Analizar mediante inmunomicroscopía FRET confocal la interacción entre la miosina 5a y los ribosomas.

3. Analizar mediante inmunomicroscopía FRET confocal si existen cambios en la interacción entre los ribosomas y la miosina 5a cuando las concentraciones intracelulares de calcio varían en respuesta a despolarización por KCl.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Cultivo celular**

Como modelo se usó la línea celular 3T3-L1 (ATCC® CL-173™), la cual fue mantenida en DMEM (Capricorn) con glucosa 4,5 g/L, glutamina estable 862 mg/L y piruvato de sodio 110 mg/L; penicilina 100 U/μL y estreptomina 25 mg/mL como antibióticos, y suero fetal bovino (SFB) (Capricorn), a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se eligió dicha línea celular (3T3-L1) como modelo debido a dos factores: 1) expresan Myo5a, proteína de interés de este trabajo y además 2) constituyen un modelo más sencillo de cultivar que las neuronas.

Las células -originarias de la colección del Instituto Pasteur de Montevideo- se mantuvieron en sustratos plásticos tratados para cultivo de células eucariotas (Eppendorf). Las células 3T3-L1 fueron descongeladas a partir de viales de 1,5 mL mantenidos en nitrógeno líquido. Para descongelarlas se suspendió el contenido del vial en 5 mL de medio completo (medio de cultivo con antibióticos) y a continuación se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos para remover el dimetilsulfóxido (DMSO), contenido en el medio de congelamiento, y las células muertas. Se resuspendió el pellet en 1 mL de medio de cultivo completo y se plaqueó en placas de 60 mm con una proporción 9:1 de medio de cultivo completo/SFB. Una vez plaqueadas, fueron mantenidas de acuerdo a las

recomendaciones de ATCC: no se las dejó alcanzar más de un 80% de confluencia para evitar la transformación celular y se cambió el medio al menos dos veces a la semana. En los casos en los que fue necesario realizar pasajes celulares, el procedimiento incluyó:

- 1) remoción del medio de cultivo,
- 2) lavado con 5 mL de PBS 1X,
- 3) decolamiento de las células con un 0,5 mL de tripsina-EDTA 0,05%-0,02% (Capricorn),
- 4) neutralización con 5 mL de medio de cultivo completo. Con el fin de mantener nuestra reserva de células 3T3-L1, algunos cultivos fueron congelados y preservados en nitrógeno líquido. Para congelarlas, se siguieron los pasos explicados anteriormente hasta el punto 4; resuspendiéndolas luego en 1 mL de medio de congelamiento, que contiene 70% de medio de cultivo completo, 20% de SFB y 10% de DMSO. El vial resultante se mantuvo 1 hora a -20°C y luego se lo llevó a -80°C durante 24 horas antes de ser colocado en nitrógeno líquido.

Asimismo, el crecimiento de las células destinadas a los ensayos de inmunofluorescencia se realizó sobre cubreobjetos (24 x 24 mm) hasta alcanzar un 60% de confluencia. Mayor densidad podría influir en la estructura y arquitectura de la célula, lo que afectaría la reproducibilidad de nuestros experimentos. Por el contrario, una densidad celular menor dificultaría encontrar un área con la cantidad adecuada de células para analizar.

Para la inducción de cambios en la concentración intracelular de calcio, se adicionó KCl 50 mM por un período de 5 minutos, que conlleva un aumento en la concentración intracelular de dicho ión. Esto es así porque las células de la línea 3T3-L1 expresan canales de calcio voltaje-dependientes<sup>91</sup>, lo que nos da la posibilidad de usar esta característica a nuestro favor y generar un estímulo considerado más fisiológico (despolarización) que el uso de ionóforos de calcio. Se incluyeron tres grupos de cultivos como controles:

1) sin adicionar KCl (control negativo),

2) otro en el que se adicionó Ionomicina 1  $\mu$ M (Sigma) y

3) un último grupo conteniendo EGTA 2 mM + KCl 50 mM. Todos fueron mantenidos bajo las diferentes condiciones durante el mismo período de tiempo que la condición experimental (5 minutos). Dichos controles fueron pensados tomando en cuenta nuestra hipótesis de trabajo. La Ionomicina es un ionóforo producido por *Streptomyces globatus* que se utiliza experimentalmente para aumentar el nivel intracelular de  $Ca^{2+}$ . Si la interacción entre los ribosomas y la Myo5a está efectivamente mediada por  $Ca^{2+}$ , se debería observar un efecto similar generado en la condición experimental (KCl 50 mM). De esta manera, la Ionomicina representa el control positivo. Por su parte, el cultivo en el que se agregó EGTA y KCl es el control negativo. El EGTA es un quelante de  $Ca^{2+}$ , por lo que si el efecto del KCl sobre la interacción entre la Myo5a y los ribosomas está regulada

por  $\text{Ca}^{2+}$ , no se debería observar ninguna diferencia con respecto a la condición normal en este cultivo.

## 4.2 Inmunomarcación

La inmunomarcación se realizó en base al protocolo usado por Calliari y colaboradores (2014)<sup>92</sup>. En primera instancia se pusieron a punto las concentraciones de los anticuerpos específicos a utilizar para los reconocimientos de Myo5a y la proteína ribosomal P0 (anticuerpos anti-Myo5a y anti-P0, respectivamente) con el propósito de ecualizar las señales de inmunofluorescencia generadas por ambos anticuerpos; condición fundamental para la realización correcta de los ensayos de FRET. El anticuerpo anti-Myo5a (*chicken brain* miosina), fue un obsequio de Roy Larson y fue utilizado de acuerdo a sus recomendaciones. El mismo es policlonal, generado en conejo y purificado por afinidad con respecto al antígeno, según se indica en Espreafico y colaboradores (1992)<sup>93</sup>. Este anticuerpo reconoce la mayoría del dominio de la cola de la Myo5a. Por otro lado, el anticuerpo comercial anti-P0 (Immunovision, Erba Diagnostics, Springdale, Arkansas, USA), es producto de la purificación de IgG a partir de un suero autoinmune humano, por lo que es policlonal. El mismo es desfibrinado y deslipidizado y luego liofilizado (<http://www.immunovision.com/hpo-0300/>).

Las células fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) 1X a 37°C y fijadas con PAF 4%-PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X. A continuación, se permeabilizaron las células y se bloquearon las uniones inespecíficas de manera simultánea, por lo que las células debieron ser incubadas en buffer de bloqueo (PBS-tritón 0,05%-BSA 1%) por 40 minutos, a temperatura ambiente y en agitación.

La incubación con anticuerpos primarios se realizó durante 16 horas a 4°C; los cubreobjetos conteniendo las células cultivadas fueron colocados en cámaras húmedas con una gota de 50 µL de sus respectivos anticuerpos primarios, diluidos en buffer de bloqueo. El anticuerpo anti-Myo5a fue utilizado a 5 µg/mL (Larson, comunicación personal). El anticuerpo anti-P0 fue probado en las siguientes diluciones: 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/6000, 1/4000, 1/5000, 1/8000, 1/10000, 1/20000 y 1/40000.

Al día siguiente, las células fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos con buffer de bloqueo a temperatura ambiente y en agitación, para remover el excedente de anticuerpos primarios y poder así realizar a continuación la incubación con los anticuerpos secundarios. Como anticuerpos secundarios se utilizaron: un anticuerpo anti-conejo generado en cabra, conjugado a Alexa Flúor 555 (Invitrogen) para el reconocimiento del anticuerpo primario anti-Myo5a, y un anticuerpo anti-humano generado en cabra, conjugado a Alexa Flúor 633 (Invitrogen) para el reconocimiento

del anticuerpo primario anti-P0. Ambos anti-anticuerpos secundarios fueron usados en una dilución 1/1000 en buffer de bloqueo.

Para asegurar la ausencia de señal debida a interacciones inespecíficas de dichos anticuerpos secundarios con el material celular -en las condiciones de nuestro protocolo-, se realizó un control negativo, donde no se hizo la incubación con anticuerpos primarios, mas sí con los anticuerpos secundarios.

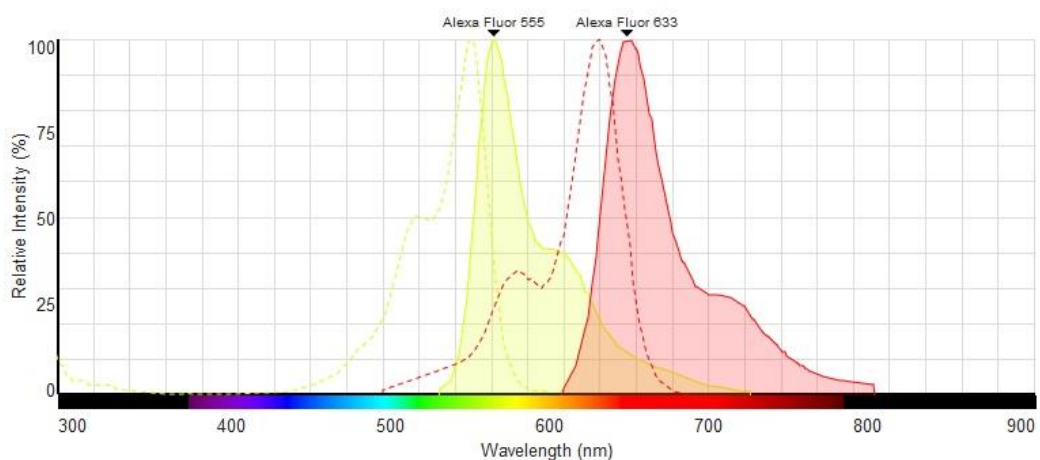
Para remover el exceso de anticuerpos secundarios, se hicieron 3 lavados de 5 minutos de duración cada uno con PBS 1X, a temperatura ambiente y en agitación. Los cubreobjetos fueron montados en medio de montaje para fluorescencia (ProLong Diamond Antifade, Invitrogen), con el fin de disminuir el decaimiento de la misma por exposición a la iluminación de alta intensidad (*photobleaching*).

#### **4.3 Microscopía confocal de Transferencia de energía resonante de Förster (FRET) cuantitativa**

La transferencia de energía resonante de Förster (FRET) es un proceso físico donde se transfiere energía de forma no radiactiva desde un fluoróforo excitado (el Donador, D) a otro fluoróforo (el Aceptor, A) mediante interacciones dipolo-dipolo. Dadas sus características, esta forma de interacción es dependiente de la distancia. Es un proceso adecuado para distancias moleculares de 10-100 Å y altamente efectivo si D y A están

posicionados dentro del radio de Förster (distancia a la cual la mitad de la energía de excitación del dador es transferida al aceptor, unos 30-60 Å)<sup>94</sup>. La eficiencia de FRET es inversamente dependiente de la sexta potencia de la separación intermolecular, convirtiéndola en una técnica muy sensible para estudiar procesos moleculares con una resolución subnanométrica<sup>95</sup>. De esta manera, la microscopía FRET permite estimar la distancia entre dos interactores con una resolución indicativa de interacción a nivel molecular, ubicándola además en el espacio dentro de la célula.

Para elegir el par DA, consideramos que las longitudes de onda de excitación estuvieran suficientemente separadas de manera de excitar selectivamente al Donador, pero que a la vez exista una superposición tal entre el espectro de emisión del Donador y el de excitación del Aceptor que permita la transferencia de energía (figura 1). Si ocurre FRET, la señal de fluoróforo D será menor debido al “*quenching*” de su fluorescencia, mientras que la señal del canal de A se incrementará<sup>94</sup>.





**Figura 1. Espectros de excitación y de emisión de los fluoróforos de trabajo.** Se muestran los espectros de excitación y de emisión para el fluoróforo Alexa 555 y para el fluoróforo Alexa 633. Se observa una superposición entre el espectro de emisión del Donador y el de excitación del Aceptor; condición fundamental para FRET.

En esta aproximación experimental, el *spectral bleedthrough* (SBT), que es la contaminación generada por la emisión del Donador en el canal del Aceptor y por la excitación de moléculas de Aceptor por la luz que excita al Donador, es un problema de gran importancia. Por lo tanto, la señal de FRET observada es más alta que el FRET real. Para corregir este problema, elegimos utilizar el método de análisis de los datos de FRET basado en el algoritmo PFRET (Keck Center for Cellular Imaging, University of Virginia, Charlottesville, VA 22903). Este algoritmo remueve el SBT tanto para el D como para el A teniendo en cuenta las variaciones que presenta el SBT para los diferentes niveles de fluorescencia. Esto permite una determinación posterior de la eficiencia de transferencia de energía (E%) de una manera más precisa que otros algoritmos que no tienen en cuenta esta variación <sup>95</sup>. E% se define como la fracción de la cantidad de veces que la energía se transfiere desde la molécula de D excitada a la del A y que no es utilizada en ningún otro proceso <sup>94</sup>.

Para el caso de los experimentos de microscopía FRET confocal el protocolo de inmunomarcación fue el descrito en el apartado 4.2 y se realizó para cada una de las condiciones de cultivo explicadas en el punto 4.1 (esto es: condición experimental con KCl 50 mM y condiciones control normal, positivo y negativo). La elección de los fluoróforos para utilizar como par Donador-Aceptor (Alexa 555-Alexa 633) contempló los requisitos de

distancia entre los máximos de emisión del D y excitación del A y de separación entre los máximos de emisión de ambos espectros. Además, se eligieron fluoróforos de la serie Alexa dado que son más estables que los fluoróforos de primera generación, su *photobleaching* es bajo y poseen *quantum yields* adecuados (0,1 en el caso de Alexa 555 y 0,33 en el de Alexa 633)

El diseño experimental fue el siguiente:

- 1) una muestra donde se realizó la inmunomarcación utilizando ambos anticuerpos primarios, a la que llamaremos muestra “doble marcada” o “Donador-Aceptor” (DA);
- 2) una muestra en la que se utilizó sólo el anticuerpo primario anti-Myo5a para la inmunomarcación, denominada muestra “Donador” (D);
- 3) una muestra marcada únicamente con el anticuerpo primario anti-P0, llamada muestra “Aceptor” (A);
- 4) una muestra cuya inmunomarcación se hizo sin anticuerpos primarios, para evaluar el nivel de “ruido de fondo”.

Cada anticuerpo primario fue utilizado a la concentración óptima determinada durante la etapa de puesta a punto.

#### **4.4 Microscopía confocal y adquisición de imágenes**

Para la adquisición de imágenes de microscopía confocal convencional se utilizó un microscopio confocal Olympus FV-300, equipado

con un lente Plan Apo N 60X de inmersión en aceite NA 1.42 y láseres 543 y 633 nm. La intensidad de los láseres utilizada fue de 25 % en el caso del láser 543 nm y de 4 % en el del láser 633 nm, de manera de poder recoger la señal de fluorescencia de ambos fluoróforos usando el mismo valor de voltaje en ambos fotomultiplicadores (650 V), condición fundamental en la adquisición de imágenes para FRET cuantitativo. Se tomaron 6 a 9 imágenes de cada muestra, con 8 bit de profundidad y de tamaño 1024 x 1024 píxeles, siguiendo el siguiente esquema:

1) DexDem: imágenes tomadas excitando con el láser 543 (excitación del Donador, Dex) y recogiendo la imagen en el canal del Donador (emisión del Donador, Dem). Estas imágenes muestran la señal del Donador.

2) DexAem: imágenes tomadas excitando con el láser 543 (Dex) y recogiendo la imagen en el canal del Aceptor (emisión del aceptor, Aem). Muestran la señal de FRET no corregido (uFRET).

3) AexAem: imágenes tomadas excitando con el láser 633 (Aex) y recogiendo la imagen en el canal del aceptor (Aem). Estas imágenes muestran la señal del Aceptor.

#### **4.5 Análisis de FRET cuantitativo**

Las imágenes obtenidas se utilizaron para estimar la eficiencia de transferencia de energía entre los fluoróforos mediante análisis FRET cuantitativo (*processed* FRET, PFRET) utilizando, como ya se mencionó, el

algoritmo PFRET (Keck Center for Cellular Imaging, University of Virginia, Charlottesville, VA 22903) que se utiliza como plug in para ImageJ <sup>96</sup>.

Se generaron imágenes de PFRET utilizando imágenes, a las que se sustrajo el ruido de fondo, de aquellas muestras marcadas de forma simple y doble. Las regiones de interés (ROIs) se crearon de manera automática con el software PFRET en las imágenes uFRET, poniendo como medida base de intensidad e fluorescencia 10 unidades y su área fue de 10 x 10 píxeles<sup>97</sup>. Se aplicaron diferentes restricciones a la hora de realizar el análisis para evitar el FRET no específico debido a bajo nivel de fluorescencia del Aceptor y/o Donador y FRET no corregido (menor de 20), valores fuera de los límites aceptables para E% (menor de 5%) y SBT (menor de 30%, mayor de 70%). Las restricciones fueron aplicadas de manera iterada hasta alcanzar la independencia de E% con respecto a A. Este análisis estadístico permite distinguir las interacciones aleatorias (FRET no específico) de aquellas en clúster (FRET específico). En el caso de que las interacciones sean aleatorias, la probabilidad de que una molécula Aceptor co-localice con un Donador aumenta en función del aumento de la concentración de Aceptor, lo que lleva a un incremento en E%. De esta manera, E% muestra una dependencia positiva de la cantidad de Aceptor. Por el contrario, si las interacciones son en clúster, el aumento de la cantidad de Aceptor, no tiene repercusiones en la E% y por lo tanto, E% es independiente de A. Otro indicador de la especificidad del FRET es el fenómeno conocido como “exclusión geométrica del donador”, en el cual

al aumentar los niveles de uD (*unquenched donor*) o la relación uD/A, se genera un decaimiento en E%. En una interacción en clúster, sólo una molécula de donador por aceptor podrá aproximarse a una distancia de FRET efectiva aunque la concentración de donador aumente, por lo que E% será inversamente proporcional a uD/A <sup>95</sup>. Mediante este análisis estadístico se determinó la posición de las ROIs que presentan FRET específico entre la Myo5a y los ribosomas.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Puesta a punto de las condiciones de inmunomarcación con anticuerpos anti-Myo5a y anti-proteína ribosomal P0 en células 3T3-L1**

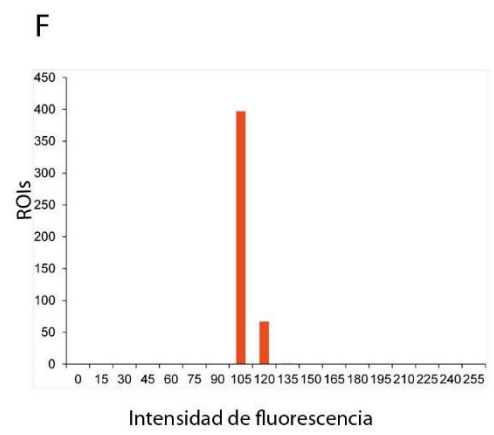
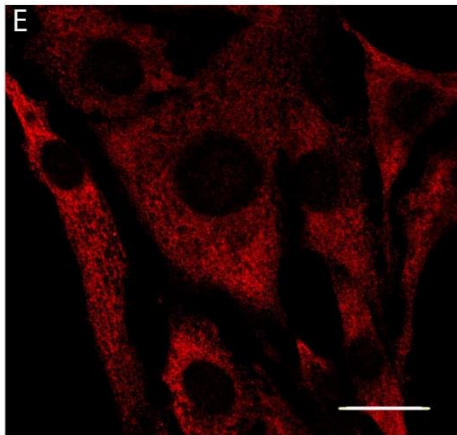
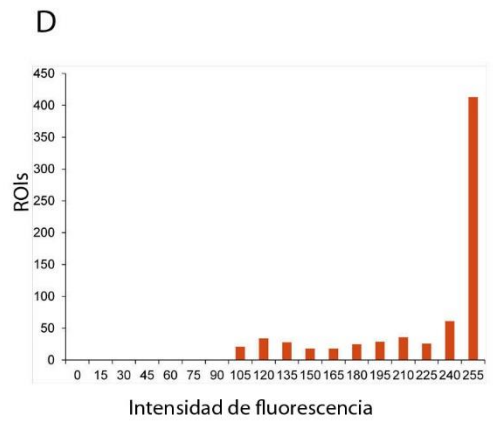
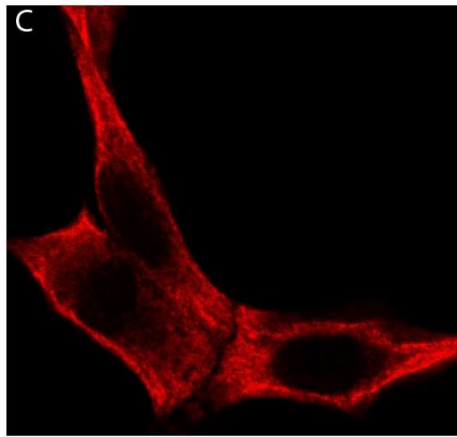
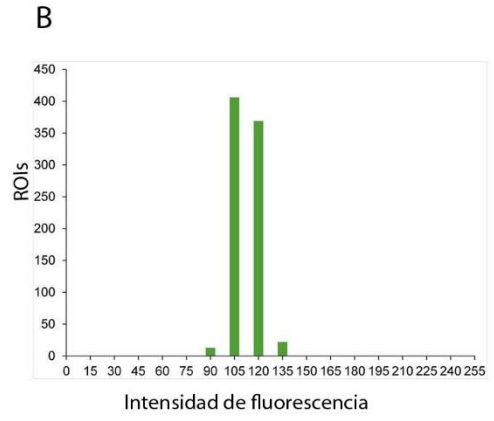
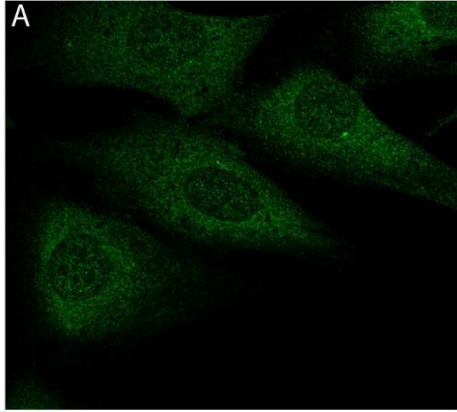
El punto de partida de este trabajo fue la puesta a punto de las condiciones de inmunomarcación con los anticuerpos a utilizarse (anti-Myo5a y anti-P0). Se encontró la concentración óptima de trabajo para cada anticuerpo tal que:

- 1) Se eliminó saturación de la señal para cualquier píxel;
- 2) El valor de voltaje asignado a cada PMT fuera el mismo para cada anticuerpo, pues cuando el voltaje del PMT adquiere un valor cercano a los 650 V, trabajamos en valor medio del rango lineal en el microscopio Olympus FV300.

La figura 1A muestra una imagen representativa de la inmunomarcación para Myo5a en estas condiciones. Se puede observar que la distribución es puntiforme, homogénea, citoplasmática y nuclear. El análisis del histograma de intensidad de fluorescencia para Myo5a (figura 1B) mostró una distribución en los valores medios del rango, demostrando que esta dilución de trabajo es óptima para el anticuerpo anti-Myo5a.

En el caso de anti-P0, por ser un anticuerpo comercial, se comenzó probando una dilución 1/500, teniendo como referencia que la concentración recomendada para *Western Blot* es de 1:1000. Como se puede ver en las figuras 1C y 1D (imagen representativa de inmunomarcación para P0 e histograma de intensidad de fluorescencia para P0, respectivamente), para una dilución igual a 1/20000, la señal del anticuerpo anti-P0 se encuentra completamente saturada utilizando un voltaje de adquisición en el PMT de 650 V. Por ello, se probó una dilución 1/40000.

En ambos casos, se observa que la distribución de P0 es citoplásmica, de aspecto granular y preferentemente perinuclear (figuras 1C y 1E). Se puede observar además que en la figura 1E (representativa de inmunomarcación para P0 correspondiente a la dilución 1/40000) la señal del anticuerpo anti-P0 no se encuentra saturada ni baja en la escala de valores cuando el voltaje en el PMT es de 650 V. El análisis de los histogramas de intensidad de fluorescencia muestra, para el caso de la dilución 1/20000 (figura 1D), una distribución en los valores extremos del rango. Contrariamente, para la dilución igual a 1/40000 de anti-P0, en la figura 1E se observa una señal de fluorescencia óptima y una distribución en valores medios del rango (figura 1F), demostrando así que esta dilución es adecuada para las inmunomarcaciones a realizarse con anticuerpo anti-P0.





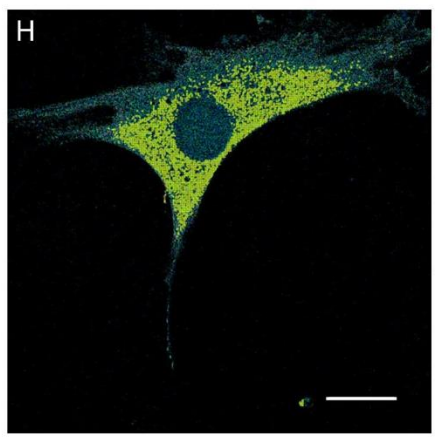
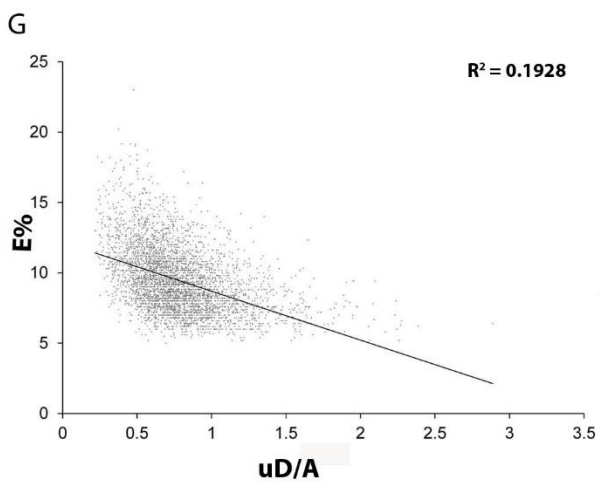
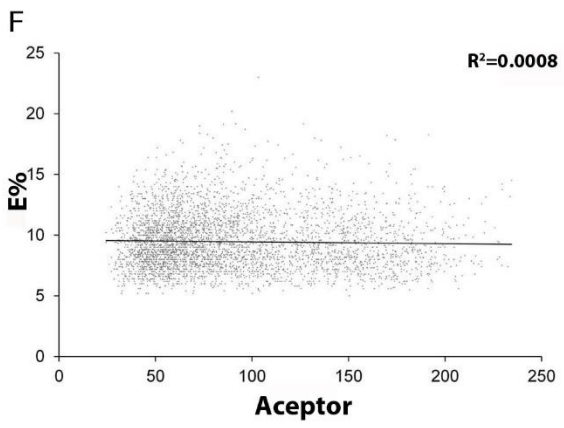
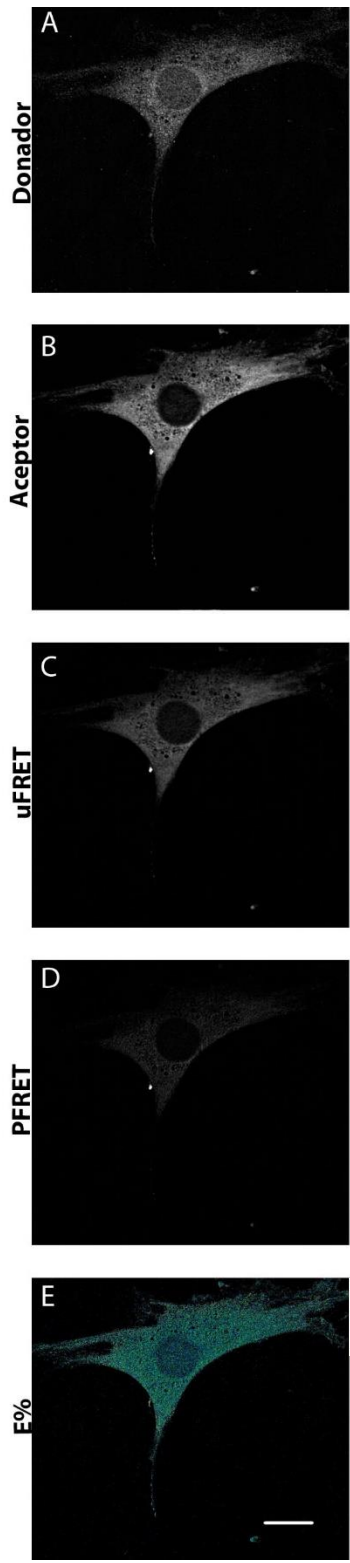
**Figura1. Inmunomarcación utilizando anticuerpos anti-Myo5a y anti-P0.** **A.** Células 3T3-L1 inmunomarcadas con anticuerpos anti-Myo5a a 5µg/mL. **B.** Histograma de intensidad de fluorescencia de la señal del anti-Myo5a. **C y E.** Células 3T3-L1 inmunomarcadas con el anticuerpo anti-P0 diluido 1/20000 y 1/40000, respectivamente. **D y F.** Histogramas de intensidad de fluorescencia para el anticuerpo anti-P0 diluido 1/20000 y 1/40000, respectivamente. Los gráficos se construyeron a partir de valores medidos en al menos 10 células por condición. Barra= 20 µM.

## **5.2 Análisis de la interacción entre los ribosomas y la Myo5a mediante inmunomicroscopía FRET confocal cuantitativa**

Las condiciones de las inmunomarcaciones ya presentadas en el apartado 4.1 fueron utilizadas para generar imágenes de pares Donador-Aceptor (ver sección 4.4 de materiales y métodos), siendo la imagen Donador aquella correspondiente a la señal de la Myo5a (figura 2A) y P0 el Aceptor (figura 2B). La remoción de la contaminación por SBT (*spectral bleedthrough*) se evidencia claramente comparando las imágenes de uFRET y PFRET (figuras 2C y 2D, respectivamente). Los valores de E% (figura 2E) obtenidos, luego de aplicar las restricciones (ver materiales y métodos) se graficaron en función de A (figura 2F) y en función de uD/A (figura 2G). Como se observa, E% es independiente de los valores de A ( $r=0.028$ ) e inversamente proporcional a uD/A ( $r=-0.439$ ) para las ROIs que permanecen luego del análisis con las restricciones aplicadas. Esto significa que el FRET en estas regiones es específico, es decir que las interacciones no son aleatorias, sino que son controladas o en clúster. En la figura 2H se puede observar que dichas ROIs presentan una distribución

citoplasmática y homogénea, estando ausentes en los lamelipodios y en el núcleo. Nuestro análisis demuestra una interacción controlada entre los ribosomas y la Myo5a en el citoplasma de células 3T3-L1 bajo condiciones habituales de cultivo.

**Figura 2.** Distribución del Donador (señal de Myo5a), Aceptor (señal de P0), uFRET, PFRET y E% en células 3T3-L1 en condición basal. **A.** Señal correspondiente al canal del Donador cuando se excita utilizando el láser 543. **B.** Señal en el canal del Aceptor al excitar con el láser 633. **C.** Señal en el canal de Aceptor al excitar con el láser del Donador: se observa la señal correspondiente al FRET no corregido (uFRET), que incluye la señal proveniente de la transferencia de energía D-A, el donador *crosstalk* y el SBT del A. **D.** Imagen de FRET corregido donde fueron removidos del canal de uFRET el donador *crosstalk* y el SBT del A. La imagen resultante representa la señal proveniente de la transferencia de energía (PFRET). **E.** Distribución de E%. **F.** Gráfico E% vs. A. **G.** Gráfico E% vs. uD/A. **H.** ROIs que sobreviven al análisis. Barra= 20  $\mu$ m

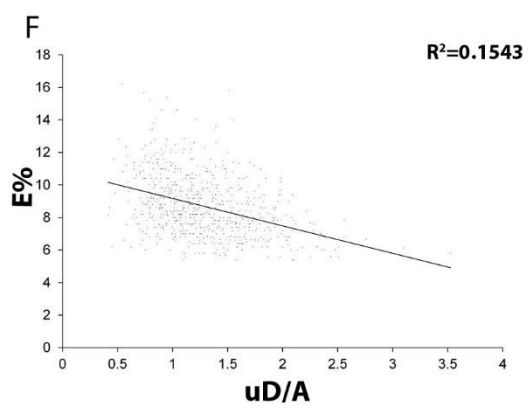
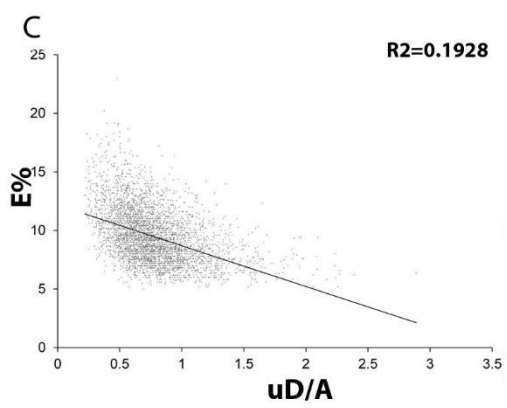
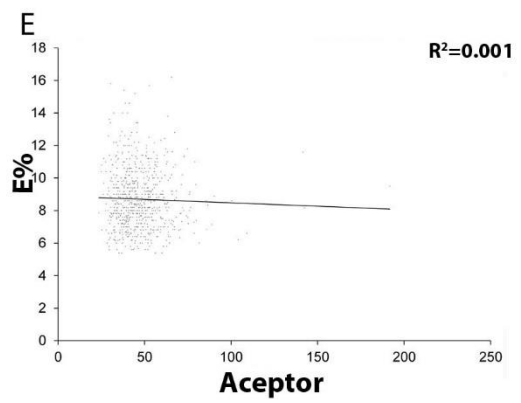
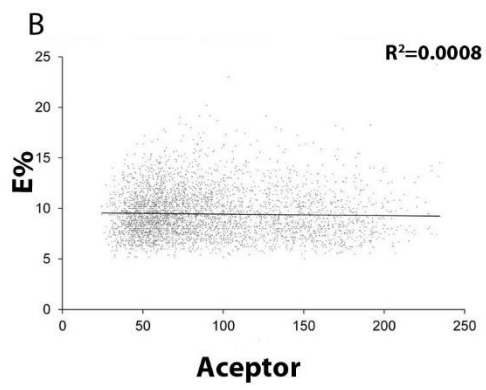
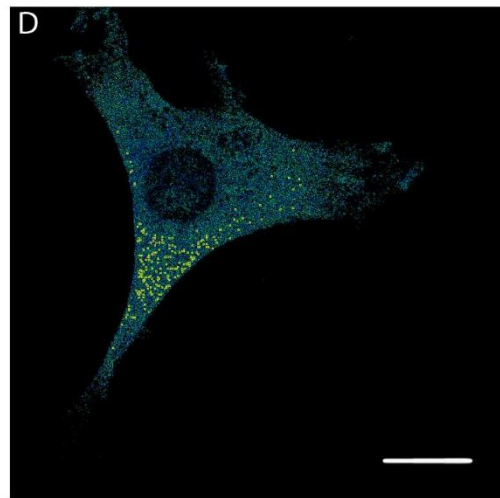
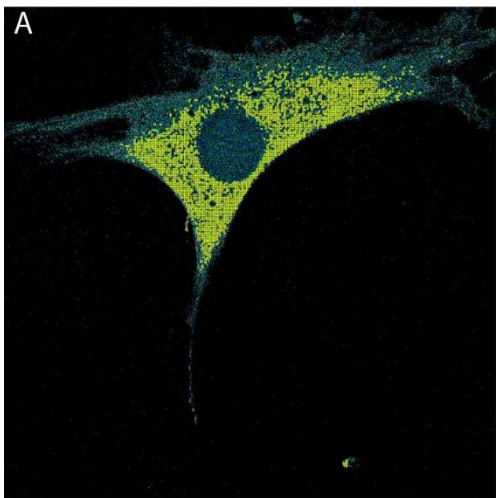


### 5.3 Análisis de los cambios en la interacción entre los ribosomas y la Myo5a en respuesta a KCl mediante inmunomicroscopía FRET confocal

Con el fin de saber si la interacción entre los ribosomas y la Myo5a sufre cambios en respuesta a un estímulo con KCl, se realizó inmunomicroscopía FRET confocal en las mismas condiciones presentadas en el apartado 5.2, incluyendo en este caso imágenes tomadas a partir de cultivos tratados con KCl 50 mM (ver materiales y métodos sección 4.1).

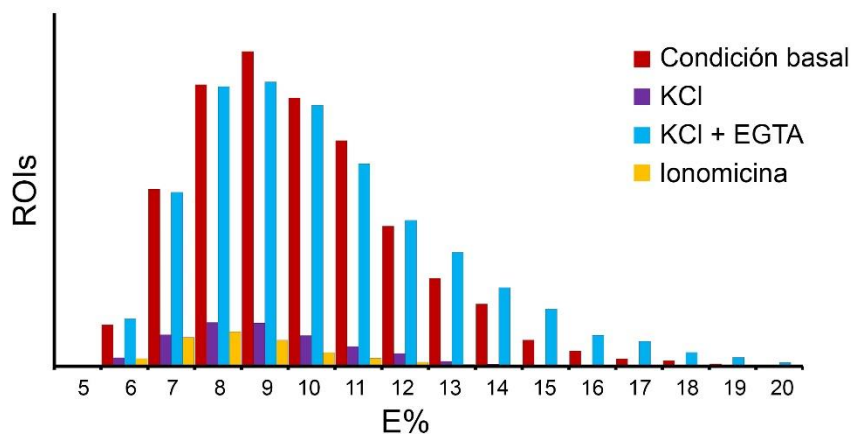
En la figura 3D se muestran las ROIs sobrevivientes al análisis FRET de imágenes provenientes de cultivos tratados con KCl y se compara con aquellas de la condición basal (figura 3A). También se presentan los gráficos de E% en función de A (figuras 3B y 3E) y de E% en función de uD/A (figuras 3C y 3F) para ambas situaciones experimentales, donde se observa la independencia de E% con respecto a A ( $r=0,028$  y  $r=0,032$  respectivamente) y su dependencia negativa con respecto a uD/A ( $r=-0,439$  y  $r=-0,393$  respectivamente).

**Figura 3.** **A.** ROIs en una célula 3T3-L1 en condición normal. **B.** Gráfico de E% vs. A para la condición basal. **C.** Gráfico de E% vs uD/A para la condición basal. **D.** ROIs en una célula 3T3-L1 tratada con KCl. **E.** Gráfico de E% vs A para la condición experimental. **F.** Gráfico de E% vs uD/A para la condición experimental. Barra = 20  $\mu$ m.



Comparando los resultados obtenidos para las células tratadas con KCl con respecto a la situación basal podemos apreciar que si bien la distribución de las ROIs es citoplasmática y homogénea en ambos casos, hay una gran disminución en el número de ROIs en la condición experimental.

Para discernir si la respuesta que se da en la interacción entre la proteína ribosomal P0 y la Myo5a al tratamiento con KCl está mediada por un cambio en la concentración intracelular de calcio o por la despolarización misma, se realizaron experimentos de FRET confocal cuantitativo en cultivos de células 3T3-L1 bajo dos condiciones control: 1) conteniendo KCl 50 mM y EGTA 2 mM y 2) conteniendo Ionomicina 1  $\mu$ M. La figura 4 muestra un histograma de frecuencias de E% comparando todas las condiciones experimentales ensayadas. Como se puede observar, el tratamiento con EGTA da lugar a una muestra con un FRET similar al de la muestra cultivada en condiciones basales, con un porcentaje de ROIs que permanecen luego de la aplicación de las restricciones. Contrariamente, cuando se trata a los cultivos celulares con Ionomicina, el porcentaje de ROIs disminuye más de un 90% con respecto a la condición de cultivo basal. Este comportamiento también se observa en las células tratadas con KCl.



**Figura 4.** Histograma de ROIs en función de E% para todas las condiciones estudiadas.

## 6. DISCUSIÓN

Como paso inicial de la presente tesina, se puso a punto la concentración de trabajo de los anticuerpos que se iban a utilizar. Es decir, con estas diluciones de trabajo del anticuerpo, logramos recoger su señal utilizando un valor de voltaje del fotomultiplicador (650V) dentro del rango lineal de trabajo de los PMT instalados en el equipo Olympus FV-300 (400-800 V). Obtuvimos además una distribución de intensidad de fluorescencia para este anticuerpo en valores medios de la escala de grises (0-255), lo que aseguró la realización del ensayo de FRET en ausencia de saturación y en presencia de niveles adecuados de señal para permitir la sustracción de los contaminantes por SBT <sup>95</sup>. A nivel celular, se obtuvo una distribución de la señal en concordancia con lo ya reportado para Myo5a en células en cultivo en condiciones similares <sup>47,87,98</sup>. Salerno y colaboradores mostraron que en fibroblastos la Myo5a se encuentra tanto en núcleo como en citoplasma, pero los niveles de fluorescencia del núcleo y perinúcleo son más bajos que los del citoplasma, haciendo notoria la diferencia entre ellos. Además, Larson y colaboradores observaron la presencia de Myo5a en el núcleo <sup>98</sup>.

En el caso del anticuerpo anti-P0, las condiciones adecuadas en cuanto a la intensidad de fluorescencia de su señal se obtuvieron utilizando una dilución del mismo de 1/40000. Este anticuerpo comercial reveló una



distribución granular, citoplasmática, preferentemente perinuclear de la proteína ribosomal P0. Y si bien la misma no muestra una co-localización evidente en la observación ocular, demostramos su co-localización mediante microscopia FRET cuantitativa.

Respecto a la interacción entre el motor molecular Myo5a y los ribosomas se puede decir que, dados los resultados obtenidos mediante el análisis de FRET realizado en el presente trabajo, existe una asociación controlada entre la Myo5a y la proteína P0 *in vivo* en condiciones basales. Esta interacción se da de forma específica en el citoplasma y muestra una distribución homogénea. Asimismo, al observar los resultados del análisis FRET obtenidos cuando se induce la despolarización por adición de KCl sugieren que, como se esperaba, la ya mencionada asociación entre Myo5a y los ribosomas es modulada por el ión calcio, ya que las señales de FRET específico disminuyen de manera notoria. Esto es también apoyado por los comportamientos observados en los cultivos en presencia de KCl + EGTA e Ionomicina; al quelar el calcio, la señal de FRET específico entre la Myo5a y la proteína P0 es similar a la obtenida en condiciones basales, mientras que en presencia de Ionomicina, el FRET específico disminuye a niveles análogos a los de nuestra condición experimental. Es sabido que el calcio modula la actividad motora de la Myo5a a través de las calmodulinas <sup>70-72,99</sup>, sin embargo, la modulación de la interacción entre este motor y su carga *in vivo*, no había sido descrita hasta ahora. Nuestros resultados apuntan a una disociación del motor molecular de los ribosomas

en respuesta al aumento de concentraciones intracelulares de calcio. Esto ha sido observado ya mediante la utilización de otras técnicas experimentales *in vitro*: inmunoprecipitación, *western blot*, gradiente de sacarosa y sedimentación por ultracentrifugación, apoyando la idea de que el calcio puede tener un efecto directo sobre algunos componentes de las RNPs <sup>47</sup>.

No obstante, esta aproximación experimental nos impide saber si la modulación por parte del calcio de la interacción vista entre la Myo5a y los ribosomas tiene un rol fisiológico. En particular, sería importante conocer las concentraciones efectivas de calcio intracelular que se alcanzan en estas condiciones. Considerando que el medio de cultivo está suplementado con CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, sabemos que al menos en la condición en la que se trata las células con ionóforo, la concentración final de calcio debería llegar a valores cercanos a ésta. Más difícil es especular sobre lo que ocurre con la despolarización por KCl. De acuerdo a lo reportado por Yang & Huang (2005) <sup>100</sup> estas células expresan canales de calcio voltaje dependientes sensibles al agonista nimodipina, usada para caracterizar los canales de tipo L, los cuales son de inactivación lenta y alta conductancia.

Existe evidencia que muestra la posible importancia fisiológica del fenómeno generado por el calcio y su asociación al transporte de ARN, tal es el caso de la interacción entre la proteína TLS (de unión a ARNm) y la Myo 5a, que es alterada por el calcio <sup>90</sup>. En células de hipocampo, se ha visto que la translocación de GFP-TLS hacia las espinas dendríticas es

inducida por la estimulación de receptores metabotrópicos de glutamato, cuya estimulación genera la liberación de calcio de reservorios internos. Además, en sinaptodendrosomas de corteza de cerebro de ratón se observó que, cuando se libera calcio de los reservorios internos, la interacción entre el ARNm codificante para APP (Proteína Precursor de Amiloide) y FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) –que reprime la traducción del ARNm- se debilita. Por lo tanto, se podría pensar que el calcio liberado genera la disociación de este complejo y la síntesis local de APP <sup>101</sup>.

Resumiendo, los resultados de esta tesina de grado son consecuentes con la evidencia ya publicada. Los mismos sugieren que existe una asociación entre la Myo5a y la proteína ribosomal P0 en células 3T3-L1 y que dicho complejo se disocia en presencia de calcio, lo que no había sido reportado anteriormente *in vivo*.

## 7. CONCLUSIONES

El presente trabajo de fin de carrera implicó el desarrollo de actividades y destrezas varias, en torno a un proyecto de investigación con objetivos concretos. Durante el trabajo se adquirió destreza en diversas técnicas rutinarias de laboratorio (cálculo y realización de soluciones, medidas de pH, etc) y otras más específicas como ser la rutina del trabajo con cultivos celulares, las técnicas de inmunomarcación y microscopía confocal cuantitativa. Otro aspecto importante fue la experiencia en el diseño de experimentos y el análisis de sus resultados. En relación a esto último, se logró explorar la hipótesis planteada a través del recorrido por cada uno de los objetivos específicos enunciados; se demostró la interacción de los ribosomas y el motor molecular miosina 5a, pudiéndose demostrar también que dicha interacción es sensible a calcio. Si bien es conocido que el calcio es un elemento esencial para la actividad enzimática de las miosinas, su capacidad para regular la interacción con la carga (y en particular con ribosomas), constituye un aspecto absolutamente novedoso.

## 8. PERSPECTIVAS

La profundización en este trabajo debería implicar en primer término, darle más solidez a los resultados obtenidos; en ese sentido, sería importante reproducir las observaciones realizadas por FRET, pero utilizando aproximaciones experimentales complementarias. Por ejemplo, realizar q-PCR para detectar ARN ribosomal en inmunoprecipitaciones con anticuerpo anti-Myo5a a partir de suspensiones celulares de la línea 3T3-L1, de todas las condiciones experimentales exploradas; en estos experimentos esperaríamos observar que la Myo5a precipitada está formando complejos con los ribosomas. Asimismo esperaríamos que en presencia de calcio, la Myo5a se encontrara disociada de los ribosomas, no observando así amplificación.

Por otro lado, sería importante estudiar la relevancia fisiológica de esta interacción, ya sea explorando si modula la síntesis de proteínas o la localización de los ribosomas en la célula.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ben-Shem, A. *et al.* The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science* (80-. ). **334**, 1524–1529 (2011).
2. Peña, C., Hurt, E. & Panse, V. G. Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 689–699 (2017).
3. de la Cruz, J., Karbstein, K. & Woolford, J. L. Functions of Ribosomal Proteins in Assembly of Eukaryotic Ribosomes In Vivo. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 93–129 (2015).
4. Thomson, E., Ferreira-Cerca, S. & Hurt, E. Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *J. Cell Sci.* **126**, 4815–4821 (2013).
5. Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.-F., Chakraborty, A. & Gleizes, P.-E. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **6**, 225–242 (2015).
6. Woolford, J. L. & Baserga, S. J. Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **195**, 643–681 (2013).
7. Nerurkar, P. *et al.* Eukaryotic Ribosome Assembly and Nuclear Export. in *International review of cell and molecular biology* **319**, 107–140 (2015).
8. Mauro, V. P. & Edelman, G. M. The ribosome filter hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12031–12036 (2002).
9. Filipovska, A. & Rackham, O. Specialization from synthesis: How ribosome diversity can customize protein function. *FEBS Lett.* **587**, 1189–1197 (2013).
10. Lafontaine, D. L. J. A 'garbage can' for ribosomes: how eukaryotes degrade their ribosomes. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 267–277 (2010).
11. Oeffinger, M. *et al.* Rrp17p is a eukaryotic exonuclease required for 5' end processing of Pre-60S ribosomal RNA. *Mol. Cell* **36**, 768–81 (2009).
12. Schillewaert, S., Wacheul, L., Lhomme, F. & Lafontaine, D. L. J. The Evolutionarily Conserved Protein LAS1 Is Required for Pre-rRNA Processing at Both Ends of ITS2. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 430–444 (2012).
13. Talkish, J. *et al.* Disruption of ribosome assembly in yeast blocks cotranscriptional pre-rRNA processing and affects the global hierarchy of ribosome biogenesis. *RNA* **22**, 852–866 (2016).
14. Watkins, N. J. & Bohnsack, M. T. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of

- ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **3**, 397–414 (2012).
15. Decatur, W. A. & Fournier, M. J. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 344–51 (2002).
  16. Lafontaine, D. L. J. Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 11–19 (2015).
  17. Freitas, N. & Cunha, C. Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins. *Curr. Genomics* **10**, 550–7 (2009).
  18. Panse, V. G. & Johnson, A. W. Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 260–266 (2010).
  19. Hedges, J., West, M. & Johnson, A. W. Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *EMBO J.* **24**, 567–579 (2005).
  20. Pertschy, B. *et al.* Cytoplasmic Recycling of 60S Preribosomal Factors Depends on the AAA Protein Drg1. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6581–6592 (2007).
  21. Greber, B. J., Boehringer, D., Montellese, C. & Ban, N. Cryo-EM structures of Arx1 and maturation factors Rei1 and Jjj1 bound to the 60S ribosomal subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1228–1233 (2012).
  22. Meyer, A. E., Hoover, L. A. & Craig, E. A. The Cytosolic J-protein, Jjj1, and Rei1 Function in the Removal of the Pre-60 S Subunit Factor Arx1. *J. Biol. Chem.* **285**, 961–968 (2010).
  23. Schäfer, T. *et al.* Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature* **441**, 651–655 (2006).
  24. Lo, K.-Y. *et al.* Defining the Pathway of Cytoplasmic Maturation of the 60S Ribosomal Subunit. *Mol. Cell* **39**, 196–208 (2010).
  25. Tanzawa, T. *et al.* The C-terminal helix of ribosomal P stalk recognizes a hydrophobic groove of elongation factor 2 in a novel fashion. *Nucleic Acids Res.* **46**, 3232–3244 (2018).
  26. Fan, X. *et al.* Structural insights into the interaction of the ribosomal P stalk protein P2 with a type II ribosome-inactivating protein ricin. *Sci. Rep.* **6**, 37803 (2016).
  27. Kemmler, S., Occhipinti, L., Veisu, M. & Panse, V. G. Yvh1 is required for a late maturation step in the 60S biogenesis pathway. *J. Cell Biol.* **186**, 863–880 (2009).
  28. Rodríguez-Mateos, M. *et al.* Role and dynamics of the ribosomal protein P0 and its related trans-acting factor Mrt4 during ribosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **37**, 7519–7532 (2009).

29. Tchórzewski, M., Krokowski, D., Rzeski, W., Issinger, O.-G. & Grankowski, N. The subcellular distribution of the human ribosomal "stalk" components: P1, P2 and P0 proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 203–11 (2003).
30. Hirokawa, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**, 519–26 (1998).
31. Rogers, S. L. & Gelfand, V. I. Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 57–62 (2000).
32. Jansen, R. P. RNA-cytoskeletal associations. *FASEB J.* **13**, 455–66 (1999).
33. Ris, H. The cytoplasmic filament system in critical point-dried whole mounts and plastic-embedded sections. *J. Cell Biol.* **100**, 1474–87 (1985).
34. Macgregor, H. C. & Stebbings, H. A MASSIVE SYSTEM OF MICROTUBULES ASSOCIATED WITH CYTOPLASMIC MOVEMENT IN TELOTROPHIC OVARIOLES. *J. Cell Set* **6**, (1970).
35. Krishan, A. & Hsu, D. Vinblastine-induced ribosomal complexes. Effect of some metabolic inhibitors on their formation and structure. *J. Cell Biol.* **49**, 927–32 (1971).
36. Lenk, R., Ransom, L., Kaufmann, Y. & Penman, S. A cytoskeletal structure with associated polyribosomes obtained from HeLa cells. *Cell* **10**, 67–78 (1977).
37. Moon, R. T., Nicosia, R. F., Olsen, C., Hille, M. B. & Jeffery, W. R. The cytoskeletal framework of sea urchin eggs and embryos: Developmental changes in the association of messenger RNA. *Dev. Biol.* **95**, 447–458 (1983).
38. Ramaekers, F. C., Benedetti, E. L., Dunia, I., Vorstenbosch, P. & Bloemendal, H. Polyribosomes associated with microfilaments in cultured lens cells. *Biochim. Biophys. Acta* **740**, 441–8 (1983).
39. Howe, J. G. & Hershey, J. W. Translational initiation factor and ribosome association with the cytoskeletal framework fraction from HeLa cells. *Cell* **37**, 85–93 (1984).
40. Fey, E. G., Ornelles, D. A. & Penman, S. Association of RNA with the cytoskeleton and the nuclear matrix. *J. Cell Sci. Suppl.* **5**, 99–119 (1986).
41. Chierchia, L. *et al.* Cytoskeletal proteins associate with components of the ribosomal maturation and translation apparatus in *Xenopus* stage I oocytes. *Zygote* **23**, 669–682 (2015).



42. Krichevsky, A. M. & Kosik, K. S. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**, 683–96 (2001).
43. Kanai, Y., Dohmae, N. & Hirokawa, N. Kinesin Transports RNA. *Neuron* **43**, 513–525 (2004).
44. Bisbal, M. *et al.* KIF4 mediates anterograde translocation and positioning of ribosomal constituents to axons. *J. Biol. Chem.* **284**, 9489–97 (2009).
45. Diefenbach, R. J., Diefenbach, E., Douglas, M. W. & Cunningham, A. L. The ribosome receptor, p180, interacts with kinesin heavy chain, KIF5B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 987–992 (2004).
46. Higuchi, Y., Ashwin, P., Roger, Y. & Steinberg, G. Early endosome motility spatially organizes polysome distribution. *J. Cell Biol.* **204**, 343–357 (2014).
47. Calliari, A. Implicancias de la proteína miosina Va en los procesos de generación de asimetrías y polarización celular. Tesis de Doctorado-PEDECIBA, 2008.
48. Vedeler, A., Pryme, I. F. & Hesketh, J. E. Insulin and step-up conditions cause a redistribution of polysomes among free, cytoskeletal-bound and membrane-bound fractions in krebs II ascites cells. *Cell Biol. Int. Rep.* **14**, 211–218 (1990).
49. Gross, S. R. & Kinzy, T. G. Improper Organization of the Actin Cytoskeleton Affects Protein Synthesis at Initiation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1974–1989 (2007).
50. Sellers, J. R. *Myosins*. (Oxford University Press, 1999).
51. Bähler, M. Are class III and class IX myosins motorized signalling molecules? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1496**, 52–59 (2000).
52. Foth, B. J., Goedecke, M. C. & Soldati, D. New insights into myosin evolution and classification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 3681–3686 (2006).
53. Sellers, J. R. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* **1496**, 3–22 (2000).
54. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. & Horwitz, A. R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 778–790 (2009).
55. Kempler, K. *et al.* Loop 2 of limulus myosin III is phosphorylated by protein kinase A and autophosphorylation. *Biochemistry* **46**, 4280–93 (2007).

56. Berg, J. S., Powell, B. C. & Cheney, R. E. A Millennial Myosin Census. *Mol. Biol. Cell* **12**, 780–794 (2001).
57. Syamaladevi, D. P., Spudich, J. A. & Sowdhamini, R. Structural and functional insights on the Myosin superfamily. *Bioinform. Biol. Insights* **6**, 11–21 (2012).
58. Rump, A. *et al.* Myosin-1C associates with microtubules and stabilizes the mitotic spindle during cell division. *J. Cell Sci.* **124**, 2521–2528 (2011).
59. Woolner, S., O'Brien, L. L., Wiese, C. & Bement, W. M. Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* **182**, 77–88 (2008).
60. Sparkes, I. A. Motoring around the plant cell: insights from plant myosins. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 833–838 (2010).
61. Thompson, R. F. & Langford, G. M. Myosin superfamily evolutionary history. *Anat. Rec.* **268**, 276–289 (2002).
62. Woolner, S. & Bement, W. M. Unconventional myosins acting unconventionally. *Trends Cell Biol.* **19**, 245–52 (2009).
63. Zhang, W.-B., Yao, L.-L. & Li, X. The Globular Tail Domain of Myosin-5a Functions as a Dimer in Regulating the Motor Activity. *J. Biol. Chem.* **291**, 13571–13579 (2016).
64. Sellers, J. R. & Veigel, C. Walking with myosin V. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 68–73 (2006).
65. Kurochkina, N. & Guha, U. SH3 domains: modules of protein-protein interactions. doi:10.1007/s12551-012-0081-z
66. Trybus, K. M. Myosin V from head to tail. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 1378–89 (2008).
67. Wang, F. *et al.* Effect of ADP and ionic strength on the kinetic and motile properties of recombinant mouse myosin V. *J. Biol. Chem.* **275**, 4329–35 (2000).
68. Nascimento, A. A., Cheney, R. E., Tauhata, S. B., Larson, R. E. & Mooseker, M. S. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J. Biol. Chem.* **271**, 17561–9 (1996).
69. Pashkova, N. *et al.* Myosin V attachment to cargo requires the tight association of two functional subdomains. *J. Cell Biol.* **168**, 359–364 (2005).
70. Cameron, L.-C. *et al.* Calcium-Induced Quenching of Intrinsic Fluorescence in Brain Myosin V Is Linked to Dissociation of Calmodulin Light Chains. *Arch. Biochem. Biophys.* **355**, 35–42

(1998).

71. Liu, J., Taylor, D. W., Krementsova, E. B., Trybus, K. M. & Taylor, K. A. Three-dimensional structure of the myosin V inhibited state by cryoelectron tomography. *Nature* **442**, 208–11 (2006).
72. Thirumurugan, K., Sakamoto, T., Hammer, J. A., Sellers, J. R. & Knight, P. J. The cargo-binding domain regulates structure and activity of myosin 5. *Nature* **442**, 212–215 (2006).
73. Wang, F. *et al.* Regulated Conformation of Myosin V. *J. Biol. Chem.* **279**, 2333–2336 (2004).
74. Wu, X. *et al.* Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J. Cell Sci.* **114**, 1091–100 (2001).
75. Provance, D. W., Wei, M., Ipe, V. & Mercer, J. A. Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14554–8 (1996).
76. Wöllert, T. *et al.* Myosin5a Tail Associates Directly with Rab3A-containing Compartments in Neurons. *J. Biol. Chem.* **286**, 14352–14361 (2011).
77. Chaudhury, A., He, X.-D. & Goyal, R. K. Role of myosin Va in purinergic vesicular neurotransmission in the gut. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **302**, G598–G607 (2012).
78. Chaudhury, A., He, X.-D. & Goyal, R. K. Myosin Va plays a key role in nitrergic neurotransmission by transporting nNOS $\alpha$  to enteric varicosity membrane. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **301**, G498–G507 (2011).
79. Hammer, J. A., Wagner, W. & Wagner, W. Functions of class V myosins in neurons. *J. Biol. Chem.* **288**, 28428–34 (2013).
80. Bittins, C. M., Eichler, T. W., Hammer, J. A. & Gerdes, H.-H. Dominant-Negative Myosin Va Impairs Retrograde but Not Anterograde Axonal Transport of Large Dense Core Vesicles. *Cell. Mol. Neurobiol.* **30**, 369–379 (2010).
81. Correia, S. S. *et al.* Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* **11**, 457–466 (2008).
82. Wagner, W., Brenowitz, S. D. & Hammer, J. A. I. Myosin-Va transports the endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje neurons. *Nat. Cell Biol.* **13**, 40–8 (2011).
83. Varadi, A., Tsuboi, T. & Rutter, G. A. Myosin Va transports dense core

- secretory vesicles in pancreatic MIN6 beta-cells. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2670–80 (2005).
84. Yoshizaki, T. *et al.* Myosin 5a is an insulin-stimulated Akt2 (protein kinase B $\beta$ ) substrate modulating GLUT4 vesicle translocation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 5172–83 (2007).
  85. Li, Y.-R. *et al.* Myosin Va plays essential roles in maintaining normal mitosis, enhancing tumor cell motility and viability. *Oncotarget* **8**, 54654–54671 (2017).
  86. Long, R. M. *et al.* Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* **277**, 383–7 (1997).
  87. Salerno, V. P. *et al.* Myosin-Va mediates RNA distribution in primary fibroblasts from multiple organs. *Cell Motil. Cytoskeleton* **65**, 422–33 (2008).
  88. Nalavadi, V. C. *et al.* Regulation of zipcode binding protein 1 transport dynamics in axons by myosin Va. *J. Neurosci.* **32**, 15133–41 (2012).
  89. Ceci, M. *et al.* RACK1 Is a Ribosome Scaffold Protein for  $\beta$ -actin mRNA/ZBP1 Complex. *PLoS One* **7**, e35034 (2012).
  90. Yoshimura, A. *et al.* Myosin-Va Facilitates the Accumulation of mRNA/Protein Complex in Dendritic Spines. *Curr. Biol.* **16**, 2345–2351 (2006).
  91. Yang, S. & Huang, X.-Y. Ca<sup>2+</sup> Influx through L-type Ca<sup>2+</sup> Channels Controls the Trailing Tail Contraction in Growth Factor-induced Fibroblast Cell Migration\*. (2005). doi:10.1074/jbc.M501625200
  92. Calliari, A., Bobba, N., Escande, C. & Chini, E. N. Resveratrol delays Wallerian degeneration in a NAD<sup>+</sup> and DBC1 dependent manner. *Exp. Neurol.* **251**, 91–100 (2014).
  93. Espreafico, E. M. *et al.* Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biol.* **119**, 1541–57 (1992).
  94. Sekar, R. B. & Periasamy, A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J. Cell Biol.* **160**, 629–33 (2003).
  95. Periasamy, A., Day, R. N. & American Physiological Society (1887- ). *Molecular imaging : FRET microscopy and spectroscopy*. (Published for the American Physiological Society by Oxford University Press, 2005).
  96. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).

97. Elangovan, M. *et al.* Characterization of one- and two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* **29**, 58–73 (2003).
98. Pranchevicius, M. C. S. *et al.* Myosin Va phosphorylated on Ser1650 is found in nuclear speckles and redistributes to nucleoli upon inhibition of transcription. *Cell Motil. Cytoskeleton* **65**, 441–456 (2008).
99. Cheney, R. E. *et al.* Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* **75**, 13–23 (1993).
100. Yang, S. & Huang, X.-Y. Ca<sup>2+</sup> Influx through L-type Ca<sup>2+</sup> Channels Controls the Trailing Tail Contraction in Growth Factor-induced Fibroblast Cell Migration. *J. Biol. Chem.* **280**, 27130–27137 (2005).
101. Westmark, C. J. & Malter, J. S. FMRP Mediates mGluR5-Dependent Translation of Amyloid Precursor Protein. *PLoS Biol.* **5**, e52 (2007).