



Universidad de la República
Facultad de Ciencias

Tesis para optar al título de Licenciado en Bioquímica

**Análisis de localización diferencial de ARNm
codificantes para proteínas ribosomales en
neuronas**

Autor: Bach. Joaquín Garat

Tutora: Mg. Joaquina Farias

Co-Tutor: Dr. José Sotelo-Silveira

Departamento de Genómica
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, 2018

Agradecimientos

A Joaquina, por haber sido una excelente tutora y compañera de laboratorio, por todos los aprendizajes que me llevo de este trabajo, y por la buena onda que contagia en el día a día.

Al Coya por haberme permitido trabajar en el grupo de trabajo, y por las charlas que hemos tenido, ya sea acerca del proyecto o de la vida en general, que siempre resultan enriquecedoras.

A todos los compañeros de los departamentos de Genómica y del DPAN que hacen que el día a día sea muy disfrutable, y que siempre están dispuestos a dar consejos.

A mis amigos, por todos los buenos momentos vividos, por siempre contagiar alegría y estar a mi lado, dándome fuerzas en todo sentido.

A mi familia, por todo el cariño que me brindan día a día, por el apoyo incondicional, y por estos 22 años de felicidad a su lado.

Abreviaciones Utilizadas

ADNc: ADN copia

ARD: Axoplasma de raíz dorsal

ARNm: ARN mensajero

ARN pol: ARN Polimerasa

ARNr: ARN ribosomal

lincRNA: long intergenic non coding RNA, ARN largo no codificante

miscRNA: miscellaneous RNA, ARN no codificantes sin clasificar

snoRNA: small nucleolar RNA, ARN pequeño nucleolar

ARV: Axoplasma de raíz ventral

GAIT: Complejo inhibidor de la traducción activado por interferón gamma

IntDen: Densidad integrada de Fluorescencia

Nefl: Neurofilamento liviano

RD: Raíz Dorsal

RNP: Ribonucleoproteína

RNA-seq: Secuenciación masiva de ARN

RPKM: Reads per Kilobase Million, lecturas por Kilobase de transcripto por millón de lecturas mapeadas.

RV: Raíz ventral

TPM: Transcriptos por millón

UTR: Región no traducida del ARN mensajero

Resumen

Con el fin de estudiar la maquinaria traduccional en células del sistema nervioso y sus compartimentos especializados, se analizó la abundancia de ARN mensajeros (ARNm) codificantes para proteínas ribosomales en transcriptomas obtenidos de raíces ventrales (RV) y dorsales (RD), y de axoplasmas de las neuronas que componen dichos tejidos (motoras (ARV) y sensoriales (ARD), respectivamente). Se realizan aportes relevantes en la temática al formar parte del primer abordaje del estudio transcriptómico de axones in vivo. Se observó en estudios de ontología génica que los transcriptomas axonales se encuentran enriquecidos en ARNm codificantes para proteínas ribosomales, lo cual resulta llamativo, dado que las subunidades ribosomales son ensambladas en el núcleo. Se observó que en ambas muestras de axoplasma se detectan transcritos codificantes para la mayoría de las proteínas ribosomales, y que existen diferencias entre lo observado para neuronas motoras y sensoriales (43/80 en ARV y 68/80 en ARD). Además, se observó que no todos los ARNm codificantes para proteínas ribosomales se encuentran en la misma abundancia, encontrando que en ARD el codificante para Rps30 es el más abundante, mientras que en ARV el codificante para Rpl35 es el que se encuentra en mayor abundancia. Se compararon los resultados obtenidos con datos transcriptómicos de hígado, ciático y cultivo de fibroblastos de rata para analizar el perfil de abundancia de estos ARNm en diferentes tejidos, tipos celulares y estructuras sub-celulares. Esto permitió observar diferencias en el perfil de abundancia de ARNm entre las diferentes muestras identificando mensajeros de alta y baja abundancia. Las diferencias observadas entre tejidos podrían ser explicadas por la presencia de ribosomas heterogéneos o por la existencia de proteínas ribosomales con funciones externas al mismo. Adicionalmente, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia sobre raíces dorsales y ventrales que permitieron

analizar la distribución de proteínas ribosomales en estos tejidos. En las imágenes obtenidas se observó que las proteínas ribosomales Rpl5, Rps3a y Rplp0, 1 y 2 tendrían una distribución diferencial entre axones y células de Schwann. En suma, los resultados obtenidos aportan datos al estudio de la traducción local axonal, generando a su vez preguntas acerca del posible rol de las proteínas ribosomales sintetizadas localmente.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Expresión Génica	1
1.2 Ribosoma	1
1.2.1 Generalidades y evolución del ribosoma	1
1.2.2 Biogénesis del ribosoma eucariota	2
1.2.3 Ribosomas especializados	4
1.2.4 Funcionas extra ribosomales de proteínas ribosomales	6
1.3 Síntesis proteica en neuronas y sus compartimentos subcelulares	8
1.3.1 Transcriptomas axonales	10
2. Objetivos	14
2.1 Objetivos Generales	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. Materiales y métodos	15
3.1 Datos transcriptómicos	15
3.1.1 Transcriptomas de raíces y axoplasmas dorsales y ventrales	15
3.1.2 Transcriptomas de tejidos y cultivos celulares de rata obtenidos de bases de datos	16
3.2 Análisis de datos de secuenciación	17
3.2.1 Genoma de referencia	17
3.2.2 Análisis de calidad y recorte	19
3.2.3 Alineamiento y conteo de lecturas	19
3.2.4 Comparativa de genes detectados mediante diagramas de Venn	20
3.2.5 Estudios de ontología	20
3.2.6 Obtención del listado de proteínas ribosomales de <i>Rattus Norvegicus</i>	21
3.2.7 Heat Maps	21
3.3 Inmunofluorescencia	22
3.3.1 Animales de experimentación	22
3.3.2 Extracción de raíces	22
3.3.3 Cortes	22
3.3.4 Protocolo de Inmunofluorescencia	23
3.3.5 Visualización en el microscopio confocal de alta resolución	24
3.3.6 Cuantificación	25
3.3.6.1 Cuantificación de señales en tejido entero	25
3.3.6.2 Cuantificación de señales en axones	25
3.3.7 Colocalización	28
4. Resultados	29
4.1 Análisis y procesamiento preliminar de las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva	29
4.2 Alineamientos	30
4.3 Distribución de biotipos de ARN secuenciadas	31
4.4 Comparación de ARNs detectados en las diferentes listas	32

4.5 Análisis de ontología.....	34
4.6 Detección de ARNs codificantes para proteínas ribosomales en muestras de raíz ventral, dorsal y axoplasma	37
4.7 Detección de ARNs codificantes para proteínas ribosomales en transcriptomas obtenidos de bases de datos	40
4.8 Análisis comparativo de la expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales en diferentes tejidos, células y estructuras sub-celulares mediante Heat Map.....	43
4.9 Detección de proteínas ribosomales mediante inmunofluorescencia	45
5. Discusión.....	54
5.1 Análisis transcriptómico de muestras de raíz dorsal y ventral	54
5.2 Distribución de biotipos de moléculas de ARN secuenciadas	55
5.3 Comparación de ARNs detectados en las diferentes listas	56
5.4 Análisis de ontología.....	59
5.5 Detección de ARNs codificantes para proteínas ribosomales en muestras de raíz ventral, dorsal y axoplasma	59
5.6 Perfil de expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales	62
5.7 Expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales en diferentes tejidos y tipos celulares.....	64
5.8 Detección de proteínas ribosomales mediante inmunofluorescencia	66
6. Conclusiones y Perspectivas	69
7. Bibliografía	72

1. Introducción

1.1 - Expresión Génica

Por décadas, el dogma central de la biología molecular ha explicado el flujo de la información génica en los seres vivos. Los genes poseen información para sintetizar determinados ARNm mediante el proceso de transcripción, y a partir de la información que contienen, se sintetizan proteínas mediante el proceso de traducción. Ambos procesos biológicos se encuentran finamente regulados, de modo que los productos génicos se expresen en la localización y momento adecuados para el correcto funcionamiento del organismo. A pesar de que estos procesos han sido extensamente estudiados, la regulación de los mismos aún no es completamente comprendida. Particularmente, en la actualidad se ha visto que el ribosoma podría participar en la regulación del proceso de traducción, aunque históricamente se le ha considerado como una maquinaria capaz de realizar exclusivamente la lectura de ARNm y posterior síntesis de proteínas (Shi and Barna 2015).

1.2 - Ribosoma

1.2.1 - Generalidades y evolución del ribosoma

Una de las teorías más aceptadas acerca del origen de la vida tiene sus bases en la existencia previa de un “mundo ARN” el cual, de haber existido, habría sido hace más de cuatro mil millones de años (Higgs and Lehman 2015). Un hecho que apoya en gran medida esta teoría es que se ha visto que los ARN pueden catalizar diferentes reacciones, particularmente la formación del enlace peptídico a partir de dos aminoácidos libres (Fox 2010).

El ribosoma eucariota se encuentra compuesto por dos subunidades. La subunidad mayor 60S contiene tres tipos de ARN ribosomales (ARNr) (5S, 28S y 5,8S) y 47 proteínas, mientras que la subunidad menor 40S tiene una sola molécula de ARNr (18S) y contiene 33 proteínas (de la Cruz, Karbstein, and Woolford Jr. 2015). Asumiendo que la traducción y por lo tanto el ribosoma tiene su origen únicamente en ARN catalítico, todas las proteínas ribosomales que hoy forman parte del mismo se deben haber incorporado posteriormente a la maquinaria traduccional ancestral. La incorporación de las proteínas habría facilitado el plegamiento del mismo y generado que la traducción se convierta en un proceso con mayor precisión y velocidad. Esta situación permite plantearse dos posibles escenarios: uno en el cual las proteínas que se incorporaron evolucionaron asociadas únicamente a la función ribosomal, u otro en el cual las proteínas ya existían cumpliendo otra función y posteriormente fueron reclutadas por el ribosoma para cumplir la función ribosomal (Wool 1996).

1.2.2 - Biogénesis del ribosoma eucariota

La biogénesis del ribosoma eucariota es un proceso muy complejo y altamente conservado. Del mismo participan además de los propios componentes del ribosoma, más de 200 moléculas incluyendo diferentes proteínas y ARNs no ribosomales que confieren direccionalidad y precisión al proceso (Kressler, Hurt, and Baßler 2010).

Los ARNr 18S, 28S y 5,8S son transcritos por la ARN pol I en el núcleo, más específicamente en el nucléolo, como un único transcripto 47S (preARNr), que luego es procesado y modificado formando los ARNr previamente mencionados. En cambio, el ARNr 5S se transcribe mediante la actividad de la ARN pol III en el núcleo.

Por otro lado, todos los transcritos codificantes para proteínas ribosomales se sintetizan mediante la actividad de la ARN pol II, y luego son exportados al citoplasma donde se traducen a proteínas. Luego, las proteínas se

importan al núcleo y se ensamblan junto al preARNr a medida que este se transcribe. Mientras se ensamblan las proteínas, el preARNr se pliega y corta formando los ARNr 18S, 28S y 5,8S. El ARNr 18S se ensambla junto a 33 de estas proteínas formando la subunidad menor del ribosoma, mientras que los ARNr 5S, 28S y 5,8S se ensamblan junto a 47 proteínas formando la subunidad mayor del ribosoma. Por último, en un proceso coordinado, ambas subunidades se exportan al citoplasma (de la Cruz, Karbstein, and Woolford Jr. 2015; Xue and Barna 2014).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, no se esperaría encontrar proteínas ribosomales libres en el citosol alejadas del núcleo, ya que luego de sintetizadas son transportadas al núcleo dónde se ensamblan formando parte de las subunidades ribosomales. Sin embargo, en la actualidad se hipotetiza que la presencia de proteínas ribosomales en el citosol podría ser un mecanismo de reciclaje del ribosoma, siendo clave para aumentar la vida media del complejo ribonucleoproteico.

En un estudio realizado por Dörrbaum y colaboradores hallaron que las proteínas ribosomales tendrían vidas medias variables, indicando que algunas podrían perder funcionalidad antes que otras (Dörrbaum et al. 2018). Este hecho, sumado a estudios *in vitro* que han comprobado la posible reactivación de ribosomas dañados mediante el intercambio de proteínas ribosomales (Pulk et al. 2010), sugiere que las proteínas ribosomales con vidas medias menores podrían ser intercambiadas por proteínas ribosomales citosólicas de modo de mantener la funcionalidad del complejo. Apoyando esta idea, en organismos eucariotas se ha observado que es posible encontrar proteínas ribosomales P en un pool citosólico, y que las mismas se podrían intercambiar con sus pares presentes en el ribosoma (Gonzalo and Reboud 2003).

La estequiometría resulta esencial para el correcto ensamblaje de las subunidades ribosomales, requiriendo una producción equimolar de los ARNr y las proteínas que los constituyen (Perry 2007). En este sentido, se ha visto que proteínas ribosomales de *E.coli* son capaces de actuar como

represores traduccionales y así autorregular su síntesis. En eucariotas, aunque en menor medida, también se ha observado casos en que las proteínas ribosomales regulan su propia síntesis. Además, se ha visto que defectos en la biogénesis del ribosoma pueden conducir al arresto del ciclo celular o a apoptosis que puede ser inducida por algunas proteínas ribosomales libres (Warner and McIntosh 2009).

A pesar del requerimiento de un ensamblaje equimolar de ARNr y proteínas ribosomales, en diversas investigaciones se observa que diferentes tejidos pueden presentar una diferencia importante en la abundancia de mensajeros codificantes para cada proteína ribosomal (Bortoluzzi et al. 2001; Guimaraes and Zavolan 2016; Kondrashov et al. 2011). Teniendo en cuenta esto, se plantean dos situaciones que explicarían las diferencias observadas a nivel transcriptómico. Una posibilidad es que exista una fuerte regulación traduccional, de modo de que las diferencias en abundancia observadas a nivel de ARNm no se vean reflejadas en diferencias de abundancia a nivel de proteína. Otra posibilidad es que efectivamente las proteínas ribosomales no se sinteticen en iguales cantidades.

1.2.3 - Ribosomas especializados

Durante años se ha visto al ribosoma como una maquinaria molecular muy precisa y constitutiva para todas las células. Sin embargo, es notorio el aumento progresivo de tamaño del ribosoma desde procariontes a eucariotas unicelulares y a mamíferos. El ribosoma humano posee 2650 nucleótidos más y 2542 aminoácidos más incluyendo 26 nuevas proteínas ribosomales comparándolo frente a ribosomas procariontes. Por otro lado, al comparar el ribosoma humano con el ribosoma de levadura se observa que el humano posee 1706 nucleótidos más y una proteína ribosomal adicional (Melnikov et al. 2012). Este aumento de tamaño y complejidad de los ribosomas, sumado a un aumento en el rango de longitudes de las regiones 5' UTR de los ARNm (Leppek, Das, and Barna 2018) podría estar indicando

un aumento de la regulación y especialización del proceso de traducción (Genuth and Barna 2018).

En la actualidad se sabe que diferentes proteínas ribosomales poseen especificidad funcional, y que el ribosoma no realiza exclusivamente la lectura de ARNm y posterior síntesis de proteínas, sino que también participa en la regulación de este proceso (Shi and Barna 2015). Como ya se ha mencionado, varias investigaciones han demostrado que existe una diferencia importante en la abundancia de transcritos codificantes para proteínas ribosomales entre diferentes tejidos y tipos celulares, sugiriendo que los ribosomas podrían variar en su composición de manera tejido específica (Bortoluzzi et al. 2001; Guimaraes and Zavolan 2016; Kondrashov et al. 2011). Estudios posteriores lograron confirmar que los ribosomas pueden presentar heterogeneidad en cuanto a su composición. Para ello se utilizaron técnicas de espectrometría de masas cuantitativa que permitieron estudiar la composición de ribosomas activos dentro de un mismo tipo celular (células madre embrionarias de ratón). Interesantemente, también observaron que al variar la proporción de ciertas proteínas ribosomales se favorece la transcripción de cierto subgrupo de mensajeros. De esta manera lograron evidenciar la importancia a nivel de regulación traduccional que podrían tener las proteínas ribosomales (Shi et al. 2017).

Además de estas posibles variaciones en la composición de los ribosomas, se ha demostrado que los parálogos de proteínas ribosomales pueden ser expresados preferentemente en ciertos tejidos. Dada su similitud, los parálogos suelen competir por la unión al ribosoma en el mismo sitio, añadiendo una mayor complejidad y diversidad a los ribosomas. La complejidad aumenta aún más si se tiene en cuenta que tanto las proteínas como el ARNr que componen al ribosoma pueden verse alteradas por diversas modificaciones químicas (Genuth and Barna 2018). Teniendo en cuenta que el ribosoma puede incluir o no ciertas proteínas ribosomales, y que estas proteínas pueden contener o no modificaciones post-

traduccionales es posible que existan numerosas conformaciones posibles para los ribosomas, lo cual podría afectar la función y/o actividad del mismo (Shi and Barna 2015).

1.2.4 - Funciones extra ribosomales de proteínas ribosomales

Las proteínas ribosomales son proteínas de unión al ARN presentes en alta concentración en todas las células, por lo que *a priori* resulta probable que las mismas fueran reclutadas para cumplir variadas funciones auxiliares (Warner and McIntosh 2009). Recordando lo mencionado por Wool (1996), se plantean dos posibles escenarios que explicarían la actual composición del ribosoma asumiendo una maquinaria ancestral formada únicamente por ARNr. Uno en el cual las proteínas que se incorporaron al ribosoma evolucionaron asociadas únicamente a la función ribosomal, y otro en el cual las proteínas existían cumpliendo otra función y posteriormente fueron reclutadas por el ribosoma para cumplir la función ribosomal. Por lo tanto, parecería probable que estas proteínas sean capaces de cumplir otras funciones por fuera del ribosoma (Wool 1996).

La capacidad de una proteína ribosomal de cumplir una función por fuera del mismo fue descrita por primera vez 1974 para la proteína Rps1 de *E.coli*. Se observó que esta proteína era reclutada por el bacteriófago Q β junto a dos factores de traducción con el fin de formar la replicasa de ARN responsable de la duplicación de su genoma (Blumenthal 1979). Desde entonces, muchas investigaciones se han centrado en esta área de investigación, habiéndose detectado diversas proteínas ribosomales capaces de cumplir funciones extra ribosomales. Por ejemplo, se ha visto que algunas de ellas pueden participar en la regulación de la apoptosis, arresto del ciclo celular, proliferación celular, migración e invasión celular y reparación de ADN dañado. Estas funciones son principalmente mediadas y reguladas por la vía de p53-MDM2 (Xu, Xiong, and Sun 2016).

Algunas de las proteínas que se conoce que pueden afectar esta vía son Rpl5 y Rpl11, las cuales cumplen esta función al interactuar con el ARNr 5S y formar la ribonucleoproteína (RNP) 5S. Esta RNP es capaz de interactuar con el represor de p53 (MDM2) bloqueando su actividad y de esta manera activando indirectamente a p53. La interacción entre la 5S RNP y MDM2 se ve potenciada cuando hay defectos en la biogénesis del ribosoma, lo cual genera una acumulación de esta RNP (Sloan, Bohnsack, and Watkins 2013; Bursac et al. 2012; Donati et al. 2013).

Una de las funciones extra ribosomales más estudiadas es la descrita para Rpl13a. Ésta puede ser fosforilada en respuesta a la presencia de interferón gamma, liberarse de la subunidad mayor del ribosoma y pasar a formar parte del complejo inhibidor de la traducción activado por interferón gamma (GAIT) (Mazumder et al. 2003; Zhou et al. 2015). Resulta particularmente interesante que una modificación post-traducciona l de la proteína permita que ésta se libere de la subunidad ribosomal y que como consecuencia la conduzca a cumplir otra función por fuera del mismo.

A nivel neuronal, resulta interesante la posible actividad extra ribosomal que ha sido descrita para Rps3a en un modelo de levadura por De Graeve y colaboradores. En este modelo, mediante el clonado de secuencias codificantes para Rps3a y α -sinucleína de mamífero observaron que dicha proteína ribosomal es capaz de actuar como chaperona, contrarrestando la toxicidad provocada por la agregación de α -sinucleína. La importancia a nivel neuronal de esta posible actividad chaperona de Rps3a viene dada porque se ha visto que la agregación de α -sinucleína en cuerpos de Lewy es un sello distintivo asociado con la muerte de células neuronales en la enfermedad de Parkinson (De Graeve et al. 2013).

1.3 - Síntesis proteica en neuronas y sus compartimentos subcelulares

El estudio de las proteínas ribosomales puede llevarse a cabo utilizando variados modelos celulares. Particularmente, nos resultó interesante realizar una primera aproximación al estudio de la expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales en neuronas y sus compartimentos especializados, dada su morfología particular. Soma, dendritas y axones son las tres grandes estructuras que componen a una neurona. El soma es el sitio que comprende al núcleo y el citoplasma que lo rodea, y de él se proyectan ramificaciones citoplasmáticas denominadas dendritas. El axón, en tanto, es una proyección citoplasmática que parte del soma y cuya longitud puede variar entre un milímetro y un metro según el tipo de neurona (Franze and Guck 2010).

Históricamente se creía que las proteínas neuronales se traducían únicamente en el soma, y que aquellas proteínas que cumplían una función en el axón eran transportadas al mismo. Este transporte puede ocurrir mediante dos mecanismos, el transporte axonal rápido ($0,5-0,4 \mu\text{m/s}$) o el transporte axonal lento ($0,01-0,05 \mu\text{m/s}$). Las proteínas asociadas a vesículas y otros organelos membranosos se transportan por la vía de transporte axonal rápida, mientras que las proteínas citosólicas y del citoesqueleto lo hacen por la vía de transporte axonal lento (Lasek, Garner, and Brady 1984; Álvarez and Torres 1985).

Esta idea del transporte como único método de suministro de proteínas al axón surgió debido a que en estudios realizados en los 1970s no se pudo detectar cantidades significativas de ARNr en axoplasmas provenientes de axones gigantes de poliqueto y calamar. Por ello, no resultaba probable que hubiera presencia de ribosomas, indicando que no era posible la traducción local en el axón (Lasek, Dabrowski, and Nordlander 1973). Además, inicialmente tanto los poli ribosomas como el retículo endoplásmico rugoso

se lograban observar mediante microscopía únicamente cerca del soma, lo cual apoyaba la idea de que la síntesis proteica no podría ocurrir en el axón (Kim and Jung 2015). Sin embargo, para neuronas del sistema nervioso periférico donde los axones pueden llegar a medir hasta 1 metro de longitud, el transporte axonal lento no resulta un proceso viable como único suministro de proteínas dada la velocidad de transporte y la vida media de las proteínas (Antonio Giuditta et al. 2002; Álvarez and Torres 1985).

Más adelante, varios investigadores demostraron que existe transferencia de proteínas (Lasek, Gainer, and Przybylski 1974), ribosomas (Court et al. 2008) y ARN (Sotelo et al. 2013) desde células de Schwann al axón. Este proceso, sumado al transporte de proteínas desde el soma aportaría proteínas axonales solucionando la inconsistencia del transporte como único método de suministro de proteínas al axón. El hecho de que no solo se transfieran proteínas, sino que también ribosomas y ARN, indica además la posibilidad de que se utilicen para síntesis local de proteínas en el axón. Aunque en un principio se habían observado ribosomas únicamente en el soma, más adelante se lograron observar mediante microscopía electrónica poli ribosomas en espinas dendríticas. Por lo tanto, quedó demostrado que la síntesis de proteínas compartimentalizada podría ocurrir en las dendritas neuronales (Steward and Levy 1982). Desde fines de la década del 1960, mediante experimentos *in vitro* se evidenció que en axones de conejo, calamar y pez dorado es posible la síntesis de proteínas (Koenig 1967; A Giuditta, Dettbarn, and Brzin 1968; Edstrom and Sjostrand 1969). Además, en estudios posteriores se logró identificar ARNr, ARNm y polisomas activos en axones gigantes de calamar utilizando técnicas con mayor sensibilidad (Antonio Giuditta et al. 1991). Sin embargo, no fue hasta comienzos de los años 2000 que la comunidad científica comenzó a aceptar completamente la hipótesis de traducción local en el axón (Kim and Jung 2015). Dos experimentos independientes demostraron que la síntesis local de proteínas es requerida para procesos biológicos específicos como respuestas quimiotrópicas de conos de crecimiento axonales (Campbell

and Holt 2001) y para potenciar la liberación de neurotransmisores (X. H. Zhang and Poo 2002).

Dichos descubrimientos, sumados a las nuevas tecnologías desarrolladas para aislar el axoplasma y para estudiar expresión génica despertaron gran interés en estudiar la transcriptómica en el compartimento axonal. *A priori*, se esperaría que los transcriptomas axonales posean características particulares, y que los transcritos allí localizados posean funciones necesarias para el correcto funcionamiento del axón.

1.3.1 - Transcriptomas axonales

Hasta el momento se encuentran publicados 16 transcriptomas axonales de diferentes tipos neuronales como neuronas motoras y sensoriales. Estas neuronas, componen las principales vías del sistema nervioso periférico y, a pesar de ser ambas el mismo tipo celular (neuronas) cumplen funciones muy diferentes como lo son el control del movimiento (neuronas motoras) y la asimilación de diversos estímulos externos (neuronas sensoriales). Los estudios transcriptómicos, tanto axonales como de soma, permiten ahondar en el conocimiento de la expresión génica y transporte de ARNm hacia compartimentos especializados como el axón, permitiendo así un estudio más profundo de las mismas de modo de comprender en mayor medida las diferencias que presentan. Los transcriptomas axonales publicados fueron realizados utilizando técnicas desarrolladas para el estudio de la expresión génica como SAGE (serial analysis of gene expression) (Andreassi et al. 2010) , microarreglos (Willis et al. 2007; Taylor et al. 2009; Zivraj et al. 2010; Gumy et al. 2011; Saal et al. 2014; Bigler et al. 2017) y secuenciación masiva (Cajigas et al. 2012; Y. Zhang et al. 2014; Baleriola et al. 2014; Minis et al. 2014; Briese et al. 2015; Taliaferro et al. 2016; Rotem et al. 2017; Zappulo et al. 2017; Tóth et al. 2018).

Para el estudio de transcriptomas axonales se debe aislar el axoplasma previo a la extracción de ARN, lo cual se puede realizar a partir de

estrategias basadas en cultivos celulares o a partir de nervios *in vivo*. Hasta el momento, todos los transcriptomas publicados fueron realizados a partir del aislamiento de axoplasmas de cultivos celulares. El axoplasma de células neuronales en cultivo se ha aislado mediante la utilización de cámaras Campenot, cámaras Boyden modificadas, dispositivos microfluídicos o mediante microdissección por captura láser (Revisado en Kim and Jung 2015). Por otro lado, se puede extraer axoplasma *in vivo* a partir de nervios mediante la aplicación de las técnicas de microdissección descritas por Koenig (Koenig 1979), o mediante estrategias basadas en cambios de osmolaridad tal como lo detalla el grupo de Fainzilber (Rishal, Rozenbaum, and Fainzilber 2010). El aislamiento de axoplasma *in vivo* permitiría el estudio del transcriptoma axonal sin afectar el ambiente que rodea a la neurona. De este modo, los resultados serían más representativos de lo que ocurre en el animal. Por otro lado, es muy probable que los resultados obtenidos posean una mayor variabilidad que cuando se estudia sobre cultivos celulares.

La posibilidad de obtener el transcriptoma axonal permite estudiar el posible rol que puede tener la síntesis local en axones, permitiendo inferir cuáles son las proteínas que allí se podrían sintetizar. Mediante estos experimentos se ha confirmado que el contenido del transcriptoma axonal es dependiente de la etapa del desarrollo del organismo (Zivraj et al. 2010) y de factores extrínsecos (Willis et al. 2005). Se ha detectado una gran variedad de ARNm presentes en el axón, pero a pesar de ello, se sabe que solo unos pocos son traducidos en un momento dado. Este hecho sugiere que los ARNm codificantes para proteínas que se requieren en un futuro cercano son almacenados en el axón y son traducidos en el momento que es necesaria su actividad (revisado en Kim and Jung 2015).

La sensibilidad de los estudios transcriptómicos es mayor cuándo se utilizan técnicas de secuenciación masiva de ARN (RNA-seq) que cuándo se utilizan microarreglos. Esto se confirma al comparar la variedad de transcriptos detectados en experimentos realizados mediante RNA-seq

(Minis et al. 2014) con experimentos realizados utilizando microarreglos (Gumy et al. 2011). Se detectó alrededor de dos veces más variedad de transcriptos en el análisis de Minis y colaboradores que en el realizado por Gumy y colaboradores.

Sorprendentemente, entre la gran variedad de ARNm que fueron detectados en los transcriptomas axonales publicados, se han encontrado mensajeros codificantes para proteínas que no se esperaba que fueran traducidas en el axón. Entre ellos se encuentran mensajeros codificantes para factores de transcripción, factores de splicing y para la mayoría de las proteínas ribosomales, lo cual abre un campo de investigación centrada en el que rol cumplirían estas proteínas traducidas localmente (Jung, Yoon, and Holt 2013).

Particularmente, esta tesina se centró en el estudio de los mensajeros codificantes para proteínas ribosomales, los cuales han sido reportados en 9 de los artículos de transcriptomas axonales (Willis et al. 2007; Taylor et al. 2009; Zivraj et al. 2010; Gumy et al. 2011; Saal et al. 2014; Briese et al. 2015; Rotem et al. 2017; Bigler et al. 2017; Tóth et al. 2018). En particular, Zivraj y colaboradores (2010), observaron que el transcriptoma de conos de crecimiento axonales incluye mensajeros codificantes para 69 de las 80 proteínas ribosomales en *Xenopus* y para 79 de 80 proteínas ribosomales en ratón (Zivraj et al. 2010). El hecho de que se hayan detectado estos transcriptos en varios experimentos independientes, que utilizan diferentes técnicas y variados tipos neuronales, demuestra que los mismos se pueden localizar en axones, siendo intrigante la función que cumplirían. Estudios proteómicos recientes han demostrado que la categoría “proteínas ribosomales” se encuentra enriquecida dentro de las traducidas basalmente en el axón. Además, interesantemente observaron que la abundancia de las proteínas ribosomales es variable, y confirmaron que en algunos casos la abundancia depende de estímulos externos (Cagnetta et al. 2018).

El presente trabajo de grado forma parte del primer abordaje del estudio de transcriptomas axonales *in vivo*. Particularmente, se analizaron transcriptomas de axoplasmas obtenidos a partir de neuronas que componen las dos grandes vías del sistema nervioso periférico, las motoras y las sensoriales. El mismo se centra fundamentalmente en el análisis de abundancia de transcritos codificantes para proteínas ribosomales, detectando y comparando los perfiles de abundancia de estos transcritos entre ambos tipos de axoplasma, así como también con los perfiles de abundancia de otros tejidos y tipos celulares. De este modo, se observa qué transcritos son detectados en cada axoplasma, y cómo es la abundancia relativa de cada uno.

2. Objetivos

2.1 – Objetivos Generales

Analizar el transcriptoma de axones provenientes de neuronas que componen las raíces dorsales y ventrales de *Rattus Norvegicus*, poniendo especial énfasis en el análisis de mensajeros codificantes para proteínas ribosomales.

2.2 - Objetivos específicos

Analizar y comparar el perfil de expresión de las proteínas ribosomales en diferentes tejidos y cultivos celulares de rata.

Analizar el significado biológico de los ARNm detectados en el axoplasma mediante estudios de ontología.

Observar mediante inmunofluorescencia la presencia de proteínas ribosomales en el axón analizando la abundancia y distribución de las mismas en células de raíces nerviosas.

3. Materiales y métodos

3.1 - Datos transcriptómicos

3.1.1 - Transcriptomas de raíces y axoplasmas dorsales y ventrales

Se analizaron datos de secuenciación obtenidos previamente por Joaquina Farías en el marco de su tesis de doctorado. Los datos corresponden a la secuenciación de cuatro muestras diferentes de ADN copia (ADNc), Las muestras analizadas corresponden a axoplasmas de neuronas motoras o sensoriales y a las raíces nerviosas de las cuales forman parte. El estudio del transcriptoma de la raíz completa puede utilizarse como control del transcriptoma axonal, al encontrarse los axones incluidos en la raíz. El protocolo detallado se puede encontrar en la Tesis de Maestría de Joaquina Farias (Farias 2014).

- i) Axones de raíces de nervios dorsales (provenientes de 5 ratas diferentes).
- ii) Axones de raíces de nervios ventrales (provenientes de 5 ratas diferentes).
- iii) Raíces de nervios dorsales (provenientes de 5 ratas diferentes).
- iv) Raíces de nervios ventrales (provenientes de 5 ratas diferentes).

Para la obtención de las muestras se utilizaron ratas adultas (6 meses de edad) de la cepa *Sprague Dawley* del bioterio del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

Luego de sacrificadas las ratas, se realizó una disección de la médula espinal, identificando y separando raíces dorsales y raíces ventrales a la altura de la vértebra L5 (las cuales darán origen al nervio ciático junto con las de L4 y L6). La extracción de ARN de las raíces (iii y iv) fue realizada mediante una primera ronda de extracción utilizando trizol (Life

Technologies) y una segunda ronda de extracción utilizando el kit RNAqueous®-Micro Kit (Ambion).

De modo de obtener el ARN presente en axoplasmas (i y ii), partiendo de raíces ventrales y dorsales se realizó una micro-disección de axoplasmas tomando como base el protocolo descrito por Koenig y colaboradores. Este protocolo permite obtener conjuntos de axoplasmas purificados, evitando contaminaciones de otros tipos celulares (Koenig et al., 2000). La extracción de ARN de los pools de axoplasmas fue realizado utilizando el kit RNAqueous®-Micro Kit (Ambion), el cual es especialmente diseñado para la extracción de ARN a partir de micro-muestras. Se utilizó el componente para muestras de micro-disección de captura láser ya que mejora la extracción en muestras con poca concentración de ARN.

Luego, todas las muestras de ARN fueron amplificadas utilizando el kit Ovation RNA-seq system V2 (NuGen), el cual es capaz de amplificar ARN de forma lineal, a partir de tan solo 500 pg de ARN total.

Finalmente, todas las muestras fueron secuenciadas mediante secuenciación pareada con un largo de secuenciación de lecturas de 100 bases.

3.1.2 - Transcriptomas de tejidos y cultivos celulares de rata obtenidos de bases de datos.

Con el fin de analizar el perfil de expresión de proteínas ribosomales en otros tejidos se descargaron datos de secuenciación de ARN de hígado y de ciático de la base de datos online de NCBI. El estudio del transcriptoma de nervio ciático permite analizar un sistema similar a las raíces nerviosas, ya que el ciático es originado en parte por las raíces dorsales y ventrales analizadas. Por otro lado, con el fin de estudiar el perfil de expresión en cultivos de líneas celulares se descargaron datos de secuenciación de ARN de cultivo celular de Fibroblastos de la base de datos EMBL-EBI.

i) Transcriptoma de ciático de ratas adultas *Sprague Dawley* (Triplicado).
BioProject: PRJNA313202, Run Accessions: SAMN05388930,
SAMN05388931, SAMN05388932 (Sapio et al. 2016).

ii) Transcriptoma de hígado de ratas adultas *Wister* (Triplicado).
Bioproject: PRJNA386218, Run Accessions: SAMN06925366,
SAMN06925365, SAMN06925364 (Agba et al. 2017).

iii) Transcriptoma de línea celular similar a fibroblastos (Rat2) de embriones de ratas *Fischer* (Duplicado).
Bioproject: PRJEB23562, Run Accessions: ERR2201449, ERR2201451
(Irigoyen et al. 2018).

Mediante Box Plots se analizó la distribución de la expresión de los genes obtenidos en cada réplica, confirmando que la distribución entre réplicas era similar. Teniendo en cuenta esto, y que son datos de secuenciación con publicaciones aceptadas, se decidió continuar los análisis utilizando el promedio de expresión entre las réplicas para cada gen.

3.2 - Análisis de datos de secuenciación

Para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizó el programa informático CLC Genomics Workbench v11.0 (Qiagen Bioinformatics) siguiendo el procedimiento que se observa en el diagrama de flujo (Figura 1).

3.2.1 - Genoma de referencia

El genoma de referencia y las anotaciones de genes del mismo fueron descargados utilizando la herramienta de descarga de genomas del CLC. El programa descarga la versión actual del genoma publicado en el

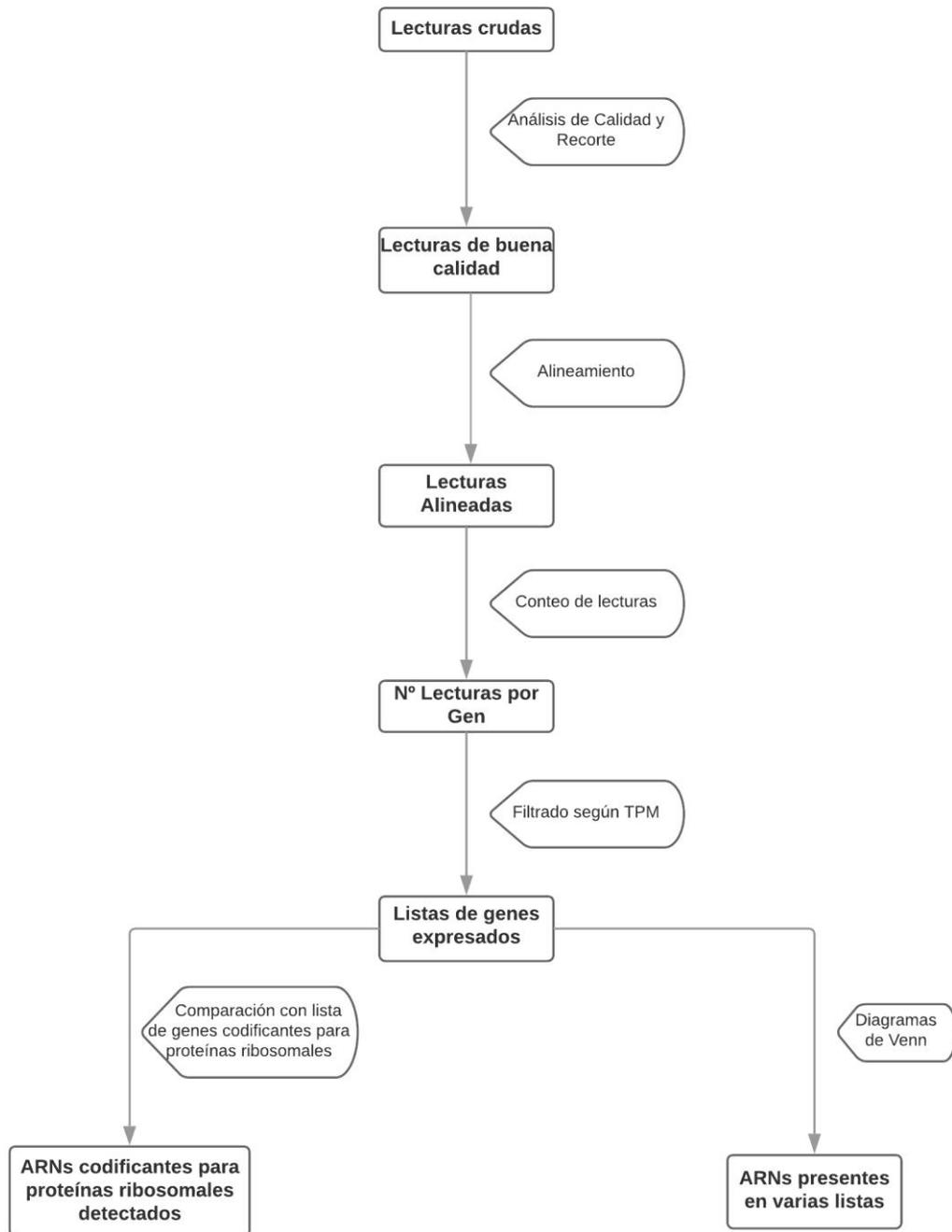


Figura 1. Diagrama de flujo ilustrando el procedimiento de análisis de secuencias llevado a cabo. Los pasos de análisis de calidad, recorte, mapeo y conteo de lecturas fueron realizados utilizando el CLC Genomics Workbench v11.0. Los Diagramas de Venn fueron realizados utilizando el programa BioVenn.

GenBank de NCBI con las anotaciones correspondientes que provee ENSEMBL. El ensamblado fue publicado en el 2014, y las anotaciones han

sido actualizadas por última vez en enero de 2017. GenBank assembly accession: GCA_000001895.4

3.2.2 - Análisis de calidad y recorte

Para analizar la calidad de las secuencias se utilizó la herramienta de control de calidad presente en el programa informático CLC Working Genomics v11.0.

Se realizó el recorte de las secuencias utilizando la herramienta “trimming” presente en el CLC. Para el recorte se utilizaron los parámetros por defecto del programa (límite de valor de calidad igual a 0,05, máximo número de nucleótidos ambiguos igual a 2 y recorte automático de adaptadores).

3.2.3 - Alineamiento y conteo de lecturas

Se procedió al análisis de las secuencias recortadas utilizando la herramienta “RNAseq Analysis” del CLC. Esta herramienta realiza el alineamiento de las secuencias seleccionadas frente al genoma de referencia, y otorga como resultados los alineamientos correspondientes junto a una tabla que incluye la cantidad de lecturas alineadas a cada gen indicando los valores de abundancia normalizados por el total de lecturas TPM (Transcript Per Million) y RPKM (Reads Per Kilobase Million). Ambos valores se definen con el fin de normalizar los resultados obtenidos teniendo en cuenta la profundidad de la secuenciación y la longitud de los genes. A pesar de que el objetivo de ambos valores es común (normalizar los resultados), los mismos poseen ciertas diferencias y se ha visto que para comparaciones entre diferentes muestras resulta más útil el valor del TPM (Wagner, Kin, and Lynch 2012). Para este análisis, se utilizaron los parámetros por defecto del CLC (coste del error de alineamiento en una base en 2, el coste de generar una inserción en 3, el coste de generar una

delección en 3, la fracción de longitud en 0,8, la fracción de similitud en 0,8 y el máximo número de hits para una lectura en 10).

Luego, se filtraron manualmente los resultados obtenidos de modo de evitar posibles falsos positivos debido a baja cantidad de lecturas alineadas. De este modo, para los posteriores análisis se tomaron como genes detectados únicamente aquellos que posean un TPM mayor a 1.

3.2.4 - Comparativa de genes detectados mediante diagramas de Venn

Los diagramas de Venn escalados según el tamaño de las muestras fueron realizados utilizando la herramienta BioVenn. Esta herramienta, además del diagrama otorga las listas de genes únicos de cada set de datos y la lista de los genes compartidos (Hulsen, de Vlieg, and Alkema 2008).

3.2.5 - Estudios de ontología

Los estudios de ontología de los genes presentes en las muestras de axones de raíces dorsales y ventrales fueron realizados utilizando la herramienta online Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 (Huang, Sherman, and Lempicki 2009a, 2009b). Para realizar el análisis se comparó las listas de genes detectados en axoplasma frente a los genes detectados en las raíces que componen. Es decir que, los genes detectados en ARV se los comparó con los genes detectados en RV, mientras que los detectados en ARD se los comparó con los detectados en RD.

Para los tres dominios ontológicos (Procesos biológicos, Componentes Celulares y Función Molecular) se presentan aquellas categorías que presentan un *p-valor* corregido menor a 0,05.

3.2.6 - Obtención del listado de proteínas ribosomales de *Rattus Norvegicus*.

Para obtener un listado con los genes codificantes para proteínas ribosomales en rata, se utilizó el buscador de la base de datos de ENSEMBL. En ella se buscaron genes cuyas anotaciones correspondían a proteínas ribosomales o a parálogos de las mismas. Se tomaron como genes codificantes para proteínas ribosomales aquellos que se encontraban descritos con el nombre de una proteína ribosomal, como “RPlike” o como “similar to RP”, y se tuvo en cuenta que dichos genes estuvieran anotados como codificantes de proteínas de modo de evitar incluir a los pseudogenes.

3.2.7 - Heat Maps

Los Heat Maps son representaciones gráficas dónde valores individuales ingresados en una matriz son representados como colores. Los colores correspondientes a cada valor se definen en base al *z-score*, el cual viene dado por la comparación (por columnas o por filas) de dicho valor respecto al promedio de valores frente a los que se está comparando. Para realizar el Heat Map de expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales se utilizó la herramienta online Heatmapper (Babicki et al. 2016). Se ingresaron los valores correspondientes al TPM de cada gen codificante para proteínas ribosomales detectados en cada muestra de modo que las columnas representan a las muestras y las filas a cada gen. Realizando un escalado por muestra (columna) se logra normalizar los TPM observados de modo de poder comparar fácilmente cuáles genes codificantes para proteínas ribosomales se expresan por encima o por debajo del promedio en cada caso. Además de la representación de colores, también se puede representar la similaridad entre las muestras aplicando métodos de clustering y mediante diferentes métodos de medidas de distancia. En este

caso se aplicó el método de promedios para el clustering y el método de Kendall's Tau para las medidas de distancia, ya que se observó que era el método que mejor agrupaba las muestras.

3.3 - Inmunofluorescencia

3.3.1 - Animales de experimentación

Con el fin de extraer raíces dorsales y ventrales de rata para realizar inmunofluorescencias, se sacrificaron ratas *Sprague Dawley* adultas del bioterio del IIBCE mediante decapitación.

3.3.2 - Extracción de raíces

Se procedió a disecar la médula espinal con el fin de identificar raíces ventrales y dorsales a ambos lados de la misma. A medida que se extraen los nervios se los coloca en medio de cultivo (DMEM) de modo de mantener el tejido en buenas condiciones mientras se extraen los nervios.

Luego, se separaron las raíces dorsales y ventrales observando las mismas bajo la lupa, y se colocaron en fijador [PAF 4% en PHEM (PIPES 60mM, HEPES 25mM, EGTA 10mM, MgCl₂ 2mM)] por una hora.

Transcurrida esa hora se procedió a realizar 3 lavados de 5 minutos con PHEM, y finalmente se crioprotegieron las muestras (se guardaron las raíces a 4°C en sacarosa 30% en PHEM).

3.3.3 - Cortes

Los cortes de los nervios se realizaron utilizando el criostato institucional del IIBCE, el cual funciona a temperaturas menores a -20°C. Para ello se

colocó un nervio dorsal y un nervio ventral en un molde al que luego se le agregó medio de montaje (CryoGlue SLEE medical GmbH 30001101). Utilizando el crióstato se realizaron cortes longitudinales de 15 micrómetros consecutivos de los tejidos presentes en los bloques y se fijaron a portaobjetos previamente tratados con poli-L Lisina 0,1% (Sigma Life Science P8920). Luego, los mismos fueron guardados a -20°C hasta el momento de llevar a cabo la inmunofluorescencia.

3.3.4 – Protocolo de Inmunofluorescencia

Se tomaron los portaobjetos con los cortes guardados a -20°C, se los dejó unos minutos a temperatura ambiente y luego se marcó alrededor de los cortes con un marcador de cera (Mini PAP Pen Invitrogen 008877). Se colocaron los portaobjetos sobre una cámara húmeda y se realizó una permeabilización con Tritón 0,5% en PHEM durante 20 minutos. Luego se realizaron lavados 3x5 minutos con PHEM. Después del último lavado se realizó el bloqueo utilizando buffer de incubación (Composición del Buffer de Incubación: Glicina 3% y BSA 2% en PHEM) durante 30 minutos en horno de hibridación a 37°C. Luego del bloqueo se realizó la incubación con anticuerpos primarios específicos en buffer de incubación (Tabla 1) overnight a 4°C. Se realizaron experimentos con diferente combinación de anticuerpos primarios (Anti-Rpl5, Anti-Nefl y Anti-P o Anti-Rps3a, Anti-Nefl

Tabla 1. Anticuerpos primarios específicos.

Anticuerpo específico	Organismo de origen	Compañía	Código	Dilución
Anti-Rpl5	Conejo	ProteinTech	15430-1-AP	1/150
Anti-Rps3a	Conejo	ProteinTech	14123-1-AP	1/300
Anti-Proteína ribosomal P	Humano	ImmunoVision	HPO-0100	1/500
Anti-Neurofilamento	Ratón	Cell Signaling Technology	2835	1/400

y Anti-P). Es importante tener en cuenta que las proteínas ribosomales P son marcadas en ambas combinaciones de anticuerpos, por lo que se obtendrán réplicas de dicho marcaje. Al día siguiente se realizaron lavados 3x5 minutos con PHEM, y luego del último lavado se realizó la incubación con DAPI y los anticuerpos secundarios en buffer de incubación (Tabla 2) durante 2 horas a temperatura ambiente. Es importante que una vez agregados los anticuerpos secundarios se evite la exposición a la luz de los preparados, de modo de proteger el fluoróforo. Transcurridas estas dos horas se realizaron lavados 3x5 minutos con PHEM y por último se procedió a realizar el montaje con un cubre objetos utilizando el medio de montaje

Tabla 2. Anticuerpos secundarios y métodos de tinción.

Anticuerpo secundario y sondas	Anticuerpo primario reconocido	Compañía	Código	Dilución
Faloidina - Alexa Fluor 488		Life technologies	A12379	1/400
Alexa Fluor Goat Anti Mouse 488	Anti-Neurofilamento	Life technologies	A-11008	1/500
Alexa Fluor Goat Anti Rabbit 555	Anti-Rpl5 Anti-Rps3a	Life technologies	A-21422	1/500
Alexa Fluor Goat Anti Human 647	Anti-Proteína ribosomal P	Life technologies	A-21445	1/500
ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI 405		Life technologies	P-36931	

Prolong conjugado a DAPI (Life Technologies P-36931). Luego de secados los preparados se los sella con esmalte y se guardan a 4°C hasta el momento de su visualización en el microscopio confocal. En paralelo se realiza un control negativo de la inmunofluorescencia, cuya única diferencia es que no fue incubado con anticuerpos primarios específicos.

3.3.5 - Visualización en el microscopio confocal de alta resolución

La visualización se realizó utilizando el microscopio confocal institucional Zeiss LSM800 – AiryScan del IIBCE con el objetivo 63X de inmersión en aceite, y las imágenes fueron obtenidas utilizando el software asociado Zen Blue 2.3. Observando el control negativo se fijó la potencia del láser y el nivel del fotomultiplicador de modo de que no se observe señal al irradiar

la muestra con las diferentes longitudes de onda utilizadas. Luego de fijados los parámetros para evitar la observación de señales debidas a reconocimiento inespecífico por parte de los anticuerpos secundarios o autofluorescencia de los tejidos, se procedió a analizar los experimentos. Para ello se obtuvieron más de 15 imágenes de planos a lo largo de los cortes de ambas raíces sin variar la potencia del láser ni el fotomultiplicador, de modo de poder cuantificar y comparar las señales de expresión entre ambas raíces.

3.3.6 - Cuantificación

Para realizar la cuantificación de las señales observadas en el microscopio confocal se utilizó la herramienta informática ImageJ Fiji. Según el objetivo planteado se siguieron dos metodologías diferentes:

3.3.6.1 - Cuantificación de señales en Tejido Entero

Se abrieron todas las imágenes y se utilizó la herramienta Measure para medir intensidad de fluorescencia en cada canal. De este modo se obtuvo un valor de Intensidad de Fluorescencia, el cual luego se dividió por el área de la sección de modo de obtener una medida independiente del área observada.

3.3.6.2 - Cuantificación de señales en axones

Para la cuantificación en axones, se utilizó la fluorescencia dada por el marcaje del neurofilamento para delimitar los axones en las imágenes obtenidas y posteriormente se cuantificó la señal dentro de los mismos siguiendo los pasos que se detallan a continuación. Para cada imagen correspondiente al canal donde se marca neurofilamento (Figura 2a) se utilizan las opciones “Make binary” y “Fill holes” dentro de la pestaña

“process” del ImageJ. De esta manera se obtiene una imagen binaria donde se marcan en negro únicamente aquellas partes de la imagen que poseen señal superior a un umbral seleccionado (en este caso se utilizó el umbral por defecto) debido a la presencia de axones (Figura 2b). Luego se utiliza la opción “Analyze Particles” de la pestaña “Analyze”, en donde se define que la máscara detectada debe tener un mínimo de tamaño de 4 micras cuadradas de modo de filtrar un posible marcaje inespecífico (Figura 2c). Para las imágenes correspondientes a todos los canales de fluorescencia se utiliza la opción “Overlay From Roy Manager” presente en la pestaña “Image” de modo de incorporar la máscara de neurofilamento generada en los pasos previos (Figura 2d). Finalmente se utiliza la herramienta “Measure” presente en el “Roy Manager”, obteniendo como resultado

intensidad de fluorescencia y área de cada axón detectado en la imagen. De modo de obtener una medida independiente de la cantidad de axones y del área de axones observada en cada imagen, se sumaron las intensidades de fluorescencia de cada canal y se dividieron por el área total de axones en la imagen. Así, se obtuvo para cada canal de fluorescencia

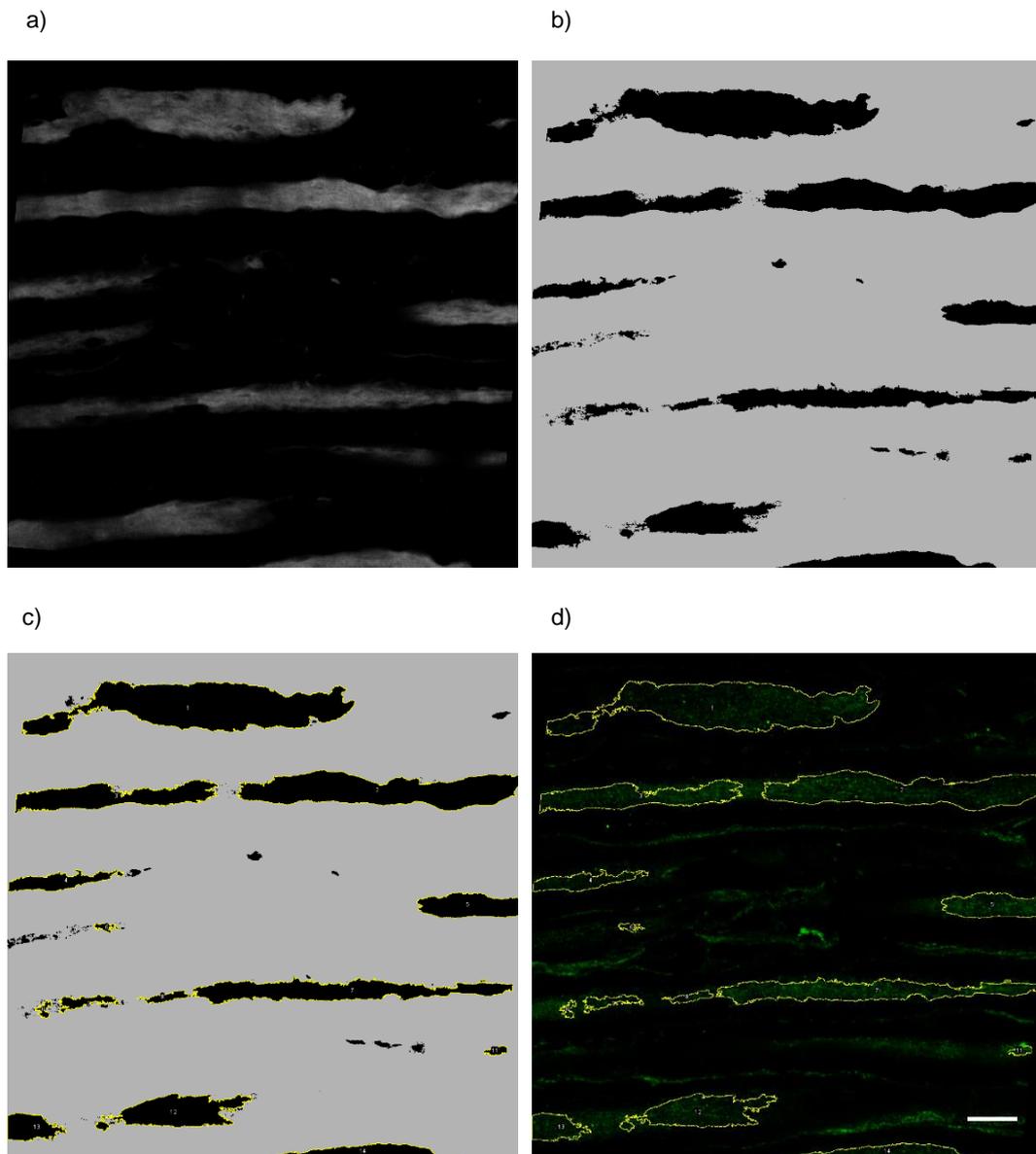


Figura 2. Método utilizado para cuantificación de señal en axones en imágenes de inmunofluorescencia. a) Canal correspondiente a neurofilamento. b) Imagen binaria representando en negro la señal proveniente de neurofilamento. c) Selección de máscara utilizando la imagen binaria mencionada anteriormente. d) Superposición de máscara con canal de fluorescencia que se desea cuantificar. La barra de escala corresponde a 10 μm .

un valor de $\text{IntDen}/\text{Area}$ (siendo IntDen densidad integrada de fluorescencia) de las imágenes obtenidas. Para evaluar si la intensidad de fluorescencia es significativamente diferente entre las raíces se utilizó el test estadístico t-student de dos colas asumiendo varianzas iguales.

3.3.7 – Colocalización

Las imágenes de Colocalización fueron realizadas utilizando el plugin Colocalization Finder del programa de análisis de imágenes ImageJ. Se analizó la Colocalización de las proteínas ribosomales P con Rps3a o con Rpl5. De esta manera, se generaron imágenes en las que se observa los pixeles de la imagen original dónde hay intensidad de fluorescencia mayor al umbral fijado en los dos canales analizados. Así, permite confirmar que dos moléculas se encuentran cercanas espacialmente en la célula.

4. Resultados

El principal material de partida para abordar los objetivos planteados son los datos de secuenciación obtenidos a partir de extracciones de ARN de muestras de RD, RV, ARV y ARD. Estos datos fueron procesados y analizados utilizando principalmente la herramienta bioinformática CLC Genomics Workbench v.11.

4.1 - Análisis y procesamiento preliminar de las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva

En primer lugar se resolvió realizar un recorte de las secuencias con el fin de mejorar la calidad de las mismas. En la Tabla 3 se presentan la longitud y número de lecturas iniciales y posteriores al recorte. Se observa que el largo final difiere levemente del inicial y que muy pocas fueron descartadas con los parámetros escogidos para el recorte. Posteriormente se analizó la calidad de las secuencias, observando que la misma era adecuada para seguir adelante con el análisis.

Tabla 3. Cantidad y largo de lecturas obtenidas por secuenciación de ARN previas y posteriores al recorte de las mismas según su calidad. Se presentan datos correspondientes a axoplasmas de raíz dorsal (ARD), axoplasmas de raíz ventral (ARV), raíces dorsales (RD) y raíces ventrales (RV).

Muestra	Promedio largo lecturas inicial (pb)	Nº Lecturas iniciales	Promedio largo lecturas finales (pb)	Nº lecturas finales
ARD	100	46.481.126	99,8	46.480.929
ARV	100	45.444.018	99,8	45.444.018
RD	100	41.414.414	99,8	41.414.387
RV	100	40.768.410	99,8	40.768.288

4.2 - Alineamientos

Las lecturas recortadas de acuerdo a los parámetros de calidad escogidos fueron alineadas frente al genoma de referencia actualizado de *Rattus Norvegicus* (GCA_000001895.4). El CLC otorga las estadísticas generales del alineamiento, las cuales se presentan en la Tabla 4 y permiten confirmar que se obtuvo un buen porcentaje de lecturas alineadas (porcentaje de lecturas no alineadas menor al 15% en todos los casos). La secuenciación fue realizada a partir de extracciones de ARN, por lo que *a priori* se esperaba que las secuencias alineen frente a regiones definidas como

Tabla 4. Estadísticas generales del alineamiento. Se indican los porcentajes de lecturas alineadas en pares o sin par, y también el porcentaje de lecturas no alineadas frente al genoma de referencia para los 4 transcriptomas en estudio.

	Porcentaje de lecturas alineadas			
	ARD	ARV	RD	RV
En pares	74,44	77,16	83,25	84,54
Sin par	11,82	12,44	11,26	11,07
No Alineadas	13,74	10,40	5,49	4,39

Tabla 5. Estadísticas de las lecturas alineadas frente al genoma. Se presentan los porcentajes de las lecturas alineadas frente a regiones anotadas como genes, diferenciando intrones y exones, o frente a regiones intergénicas.

	Porcentaje de lecturas alineadas			
	ARD	ARV	RD	RV
Gen (total)	91,76	97,14	89,19	88,61
-Intrón	12,42	5,34	17,72	19,47
-Exón	79,35	91,80	71,47	69,14
Intergénico	8,24	2,86	10,81	11,39

genes. De modo de verificar lo anteriormente mencionado, se presentan las estadísticas otorgadas por el CLC indicando el porcentaje de lecturas que se alinean a las distintas regiones del genoma en la Tabla 5. Se observa que la mayoría de las lecturas alinean contra genes y particularmente contra exones. Además, hay lecturas que alinean frente a regiones intergénicas, pero aun así estas resultan ser la minoría (no superan en ningún caso el 15% de las lecturas alineadas).

4.3 - Distribución de biotipos de moléculas de ARN secuenciadas

Esta tesina se centra en el análisis de ARNs codificantes para proteínas, pero estos no son los únicos tipos de ARNs presentes en un tejido. Por lo tanto, además de verificar que la mayoría de las lecturas alinea frente a genes, es importante analizar la distribución de biotipos (Figura 3).

Analizando esta distribución, es posible observar que la amplia mayoría de las lecturas alinean frente a genes codificantes para ARNr mitocondriales en todas las muestras que se estudian. En segundo lugar se encuentran los genes que codifican para proteínas y muy por debajo genes que codifican para ARNs largos no codificantes (lincRNA), ARNs no

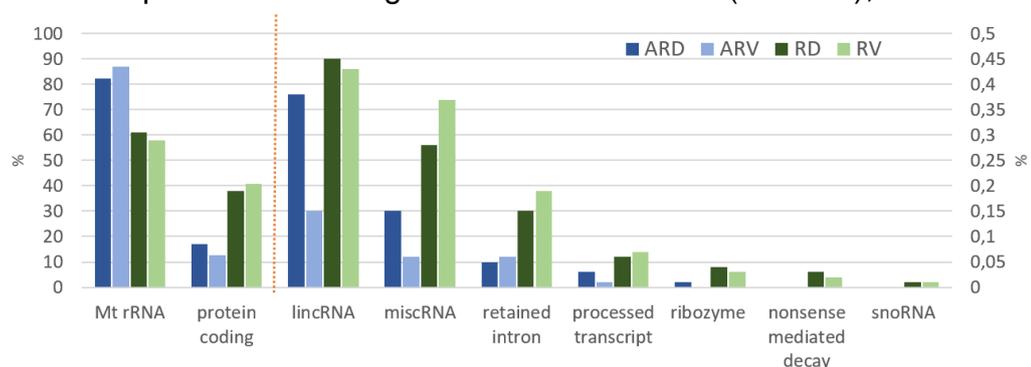


Figura 3. Distribución de biotipos. Porcentaje de lecturas alineadas en función de las distintas categorías de ARN. Las categorías a la izquierda de la línea punteada roja se corresponden con los valores del eje Y primario (a la izquierda), mientras que las categorías a la derecha de la misma se corresponden con los valores del eje Y secundario (a la derecha).

codificantes sin clasificar (miscRNA), intrones retenidos (retained intron), transcritos procesados (processed transcripts), ribozimas (rybozime), ARNs degradados por mutaciones terminadoras (nonsense mediated decay) y ARNs nucleolares pequeños (snoRNA). También se observa que la distribución se asemeja en mayor medida cuando se comparan las dos muestras de axoplasma o las dos muestras de raíz completa entre ellas que al comparar axoplasmas con raíces.

4.4 - Comparación de ARNs detectados en las diferentes listas

Luego del alineamiento, se filtró la lista de genes de modo de evitar incluir genes con pocas lecturas que podrían ser falsos positivos. El filtrado se realizó tomando 1 como límite inferior de TPM. Se detectaron transcritos codificados por 1240 genes en ARD y por 882 genes en ARV. Las listas de genes con expresión detectada se compararon mediante diagramas de Venn (Figura 4), los cuales permiten obtener un listado de genes únicos y compartidos entre las muestras.

En la Figura 4a, se observa que varios de los genes con expresión detectada en ambos axoplasmas son compartidos, pero hay una gran proporción que se detectan únicamente en axones de neuronas motoras o

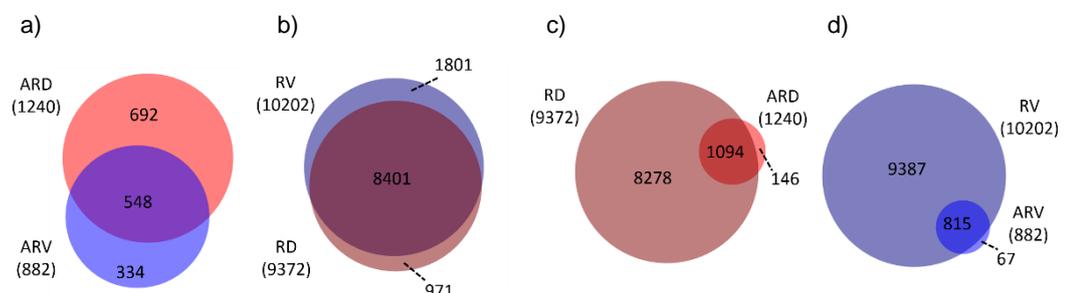


Figura 4. Diagramas de Venn comparando los genes cuya expresión fue detectada en las muestras de axoplasma de raíz ventral (ARV), axoplasma de raíz dorsal (ARD), raíz ventral (RV) y raíz dorsal (RD).

en axones de neuronas sensoriales. Más de la mitad de los genes con expresión detectada (55%) en axoplasmas de raíces dorsales no se detectan en axoplasmas de raíces ventrales, y el 38% de los genes con expresión detectada en axoplasmas de raíces ventrales no se detectan en axoplasmas de raíces dorsales. El diagrama también permite observar que se detectaron transcritos provenientes de una mayor variedad de genes en axones de raíz dorsal (1240) que en axones de raíz ventral (882).

A nivel de las raíces completas, en la Figura 4b se observa que la mayor parte de los genes con expresión detectada en ambas raíces son compartidos, pero aun así existe cierta proporción de los mismos que se detectan en una raíz y no en la otra. Alrededor del 18% de los genes detectados en raíces dorsales no se detectan en raíces ventrales, mientras que aproximadamente el 10% de los que son detectados en raíces ventrales no se detectan en raíces dorsales. Al analizar las Figuras 4a y 4b en conjunto se observa que la variedad de ARNs es mucho mayor en el tejido completo de raíces que en axoplasmas.

Por otro lado, las Figuras 4c y 4d comparan genes con expresión detectada en los axones frente a los detectados en la raíz completa de la cual forman parte. *A priori*, se esperaría que todos los que se detectan en axones se detecten en la raíz correspondiente, dado que los axones son componentes del tejido analizado. Sin embargo, a pesar de que se observa que la mayor parte de ellos son detectados en ambas muestras, existe un pequeño subgrupo que se detecta en los axones y no en la raíz completa. En el caso de axoplasmas de raíces dorsales este subgrupo corresponde a aproximadamente el 12% de los genes con expresión detectada, mientras que en axoplasmas de raíces ventrales corresponde a aproximadamente el 8%. Intrigantemente, dentro del subgrupo de ARNs que se detectaron en ARV y no en RV, se encuentra el codificante para ADN Polimerasa Nu (Poln), proteína que participa en la reparación del ADN. A partir de este resultado se decidió investigar si se detectaba la presencia de mensajeros

codificantes para otras ADN polimerasas, encontrando que el codificante para Poln era el único presente en la muestra.

Para analizar el conjunto de genes con expresión detectada en el axoplasma y no en la raíz que componen se realizaron análisis de ontología. En ellos, se observó un enriquecimiento de categorías ontológicas relacionadas a la función axonal como “sinapsis” y “proyecciones neuronales” entre otras.

4.5 - Análisis de ontología

Sobre todos los genes cuya expresión fue detectada en las muestras axonales se realizaron análisis de ontología utilizando la herramienta informática DAVID 6.7. De esta forma se analizó si las muestras presentan enriquecimiento de algunas de las categorías de los diferentes dominios ontológicos estudiados (proceso biológico, componente celular, función molecular).

En las Figuras 5 y 6 se observan las categorías ontológicas enriquecidas significativamente en cada dominio ontológico para ARD y ARV respectivamente, ordenadas según el porcentaje de genes de dicha categoría detectados. Únicamente se muestran aquellas categorías cuyo *p-valor* corregido (Benjamini) es menor a 0,05. A pesar de que en los diagramas de Venn se habían observado grandes diferencias en los genes detectados entre ARV y ARD, se observó que las categorías enriquecidas en ambas muestras para los tres dominios ontológicos son similares entre sí. Categorías relacionadas a la traducción y al ribosoma se encuentran enriquecidas en ambas muestras, demostrando así la importancia de analizar específicamente los ARNs codificantes para proteínas ribosomales en el axón.

Categorías enriquecidas ARD

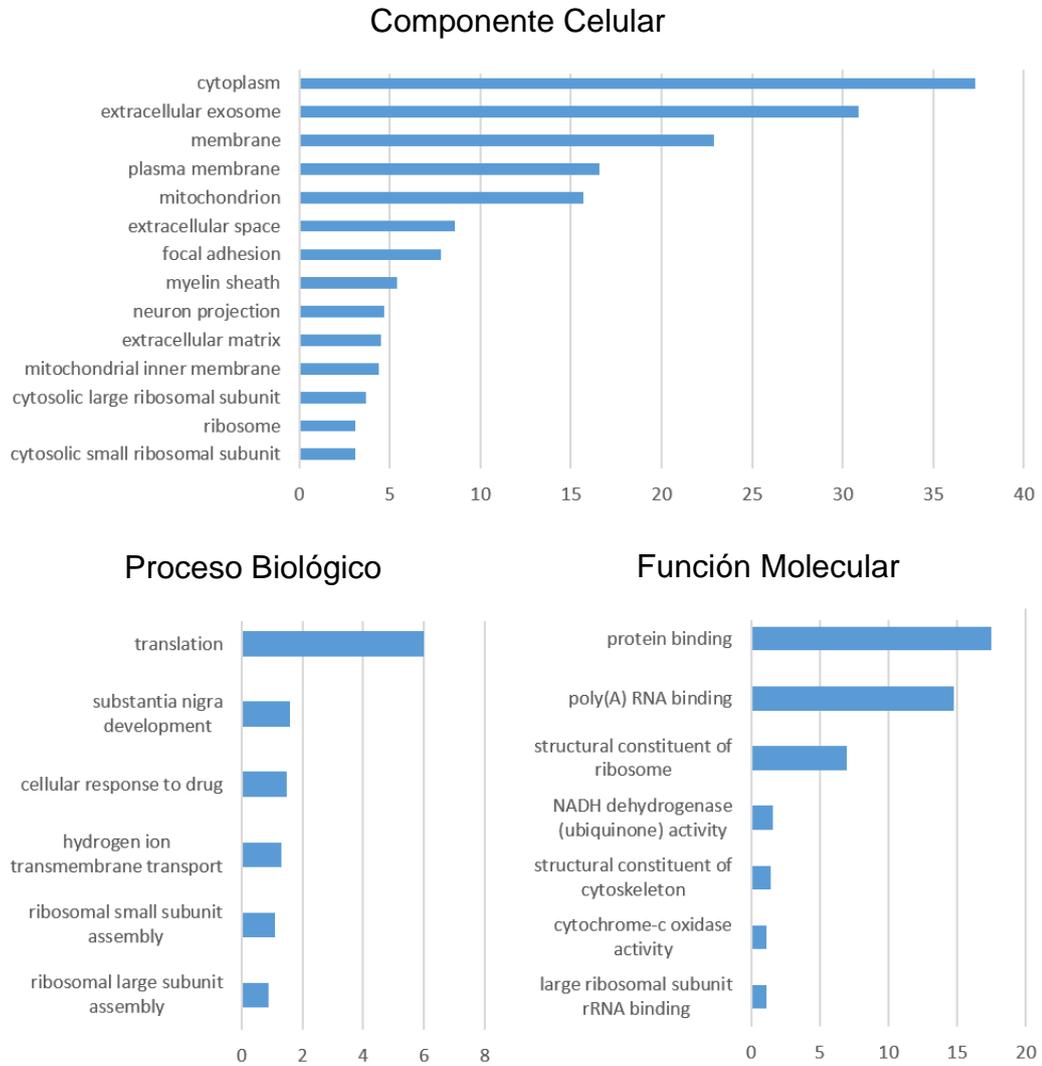


Figura 5. Categorías ontológicas enriquecidas en el transcriptoma de axoplasma de raíz dorsal comparándolo frente al transcriptoma de raíz dorsal.

Categorías enriquecidas ARV

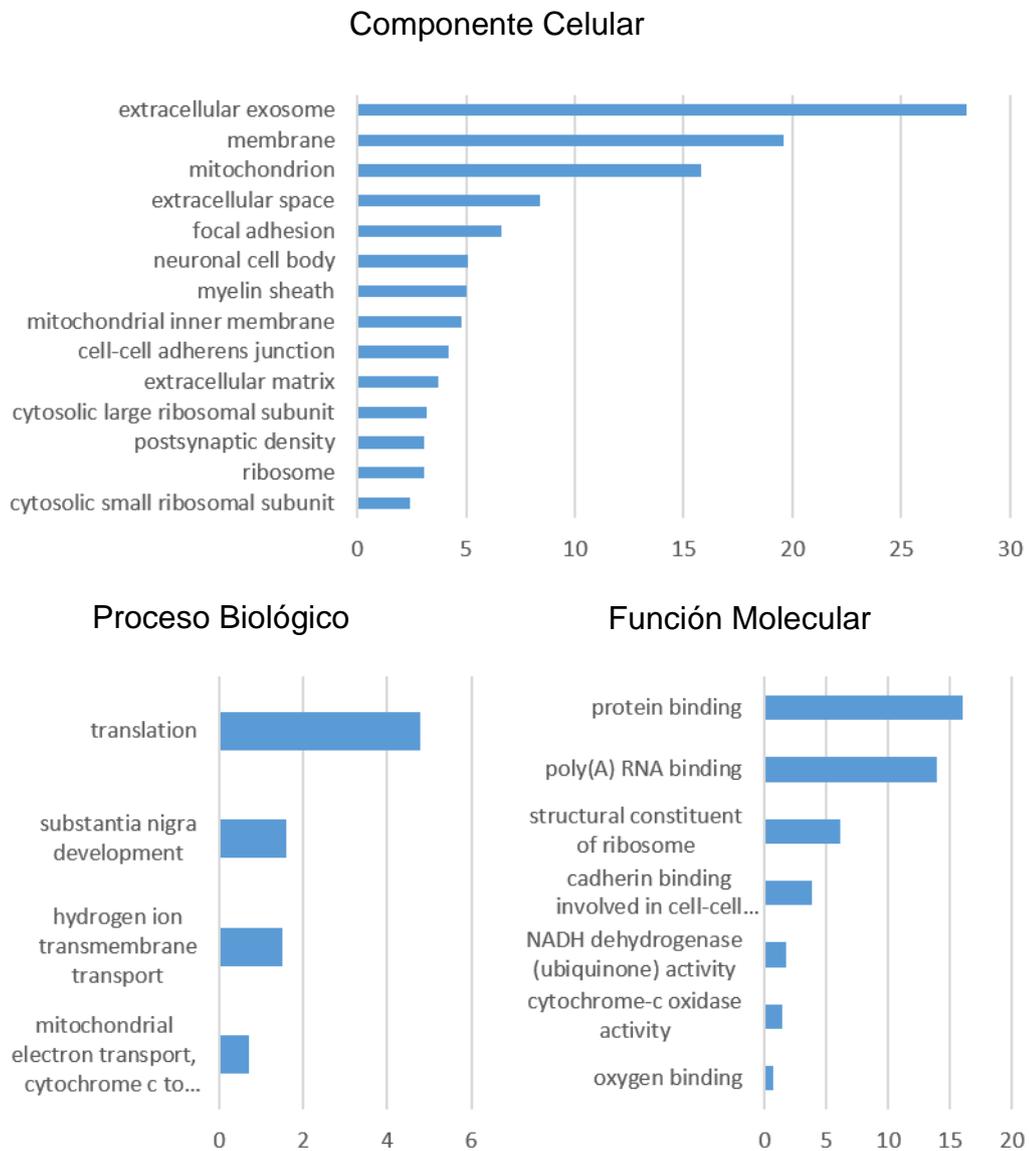


Figura 6. Categorías ontológicas enriquecidas en el transcriptoma de axoplasma de raíz ventral comparándolo frente al transcriptoma de raíz ventral.

4.6 - Detección de ARNs codificantes para proteínas ribosomales en muestras de raíz ventral, dorsal y axoplasma

Con el fin de analizar la expresión de genes codificantes para distintas proteínas ribosomales, en primer lugar se debió generar un listado de los mismos, ya que el mismo no se encuentra publicado en la bibliografía revisada. Dicho listado fue generado mediante la búsqueda de genes codificantes para proteínas ribosomales en la base de datos ENSEMBL. A partir de dicha búsqueda se obtuvo un listado de 163 genes, los cuales codifican para las 80 proteínas ribosomales y para parálogos de las mismas.

Luego, se analizó la presencia de mensajeros codificados por dichos genes en los transcriptomas en estudio. En las raíces completas se detectó una mayor variedad de mensajeros codificantes para proteínas ribosomales que en axoplasma, habiéndose detectado mensajeros para 107 de los 163 genes con un TPM mayor a 1 tanto en RV como en RD. En cambio, al analizar la expresión de estos genes en las muestras de axoplasma se observa que del total de 163 genes, se detectan 47 genes en ARV y 75 genes en ARD.

Se realizaron gráficos de distribución de TPM con el fin de comparar los perfiles de abundancia de transcritos codificantes para proteínas ribosomales entre axoplasmas y entre raíces. El gráfico presentado en la Figura 7a permite observar los perfiles de abundancia de ambas raíces nerviosas. Para su realización se tomaron en cuenta los 110 genes que presentan TPM mayor a uno en al menos una de las dos muestras. El gráfico presentado en la Figura 7b permite analizar las diferencias en la abundancia de cada mensajero. Por otro lado, el gráfico presentado en la Figura 8a presenta los perfiles de abundancia de las muestras de axoplasma, y para su realización se tomaron en cuenta los 80 genes que

presentan TPM mayor a 1 en al menos una de las dos muestras. El gráfico presentado en la Figura 8b permite analizar las diferencias en la



Figura 7. a) Perfil de abundancia de TPM de ARNm codificantes para proteínas ribosomales en raíces ventrales (RV) y dorsales (RD). El eje de las ordenadas posee dos escalas diferentes, cambiando la misma a partir del valor correspondiente a 800 TPM. b) Diferencias en los niveles de abundancia de cada mensajero entre ambas muestras.

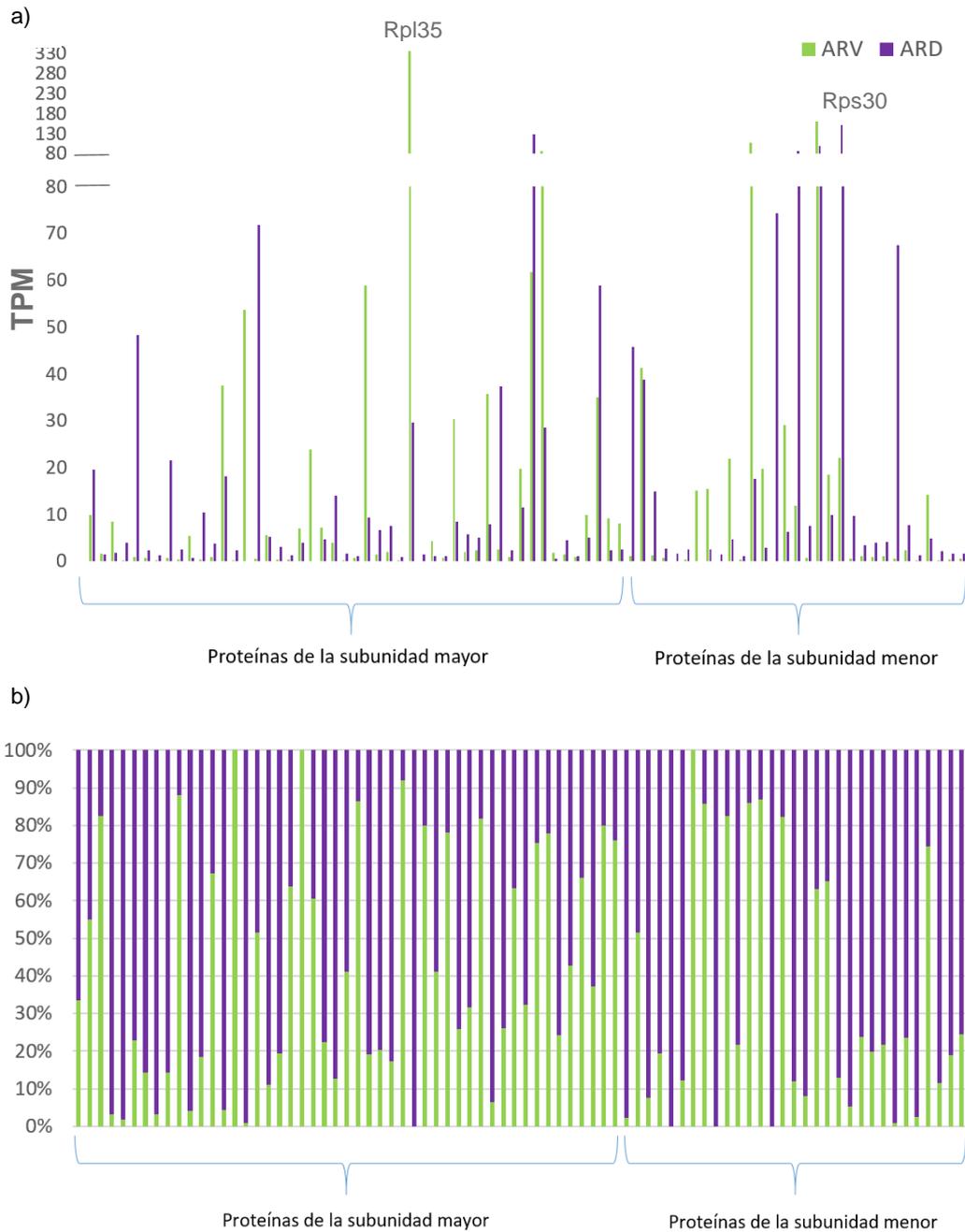


Figura 8. a) Perfil de abundancia de TPM de ARNm codificantes para proteínas ribosomales en axoplasmas de raíces ventrales (ARV) y dorsales (ARD). El eje de las ordenadas posee dos escalas diferentes, cambiando la misma a partir del valor correspondiente a 80 TPM. b) Diferencias en los niveles de abundancia de cada mensajero entre ambas muestras.

abundancia de cada mensajero. En la Figura 7b, se observa que el patrón de abundancia de mensajeros para los tejidos RV y RD refleja perfiles muy

similares indicando que no presentan grandes diferencias. A diferencia de ello, al analizar el perfil obtenido para las muestras de axoplasma en la Figura 8b, se puede observar que, si bien el perfil no es completamente diferente, hay notorias diferencias en los valores de expresión obtenidos para ciertos genes. Al observar las Figuras 7a y 8a se observa que la abundancia difiere entre cada mensajero, siendo para algunos casos llamativamente mayor al resto. Por ejemplo, en raíces ventrales y dorsales se observa que el ARNm codificante para Rpl21 es el que posee mayor abundancia, siendo ésta mayor al doble de la abundancia media de ARNm codificantes para proteínas ribosomales detectados. En axoplasmas, se observa que para ARV el ARNm que se encuentra en mayor abundancia es el codificante para Rpl35, mientras que en ARD es el codificante para Rps30.

4.7 - Detección de ARNs codificantes para proteínas ribosomales en transcriptomas obtenidos de bases de datos

Posteriormente, se decidió re-analizar un transcriptoma de hígado de rata con el fin de analizar el perfil de expresión de proteínas ribosomales en otros tejidos. También se re-analizó un transcriptoma de ciático de modo de analizar el perfil de expresión en un tejido similar a los analizados previamente. Por último, se re-analizó un transcriptoma de cultivo celular de fibroblastos de modo de analizar el perfil de expresión en líneas celulares.

Al igual que para los datos de secuenciación obtenidos previamente, se realizó un recorte con las mismas exigencias de calidad de modo de que la calidad de las secuencias fuera óptima. Luego, se analizó la calidad de las mismas verificando que fuera adecuada y se prosiguió con los análisis de alineamiento. Con el fin de observar la distribución general de expresión de

mensajeros en todas las muestras (incluyendo las obtenidas mediante secuenciación y las descargadas de bases de datos), y para confirmar que las réplicas sean efectivamente comparables entre sí, se realizó un boxplot donde se representa el TPM de los genes detectados en cada muestra (Figura 9). Analizando el box plot se confirma que las réplicas tienen una distribución similar, lo cual sumado a que son datos provenientes de publicaciones científicas permite asumir que las mismas son réplicas confiables. Por lo tanto, para los análisis posteriores se trabajó con el promedio de TPM de cada gen para los datos con réplicas. A su vez, también se observa que las distribuciones obtenidas para los axoplasmas son similares entre sí, y que las mismas difieren de las distribuciones obtenidas para raíces completas.

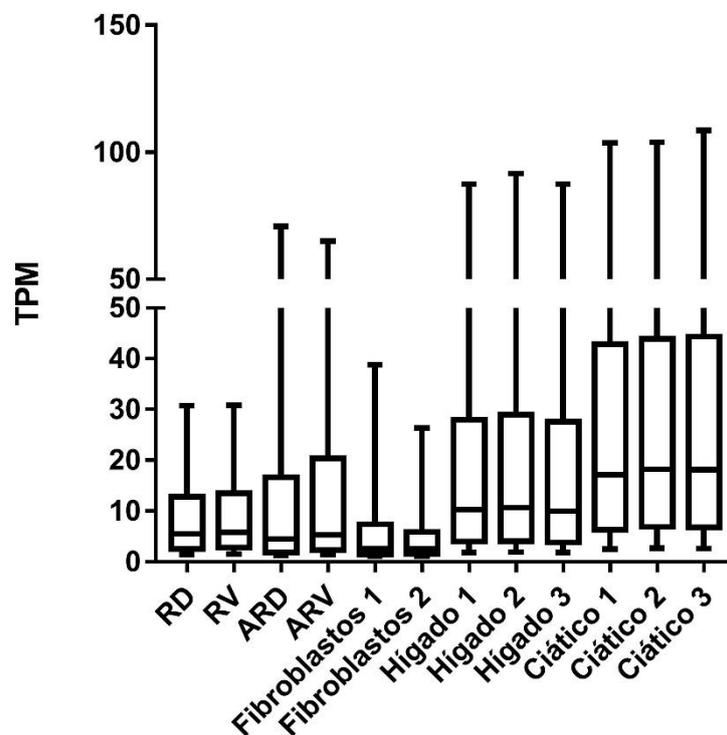


Figura 9. Comparación entre la distribución de TPM de transcriptomas de diferentes muestras. Las muestras analizadas fueron raíces ventrales y dorsales, axoplasmas provenientes de las mismas, fibroblastos (duplicado), hígado (triplicado) y ciático (triplicado). Las cajas junto a las barras de variación representan a los percentiles 10-90. Se presenta la mediana de expresión para cada muestra

Con el fin de analizar y comparar la distribución de TPMs de los genes codificantes para proteínas ribosomales en todas las muestras con las que se trabajó se realizó otro boxplot (Figura 10). En este gráfico, además de la distribución de TPMs de todos los genes detectados en cada muestra, se representa la distribución de TPMs de los genes codificantes para proteínas ribosomales. Se observa que, exceptuando a las muestras de axoplasma, la mediana de TPM para proteínas ribosomales es mayor a la mediana de TPM de los genes totales detectados, indicando que son genes de alta expresión. Para el caso de las muestras de axoplasmas se observa que la distribución de TPMs de genes codificantes para proteínas ribosomales es muy similar a la de TPMs de todos los genes. A pesar de ello, se observa

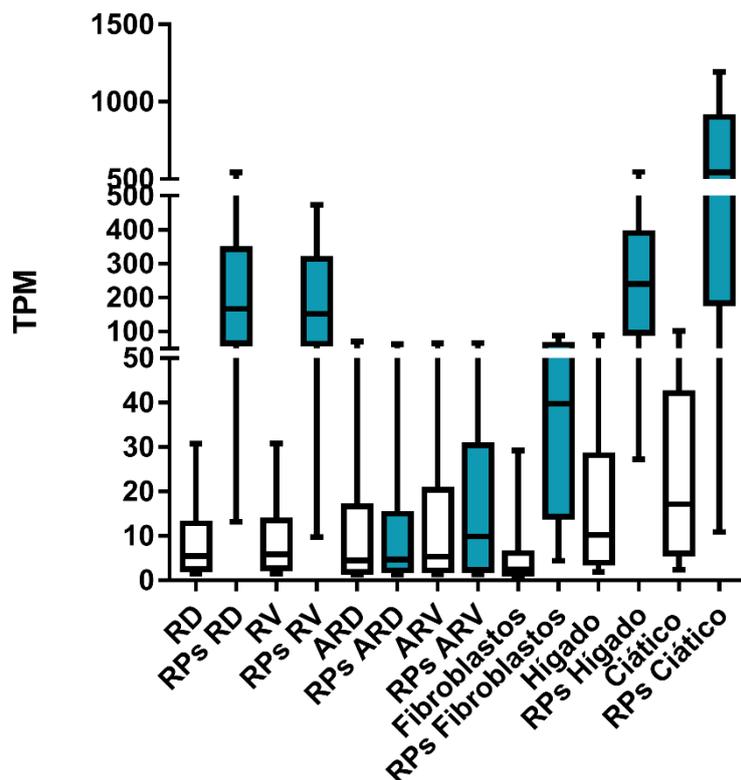


Figura 10. Comparación entre la distribución de TPM de transcriptomas (blanco) y de mensajeros codificantes para proteínas ribosomales (azul). Las muestras analizadas fueron raíces ventrales y dorsales, axoplasmas provenientes de las mismas, fibroblastos, hígado y ciático. Las cajas junto a las barras de variación representan a los percentiles 10-90. Se presenta la mediana de expresión para cada muestra.

que la mediana de TPMs de genes codificantes para proteínas ribosomales aumentaría levemente frente a la mediana de TPMs de todos los genes tanto para ARV como para ARD.

4.8 – Análisis comparativo de la expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales en diferentes tejidos, células y estructuras sub-celulares mediante Heat Map

Analizando los perfiles de TPMs de genes codificantes para proteínas ribosomales en raíces y en axoplasmas, se observó que ciertos mensajeros se encuentran en mayor abundancia que otros. Para evaluar esta situación se realizó un Heat Map (Figura 11), el cual permite, mediante una representación coloreada identificar aquellos mensajeros con una abundancia mayor o menor a la media, así como también agrupar a las muestras según su similitud. Las columnas del Heat Map representan a las muestras y las filas a cada gen. Se realizó un escalado por columnas, por lo que los colores indican expresión del gen respecto a la media de expresiones en la muestra. Para el agrupamiento entre muestras se utilizó el método de promedios para el clustering y el método de Kendall's Tau para medidas de distancia. Las muestras ARV y ARD se agrupan entre sí, y lo mismo ocurre con las muestras de raíces completas RV y RD. Se observa que varios genes se mantienen como los más expresados en todas las muestras, como es el caso de Rplp1, Rpl41 y Rps29. Sin embargo, se observa que hay otros que presentan una mayor expresión que la media en cierta muestra y no en otras, indicando una posible sobreexpresión específica de tipo o estructura celular. Tal es el caso de Rps7 y Rps10I1, cuyos mensajeros se encuentran en alta abundancia relativa en ARD y no en el resto de las muestras.

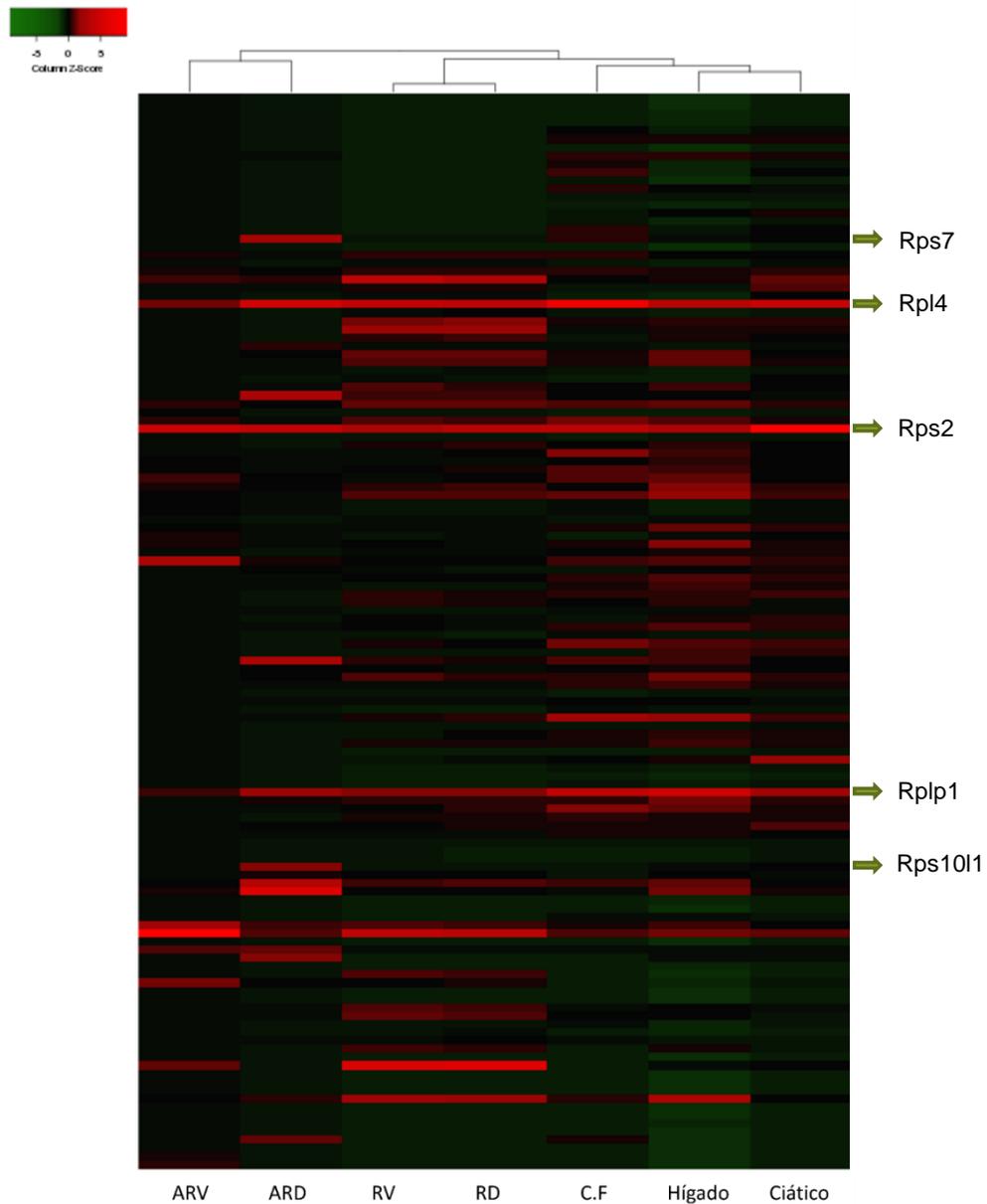


Figura 11. Distribución de abundancia de mensajeros codificantes para proteínas ribosomales relativa a cada muestra. Heat Map escalado por columna, siendo las columnas las muestras y las filas los genes codificantes para proteínas ribosomales. Las muestras analizadas corresponden a ARV, ARD, RV, RD, cultivo de fibroblastos (C.F), hígado y ciático.

4.9 - Detección de proteínas ribosomales mediante inmunofluorescencia

Utilizando las herramientas bioinformáticas mencionadas anteriormente, se observaron diferencias en la abundancia de mensajeros codificantes para Rps3a y Rpl5 entre las diferentes muestras ventrales o dorsales tal como se observa en las Tablas 6 y 7. Con el fin de evaluar si las diferencias en abundancia de mensajeros se ven reflejadas en una diferente abundancia de proteínas, usualmente se suelen realizar experimentos de Western Blot. Sin embargo, este abordaje no resulta útil para realizar cuantificaciones a nivel axonal, dado que con el instrumental disponible no es posible detectar los bajos niveles de proteína allí presentes. Una estrategia que *a priori* resultaba factible para abordar este problema es la realización de experimentos de inmunofluorescencia semi-cuantitativos.

De modo de identificar correctamente las estructuras y tipos celulares presentes en las raíces nerviosas, se realizaron experimentos de marcaje

Tabla 6. Abundancia de mensajeros codificantes para Rps3a en las muestras de axoplasma y raíces.

Muestra	TPM	RPKM	Lecturas únicas	Lecturas totales
ARV	0,54	0,41	2	8
ARD	9,65	6,25	36	119
RV	205,99	104,51	1070	1985
RD	173,22	94,39	869	1840

Tabla 7. Abundancia de mensajeros codificantes para Rpl5 en las muestras de axoplasma y raíces.

Muestra	TPM	RPKM	Lecturas únicas	Lecturas totales
ARV	87,27	66,69	1329	1335
ARD	28,53	18,49	337	342
RV	385,08	195,37	3148	3658
RD	427,67	233,06	3788	4347

de los tejidos con DAPI y con Faloidina conjugada a un fluoróforo. De esta manera se pueden detectar los filamentos de actina y los núcleos en el tejido, facilitando el análisis de las diferentes estructuras y tipos celulares presentes. En las Figuras 12 y 13 se señalan las principales estructuras celulares presentes en el tejido de estudio, lo cual sirve de base para tener conocimientos generales del tejido.

Luego, se diseñaron experimentos de inmunofluorescencia donde se marcaron proteínas ribosomales en las que se observa diferente abundancia de transcritos entre ARV y ARD (Rpl5 o Rps3a) y otras en las que no se observan dichas diferencias (Proteínas ribosomales P (Rplp0, Rplp1 y Rplp2)). Estos experimentos fueron realizados sobre cortes de raíz dorsal y ventral con el fin de realizar las cuantificaciones de proteína tanto

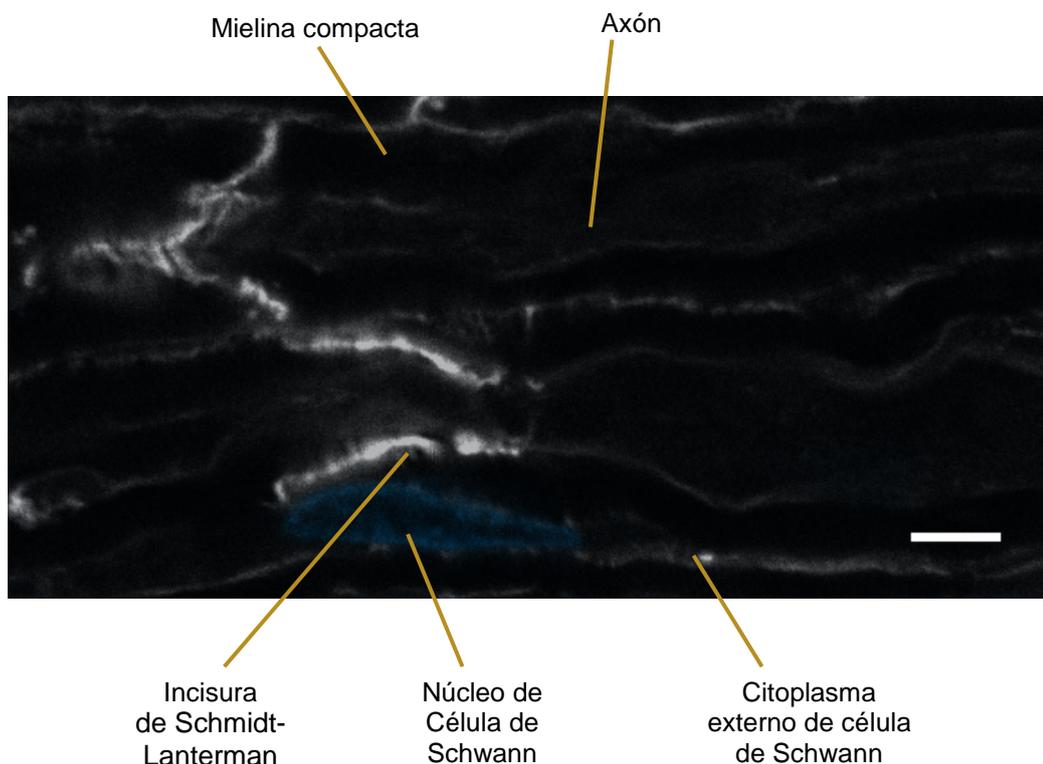


Figura 12. Estructuras de raíz ventral de rata obtenidas utilizando métodos de tinción con DAPI y Faloidina conjugada a fluoróforo. Se observan filamentos de actina (gris) y núcleos (azul). La barra de escala (blanco) corresponde a 5 µm

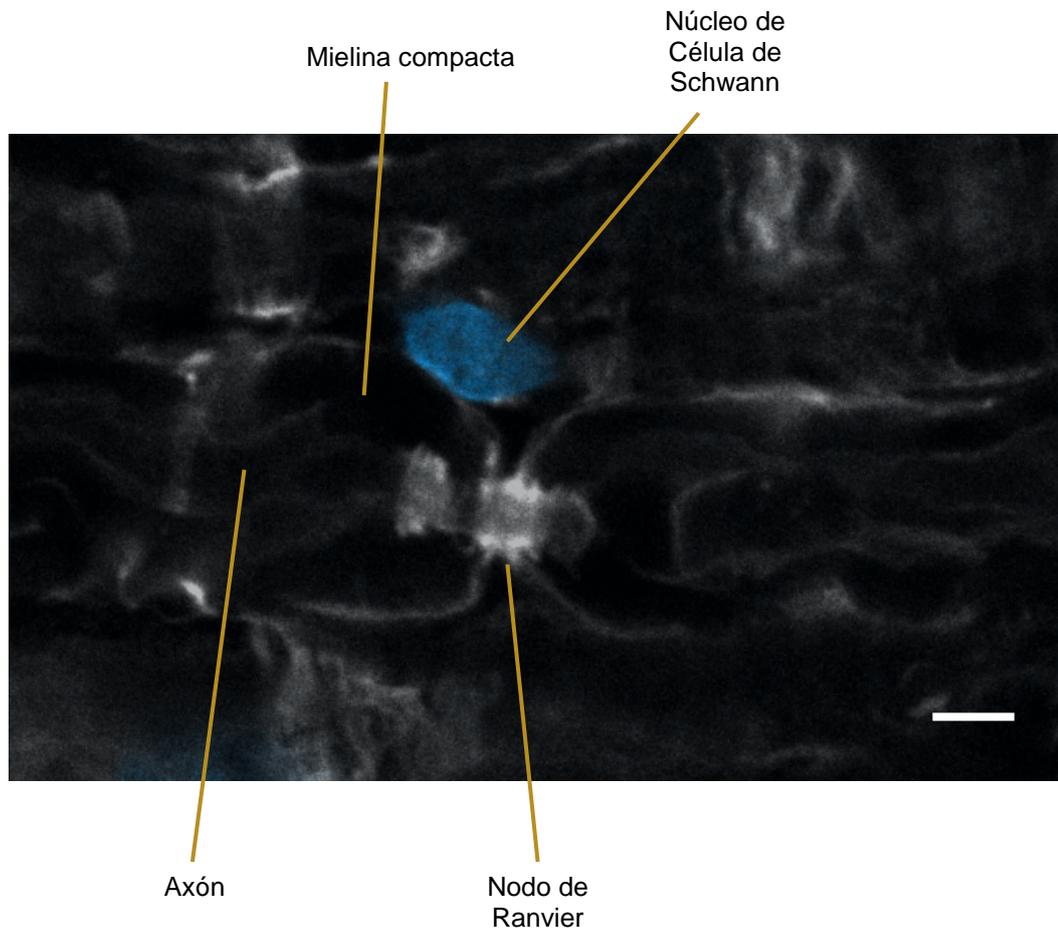


Figura 13. Estructuras de raíz ventral de rata obtenidas utilizando métodos de tinción con DAPI y Faloidina conjugada a fluoróforo. Se observan filamentos de actina (gris) y núcleos (azul). La barra de escala (blanco) corresponde a 5 μm

a nivel de tejido entero como a nivel axonal. Además, permiten analizar la distribución de las proteínas previamente mencionadas en las raíces.

Se obtuvieron 15 imágenes de cada experimento con el fin de realizar cuantificaciones de intensidad de fluorescencia para cada proteína ribosomal en la raíz completa, así como también en el axón. Para obtener las imágenes de microscopía, se configuraron los parámetros del microscopio de modo de que no se observe señal de fluorescencia en el control negativo. De esta manera, se evita en gran medida la detección de fluorescencia debido a reconocimientos inespecíficos del anticuerpo secundario y a autofluorescencia. Los experimentos de

inmunofluorescencia realizados no permitieron la correcta cuantificación de señal de modo de poder correlacionarlo con la abundancia de las proteínas en el axón. Los resultados obtenidos no fueron reproducibles, ya que al cuantificar la presencia de proteínas ribosomales P en las réplicas técnicas obtenidas, se obtuvieron resultados discordantes. Las complejidades propias de la técnica provocan errores al utilizarla para cuantificar proteínas en diferentes muestras, ya que hay muchas variables que pueden afectar la cuantificación. Ejemplo de ello son la selección de planos, la diferente penetrabilidad de los anticuerpos en muestras distintas y la calidad de los cortes de modo de que sean comparables.

Las inmunofluorescencias realizadas permitieron analizar la distribución de las proteínas ribosomales Rpl5, Rps3a y las proteínas ribosomales P (Rplp0, Rplp1, Rplp2) en los tejidos en estudio. Los anticuerpos conjugados a fluorescencia que detectan neurofilamentos nos permiten identificar claramente las regiones en las que se encuentran los axones, y el DAPI permite identificar núcleos pertenecientes a células de Schwann.

Se analizó un núcleo de célula de Schwann de raíz dorsal en detalle mediante tinción con DAPI (Figura 14). En la región interna al núcleo se detecta un sitio sin tinción, el cual correspondería al nucléolo (Sirri et al. 2008). En este sitio, se observa una mayor intensidad de fluorescencia correspondiente al marcado de las proteínas ribosomales P, indicando una acumulación de las mismas en el nucléolo. En cambio, la intensidad de fluorescencia correspondiente a la proteína ribosomal Rpl5 no presenta mayores diferencias en las distintas regiones del núcleo.

También se analizó un nodo de Ranvier en detalle (Figura 15). Esta imagen se obtuvo mediante la captura de imágenes en diferentes planos focales, lo cual permite realizar la proyección ortogonal que en dicha Figura se representa. Allí se confirma que hay señal correspondiente a Rpl5 y las proteínas ribosomales P en todas las secciones del axón. Además, se

observa una acumulación de señal para Rpl5 en la zona correspondiente al nodo.

Por otro lado, se analizó globalmente la distribución de las proteínas ribosomales en los tejidos de raíz ventral y dorsal de rata (Figuras 16 y 17). Tal como se esperaba, ninguna de las proteínas ribosomales fue detectada en la región correspondiente a mielina compacta. Se observa alta señal de fluorescencia correspondiente a la marca de las proteínas ribosomales Rpl5 y Rps3a en axones (identificados mediante la utilización de anti-neurofilamento), mientras que la detección de dichas señales es de menor abundancia en las células de Schwann. La distribución de las proteínas ribosomales P es diferente, ya que se detecta una mayor abundancia de señal en las células de Schwann, fundamentalmente en zonas cercanas e internas a núcleos, y una señal menor en axones. Igualmente, se observa que existen sitios de colocalización de las proteínas ribosomales P con Rps3a o con Rpl5. La colocalización entre Rps3a y proteínas ribosomales P indica sitios donde probablemente se encuentren ribosomas ensamblados al haber cercanía entre proteínas de la subunidad mayor y menor del ribosoma. Sin embargo, se observan sitios de colocalización internos al núcleo, localización en la que no se encontrarían ribosomas ensamblados. Por lo tanto, a pesar de que indica cercanía entre las dos subunidades, no es posible afirmar que todos los sitios de colocalización correspondan a ribosomas ensamblados. Los sitios de colocalización se observan con mayor intensidad en regiones cercanas al núcleo, lo cual es esperable dada la presencia de retículo endoplasmático en dichas regiones. Aunque en menor cantidad, también se observan sitios de colocalización en axones.

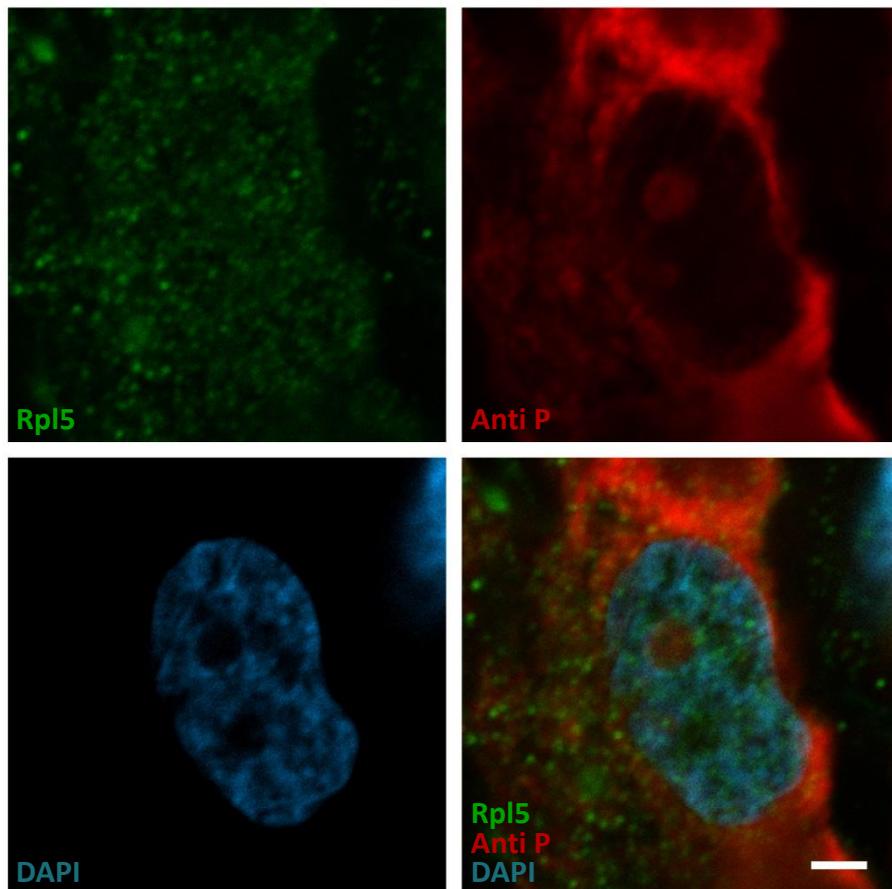


Figura 14. Detalle de núcleo de Célula de Schwann obtenida de raíz dorsal. Se observa Rpl5 (verde), Rplp0, Rplp1 y Rplp2 (rojo), y núcleo (azul). La barra de escala corresponde a 5 μ m.

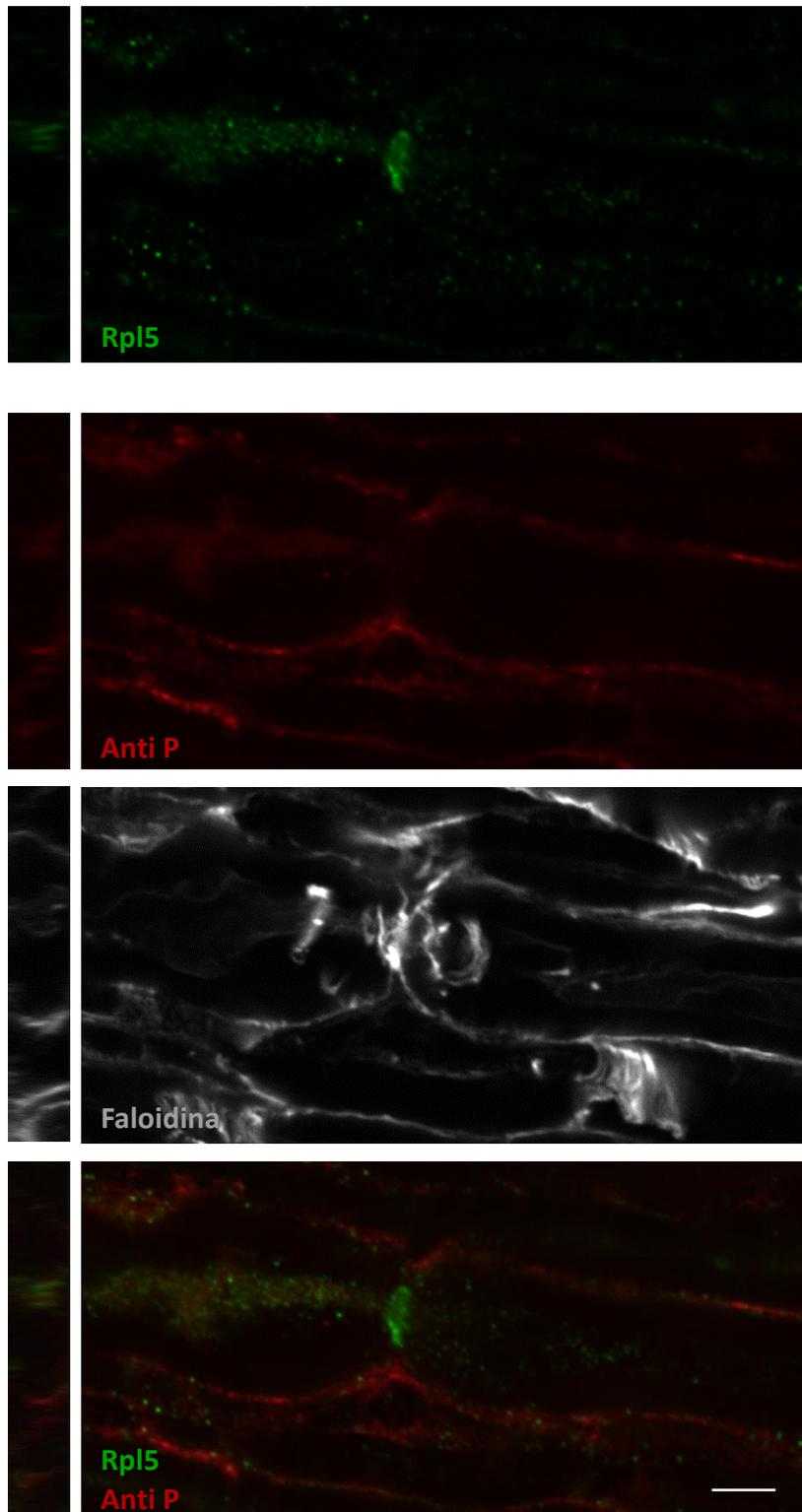


Figura 15. Detalle de nodo de Ranvier en raíz ventral de rata. A la izquierda de cada imagen se observa su proyección ortogonal. Se observa Rpl5 (verde), Rplp0, Rplp1 y Rplp2 (rojo), y filamentos de actina (gris). La barra de escala corresponde a 5 μ m.

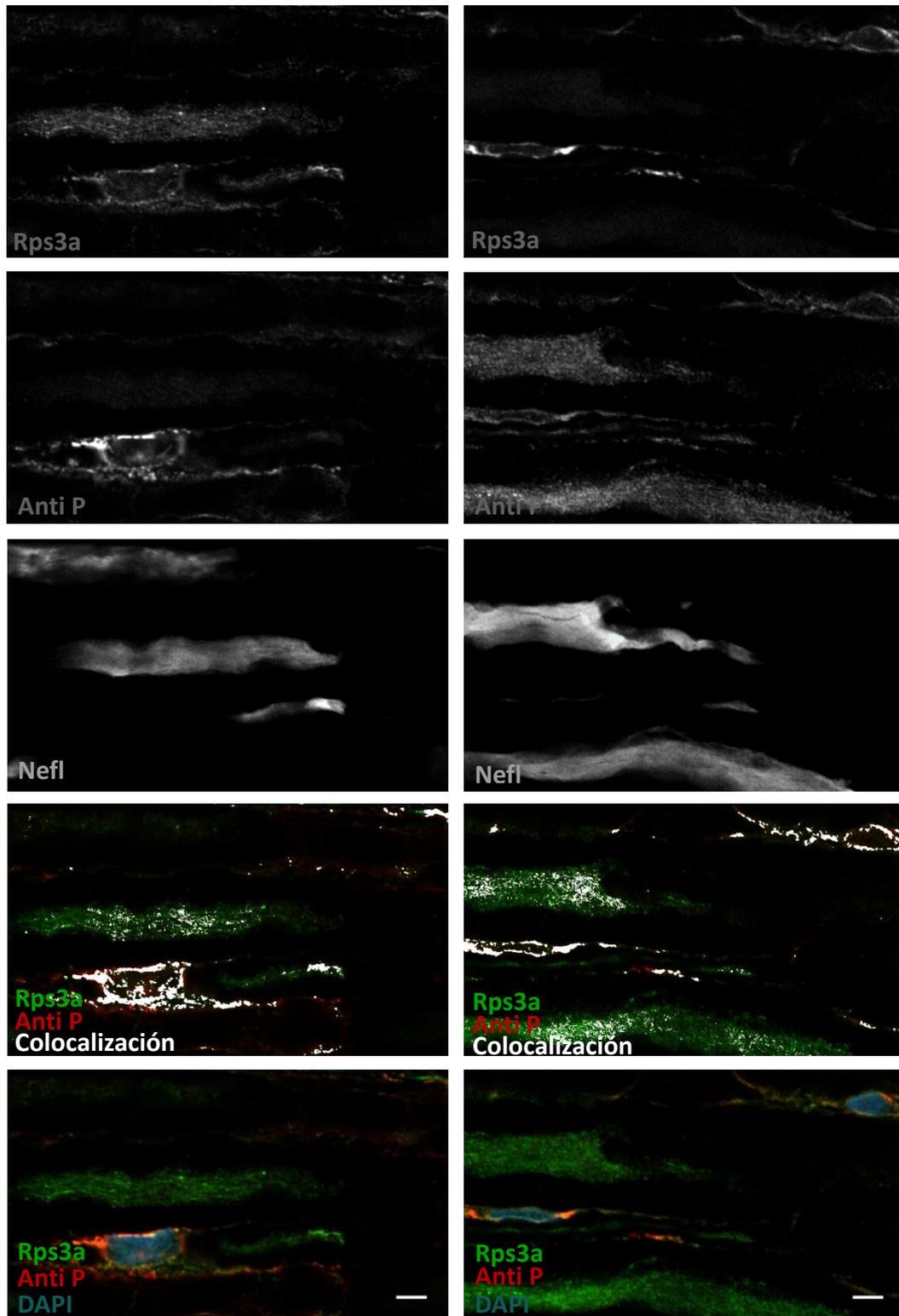


Figura 16. Inmunofluorescencias sobre raíces dorsales (izquierda) y ventrales (derecha) de rata. Se observan las proteínas ribosomales Rplp0, Rplp1 y Rplp2 (rojo), Rps3a (verde), Neurofilamento (gris) y núcleos (azul). En blanco se observa colocalización entre Rps3a y Anti P. Las barras de escala corresponden a 5 μ m.

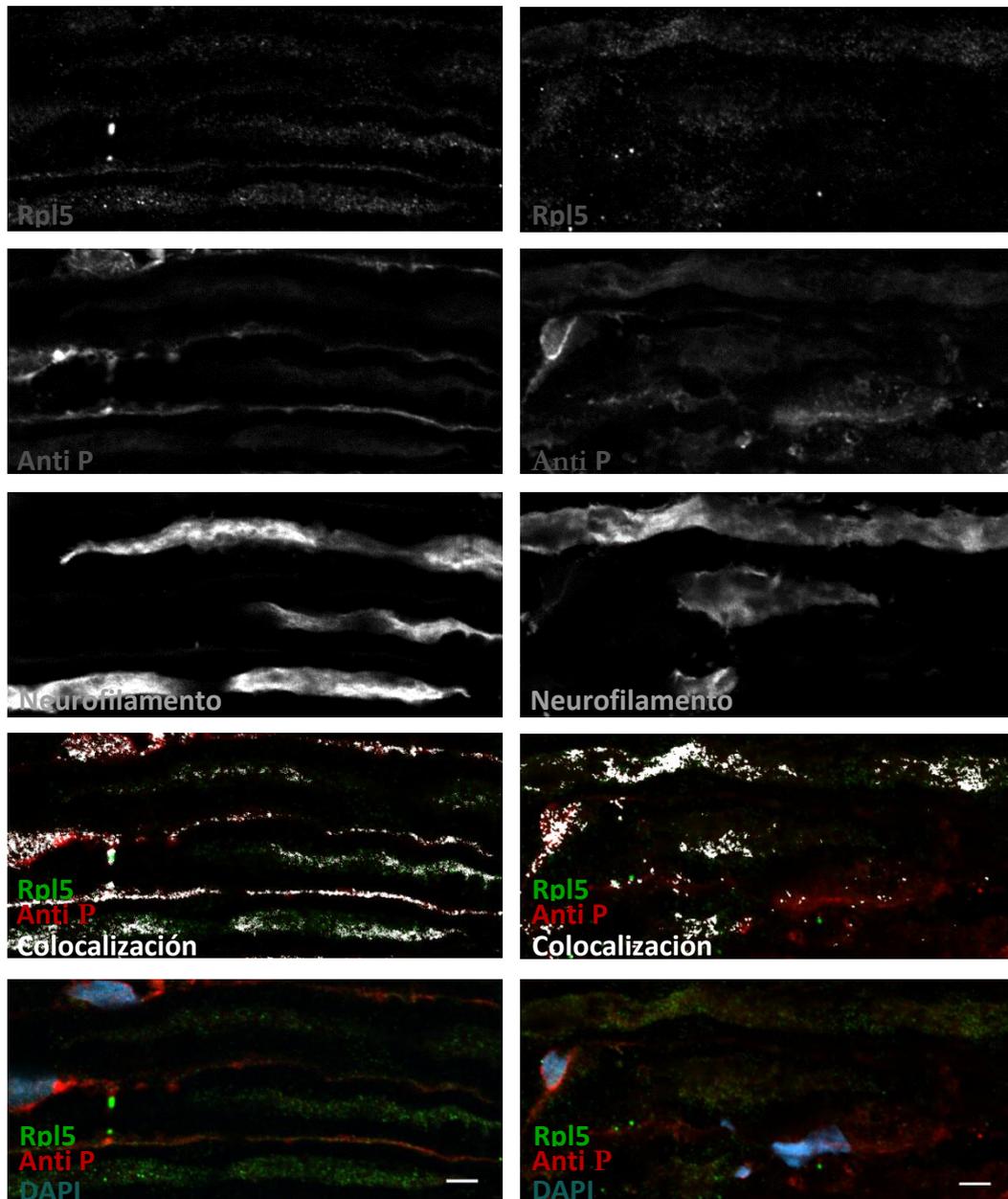


Figura 17. Inmunofluorescencias sobre raíces dorsales (izquierda) y ventrales (derecha) de rata. Se observan las proteínas ribosomales Rplp0, Rplp1 y Rplp2 (rojo), Rpl5 (verde), Neurofilamento (gris) y núcleos (azul). En blanco se observa colocalización entre Rpl5 y Anti P. Las barras de escala corresponden a 5 μ m.

5. Discusión

Esta tesina realiza un aporte importante al estudio del transcriptoma axonal al ser parte del primer análisis realizado sobre axoplasmas *in vivo*. Particularmente, se realiza una primera aproximación al estudio de la expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales en axoplasmas, observando y analizando diferencias entre neuronas motoras y sensoriales.

5.1 - Análisis transcriptómico de muestras de raíz dorsal y ventral

El principal objeto de partida para los análisis aquí realizados fueron datos de secuenciación, los cuales se debieron alinear frente al genoma de referencia actualizado de rata, incluyendo las anotaciones de genes. Un importante parámetro de la calidad del alineamiento es el porcentaje de lecturas alineadas frente al genoma de referencia, lo cual es un indicador de la calidad de la secuenciación y de la presencia de contaminaciones en la muestra. Usualmente, se espera que el porcentaje de lecturas alineadas ronde entre el 70-90% (Conesa et al. 2016). El alineamiento realizado fue exitoso para las 4 muestras, al lograr alinear más de un 85% de las secuencias frente al genoma de referencia, lo cual evidencia que las lecturas y el genoma de referencia utilizados son adecuados. Además, para las 4 muestras se observa que más de un 85 % de las lecturas mapeadas frente al genoma se alinean contra zonas anotadas como genes, lo cual es esperable al estar secuenciando ARN. Las restantes secuencias alinean frente a zonas descritas como intergénicas, lo cual se puede deber a posibles errores en las anotaciones del genoma ya que muchas veces resulta complejo definir el inicio y fin de determinado gen. También cabe la posibilidad de que algunas de estas secuencias correspondan a genes no

anotados, o bien que haya habido cierto porcentaje de error en el alineamiento.

5.2 - Distribución de biotipos de moléculas de ARN secuenciadas

El abordaje que realizamos en esta tesina, de secuenciar el ARN a partir de extracción de ARN total, lleva a obtener tanto alineamientos frente a genes codificantes como no codificantes para proteínas. En el gráfico que representa la distribución de biotipos (Figura 3) se observa que la mayor parte de las lecturas alinean frente a ARNr mitocondriales y frente a genes codificantes para proteínas. Aunque se detectan en baja proporción en comparación con los genes codificantes para proteínas y para ARNr mitocondriales, resulta importante destacar que se detecta presencia de diversos tipos de ARNs no codificantes tanto en las muestras de axoplasma como en las de tejido. El estudio de este tipo de ARNs es un tema de investigación activa dado que se han encontrado ARNs que pueden cumplir una amplia variedad de funciones, y otros cuya función permanece desconocida. (Cech and Steitz 2014). Es intrigante por lo tanto detectar este tipo de ARNs en el axón, generándose preguntas acerca de las posibles funciones que podrían cumplir en el mismo.

La distribución de biotipos varía entre las diferentes muestras analizadas, observándose que la distribución es diferente entre axoplasma y raíz. Por ejemplo, el porcentaje de lecturas alineadas frente a ARNr mitocondrial es aproximadamente 20% mayor en axoplasma que en raíz. Sin embargo, las distribuciones de ambos axoplasmas resultan similares entre sí, y lo mismo ocurre al comparar las distribuciones de raíces. En transcriptomas axonales publicados también se observó una mayor abundancia de ARNr mitocondrial en axones que en somas (Briese et al., 2015), sugiriendo que, relativamente, el axón posee una mayor cantidad de mitocondrias que el

soma. Este hecho, provoca que en las muestras de axoplasma el porcentaje de lecturas alineadas frente a genes codificantes para proteína sea bajo (entre 10-20% del total de lecturas alineadas). Igualmente, al tratarse de datos de secuenciación de alta profundidad (más de 4×10^7 lecturas), es suficiente para analizar el transcriptoma. Al analizar la lista de genes codificantes para proteínas detectadas en las muestras de axoplasma se observa que los 10 genes con mayor abundancia de transcritos en ambos tipos axonales corresponden a genes codificados por el genoma mitocondrial. Este hecho, sumado a la sobreexpresión de ARNr mitocondrial observada en la distribución de biotipos confirma que el transcriptoma axonal se encuentra enriquecido en transcritos requeridos por la mitocondria. Esta situación no se observa al analizar las listas de genes detectadas en las muestras de raíz, donde los genes con mayor abundancia provienen de distintos cromosomas sin mostrar una tendencia clara.

5.3 - Comparación de ARNs detectados en las diferentes listas

En este trabajo nos interesó realizar las comparaciones de los transcriptomas de raíces y axoplasmas tomando en cuenta exclusivamente los transcritos codificantes. Se consideró como genes detectados a aquellos genes con un TPM mayor a 1. El filtrado, aunque puede provocar que algún gen cuyo transcrito se encontraba en baja abundancia deje de detectarse, es necesario para evitar posibles falsos positivos por errores de alineamiento. De esta manera, se trata de trabajar únicamente con aquellos genes que se pueda afirmar con seguridad que los transcritos que codifican se encuentran en las muestras de estudio.

Las anotaciones descargadas del genoma de *Rattus Norvegicus* poseen información de localización para 30967 genes. Se detectaron transcritos codificados por 9372 y 10202 genes en las muestras de raíces dorsales y

ventrales respectivamente. Para las muestras de axoplasma se detectaron transcritos de una variedad notoriamente menor de genes; 1240 para la muestra proveniente de raíz dorsal y 882 para la de raíz ventral. Esta diferencia en la variedad de genes detectados era esperable, ya que las muestras de tejido poseen varios tipos celulares y por lo tanto una gran diversidad, mientras que las muestras de axoplasma representan a una estructura sub-celular de un solo tipo celular. Teniendo en cuenta además, que ciertas proteínas pueden ser sintetizadas en el soma para luego ser transportadas al axón, únicamente se esperaría encontrar en esta localización subcelular a aquellos ARNs que cumplan directamente funciones en el axón o que necesariamente deban ser traducidos localmente.

El número de transcritos detectados en axoplasmas es notoriamente menor al reportado en diferentes análisis transcriptómicos axonales realizados a partir de axones en cultivos celulares mediante RNA-seq. Mientras que Minis y colaboradores detectaron aproximadamente 6000 transcritos (Minis et al. 2014), y Briese y colaboradores 11000 transcritos (Briese et al. 2015), en el presente trabajo se detectan 1366 transcritos en ARD y 943 en ARV (codificantes por los 1240 y 882 genes respectivamente). Teniendo en cuenta que los presentes análisis fueron realizados partiendo de axones maduros y mielinizados *in vivo*, y que los realizados por Minis y Briese fueron realizados a partir de cultivos neuronales, las diferencias observadas podrían deberse a las características del axón y al ambiente en el que se encuentra. A esto se le podría sumar que en las técnicas de aislamiento de axoplasma mediante cultivos compartimentalizados exista una contaminación de residuos entre los compartimentos, según indica un artículo en proceso de publicación (Nijssen et al. 2018). Por lo tanto, existe la posibilidad de que ciertos transcritos detectados en baja abundancia en los compartimentos axonales provengan del soma y no del axón.

Al comparar las listas de genes con expresión detectada en muestras de axoplasma con los detectados en el tejido de raíz de la cual provienen, se observa que algunos de los genes que se detectan en el axoplasma no se detectan en la raíz. Esto podría deberse a que son genes de baja expresión en las raíces nerviosas. Al analizar los transcriptomas axonales es posible detectar la presencia de estos transcritos dado que la gran mayoría de los transcritos de alta expresión no se encuentran presentes en esta estructura subcelular provocando que, a pesar de su baja abundancia, sí se puedan detectar en axoplasmas. Al analizar los niveles de abundancia de estos mensajeros se observa que un grupo importante de los mismos se encuentra por encima del percentil 50 de los expresados en el axoplasma. Además, al realizar análisis de ontología con estos subgrupos de genes se observa enriquecimiento en categorías ontológicas relacionadas a la función axonal como la sinapsis, proyecciones neuronales, etc. Por lo tanto, se podría considerar a este subgrupo de genes como enriquecidos en el axón.

Los axoplasmas analizados provienen de diferentes tipos neuronales. Las neuronas motoras son neuronas que participan en vías eferentes cuya función es provocar el movimiento de músculos, mientras que las sensoriales son neuronas que participan en vías aferentes cuya función principal es convertir estímulos externos en estímulos internos. Resulta sorprendentemente alta la proporción de genes cuya expresión se detecta en un tipo de axoplasma y no en el otro, ya que a pesar de poseer diferencias en cuanto a la función que cumplen, se trata del mismo tipo celular. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito por el grupo de Jeffery Twiss, quienes observaron una baja correlación entre los transcritos enriquecidos en axoplasmas de neuronas motoras y sensoriales. Estos resultados los obtuvieron al re-analizar los transcriptomas publicados por Briese y colaboradores y Minis y colaboradores (Kar, Joon Lee, and Twiss 2018).

5.4 - Análisis de ontología

Mediante los análisis de ontología se observa que, a pesar de las diferencias observadas en los genes cuya expresión se detecta en cada tipo neuronal, las categorías ontológicas enriquecidas en ambas muestras de axoplasma son similares entre sí. Resulta llamativo que en ambas muestras de axoplasma se detecta enriquecimiento en categorías relacionadas a la traducción y de componentes del ribosoma. El hecho de que se encuentre enriquecida la categoría traducción puede ser explicado por la síntesis local de proteínas en el axón. Sin embargo, el enriquecimiento en mensajeros codificantes para componentes del ribosoma no se puede explicar tan fácilmente con los conocimientos actuales. El ensamblaje de este complejo ribonucleoproteico es un proceso muy complejo que ocurre en el núcleo. Por lo tanto, resulta incierta la función que cumplirían estos mensajeros en compartimentos subcelulares alejados del núcleo como el axón. Se puso especial énfasis en el estudio de la expresión de estos mensajeros con el fin de evaluar cuáles se expresan y para estudiar la abundancia de cada ARNm codificante para proteína ribosomal.

5.5 - Detección de ARNs codificantes para proteínas ribosomales en muestras de raíz ventral, dorsal y axoplasma

Con el fin de generar un listado de genes codificantes para proteínas ribosomales se realizó una búsqueda en las anotaciones presentadas en ENSEMBL. Se encontró que la rata posee un total de 163 genes codificantes para proteínas ribosomales, evidenciando que existen varios genes con parálogos asociados. Es posible que el listado sea aún mayor, ya que se observaron ciertos genes anotados dentro de familias de

proteínas ribosomales que no fueron tenidos en cuenta para el presente análisis al no poseer descripciones claras. Además, la rata posee más de 2500 pseudogenes asociados a estas proteínas (Balasubramanian et al. 2009), los cuales no fueron tenidos en cuenta para la generación de este listado. Dada la similitud que usualmente presentan los pseudogenes con los genes asociados, cabe preguntarse acerca de la conveniencia de enmascarar estos pseudogenes en el genoma. De este modo, se evitaría la asignación de lecturas a pseudogenes que podría estar afectando el valor de expresión de los genes. En este proyecto se decidió no enmascarar a los mismos, ya que los pseudogenes en muchas ocasiones se pueden transcribir, y por tanto al enmascararlos se estaría obviando esta situación. Sin embargo, no se descarta para estudios posteriores la realización de los análisis aquí presentados enmascarando los pseudogenes de modo de comparar los resultados obtenidos.

No todas las proteínas presentes en el axón son sintetizadas localmente, siendo varias de ellas transportadas desde el soma. *A priori*, se pensaría que las proteínas ribosomales no deberían sintetizarse localmente en el axón teniendo en cuenta que el ensamblaje de las subunidades ribosomales ocurre en el nucléolo. Por lo tanto, resulta lógico imaginar que la traducción ocurra en el soma, posteriormente se ensamblen las subunidades ribosomales y que las mismas sean transportadas al axón. Sin embargo, diversos autores hallaron varios ARNs codificantes para proteínas ribosomales al analizar transcriptomas de axón (Bigler et al. 2017; Briese et al. 2015; Gummy et al. 2011; Rotem et al. 2017; Saal et al. 2014; Taylor et al. 2009; Tóth et al. 2018; Willis et al. 2007; Zivraj et al. 2010).

Consistentemente con estos hallazgos, en los análisis realizados en la presente tesina, se detectan varios ARNs codificantes para proteínas ribosomales en muestras de axoplasma de neuronas motoras y sensoriales *in vivo*. Específicamente, del total de 163 genes identificados como

codificantes para proteínas ribosomales, se detectaron ARNs codificados por 47 genes en ARV y por 75 genes en ARD. Teniendo en cuenta que varios genes codifican para la misma proteína, o para parálogos que pueden reemplazarlas en el ribosoma (Genuth and Barna 2018), de las 80 proteínas ribosomales se detectan transcritos codificantes para 43 en ARV y para 68 en ARD.

A diferencia del axoplasma, en las muestras de raíz se detectó mensajeros codificantes para las 80 proteínas ribosomales (107/163 genes en ambos casos). Esto era esperable ya que este tejido incluye neuronas completas (soma, axón y dendritas), y también varios tipos celulares diferentes como células de Schwann y células del tejido conectivo. Estas células requieren de la expresión de todas las proteínas ribosomales de modo de que el ensamblaje de las subunidades ribosomales pueda ocurrir correctamente.

Resulta interesante el hecho de que más de la mitad de las proteínas ribosomales sean potencialmente traducibles en el axón, despertando preguntas acerca de las posibles funciones que podrían cumplir en el mismo. En la investigación realizada por Deglincerti y Jaffrey (2012) observan que además de la detección de ARNs codificantes para proteínas ribosomales en el axón, también se detectan ARNs codificantes para factores necesarios en el ensamblaje de las subunidades ribosomales (nucleolina, EMG1, GNL3 y Nola1–5) (Deglincerti and Jaffrey 2012). Algunos de estos mensajeros fueron detectados en el presente estudio (nucleolina, GNL3, Nola3) reafirmando lo observado por estos autores. Estos hallazgos permiten hipotetizar que, al estar presentes mensajeros que codifican para proteínas involucradas en el ensamblaje y maduración del ribosoma, podrían ocurrir algunos pasos del ensamblaje de las subunidades ribosomales en el axón. Sin embargo, teniendo en cuenta la complejidad del proceso, y que del mismo participan más de 200 moléculas diferentes resulta poco probable que se puedan ensamblar subunidades ribosomales *de novo*. Otra posibilidad que se plantea es que las proteínas

sintetizadas localmente sean capaces de sustituir proteínas dañadas del ribosoma, de esta manera reciclandolo y aumentando la vida media del complejo. También es posible que estas proteínas, al ser traducidas cumplan funciones extrarribosomales claves para el axón. De las funciones extrarribosomales descritas, varias de ellas podrían tener roles importantes en el axón. Este es el caso de Rpl5 y Rpl11, que formando un complejo molecular con el ARN 5S participan en la regulación de la vía p53, la cual se ha visto que participa en la regeneración axonal y crecimiento de neuritas (Di Giovanni and Rathore 2012). Otro ejemplo es la función extra ribosomal sugerida para Rps3a, la cual se ha demostrado que es capaz de actuar como chaperona en un modelo de levadura, contrarrestando la toxicidad provocada por la agregación de α -sinucleína. Se ha visto que la agregación de α -sinucleína en cuerpos de Lewy es un sello distintivo asociado con la muerte de células neuronales en la enfermedad de Parkinson, por lo que la actividad chaperona de Rps3a podría ser de gran importancia en axones (De Graeve et al., 2013).

En ambas muestras axonales se detectan lecturas que alinean contra genes codificantes tanto para Rpl5 y Rpl11 como para Rps3a. A pesar de ello, en ARV el valor de TPM para Rps3a fue menor a 1, por lo que no se puede confirmar la presencia de transcritos codificantes para dicha proteína. Para confirmar la presencia de transcritos codificantes para Rps3a se podrían realizar qPCR, hibridación *in situ* fluorescente, o bien analizar una mayor cantidad de transcriptomas axonales publicados en bases de datos.

5.6 - Perfil de expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales

Resulta mayormente aceptado que los ribosomas se componen de una copia de cada una de las 80 proteínas ribosomales y los 4 ARNr, y que por

lo tanto requieren una producción equimolar de sus componentes (Perry 2007). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que pueden existir ribosomas con diferentes composiciones, y que la composición del mismo sería un paso novedoso de regulación traduccional (Shi et al. 2017).

Interesantemente, se observó tanto en los transcriptomas axonales como en los transcriptomas de raíces que los valores de TPM difieren para cada proteína ribosomal. Esto indicaría que, o bien hay una extensa regulación traduccional que provoca que las diferencias de abundancia de mensajeros no se vean reflejadas en diferencias de abundancia a nivel de proteína, o bien que ciertas proteínas ribosomales se traducen en mayor medida.

Analizando la Figura 7 se observa que el perfil de abundancia es muy similar en ambos tipos de raíces, con algunos genes claramente más expresados que otros. Este hecho demuestra que la detección de una mayor abundancia de ciertos ARNs no sería casual, al obtener resultados muy similares en ambas muestras dejando entrever que existe una regulación transcripcional común.

En cambio, para las muestras de axoplasma se observa que los perfiles presentan importantes diferencias. Esto indica que podría haber transcripción y/o transporte diferencial de ciertos ARN codificantes para proteínas ribosomales entre diferentes neuronas. Se destaca por ejemplo que los transcritos con mayor abundancia en axones de raíz ventral codifican para Rpl35, mientras que los transcritos con mayor abundancia en axones de raíz dorsal codifican para Rps30. No hay funciones extraribosomales descritas para estas proteínas ribosomales, por lo que resulta interesante el hecho que sus transcritos se expresen en mayor medida y que a su vez su expresión varíe entre los diferentes tipos de neurona. Estas diferencias, sumadas a las grandes diferencias en los genes detectados evidenciados en los diagramas de Venn, dejan entrever que existirían grandes diferencias en los transcriptomas axonales de estos tipos de neuronas, explicada por diferencias a nivel de expresión génica y/o

de transporte de ARNm. Estas diferencias probablemente se vean reflejadas en diferencias en el funcionamiento celular de cada tipo neuronal.

Al observar ambos gráficos simultáneamente, y analizando el listado de genes con sus correspondientes valores de abundancia de ARN, se observa que ciertos genes son preferentemente expresados en las 4 muestras, y que otros son de baja expresión en todos los casos. Este hecho demuestra que hay un importante paso de regulación transcripcional de estos genes, y genera preguntas acerca de si este patrón de expresión es compartido con otros tipos celulares. Para responder esta pregunta se decidió analizar transcriptomas de tejidos similares (ciático), tejidos con tipos celulares variados y diferentes a los del sistema nervioso (hígado), y células en otros sistemas como lo son los cultivos celulares (cultivo de fibroblastos).

5.7 - Expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales en diferentes tejidos y tipos celulares

En el box plot que se muestra en la Figura 10 se observa que la mediana de expresión de los genes codificantes para proteínas ribosomales es superior que la del global de genes expresados para todas las muestras estudiadas. Este hecho resulta lógico para la mayoría de ellas, dado que las proteínas ribosomales son componentes indispensables para el correcto funcionamiento celular al formar parte de la maquinaria traduccional, y suelen tener una alta expresión. En las muestras de axoplasma se observa que la diferencia entre la mediana de expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales y la de genes totales expresados es mínima, y serían necesarios análisis sobre más muestras de axoplasma para confirmar si estos valores son significativamente diferentes. Igualmente, el hecho de que la mediana de abundancia de

mensajeros codificantes para proteínas ribosomales sea similar a la del total de genes con expresión detectada demuestra que no solo es posible encontrarlos, sino que se encuentran en una alta abundancia relativa.

Los niveles de abundancia de los genes codificantes para proteínas ribosomales fueron representados en el Heat Map que se muestra en la Figura 11. El escalado por columnas permite normalizar la expresión de modo de volverlas comparables entre una muestra y las otras. Se observa que mediante el método de clustering elegido se agrupan las muestras según lo esperado por la similitud de las mismas, a excepción del nervio ciático, que *a priori* se esperaba que agrupara junto a los datos de raíces nerviosas dada las similitudes entre estos tejidos.

Este gráfico permite observar que hay ciertos genes que mantienen sus niveles de expresión relativos en todas las muestras. Ejemplo de ello son las proteínas Rpl41 y Rps29, las cuales se encuentran dentro de los genes ribosomales con mayor expresión en todas las muestras de estudio. La sobreexpresión de mensajeros codificantes para Rpl41 ya ha sido reportada por otros autores, y se cree que podría ser un mecanismo para compensar la posible baja eficiencia traduccional del transcrito. Se plantean dos explicaciones para justificar lo anteriormente mencionado, la primera sería que debido al pequeño tamaño del marco de lectura, el transcrito podría ser traducido únicamente por un ribosoma a la vez, disminuyendo así la velocidad de traducción. La segunda, es que la proteína se compone mayoritariamente de aminoácidos básicos, cuyas repeticiones se ha visto que provocan una traducción menos eficiente (Gupta and Warner 2014). Es probable entonces, que algunas de las diferencias en los niveles de transcripción de genes codificantes para proteínas ribosomales se deba a una compensación frente a la eficiencia traduccional de los transcritos. Sin embargo, existen genes cuyos niveles de transcripción varían según el tejido, tipo celular o estructura sub-celular, lo cual no es explicado por las posibles diferencias en la eficiencia traduccional. Estas diferencias, de no

haber pasos de regulación específicas de tejido podrían verse reflejadas en una diferente abundancia de proteínas.

5.8 - Detección de proteínas ribosomales mediante inmunofluorescencia

Al analizar las imágenes obtenidas, se logró estudiar la distribución de diferentes proteínas ribosomales. Se eligió realizar el análisis de proteínas ribosomales que poseían abundancia diferencial de ARNm entre axoplasmas de raíces ventrales y dorsales (Rpl5, Rps3a) y de otras cuyos niveles de transcripción eran similares en ambos tipos axonales (Rplp0, 1 y 2). Para ello se utilizaron anticuerpos comerciales capaces de reconocer a las proteínas ribosomales mencionadas.

Se analizó en detalle núcleos de células de Schwann, los cuales se observan en color azul debido a su tinción con DAPI. En la Figura 14, se observa que hay una acumulación de proteínas ribosomales P en el nucléolo, lo cual es esperable al ser éste el sitio de ensamblaje de las subunidades ribosomales. Sin embargo, no ocurre lo mismo para Rpl5, la cual presenta una distribución prácticamente uniforme en el núcleo. No es posible definir la causa de ello, pero si se pueden plantear hipótesis que lo explicarían. Por ejemplo, se podría explicar su distribución si la Rpl5 se encuentra cumpliendo funciones extra ribosomales en el núcleo.

También se analizaron en detalle nodos de Ranvier. La Figura 15 muestra un nodo de Ranvier y las proyecciones ortogonales que permiten observar la distribución de las proteínas en las diferentes secciones del corte. Se observa una acumulación de Rpl5 y proteínas ribosomales P en la zona correspondiente al nodo. Esto podría explicarse por la transferencia de ribosomas desde células de Schwann al axón a través de los nodos, hecho

que fue confirmado en estudios realizados por Court y colaboradores (Court et al. 2008).

A *priori*, se esperaría observar una mayor abundancia de proteínas ribosomales en las células de Schwann que en axones, dadas las dificultades para observar ribosomas en axón mediante microscopía electrónica. Sin embargo, las proteínas ribosomales Rpl5 y Rps3a se detectan en mayor proporción en axones que en células de Schwann. Resulta poco probable que toda la señal detectada en axones provenga de proteínas formando parte de ribosomas, por lo que se puede pensar que las mismas se encuentren libres en el citoplasma. Dos hipótesis permitirían explicar la presencia de proteínas libres. Por un lado, se ha demostrado que ribosomas inactivos pueden ser reactivados al intercambiar proteínas dañadas por sus pares neosintetizados en el citoplasma, permitiendo quizás que aumente la vida media del ribosoma (Pulk et al. 2010). Otra posibilidad es que las proteínas ribosomales se encuentren cumpliendo funciones extra ribosomales. Sería interesante conocer la proporción de las proteínas que se encuentran formando parte de ribosomas o libres en el citoplasma.

Se realizaron estudios de colocalización de proteínas ribosomales P con Rpl5 o Rps3a. Particularmente, la colocalización de una proteína perteneciente a la subunidad menor (Rps3a) con proteínas pertenecientes a la subunidad mayor (Proteínas ribosomales P), sugiere la presencia de ribosomas ensamblados en el axón. Además, se observó que dicha colocalización se detecta en mayor medida en zonas cercanas al núcleo, lo cual es esperable al ser la zona en la que se encuentra el retículo endoplasmático, y por lo tanto una mayor concentración de ribosomas ensamblados. Para confirmar lo observado mediante colocalización se podrían realizar experimentos con mayor sensibilidad para detectar cercanía entre dos moléculas como lo son los experimentos de

transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET) y los ensayos de ligación por proximidad (PLA).

6. Conclusiones y perspectivas

A diferencia de los transcriptomas axonales publicados hasta la fecha, el aislamiento de los axoplasmas analizados en la presente tesina fue realizado a partir de raíces nerviosas de ratas adultas *in vivo*. Este hecho provoca que los resultados obtenidos realicen aportes novedosos al área en estudio.

Se observaron diferencias importantes entre los transcriptomas de axones de neuronas sensoriales y motoras. Este resultado está de acuerdo con lo observado por otros investigadores, y demuestra que podría haber mayores diferencias de las esperadas entre los transcriptomas de diferentes tipos neuronales. A pesar de las diferencias observadas, las categorías ontológicas enriquecidas en ambas muestras son similares, relacionadas principalmente a funciones axonales y al proceso de traducción. De modo de aportar una mayor cantidad de datos en este tópico se plantea la realización de análisis transcriptómicos de secuencias obtenidas mediante Single-Cell RNAseq. Esta estrategia permitiría identificar diferentes tipos celulares del sistema nervioso y estudiar diferencias y similitudes globales entre sus transcriptomas.

Mediante los análisis transcriptómicos realizados se confirmó la presencia de ARNm codificantes para proteínas ribosomales en muestras de axoplasma de neuronas motoras y sensoriales obtenidas *in vivo*. Esto había sido observado previamente por diversos investigadores en transcriptomas axonales realizados a partir de cultivos celulares. Específicamente, se detectó la presencia de mensajeros codificantes para más de la mitad de las proteínas ribosomales en ambos tipos de axoplasma. Este resultado es llamativo teniendo en cuenta que el ensamblaje de las subunidades ribosomales ocurre en el núcleo. Además, se observaron diferencias importantes en los perfiles de abundancia de mensajeros codificantes para proteínas ribosomales entre axones de neuronas motoras y sensoriales,

sugiriendo la presencia de regulación de transporte y/o transcripcional diferencial entre ellas. Mediante el re-análisis de transcriptomas publicados en bases de datos se podría evaluar los perfiles de abundancia de mensajeros en axones de neuronas sensoriales y motoras con el fin de confirmar lo que aquí se expone. También se podría evaluar el perfil de abundancia de axones pertenecientes a otros tipos neuronales, de modo de comprender en mayor medida la regulación de la expresión de proteínas ribosomales. Los estudios transcriptómicos no indican por sí solos que las proteínas ribosomales se traducen en el axón. Sería sumamente interesante realizar estudios de huellas ribosomales (ribosome profiling) o identificación de proteínas neosintetizadas a una escala ómica sobre axones adultos mielinizados de modo de profundizar aún más en el tema. De esta forma, se confirmaría si los mensajeros aquí observados se traducen en axones *in vivo*, permaneciendo incierta la función que cumplirían.

Al analizar transcriptomas de diferentes tejidos y tipos celulares, observamos que varios de estos mensajeros se encuentran sobre representados y sub representados en todas las muestras, indicando una regulación transcripcional común entre los tejidos. Sin embargo, también se observa la presencia mensajeros cuya abundancia relativa varía en gran medida según la muestra. Esto evidencia la presencia de regulación diferencial en los diferentes tejidos, aunque restaría analizar si estas diferencias se ven reflejadas en diferente abundancia de proteínas.

Los experimentos de inmunofluorescencia realizados sobre tejidos nerviosos indican que existiría una distribución diferencial de las proteínas ribosomales Rpl5, Rps3a y Rplp0, Rplp1 y Rplp2 entre axones y células de Schwann. Además, se observó colocalización entre proteínas de la subunidad mayor y menor ribosomal en axones, sugiriendo la presencia de ribosomas ensamblados.

En suma, los resultados obtenidos aportan datos novedosos al estudio de la expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales en axones adultos mielinizados *in vivo*, permitiendo así avanzar en el conocimiento al generar nuevas e interesantes preguntas en el área.

7. Bibliografía

- Agba, Ogechukwu Brenda, Ludwig Lausser, Klaus Huse, Christoph Bergmeier, Niels Jahn, Marco Groth, Martin Bens, et al. 2017. "Tissue-, Sex-, and Age-Specific DNA Methylation of Rat Glucocorticoid Receptor Gene Promoter and Insulin-like Growth Factor 2 Imprinting Control Region." *Physiological Genomics* 49 (11): 690–702. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00009.2017>.
- Álvarez, Jaime, and Juan Carlos Torres. 1985. "Slow Axoplasmic Transport: A Fiction?" *Journal of Theoretical Biology* 112 (3): 627–51.
- Andreassi, Catia, Carola Zimmermann, Richard Mitter, Salvatore Fusco, Serena Devita, Adolfo Saiardi, and Antonella Riccio. 2010. "An NGF-Responsive Element Targets Myo-Inositol Monophosphatase-1 mRNA to Sympathetic Neuron Axons." *Nature Neuroscience* 13 (3): 291–301. <https://doi.org/10.1038/nn.2486>.
- Babicki, Sasha, David Arndt, Ana Marcu, Yongjie Liang, Jason R. Grant, Adam Maciejewski, and David S. Wishart. 2016. "Heatmapper: Web-Enabled Heat Mapping for All." *Nucleic Acids Research* 44 (W1): W147–53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>.
- Balasubramanian, Suganthi, Deyou Zheng, Yuen Jong Liu, Gang Fang, Adam Frankish, Nicholas Carriero, Rebecca Robilotto, Philip Cayting, and Mark Gerstein. 2009. "Comparative Analysis of Processed Ribosomal Protein Pseudogenes in Four Mammalian Genomes." *Genome Biology* 10 (1). <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-1-r2>.
- Baleriola, Jimena, Chandler A. Walker, Ying Y. Jean, John F. Crary, Carol M. Troy, Peter L. Nagy, and Ulrich Hengst. 2014. "Axonally Synthesized ATF4 Transmits a Neurodegenerative Signal across Brain Regions." *Cell* 158 (5): 1159–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.001>.
- Bigler, Rebecca L., Joyce W. Kamande, Raluca Dumitru, Mark Niedringhaus, and Anne Marion Taylor. 2017. "Messenger RNAs Localized to Distal Projections of Human Stem Cell Derived Neurons." *Scientific Reports* 7 (1): 611. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00676-w>.
- Blumenthal, Thomas. 1979. "RNA Replication: Function and Structure of Q β -Replicase." *In Vitro* 48: 525–48. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.48.070179.002521>.
- Bortoluzzi, S., F. d'Alessi, C. Romualdi, and G. A. Danieli. 2001. "Differential Expression of Genes Coding for Ribosomal Proteins in Different Human Tissues." *Bioinformatics* 17 (12): 1152–57.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.12.1152>.

- Briese, Michael, Lena Saal, Silke Appenzeller, Mehri Moradi, Apoorva Baluapuri, and Michael Sendtner. 2015. "Whole Transcriptome Profiling Reveals the RNA Content of Motor Axons." *Nucleic Acids Research* 44 (4): 1–19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1027>.
- Bursac, S., M. C. Brdovcak, M. Pfannkuchen, I. Orsolich, L. Golomb, Y. Zhu, C. Katz, et al. 2012. "Mutual Protection of Ribosomal Proteins L5 and L11 from Degradation Is Essential for P53 Activation upon Ribosomal Biogenesis Stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (50): 20467–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218535109>.
- Cagnetta, Roberta, Christian K. Frese, Toshiaki Shigeoka, Jeroen Krijgsveld, and Christine E. Holt. 2018. "Rapid Cue-Specific Remodeling of the Nascent Axonal Proteome." *Neuron* 99 (1): 29–46. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.004>.
- Cajigas, Iván J., Georgi Tushev, Tristan J. Will, Susanne tom Dieck, Nicole Fuerst, and Erin M. Schuman. 2012. "The Local Transcriptome in the Synaptic Neuropil Revealed by Deep Sequencing and High-Resolution Imaging." *Neuron* 74 (3): 453–66. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.036>.
- Campbell, Douglas S., and Christine E. Holt. 2001. "Chemotropic Responses of Retinal Growth Cones Mediated by Rapid Local Protein Synthesis and Degradation." *Neuron* 32 (6): 1013–26. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00551-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00551-7).
- Cech, Thomas R., and Joan A. Steitz. 2014. "The Noncoding RNA Revolution - Trashing Old Rules to Forge New Ones." *Cell* 157 (1): 77–94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.008>.
- Conesa, Ana, Pedro Madrigal, Sonia Tarazona, David Gomez-Cabrero, Alejandra Cervera, Andrew McPherson, Michal Wojciech Szcześniak, et al. 2016. "A Survey of Best Practices for RNA-Seq Data Analysis." *Genome Biology* 17 (13). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>.
- Court, F. A., W. T. J. Hendriks, H. D. MacGillavry, J. Alvarez, and J. van Minnen. 2008. "Schwann Cell to Axon Transfer of Ribosomes: Toward a Novel Understanding of the Role of Glia in the Nervous System." *Journal of Neuroscience* 28 (43): 11024–29. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2429-08.2008>.
- Deglincerti, Alessia, and Samie R. Jaffrey. 2012. "Insights into the Roles of Local Translation from the Axonal Transcriptome." *Open Biology* 2 (6). <https://doi.org/10.1098/rsob.120079>.
- Donati, Giulio, Suresh Peddigari, Carol A. Mercer, and George Thomas.

2013. "5S Ribosomal RNA Is an Essential Component of a Nascent Ribosomal Precursor Complex That Regulates the Hdm2-P53 Checkpoint." *Cell R 4* (1): 87–98. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/15/1/015008>. Fluid.
- Dörrbaum, Aline R, Lisa Kochen, Julian D Langer, and Erin M Schuman. 2018. "Local and Global Influences on Protein Turnover in Neurons and Glia." *ELife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.34202>.
- Edstrom, A., and J. Sjostrand. 1969. "Protein Synthesis in the Isolated Mauthner Nerve Fibre of Goldfish." *Journal of Neurochemistry* 16 (1): 67–81. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1969.tb10344.x>.
- Farias, Joaquina. 2014. "Análisis Del Transcriptoma de Axones Mielínicos Mediante Secuenciación Masiva." Maestría Pedeciba Biología. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/123456789/8846>
- Fox, George E. 2010. "Origin and Evolution of the Ribosome." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003483>.
- Franze, Kristian, and Jochen Guck. 2010. "The Biophysics of Neuronal Growth." *Reports on Progress in Physics* 73 (9). <https://doi.org/10.1088/0034-4885/73/9/094601>.
- Genuth, Naomi R., and Maria Barna. 2018. "Heterogeneity and Specialized Functions of Translation Machinery: From Genes to Organisms." *Nature Reviews Genetics* 19 (7): 431–52. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0008-z>.
- Giovanni, Simone Di, and Khizr Rathore. 2012. "P53-Dependent Pathways in Neurite Outgrowth and Axonal Regeneration." *Cell and Tissue Research* 349 (1): 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1292-5>.
- Giuditta, A, W D Dettbarn, and M Brzin. 1968. "Protein Synthesis in the Isolated Giant Axon of the Squid." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 59 (4): 1284–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.59.4.1284>.
- Giuditta, Antonio, Barry B Kaplan, Jan van Minnen, Jaime Alvarez, and Edward Koenig. 2002. "Axonal and Presynaptic Protein Synthesis: New Insights into the Biology of the Neuron." *Trends in Neurosciences* 25 (8): 400–404. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02188-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02188-4).
- Giuditta, Antonio, E. Menichini, C. Perrone Capano, M. Langella, R. Martin, E. Castigli, and B. B. Kaplan. 1991. "Active Polysomes in the Axoplasm of the Squid Giant Axon." *Journal of Neuroscience Research* 28 (1): 18–28. <https://doi.org/10.1002/jnr.490280103>.
- Gonzalo, Philippe, and Jean Paul Reboud. 2003. "The Puzzling Lateral

- Flexible Stalk of the Ribosome.” *Biology of the Cell* 95 (3–4): 179–93. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(03\)00034-0](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(03)00034-0).
- Graeve, Stijn De, Sarah Marinelli, Frank Stolz, Jelle Hendrix, Jurgen Vandamme, Yves Engelborghs, Patrick Van Dijck, and Johan M. Thevelein. 2013. “Mammalian Ribosomal and Chaperone Protein RPS3A Counteracts α -Synuclein Aggregation and Toxicity in a Yeast Model System.” *Biochemical Journal* 455 (3): 295–306. <https://doi.org/10.1042/BJ20130417>.
- Guimaraes, Joao C., and Mihaela Zavolan. 2016. “Patterns of Ribosomal Protein Expression Specify Normal and Malignant Human Cells.” *Genome Biology* 17 (1): 236. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1104-z>.
- Gumy, Laura F, Giles S H Yeo, Yi-chun Loraine Tung, Krishna H Zivraj, Dianna Willis, Giovanni Coppola, Brian Y H Lam, Jeffery L Twiss, Christine E Holt, and James W Fawcett. 2011. “Transcriptome Analysis of Embryonic and Adult Sensory Axons Reveals Changes in mRNA Repertoire Localization.” *RNA* 17 (1): 85–98. <https://doi.org/10.1261/rna.2386111>.
- Gupta, Varun, and Jonathan R. Warner. 2014. “Ribosome-Omics of the Human Ribosome.” *RNA* 20 (7): 1004–13. <https://doi.org/10.1261/rna.043653.113>.
- Higgs, Paul G., and Niles Lehman. 2015. “The RNA World: Molecular Cooperation at the Origins of Life.” *Nature Reviews Genetics* 16 (1): 7–17. <https://doi.org/10.1038/nrg3841>.
- Huang, Da Wei, Brad T. Sherman, and Richard A. Lempicki. 2009a. “Bioinformatics Enrichment Tools: Paths toward the Comprehensive Functional Analysis of Large Gene Lists.” *Nucleic Acids Research* 37 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn923>.
- Huang, Da Wei, Brad T. Sherman, and Richard A. Lempicki. 2009b. “Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources.” *Nature Protocols* 4 (1): 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- Hulsen, Tim, Jacob de Vlieg, and Wynand Alkema. 2008. “BioVenn - A Web Application for the Comparison and Visualization of Biological Lists Using Area-Proportional Venn Diagrams.” *BMC Genomics* 9: 488. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-488>.
- Irigoyen, Nerea, Adam M. Dinan, Ian Brierley, and Andrew E. Firth. 2018. “Ribosome Profiling of the Retrovirus Murine Leukemia Virus.” *Retrovirology* 15 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0394-5>.
- Jung, Hosung, Byung C Yoon, and Christine E Holt. 2013. “Axonal mRNA

Localization and Local Protein Synthesis in Nervous System Assembly, Maintenance and Repair." *Nature Reviews. Neuroscience* 13 (5): 308–24. <https://doi.org/10.1038/nrn3210>.

Kar, Amar N., Seung Joon Lee, and Jeffery L. Twiss. 2018. "Expanding Axonal Transcriptome Brings New Functions for Axonally-Synthesized Proteins in Health and Disease." *Neuroscientist* 24 (2): 111–29. <https://doi.org/10.1177/1073858417712668>

Kim, Eunjin, and Hosung Jung. 2015. "Local Protein Synthesis in Neuronal Axons: Why and How We Study." *BMB Reports* 48 (3): 139–46. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.3.010>.

Koenig, Edward. 1967. "In Vitro Incorporation of [3H]Precursors Into Axonal Protein and Rna." *Journal of Neurochemistry* 14 (4): 437–46. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1967.tb09542.x>.

Koenig, Edward. 1979. "Ribosomal RNA in Mauthner Axon: Implications for a Protein Synthesizing Machinery in the Myelinated Axon." *Brain Research* 174 (1): 95–107. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90806-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90806-0).

Kondrashov, Nadya, Aya Pusic, Craig R. Stumpf, Kunihiko Shimizu, Andrew C. Hsieh, Junko Ishijima, Toshihiko Shiroishi, and Maria Barna. 2011. "Ribosome Mediated Specificity in Hox Translation and Vertebrate Tissue Patterning." *Cell* 145 (3): 383–97. <https://doi.org/10.1038/nature12157>

Kressler, Dieter, Ed Hurt, and Jochen Baßler. 2010. "Driving Ribosome Assembly." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1803 (6): 673–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.10.009>.

de la Cruz, Jesus, Katrin Karbstein, and John L. Woolford Jr. 2015. "Functions of Ribosomal Proteins in Assembly of Eukaryotic Ribosomes in Vivo." *Annual Review of Biochemistry* 84: 93–129. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.037>

Lasek, R J, Carla Dabrowski, and Ruth Nordlander. 1973. "Analysis of Axoplasmic RNA from Invertebrate Giant Axons." *Nature New Biology* 244: 162–65.

Lasek, R J, H Gainer, and R J Przybylski. 1974. "Transfer of Newly Synthesized Proteins from Schwann Cells to the Squid Giant Axon." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (4): 1188–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1188>.

Lasek, R J, J a Garner, and S T Brady. 1984. "Axonal Transport of the Cytoplasmic Matrix." *Journal of Cell Biology* 99 (1 Pt2): 212s–221s. <https://doi.org/10.1083/jcb.99.1.212s>.

- Leppek, Kathrin, Rhiju Das, and Maria Barna. 2018. "Functional 5' UTR mRNA Structures in Eukaryotic Translation Regulation and How to Find Them." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (3): 158–74. <https://doi.org/10.1002/jmri.24785>
- Mazumder, Barsanjit, Prabha Sampath, Vasudevan Seshadri, Ratan K. Maitra, Paul E. DiCorleto, and Paul L. Fox. 2003. "Regulated Release of L13a from the 60S Ribosomal Subunit as a Mechanism of Transcript-Specific Translational Control." *Cell* 115 (2): 187–98. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00773-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00773-6).
- Melnikov, Sergey, Adam Ben-Shem, Nicolas Garreau De Loubresse, Lasse Jenner, Gulnara Yusupova, and Marat Yusupov. 2012. "One Core, Two Shells: Bacterial and Eukaryotic Ribosomes." *Nature Structural and Molecular Biology* 19 (6): 560–67. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2313>.
- Minis, Adi, Dvir Dahary, Ohad Manor, Dena Leshkowitz, Yitzhak Pilpel, and Avraham Yaron. 2014. "Subcellular Transcriptomics-Dissection of the mRNA Composition in the Axonal Compartment of Sensory Neurons." *Developmental Neurobiology* 74 (3): 365–81. <https://doi.org/10.1002/dneu.22140>.
- Nijssen, Jik, Julio Aguila Benitez, Rein Hoogstraaten, Nigel Kee, and Eva Hedlund. 2018. "Axon-Seq Decodes the Motor Axon Transcriptome and Its Modulation in Response to ALS." *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/321596>.
- Perry, Robert P. 2007. "Balanced Production of Ribosomal Proteins." *Gene* 401 (1–2): 1–3. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30265-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30265-0)
- Pulk, Arto, Aivar Liiv, Lauri Peil, Ülo Maiväli, Knud Nierhaus, and Jaanus Remme. 2010. "Ribosome Reactivation by Replacement of Damaged Proteins." *Molecular Microbiology* 75 (4): 801–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07002.x>.
- Rishal, Ida, Meir Rozenbaum, and Mike Fainzilber. 2010. "Axoplasm Isolation from Rat Sciatic Nerve." *Journal of Visualized Experiments* 43. <https://doi.org/10.3791/2087>.
- Rotem, Nimrod, Iddo Magen, Ariel Ionescu, Noga Gershoni-Emek, Topaz Altman, Christopher J. Costa, Tal Gradus, et al. 2017. "ALS along the Axons - Expression of Coding and Noncoding RNA Differs in Axons of ALS Models." *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/srep44500>.
- Saal, Lena, Michael Briese, Susanne Kneitz, Michael Glinka, and Michael Sendtner. 2014. "Subcellular Transcriptome Alterations in a Cell Culture Model of Spinal Muscular Atrophy Point to Widespread Defects in Axonal Growth and Presynaptic Differentiation." *RNA* 20 (11): 1789–1802. <https://doi.org/10.1261/rna.047373.114.3>.

- Sapio, Matthew R., Samridhi C. Goswami, Jacklyn R. Gross, Andrew J. Mannes, and Michael J. Iadarola. 2016. "Transcriptomic Analyses of Genes and Tissues in Inherited Sensory Neuropathies." *Experimental Neurology* 283 (Pt A): 375–95. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.06.023>.
- Shi, Zhen, and Maria Barna. 2015. "Translating the Genome in Time and Space: Specialized Ribosomes, RNA Regulons, and RNA-Binding Proteins." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 31 (1): 31–54. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125346>.
- Shi, Zhen, Kotaro Fujii, Kyle M. Kovary, Naomi R. Genuth, Hannes L. Röst, Mary N. Teruel, and Maria Barna. 2017. "Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of MRNAs Genome-Wide." *Molecular Cell* 67 (1): 71–83.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.021>.
- Sirri, Valentina, Silvio Urcuqui-Inchima, Pascal Roussel, and Danièle Hernandez-Verdun. 2008. "Nucleolus: The Fascinating Nuclear Body." *Histochemistry and Cell Biology* 129 (1): 13–31. <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0359-6>.
- Sloan, Katherine E., Markus T. Bohnsack, and Nicholas J. Watkins. 2013. "The 5S RNP Couples P53 Homeostasis to Ribosome Biogenesis and Nucleolar Stress." *Cell Reports* 5 (1): 237–47. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.049>.
- Sotelo, José R., Lucía Canclini, Alejandra Kun, José R. Sotelo-Silveira, Lei Xu, Horst Wallrabe, Aldo Calliari, Gonzalo Rosso, Karina Cal, and John A. Mercer. 2013. "Myosin-Va-Dependent Cell-To-Cell Transfer of RNA from Schwann Cells to Axons." *PLoS ONE* 8 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061905>.
- Steward, O, and W B Levy. 1982. "Preferential Localization of Polyribosomes under the Base of Dendritic Spines in Granule Cells of the Dentate Gyrus." *J Neurosci* 2 (3): 284–91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6130-82.1982>.
- Taliaferro, J. Matthew, Marina Vidaki, Ruan Oliveira, Sara Olson, Lijun Zhan, Tanvi Saxena, Eric T. Wang, et al. 2016. "Distal Alternative Last Exons Localize MRNAs to Neural Projections." *Molecular Cell* 61 (6): 821–33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.020>.
- Taylor, Anne M, Nicole C Berchtold, Victoria M Perreau, Christina H Tu, Noo Li, and Carl W Cotman. 2009. "Axonal mRNA in Uninjured and Regenerating Cortical Mammalian Axons." *Journal of Neuroscience* 29 (15): 4697–4707. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6130-08.2009>
- Tóth, Eszter N., Akshar Lohith, Manas Mondal, Jia Guo, Akiyoshi

- Fukamizu, and Nader Pourmand. 2018. "Single-Cell Nanobiopsy Reveals Compartmentalization of MRNAs within Neuronal Cells." *Journal of Biological Chemistry* 293 (13): 4940–51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.800763>.
- Wagner, Günter P., Koryu Kin, and Vincent J. Lynch. 2012. "Measurement of mRNA Abundance Using RNA-Seq Data: RPKM Measure Is Inconsistent among Samples." *Theory in Biosciences* 131 (4): 281–85. <https://doi.org/10.1007/s12064-012-0162-3>.
- Warner, Jonathan R., and Kerri B. McIntosh. 2009. "How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins?" *Molecular Cell* 34 (1): 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.03.006>.
- Willis, Dianna E., Ka Wan Li, Jun-Qi Zheng, Jay H. Chang, August Smit, Theresa Kelly, Tanuja T. Merianda, James Sylvester, Jan van Minnen, and Jeffery L. Twiss. 2005. "Differential Transport and Local Translation of Cytoskeletal, Injury-Response, and Neurodegeneration Protein MRNAs in Axons." *Journal of Neuroscience* 25 (4): 778–91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4235-04.2005>.
- Willis, Dianna E, Erna Van Niekerk, Yukio Sasaki, Mariano Mesngon, Tanuja T Merianda, Gervan G Williams, Marvin Kendall, Deanna S Smith, Gary J Bassell, and Jeffery L Twiss. 2007. "Extracellular Stimuli Specifically Regulate Localized Levels of Individual Neuronal MRNAs." *Journal of Cell Biology* 178 (6): 965–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.200703209>.
- Wool, Ira G. 1996. "Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins." *Trends in Biochemical Sciences* 21 (5): 164–65. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)20011-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)20011-8).
- Xu, Xilong, Xiufang Xiong, and Yi Sun. 2016. "The Role of Ribosomal Proteins in the Regulation of Cell Proliferation, Tumorigenesis, and Genomic Integrity." *Science China Life Sciences* 59 (7): 656–72. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0018-0>.
- Xue, Shifeng, and Maria Barna. 2014. "Specialized Ribosomes: A New Frontier in Gene Regulation and Organismal Biology." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (6): 355–69. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.167>
- Zappulo, Alessandra, David Van Den Bruck, Camilla Ciolli Mattioli, Vedran Franke, Koshi Imami, Erik McShane, Mireia Moreno-Estelles, et al. 2017. "RNA Localization Is a Key Determinant of Neurite-Enriched Proteome." *Nature Communications* 8 (1): 583. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00690-6>.
- Zhang, Xiao Hui, and Mu Ming Poo. 2002. "Localized Synaptic Potentiation by BDNF Requires Local Protein Synthesis in the

Developing Axon." *Neuron* 36 (4): 675–88.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01023-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01023-1).

Zhang, Ye, Kenian Chen, Steven A. Sloan, Mariko L. Bennett, Anja R. Scholze, Sean O’Keeffe, Hemali P. Phatnani, et al. 2014. “An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex.” *Journal of Neuroscience* 34 (36): 11929–47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>.

Zhou, Xiang, Wen Juan Liao, Jun Ming Liao, Peng Liao, and Hua Lu. 2015. “Ribosomal Proteins: Functions beyond the Ribosome.” *Journal of Molecular Cell Biology* 7 (2): 92–104.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv014>.

Zivraj, Krishna H, Yi Chun Loraine Tung, Michael Piper, Laura Gumy, James W Fawcett, Giles S H Yeo, and Christine E Holt. 2010. “Subcellular Profiling Reveals Distinct and Developmentally Regulated Repertoire of Growth Cone MRNAs.” *Journal of Neuroscience* 30 (46): 15464–78.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1800-10.2010>