

PEDECIBA

Área Biología

Subárea Biología Celular y Molecular

Tesis de Maestría

Análisis del transcriptoma de axones mielínicos mediante secuenciación masiva

Joaquina Farias

Agosto 2014



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

(PEDECIBA)

Área Biología

Subárea Biología Celular y Molecular

Tesis de Maestría

Análisis del transcriptoma de axones mielínicos mediante secuenciación masiva

Lic. Joaquina Farias

Orientador: José R. Sotelo-Silveira

Tribunal:

Dr. Ángel Caputi (Presidente)

Dra. Patricia Lagos (Vocal)

Dr. Pablo Smircich (Vocal)

*Instituto de Investigaciones Biológicas
Clemente Estable
Agosto 2014*

Agradecimientos

Al Coya, por aceptarme como estudiarme y permitirme trabajar en este proyecto.

A los miembros del Tribunal, por dedicar su tiempo a la corrección de la tesis.

A la ANII, por brindarme un apoyo económico que, en cierta manera, permitió abocarme enteramente en el presente proyecto.

A todos los integrantes del (nuevo) Departamento de Genómica, los que siempre estuvieron para dar una mano, un consejo y sobre todo, la compañía y cariño que se necesitan luego de largas horas de trabajo.

A todos los compañeros y amigos del DPAN, los cuales fueron muy amables al compartir no sólo el espacio de trabajo y los instrumentos, sino también las horas de trabajo en el laboratorio y frente a la computadora.

A mis amigos quienes, quizá sin entender enteramente cuál era mi trabajo, siempre estuvieron a mi lado haciendo este camino más fácil.

A mi familia. A mis padres, por la confianza y el apoyo brindado. A mi hermana, por acompañarme y guiarme desde siempre. A Facundo, por ser un gran compañero y amigo durante todos estos años, siendo un sostén fundamental en momentos difíciles.

Índice

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	3
Origen de las proteínas axonales.....	3
Transporte de ARNm.....	8
Motores moleculares.....	8
Ribonucleopartículas y proteínas de unión al ARNm en axones.....	11
Estrategias experimentales para el estudio del transcriptoma axonal.....	14
Transcriptoma de axones.....	15
III. Hipótesis de trabajo.....	17
IV. Objetivos.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos:.....	18
V. Materiales y métodos.....	19
Animales de experimentación.....	19
Obtención de las muestras.....	19
Micro-disección de axoplasmas de raíces ventrales.....	20
Extracción de ARN.....	21
Raíces normales y lesionadas.....	21
Axoplasmas.....	22
Amplificación lineal de ARN.....	22
Amplificación.....	22
Cuantificación y control del tamaño de los fragmentos obtenidos.....	23
Control de calidad de las muestras de axoplasma.....	23
Secuenciación masiva.....	25
Bibliotecas.....	25
PCR de emulsión.....	26
Secuenciación.....	27
Análisis de resultados de secuenciación.....	27
Análisis funcional de los ARN identificados mediante estudios de ontología.....	28
Comparaciones de listas.....	28
Test EASE Score.....	28
ARNm axonales.....	30

Transporte de ARNm.....	31
Proteínas mitocondriales.....	31
Confirmación de resultados obtenidos por RNA-Seq mediante qPCR.....	31
VI. Resultados.....	33
Optimización y puesta a punto de la técnica de micro-disección.....	33
Extracción de ARN y amplificación lineal.....	33
Control de pureza de las muestras de axoplasma: evaluación por qPCR.....	34
Evaluación de calidad de muestras a secuenciar.....	35
Secuenciación a baja profundidad mediante la tecnología Ion Torrent.....	37
Análisis de parámetros generales del RNA-Seq.....	39
Calidad de las lecturas.....	39
Mensajeros presentes en las muestras.....	40
Verificación de niveles de abundancia de ARNm axonales mediante qPCR.....	42
Evaluación de la pureza de la muestra de axoplasma a nivel masivo.....	43
Análisis funcional-ontológico de ARNm presentes en las distintas muestras.....	44
Comparación del transcriptoma de axones maduros con el de axones en cultivo... ..	48
ARNm que codifican proteínas mitocondriales en axoplasma.....	49
ARNm axonales asociados a proteínas de unión al ARN.....	50
ARNm axonales asociados a motores moleculares.....	51
Análisis de expresión diferencial: RVN vs. RVL.....	53
VIII. Discusión.....	56
Micro-disección de axones como técnica de obtención de citoplasma axonal de neuronas adultas y mielinizadas para el estudio de su transcriptoma.....	56
Secuenciación a baja profundidad mediante la tecnología Ion Torrent.....	60
ARNs asociados a funciones neuronales presentan niveles altos de expresión en la muestra de axoplasma, mientras que ARNs asociados a mielina poseen niveles bajos de expresión.....	62
Análisis funcional-ontológico de las distintas muestras evidencian que los ARNm axonales presentan características diferenciales respecto a las raíces ventrales.....	63
El transcriptoma de axones maduros difiere, en parte, del reportado para axones en cultivo.....	66
Los mensajeros más expresados en el axón codifican proteínas mitocondriales, codificadas por el genoma mitocondrial.....	68
Mensajeros axonales y su posible asociación a proteínas de unión al ARN.....	69

Mensajeros axonales y su posible asociación a motores moleculares.....	70
Luego de una lesión en la raíz ventral cambian los niveles de expresión de genes relacionados a ribosomas, proteólisis mediada por ubiquitinación y fosforilación oxidativa	71
IX. Conclusiones y Perspectivas.....	72
X. Bibliografía.....	75
XI. Material Suplementario.....	82
Figura Suplementaria 1. Reporte de calidad de las lecturas de la muestra de axolasma.....	82
Publicación Calliari, Farias, et al 2014.....	83

I. Resumen

La síntesis local de proteínas axonales ha sido propuesta como una fuente alternativa para el mantenimiento de la masa axoplásmica desde la década del 60. Más recientemente, se demostró que frente a determinados estímulos, contribuye a generar una cierta capacidad de plasticidad local. Con el paso de los años, se ha intentado caracterizar los ARNm presentes en el axón, los cuales pueden ser traducidos localmente. Hasta el momento, los escasos trabajos que han analizado la composición del transcriptoma axonal lo han hecho solo en cultivos neuronales *in vitro*. En estas condiciones, es de esperar que el mismo difiera considerablemente con el de los axones *in vivo*. Con el objetivo de caracterizar los ARNm que se localizan en axones adultos mielinizados, optimizamos la técnica de micro-disección de axones *in toto* para obtener citoplasma axonal libre de mielina. Los ARNm así obtenidos fueron identificados mediante secuenciación masiva.

La micro-disección de axones se realizó en raíces ventrales de ratas. Posteriormente, se purificaron los ARNs, se amplificaron linealmente y se secuenciaron masivamente los transcritos más abundantes. Paralelamente y como punto de referencia, se amplificaron y secuenciaron los transcritos más abundantes de las raíces ventrales enteras. Adicionalmente, se estudió el transcriptoma de raíces ventrales sometidas a lesión, como forma de investigar si la abundancia de algunos mensajeros axonales, variaba a causa de la injuria. Para evaluar la pureza de los ARNm obtenidos por micro-disección axonal, se cuantificó mediante qPCR su contenido en 3 ARNm gliales y 3 axonales característicos.

En el axoplasma se identificaron 629 transcritos. Estos corresponden al 10% del total obtenido en las raíces normales en este experimento. Entre los más abundantes se

identificaron algunos mitocondriales y otros relacionadas al citoesqueleto. Dentro de las vías canónicas más representadas se encuentran la señalización del crecimiento axonal y la señalización mediada por integrinas. La presencia de ARNm codificantes para estas vías indican que el axón posee la información necesaria para responder ante estímulos externos. También encontramos transcritos que fueron previamente asociados a proteínas de unión al ARN o a motores moleculares. Esto indica que los mecanismos de localización podrían encontrarse operativos en el citoplasma axonal. Del total de transcritos que identificamos en el axoplasma, 60% coinciden con los obtenidos por estudios transcriptómicos axonales *in vitro*. El 40% restante, son transcritos que identificamos por primera vez en este compartimiento. Esto indicaría que los axones maduros mielinizados poseen una población diferente de transcritos. Del análisis de expresión diferencial de la raíz ventral frente a una lesión, resultó que un 10% de los ARNm identificados en el axón, podrían variar frente al daño. Los procesos biológicos más representados en este grupo, fueron la elongación de la traducción y el transporte mediado por vesículas.

Este trabajo es el primero en iniciar la caracterización masiva de transcritos provenientes de axones mielínicos motores maduros, ya que los estudios anteriores se realizaron *in vitro* en axones inmaduros. De esta manera se sientan las bases para estudios futuros que busquen investigar la participación de estos transcritos en la fisiopatología axonal.

II. Introducción

Uno de los hechos que distingue y hace únicas a las células nerviosas de otros tipos celulares es su morfología. Mientras que las dimensiones de la mayoría de las células esta en el rango de las diez micras, las neuronas, en particular las del Sistema Nervioso Periférico (SNP), tienen axones que pueden extenderse un metro o más en humanos y otros vertebrados de gran porte. Como la mayoría de las células altamente polarizadas, a causa de su peculiar morfología, las neuronas presentan una logística específica a la hora del abastecimiento de proteínas a zonas lejanas del soma. Este abastecimiento no sólo es necesario para el mantenimiento y viabilidad de la masa axoplásmica en el estado estacionario, sino también para satisfacer los requerimientos necesarios en procesos tales como el desarrollo, crecimiento y la regeneración (Alvarez et al. 2000).

Origen de las proteínas axonales

Uno de los principios de la biología celular neuronal planteaba que el pericarion es el sitio exclusivo de síntesis de proteínas dentro de la célula neuronal, las cuales son transportadas desde el soma a los distintos dominios celulares dependiendo de las necesidades. Sin embargo, gradualmente se ha acumulado evidencia de la existencia de síntesis local de proteínas fuera del soma neuronal. El descubrimiento de poliribosomas localizados en sitios postsinápticos en las dendritas (Steward & Fass 1983) y la identificación de varios ARNm dentro de las mismas (Garner et al. 1988; Racca et al. 1997) demostraba claramente que la síntesis de proteínas compartimentalizada podía ocurrir en las dendritas neuronales. Sin embargo, la síntesis proteica en el axón ha sido

un área más controversial.

La teoría que plantea que las proteínas axonales provienen exclusivamente del soma neuronal (llamada modelo “centralista”) surgió principalmente a causa de la incapacidad de los primeros estudios de detectar ribosomas en los axones (Weiss & Hiscoe 1948; Palay & Palade 1955; Lasek et al. 1973). A su vez, los resultados de una gran cantidad de experimentos de marcaje radioactivo de “pulse-chase” realizados a partir de la década de los 60 indicaron que las proteínas sintetizadas en el soma neuronal son transportadas a lo largo del axón mediante dos mecanismos (Droz & Leblond 1963; Lorenz & Willard 1978; Lasek et al. 1984). Las proteínas que están asociadas con vesículas y otros organelos membranosos viajan a través del transporte axonal rápido. Estas vesículas son producidas por el aparato de Golgi y viajan a lo largo de los microtúbulos impulsadas por la familia de motores moleculares quinesinas. Por esta vía, las proteínas asociadas a membranas, proteínas secretoras y lípidos viajan a través del axón a una velocidad de 50-200 mm/día (Lasek et al. 1984). Sin embargo, se planteó que el mecanismo por el cual las proteínas del citoesqueleto y citosólicas producidas en el cuerpo celular viajan a través del axón es a través del transporte axonal lento, a velocidades de 0.1-3.0 mm/día (Lorenz & Willard 1978; Black & Lasek 1980; Campenot & Eng 2000; Brown 2003). Mientras que los principios básicos que subyacen al transporte axonal rápido son bien comprendidos, los que subyacen al transporte axonal lento aún no se conocen en profundidad (Campenot & Eng 2000; Scott et al. 2011; Tang et al. 2012; Conway & Ross 2013). En 2005 Brown y colaboradores determinaron *in vitro* que los neurofilamentos, proteínas clásicamente transportadas lentamente, pueden moverse a velocidades típicas del transporte rápido con largas pausas en su movimiento, lo que llamaron hipótesis “stop-and-go” (Brown et al. 2005). La conjunción de estos resultados, y la estimación del tiempo de vida media de las proteínas (que va desde unos pocos

segundos hasta varios días (Varshavsky 1996), con un máximo de 6 meses (Millecamps et al. 2007)), lleva a preguntarse cuál es el mecanismo de suministro de proteínas destinadas a la parte más distal de un axón, principalmente en neuronas del sistema periférico (en las que el axón puede ser superior a 1m de longitud).

Existen dos propuestas que parecen conciliar esta inconsistencia. La primera es la transferencia de proteínas desde células cercanas al axón mediante distintos tipos de vesículas (Lasek et al. 1977; Court et al. 2008; Court et al. 2011; Frühbeis et al. 2012; Bellingham et al. 2012). Lasek y colaboradores en 1977 evaluaron la hipótesis de transferencia de proteínas desde la célula de Schwann al axón en fibras gigantes de calamar, incubando las fibras descentralizadas (separadas del soma neuronal) en presencia de aminoácidos marcados radiactivamente. Encontraron que no sólo la célula de Schwann presentaba marca radioactiva, sino también el axón. Se probó que las proteínas marcadas provenían de la célula de Schwann tratando con RNAsas los axones, encontrando la misma intensidad de señal. También probaron que la señal no provenía de síntesis local de proteínas dentro de la mitocondria, ya que trataron las células con cloranfenicol, un inhibidor de la síntesis proteica mitocondrial, y no observaron diferencias en la cantidad de marca dentro del axón (Lasek et al. 1977). Varios trabajos han demostrado la transferencia no sólo de proteínas desde la célula de Schwann al axón, sino también de ribosomas (Court et al. 2008; Court et al. 2011) y ARN (Benech et al. 1982; Sotelo et al. 2013; Canclini et al. 2014; Sotelo et al. 2014). En los trabajos de Sotelo y Canclini y colaboradores se colocaron nervios ciáticos normales y previamente lesionados (en regeneración aguda, 18 hs) en medio con análogo de uridina (5-bromouridina). Observaron que los ARN neosintetizados (aquellos que incorporaron la marca) se encontraban también dentro de los axones y que la transferencia del ARN era dependiente del motor molecular Miosina Va (Sotelo et al. 2013; Canclini et al. 2014). Los

trabajos de Court y colaboradores analizan la transferencia de ribosomas desde las células de Schwann hacia axones de nervios ciáticos luego de la desomatización de los mismos, encontrando que la cantidad de ribosomas dentro del axón aumenta de forma significativa luego de la lesión (Court et al. 2008; Court et al. 2011).

Otra propuesta que intenta explicar el mecanismo de suministro de proteínas a zonas lejanas al soma es la síntesis local de proteínas en el axón (Koenig & Adams 1982; Benech et al. 1982; Campenot & Eng 2000; Giuditta et al. 2002; Piper & Holt 2004).

Estos dos mecanismos (transferencia de proteínas desde la célula de Schwann y síntesis local de proteínas), además de ser fuentes de proteínas alternativas al soma en condiciones normales, también podrían ser utilizadas por el axón para responder de una forma más rápida a estímulos del ambiente.

En cuanto a la síntesis local de proteínas, varios estudios bioquímicos y autorradiográficos realizados a partir de la década de los 60 acumularon evidencias bioquímicas y moleculares de actividad de síntesis proteica en axones mielínicos (Giuditta et al. 1968; Benech et al. 1982; Alvarez & Benech 1983; Sotelo et al. 1992; Koenig & Giuditta 1999). Con el paso de los años, muchos de los componentes principales de la maquinaria traduccional y de la síntesis activa de proteínas (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt, ribosomas, y componentes enzimáticos) han sido reportados tanto en axones de invertebrados (Black & Lasek 1977; Giuditta et al. 1977; Ingoglia et al. 1983) como de vertebrados (Sotelo-Silveira et al. 2000; Kun et al. 2007; Sotelo-Silveira et al. 2008). Si bien no existen hasta el momento resultados que demuestren claramente la síntesis local en axones adultos *in vivo* (Campenot & Eng 2000), sí existen evidencias de que ocurre en axones en cultivo (Campenot 1982; Posse de Chaves et al. 1995; Van Minnen et al. 1997; Gaete et al. 1998), y que en axones lesionados, la inhibición de la síntesis proteica lleva a la inhibición de la regeneración axonal (Gaete et al. 1998).

En 1996, Koenig y Martin describieron por primera vez la presencia de dominios ribosomales periaxoplasmicos o “Placas Periaxoplasmicas” (PARPs) en axones de fibras de Mauthner de pez dorado. Estos dominios son visibles en la zona cortical de los axones luego de la tinción con YOYO-1 (colorante de alta afinidad por el ARN), y son sensibles a la digestión con ARNasa. Se evidenció también que las PARPs son ricas en poliribosomas y se encuentran en una íntima asociación con la actina-F cortical (Koenig & Martin 1996). Posteriormente, se describieron PARPs en axones motores y sensoriales de ratas y conejos (Koenig et al. 2000). Estos resultados llevaron a pensar que las PARPs podrían ser los sitios donde se lleve a cabo la síntesis local de proteínas, aunque hasta el momento no se ha demostrado su funcionalidad. Varios estudios encontraron evidencias que proveen datos importantes para el entendimiento de los mecanismos responsables de la localización de distintos componentes en dominios subcelulares (Morris et al. 2010; Keene 2007), en particular la localización de todos los componentes necesarios para la traducción local de proteínas en las PARPs (Koenig et al. 2000).

Una vez encontradas las PARPs, se fue en busca de caracterizar los ARNm presentes en el axón y establecer la asociación con las mismas. Para alcanzar este objetivo se utilizaron dos aproximaciones experimentales: por un lado, se analizó la expresión de ARNm codificante para proteínas específicas de neuronas, como los neurofilamentos (Sotelo-Silveira et al. 2000); y por otro lado, se utilizaron axones *in toto* provenientes de célula de Mauthner y de raíces ventrales de rata y conejo para analizar *in situ* la localización y distribución del ARNm codificante para la β - actina (Sotelo-Silveira et al. 2008). En el trabajo de Calliari y colaboradores (Calliari et al. 2002) se caracterizó por primera vez la expresión de Miosina Va en nervio ciático de rata. La localización de dicha proteína fue reportada en la zona limítrofe entre la vaina de mielina y el axoplasma. También se observó que la Miosina Va era sintetizada localmente y se regulaba

positivamente frente a una lesión del nervio. Calliari y colaboradores detectaron su ARNm en el citoplasma axonal y también asociado a las PARPs (Calliari 2008). Estudios recientes, utilizando microscopía electrónica, mostraron que ribosomas y poliribosomas están localizados en discretos dominios que se distribuyen intermitentemente en intervalos a lo largo de la periferia axoplásmica en axones mielínicos adultos (Kun et al. 2007). También se detectaron clusters de ribosomas en el dominio axonal central, que podrían representar una población de ribosomas transportados desde el cuerpo neuronal hacia el axón mediante transporte axonal mediado por motores moleculares o quizás el transporte de los mismos desde la glía al axón (Benech et al. 1982; Kun et al. 2007; Court et al. 2008; Court et al. 2011).

Por lo tanto, se ha probado que los axones poseen parte de la maquinaria necesaria para la síntesis proteica local. Es de esperar que los mismos posean un transcriptoma particular, y que las proteínas codificadas por los transcritos que allí se localizan posean funciones necesarias tanto en condiciones normales como de regeneración.

Transporte de ARNm

Motores moleculares. El transporte de organelos, vesículas secretoras y complejos proteicos y ribonucleoproteicos a lo largo del citoesqueleto por medio de motores moleculares es un proceso intracelular esencial. Los motores moleculares que llevan a cabo esta tarea incluyen a las miosinas, viajando a lo largo de filamentos de actina, y las quinesinas (transporte anterógrado, mayormente hacia el extremo +) y dineinas (transporte retrógrado, hacia extremo -) viajando sobre los microtúbulos (Ross et al. 2008). Estructuralmente, los motores moleculares consisten en dos dominios funcionales:

un dominio motor que interactúa con los filamentos del citoesqueleto y convierte energía química en movimiento, y un dominio de interacción con la carga directamente o a través de cadenas ligeras accesorias (Gunawardena & Goldstein 2004).

Quinesinas: Las quinesinas pertenecen a una gran superfamilia de motores moleculares, conocida como KIFs (del inglés, *Kinesin Superfamily Proteins*). Se han reportado más de 45 KIFs diferentes en ratones y humanos, las cuales tienen dos funciones principales. Las KIFs participan en el movimiento de diversas cargas a lugares específicos de las células a través del citoesqueleto de microtúbulos (Hirokawa 1998; Seog et al. 2004). También se los ha asociado en la organización de los cromosomas y los movimientos del huso mitótico (Sharp et al. 2000). Las KIFs pueden ser agrupadas en tres tipos, dependiendo de la posición del dominio motor dentro de la molécula: las quinesinas-N poseen el dominio motor en la región N-terminal, las quinesinas-M en el medio, y las quinesinas-C en la región C-terminal (Hirokawa & Noda 2008). La posición intramolecular del dominio motor determina la direccionalidad del motor, siendo que las quinesinas-N conducen el movimiento hacia el extremo + y las quinesinas-C lo hacen hacia el extremo -. En el 2004 se estableció una nomenclatura estándar, en donde las KIFs fueron clasificadas en 14 familias de acuerdo a los análisis filogenéticos. De las 14 familias, solo una contiene quinesinas-M, y una quinesinas-C, el resto de las 12 familias contiene sólo quinesinas-N, un sesgo que puede explicarse por el hecho de que normalmente la unidad KIF transporta anterógradamente mientras que la mayoría del transporte retrógrado es mediado por las dineínas (Hirokawa & Noda 2008). Se ha identificado que la KIF5 está asociada a gránulos de ARN (complejos ribonucleoproteicos), en los cuales se identificaron 42 proteínas (dentro de las cuales están Staufen, varias FMRPs (*Fragile X Mental Retardation Proteins*), Pur α y β , entre otras), y dos ARNm (CAMKII α y Arc). Estas proteínas y ARNm colocalizan con gránulos

asociados a quinesinas en dendritas, que se mueven bidireccionalmente (Kanai et al. 2004).

Dineínas: Como en el caso de los otros dos tipos de motores moleculares, la secuencia aminoacídica de los dominios motores de las dineínas también se encuentran altamente conservados. Existen 16 genes que codifican para cadenas pesadas de dineínas en el genoma humano, de los cuales uno codifica para dineína citoplasmática, otro para dineína intraflagelar, y el resto para dineínas axonemales. Las dineínas poseen una particularidad con respecto a las quinesinas y miosinas, y es que forman grandes complejos moleculares. Las dineínas citoplasmáticas de los mamíferos consisten en dos cadenas pesadas y varias subunidades pequeñas (Kikkawa 2013). Las cargas transportadas por las dineínas citoplasmáticas son varios organelos membranosos como lisosomas, endosomas, fagosomas, y complejos de Golgi (Hirokawa 1998).

Miosinas: La familia de las miosinas está compuesta por 18 clases, donde en cada una existen distintos genes (en total más de 40 en mamíferos), los cuales a su vez dan lugar a distintas isoformas, generando así una gran diversidad (Hodge & Cope 2000; Foth et al. 2006). Las miosinas de la clase V son singulares, pues poseen una característica biológica que las hace únicas y claramente distinguibles del resto de los integrantes de la familia: son capaces de desarrollar movimientos procesivos. Esto quiere decir que, a diferencia del resto de las miosinas, las cuales se caracterizan por generar fuerzas de tensión a partir de un punto de anclaje o de translocar una carga de un sitio a otro adyacente pero sin moverse del punto de anclaje, estas miosinas procesivas son capaces de desplazarse sobre los filamentos de actina, llevando la carga consigo (Hartman & Spudich 2012). Si bien esta clase de miosinas poseen características similares a las quinesinas y dineínas en cuanto a su procesividad, no se las ha encontrado asociadas al transporte a largas distancias. Por lo tanto se ha planteado la hipótesis que el transporte a

larga distancia es llevado a cabo por los motores moleculares asociados a microtúbulos (quinesinas para el transporte anterógrado y dineínas para el retrógrado) (Yoo et al. 2010; Gagnon & Mowry 2011), mientras que las miosinas serían necesarias para la localización final de las cargas (Diefenbach et al. 2002; Yoshimura et al. 2006; Krauss et al. 2009). Un ejemplo de miosina del grupo V estudiado en células nerviosas es la miosina Va (MyoVa). Esta es una miosina muy procesiva que transporta diversas cargas como vesículas (Wu et al. 1997), neurofilamentos (Rao et al. 2002), mitocondrias (Pathak et al. 2010), y retículo endoplásmico (ER) (Wagner et al. 2011), así como también complejos ribonucleoproteicos (RNP) (Yoshimura et al. 2006; Salerno et al. 2008; Krauss et al. 2009). La mayoría de los ejemplos conocidos referente al papel biológico de la MyoVa tiene relación con el anclaje de su carga al citoesqueleto de actina, lo que en muchos casos significa la forma en que esa carga alcanza su localización precisa y final (Yoshimura et al. 2006; Krauss et al. 2009). En el trabajo de Sotelo-Silveira y colaboradores del 2004 se evidenció que la quinesina KIBII y la miosina Va colocalizan con las PARPs en axones de raíces ventrales de ratas. Este resultado estaría apoyando la hipótesis de que la localización de las cargas (las que incluyen toda la maquinaria traduccional, ARNm, entre otros) se lleva a cabo en dos pasos, en los cuales se requieren la participación de quinesinas para el transporte a largas distancias y las miosinas para la localización focal en dominios corticales (Sotelo-Silveira et al. 2004; Sotelo-Silveira et al. 2006).

Con estos datos, podemos concluir que la localización de los ARNm en distintos compartimientos celulares es llevada a cabo por los tres tipos de motores moleculares, trasportándose a través del citoesqueleto de microtúbulos así como también de actina, en forma de gránulos.

Ribonucleopartículas y proteínas de unión al ARNm en axones. El transporte, localización

y metabolismo de los ARNm se realiza bajo la forma de complejos ribonucleoproteicos, los cuales representan una población heterogénea tanto en composición como en tamaño. Esta heterogeneidad da cuenta de los posibles estados funcionales en los cuales se encontrarían esos ARNm: en tránsito, en depósito (reprimidos o en vías de eliminación), o en su localización definitiva a la espera de su traducción. Si bien existen RNPs que contienen ribosomas y otras que no, lo que todas tienen en común es que el ARNm, mientras está incluido en ellas, está traduccionalmente inactivo (Krichevsky & Kosik 2001). Para llevar a cabo el proceso de localización de ARNm, es necesario la presencia de elementos de localización en *cis* o *zipcode*, generalmente localizado en los 3'UTR de los mismos. Esta señal es reconocida por parte de proteínas de unión al ARN (RBPs, del inglés *RNA Binding Proteins*) que actúan en *trans*, las cuales se ensamblan con los ARNm en RNPs como complejos funcionales. Estos RNP son transportados a través de los microtúbulos y luego translocados desde el citoesqueleto de microtúbulos al de actina para su localización final. Por último, se activa la traducción de los ARNm localizados (Doyle & Kiebler 2011).

Una vez identificada la presencia de ARNm y la maquinaria necesaria para llevar a cabo la síntesis local, fue necesario entender de qué forma llegan los ARNm a este compartimiento celular. Varios han sido los trabajos que buscaron identificar las proteínas de unión al ARN responsables de su localización.

Una de las proteínas de unión a ARN más estudiada en células nerviosas ha sido la *Zipcode Binding Protein 1* (ZBP1). Esta proteína presenta dos motivos de reconocimiento al ARN (RRMs) y cuatro motivos homólogos a hnRNP K (dominio KH) (Yaniv & Yisraeli 2002; Bassell & Kelic 2004). Se ha descrito que la ZBP1 reconoce un *zipcode* en el 3' UTR del mensajero de la β -actina (Ross et al. 1997), regulando la localización de este mensajero en la periferia celular de los fibroblastos (Farina et al.

2003). Estudios posteriores analizaron los blancos del homólogo de ZBP1 en humanos (IMP1) en cultivos de células embrionarias de riñón (HEK 293), encontrándose más de 250 transcritos distintos que co-inmunoprecipitan con esta proteína. Los resultados muestran que las RNPs que contienen a IMP1 exhiben una sobrerepresentación de transcritos involucrados en la secreción y metabolismo de proteínas (Jønson et al. 2007). En fibroblastos, se observó que los filamentos de actina son utilizados para localizar las partículas que contienen a ZBP1 y el mensajero de la β -actina. Por otro lado, en neuronas se observó que ZBP1 y el mensajero de la β -actina se mueven predominantemente sobre los microtúbulos (Bassell & Kelic 2004). Con estos resultados y teniendo en cuenta la hipótesis de que la localización de las cargas se lleva a cabo en dos pasos (en los cuales se requieren la participación tanto de quinesinas como de miosinas) (Muslimov et al. 2002), se plantea que ZBP1 pueda actuar como adaptador entre los ARNm y los motores moleculares asociado tanto a microtúbulos como a actina (Kindler et al. 2005). Utilizando hibridación *in situ* y microscopia láser confocal se demostró que el ARN codificante para la β -actina se encuentra localizado preferentemente en las PARPs, así como también la ZBP1 (Sotelo-Silveira et al. 2008).

Otra de las proteínas de unión al ARN de la cual está aceptado su rol en la localización de ARNm es Staufen 2 (Stau2) (Tang et al. 2001; Duchaîne et al. 2002; Monshausen et al. 2004; Jeong et al. 2007). En 2010, Maher-Laporte y DesGroseillers identificaron los ARNm unidos a Stau2 mediante la inmunoprecipitación de RNPs que contienen a Stau2 y analizando los ARNm que co-inmunoprecipitan mediante microarreglos. Este estudio se llevó a cabo en cerebro de embriones de ratas, identificándose 1780 mensajeros distintos que están enriquecidos por lo menos 8 veces en las inmunoprecipitaciones de Stau2 respecto al control (Maher-Laporte & DesGroseillers 2010; Maher-Laporte et al. 2010).

Estrategias experimentales para el estudio del transcriptoma axonal

Hoy en día existen varias estrategias experimentales que permiten obtener el citoplasma del axón (axoplasma) con una relativamente baja contaminación de componentes de otras células, lo cual permite analizar el transcriptoma axonal.

Una de estas estrategias es la utilización de cámaras compartimentalizadas o cámaras Campenot (Campenot 1977). Estas cámaras permiten, después de un determinado tiempo en cultivo, obtener axones libres de soma neuronal y otros tipos de células. Esta estrategia ya fue utilizada por los grupos de Cotman (Taylor et al. 2009), Holt (Zivraj et al. 2010) y Fawcett (Gumy et al. 2011) para obtener el material axoplásmico a partir del cual realizaron la caracterización de los ARNm presentes en dicho compartimiento celular mediante microarreglos.

Otra estrategia es la extrusión del material axoplásmico mediante el homogeneizado de los nervios en soluciones hipotónicas. Este procedimiento fue desarrollada por el grupo de Fainzilber para el caso de nervios de mamíferos (Rishal, Michaelievski, et al. 2010; Rishal, Rozenbaum, et al. 2010), los cuales probaron que las preparaciones no poseían contaminación glial. Con dicho material se procedió a la caracterización de las proteínas presentes en este compartimiento mediante espectrometría de masas (Rishal, Michaelievski, et al. 2010; Rishal, Rozenbaum, et al. 2010).

La otra estrategia disponible es la desarrollada originalmente por Koenig (Koenig 1979). Esta técnica de micro-disección permite observar axones *in toto* sin su envoltura miélnica a nivel de microscopía fotónica, así como observar mediante métodos micro-analíticos la presencia de ARNs en el axón (Koenig 1979). A partir de la micro-disección de los axones, se realizaron estudios de los ARNm presentes en dicho compartimiento

celular por RT-PCR. De este modo, se confirmó la expresión axonal de la β -actina (tanto por RT-PCR como por FISH) (Sotelo-Silveira et al. 2008), y además, se generaron mini genotecas de genes expresados (Expressed Sequences Tags, EST) provenientes de ARNm axonales (Sotelo-Silveira 2003). Utilizando hibridización *in situ* y microscopía laser confocal se demostró que el ARN codificante para la β -actina se encuentra localizado preferentemente en los dominios periaxoplásmicos (Sotelo-Silveira et al. 2008).

Las estrategias desarrolladas por Fainzilber y Koenig trabajan directamente con material proveniente de animales, sin tener que pasar por un período en cultivo. Este hecho permite conocer de una manera más clara cual es el transcriptoma de axones adultos, y no de aquellos en regeneración (crecimiento).

Transcriptoma de axones

Recientemente, a partir de cultivos (tanto en cámaras compartimentalizadas como de explantos de órganos), en algunos casos asociados a micro-disección con captura láser, combinados con análisis de expresión génica por microarreglos o secuenciación masiva, se ha caracterizado el transcriptoma de axones y conos de crecimiento derivados de diversas neuronas en distintas etapas y de distintas especies en condiciones regenerantes (Taylor et al. 2009; Zivraj et al. 2010; Gumy et al. 2011; Minis et al. 2014). En lo que respecta a neuronas del SNP, en el trabajo de Gumy y colaboradores (2011) se analizó el transcriptoma de axones embrionarios (embriones en estadio E16) y de adultos (animales de 3-5 meses) mediante cultivos en cámaras compartimentalizadas y microarreglos. En el mismo se reporta que el número de ARNm encontrados en los axones eran significativamente más altos que los descritos hasta ese momento en otras preparaciones (Willis et al. 2005; Taylor et al. 2009). En ambas etapas, la complejidad de

transcriptos fue similar, encontrándose un gran número (1400 aproximadamente) presentes en los dos estadios estudiados (embrionario y adulto), de los cuales la mayoría correspondía a las categorías de síntesis proteica y mitocondriales (Gumy et al. 2011). En el trabajo de Zivraj y colaboradores (2010), el 54% de los transcriptos encontrados en los conos de crecimiento de *Xenopus*, también fueron encontrados en los conos de crecimientos de neuronas sensoriales de ratón, siendo también la síntesis local la mayor categoría funcional identificada para las dos especies (Zivraj et al. 2010).

En el trabajo de Minis y colaboradores se caracterizó por primera vez el transcriptoma de axones periféricos regenerantes (en crecimiento en cultivos) de ratón mediante secuenciación masiva (Minis et al. 2014). En este caso se realizaron cultivos de neuronas sensoriales de ganglios de la raíz dorsal (DRG) de embriones de ratón durante 48 horas. En este trabajo, se describen más de 6000 genes presentes en el axón, encontrándose dentro de esta lista más de un 80% de los genes encontrados por Gumy y colaboradores en axones embrionarios de rata. Se puede notar que la mayor sensibilidad de detección de la secuenciación masiva con respecto a los microarreglos permite identificar más del doble de genes localizados dentro del axón.

En todos los trabajos realizados hasta el momento se analizaron transcriptomas de axones regenerantes, ya que en todos los casos las neuronas pasaron por un período de cultivo para así permitir el crecimiento de los axones sin contaminantes de otras células.

En la presente tesis se buscó caracterizar el transcriptoma de axones adultos mielínicos, utilizando como estrategias experimentales la micro-disección de axones *in toto* (desarrollada originalmente por Koenig en 1979) y la secuenciación masiva de los ARNm obtenidos de dicha muestra. De esta manera se pretendió obtener una visión más ajustada a la realidad sobre el transcriptoma de axones.

III. Hipótesis de trabajo

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años se ha avanzado mucho con respecto a caracterizar el transcriptoma de axones periféricos. Sin embargo, en todos los trabajos realizados hasta el momento se analizaron axones en cultivo, por lo tanto en condiciones regenerantes e inmaduras, tanto de embriones como de individuos adultos. En el presente estudio se buscó caracterizar el transcriptoma de axones mielínicos adultos provenientes de raíces ventrales. Adicionalmente se analizó el transcriptoma de las raíces ventrales normales, así como también el de raíces ventrales lesionadas.

La hipótesis de trabajo de la presente tesis es que *el axoplasma de neuronas adultas y mielinizadas contiene ARN mensajeros que son utilizados en la síntesis local de proteínas axonales, y que dicho transcriptoma debería ser menos complejo al de axones en crecimiento. Por otro lado, esperamos encontrar una expresión diferencial de genes entre el transcriptoma de raíces ventrales normales y lesionadas, dentro de los cuales se encuentren ARNm relacionados a la regeneración axonal.*

IV. Objetivos

Objetivo general

El presente proyecto tiene como objetivo general caracterizar el transcriptoma de axones miélnicos adultos.

Objetivos específicos:

1. Optimización y puesta a punto de la técnica de micro-disección para obtener ARNs proveniente de axoplasmas para su posterior secuenciación.
2. Obtención del transcriptoma de axones miélnicos de ratas adultas mediante micro-disección y secuenciación masiva, así como también el de raíces ventrales normales y lesionadas.
3. Análisis del significado biológico de los ARNs encontrados en el axoplasma (estudio de la ontología).
4. Análisis comparativo del transcriptoma axonal, el transcriptoma de lesión de la raíz ventral y transcriptomas axonales previamente descritos.
5. Análisis de expresión diferencial de los transcriptomas de raíces ventrales normales y lesionadas. Análisis del significado biológico de los ARNm expresados diferencialmente.

V. Materiales y métodos

Animales de experimentación

Los animales utilizados en este estudio fueron obtenidos del Bioterio de Roedores del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), los cuales fueron ratas de la cepa *Sprague Dawley*.

Toda cirugía se realizó bajo anestesia administrada intraperitonealmente, utilizando ketamina (40-90 mg/kg) y xilacina (5-10 mg/kg), con administración oral de analgésicos (ácido acetil salicílico y ketoprofeno) previo y posteriormente a la realización de las mismas.

Todas las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación (bajo anestesia).

El protocolo de experimentación fue aprobado por la Comisión de Bioética del IIBCE, con fecha 15 de setiembre de 2011.

Obtención de las muestras

Raíces ventrales normales y lesionadas. Con el objetivo de obtener raíces ventrales que dan origen al nervio ciático, se disecó la médula espinal de una rata de 6 meses de edad. Una vez identificadas las raíces ventrales a la altura de la vértebra L5 (las cuales darán origen, junto con las de L4 y L6 al nervio ciático), se tomó 10 mm de raíces de ambos lados. Para el caso de las raíces ventrales lesionadas, se realizó una laminectomía a la altura de la vértebra L5 y se expuso la zona para realizar un corte de las raíces nerviosas (ambos lados) con tijera. Dicho corte se efectuó dentro de la cavidad raquídea, próximo (5 mm) a la salida de la raíz a través del foramen intervertebral. Se suturó la herida y se dejó

transcurrir 24 horas antes de su disección (Sotelo-Silveira et al., 2008; Koenig, 1975). Se tomaron como muestra 10 mm de raíces lesionadas proximales al sitio de corte (conectadas al soma), de ambos lados. Las muestras se almacenaron a -80°C en TRI Reagent (Sigma).

Micro-disección de axoplasmas de raíces ventrales. Se utilizaron un total de 12 ratas adultas de 6 meses de edad aproximadamente (con peso entre 400 y 500 g). Se disecó la médula espinal de los animales, identificando las raíces ventrales a la altura de la vertebra lumbar L5. Se extrajeron esas raíces, las cuales fueron suspendidas en una solución salina modificada de gluconato libre de calcio (Koenig & Martin, 1996), conteniendo (en mM) 132 gluconato de sodio, 5 KCL, 20 HEPES, 10 glucosa, 3.5 MgSO₄, y 2 EGTA, a un pH de 7.2, almacenada a 4°C. Las raíces fueron seccionadas en porciones de aproximadamente 5 mm, y luego inmersas en una solución de Acetato de Zinc a 30mM, 0.1 M de N-tris[hydroxyethyl]methylglycine (Tricine; Sigma), y 0.1 M N,N-bis[hydroxyethyl]-2-aminoethane-sufonic acid (Bes; Sigma), a un pH de 4.8, por 10 minutos. Luego, las raíces fueron transferidas a una placa de cultivo de plástico de 35 mm conteniendo un cubreobjetos tratado con 1% 3-aminopropyltriethoxysilane (Polysciences) en etanol y 2 ml de solución de “pulling” a un pH de 5.5., con una concentración de ácido aspártico de 40 mM, neutralizado por tris base. La solución de “pulling” contiene una concentración apropiada de aspartato y tris base de una solución stock, 50 mM Bes, y 5 mM Mg-acetate, pH 5.5. La solución de stock contiene 0.2 M de ácido aspártico (Sigma), 0.22 de tris base (free base), 5 mM NaN₃, y 0.1% Tween 20 (Bio-Rad), pH de 5.5, y es almacenada a 4°C. Los axoplasmas extraídos fueron lavados en la solución “pulling”. En primer lugar se formaron cordones de axones de acuerdo con el método presentado por Koenig y colaboradores (Koenig et al. 2000). Esto se logra al trasladar parcialmente los

axones fuera de la solución manteniendo un extremo de los mismos inmerso en la solución favoreciendo que los axoplasmas se agrupen torneándose entre sí. Estos cordones fueron adheridos al cubreobjetos con la ayuda de la herramienta “pestaña” (la cual consiste en una pestaña montada en la punta de una pipeta Pasteur de vidrio). Una vez obtenidos los axoplasmas, se procedió a eliminar, utilizando bisturí, los extremos de estos cordones, ya que contienen tejido derivado de la raíz completa. Posteriormente, se efectuaron dos lavados con solución de pulling. Mediante la utilización de la “pestaña” se procedió a despegar los axoplasmas del cubreobjetos. Se unieron todos los paquetes de axoplasmas extraídos, y se los guardó en 20 ul de solución de pulling (en tapa de un tubo eppendorf) a -80°C hasta el momento de la extracción de ARN. En el momento de la extracción de ARN se combinaron diferentes extractos axonales provenientes de tres animales. En total, una muestra de axoplasma generalmente está compuesta por 75 cordones provenientes de 3 animales diferentes (cada cordón contiene aproximadamente 30 axones de 4mm de largo).

Extracción de ARN

Raíces normales y lesionadas. La extracción de ARN de las raíces normales y lesionadas se llevó a cabo mediante la utilización de Trizol (Life Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el homogeneizado de las muestras se utilizaron homogenizadores de teflón, debidamente tratados para la extracción de ARN (pre-tratamiento con Diethyl pyrocarbonate (Sigma) para eliminar RNAsas). Una vez obtenido el ARN, se procedió a realizar otra ronda de extracción, en este caso con el kit RNAqueous®-Micro Kit (Ambion). Durante esta segunda extracción se realizó el tratamiento con Dnasa (incluida en este kit).

Axoplasmas. El ARN del pool de axoplasmas se extrajo mediante la utilización de kit RNAqueous®-Micro Kit (Ambion). Este kit es especialmente diseñado para la extracción de ARN a partir de micro-muestras, incluyendo muestras de tejido menores a 10 mg o micro-disección de tejido mediante captura láser. Nuestras muestras se encontraban en el rango de una fracción del milímetro cúbico. En este caso se realizaron algunas modificaciones al protocolo sugerido: i) se utilizó el componente para muestras de micro-disección de captura láser (LMC), lo cual mejora la extracción para muestras con poco ARN, ii) en el tratamiento con Dnasas, se modificó el tiempo de incubación con la misma de 20 a 10 minutos.

Amplificación lineal de ARN

Amplificación. Todas las muestras de ARN obtenidas, ya sea de axoplasmas o raíces ventrales normales o lesionadas, fueron amplificadas utilizando el kit Ovation RNA-Seq System V2 (NuGEN). Este sistema cuenta con la tecnología Ribo-SPIA^(R), la cual es capaz de amplificar ADNc a partir de 500 pg de ARN total. Brevemente, la amplificación es iniciada en el extremo 3' así como también al azar a lo largo de todo el transcripto, generándose moléculas híbridas de ADNc/ARNm, las cuales contienen una secuencia única (adicionada artificialmente en el procedimiento) en el extremo 5' de la cadena de ADNc. Seguidamente, se fragmenta el ARNm dentro del complejo ADNc/ARNm, creando sitios para que la ADN polimerasa sintetice la segunda cadena del ADNc. El resultado es una doble cadena de ADNc con un único heteroduplex ADN/ARN en uno de los extremos. Por último se realiza la amplificación mediante la tecnología SPIA. Ésta utiliza cebadores quiméricos de ADN/ARN, una ADN polimerasa y una ARNasa H, la cual degrada el ARN del heteroduplex en el extremo 5'. Esto expone la secuencia de ADN para que se hibriden

los cebadores SPIA. La ADN polimerasa inicia la replicación desde el extremo 3' del cebador. Los tamaños de los productos de ADN obtenidos se encuentran entre 200 pb y 1500 pb.

Cuantificación y control del tamaño de los fragmentos obtenidos. Una vez obtenidas las muestras amplificadas se procedió a cuantificarlas y realizar controles de calidad de las mismas, antes de comenzar a preparar las bibliotecas para la secuenciación. Se cuantificó la cantidad de ADNc obtenido luego de la amplificación utilizando el kit dsDNA HS® (Invitrogen) y el fluorímetro Qubit (Invitrogen). Para el control del tamaño de los fragmentos obtenidos, se analizó un microlitro de cada muestra en el 2100 Bioanalyzer (Agilent) (el cual realiza electroforesis capilar de alta sensibilidad), con el kit High Sensitivity DNA (Agilent).

Control de calidad de las muestras de axoplasma

Luego de la amplificación se realizaron cuantificaciones de ARNm marcadores específicos del compartimiento axonal (neurofilamento liviano (Nefl), mediano (Nefm) y pesado (Nefh)) (Figura 1) (Sotelo-Silveira et al. 2000; Zivraj et al. 2010; Gumy et al. 2011; Minis et al. 2014), así como también del compartimiento mielínico (*Periheral myelin protein 22* (Pmp22), *Myelin-Associated Glycoprotein* (MAG) y *Myelin Basic Protein* (MBP)) tanto en la Raíz Ventral Normal como en el axoplasma. Los criterios utilizados para la elección de los marcadores gliales fue la siguiente: los marcadores del compartimiento mielínico son mensajeros que son transportados hacia i) la mielina laxa (Pmp22 y MAG), o ii) la mielina compacta (MBP) (Griffiths et al. 1989; Gould et al. 2000; Müller et al. 2013) (Figura 1). De esta manera, se cuantificó de forma relativa los mensajeros de los

distintos compartimientos para evaluar si, con la técnica de micro-disección, la muestra de axoplasma se enriquecía en marcadores axonales, y disminuía la cantidad relativa de marcadores gliales. Con estos datos se tomó la decisión de cuál muestra de axoplasma (de un total de 4) poseía una mejor relación entre marcadores axonales/gliales, para proceder a su secuenciación. Los cebadores utilizados para dichas cuantificaciones se presentan en la Tabla 1.

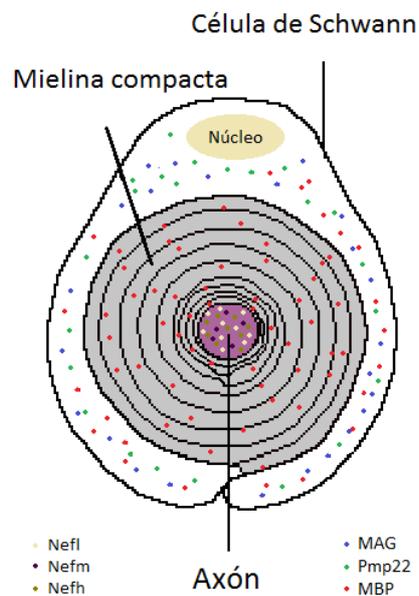


Figura 1. Esquema de localización de mensajeros marcadores gliales dentro de la Célula de Schwann y marcadores neuronales dentro del axón, en un corte transversal de axón mielinizado. Los mensajeros de MAG (azul) y Pmp22 (verde) se localizan en el citoplasma de la Célula de Schwann, mientras que el mensajero de la MBP (rojo) se transporta hacia la mielina compacta. Los mensajeros de los neurofilamentos (Nefl, Nefm y Nefh) se localizan en el axón.

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para la cuantificación de marcadores gliales y axonales

Gen	Cebador F	Cebador R
Mag	GTGGAGCTGAGCGTCATGTAT	GTGGAACACAGGATGGAGACTG
Pmp22	GAATTCCTGTTCTGTTCTTCTGCCAGCTC	AAGCTTGTAGATGGCCGCTGCACTCATC
Mbp	ACGGACACCCTTTCAAGTTCAC	GTGCCTGTCTATCCGCAGTG
Nefl	CCGGTTCTTCTCTCTAGGTCCC	GTAGGAGGTGCGAAAAGTACGGC
Nefm	AGTCGAGGCCCCCAAGCTCA	CAGAGGCTGCCAATTCCTCTGC
Nefh	CCTAAGCAATGGCCCAGAG	CCTCAAGCTGCCTCACCTTA

Secuenciación masiva

La secuenciación se llevó a cabo en el Plataforma de Secuenciación del IIBCE, utilizando la tecnología Ion Torrent. Esta tecnología es una plataforma de análisis genómico que permite la secuenciación masiva y en paralelo de fragmentos de ADN basada en el cambio de pH que produce la liberación de protones al incorporarse una base a la hebra de ADN que se está sintetizando.

Para llevar a cabo la secuenciación de las muestras, se colaboró en la instalación y puesta a punto del equipo. Previo a la realización de experimentos relacionados a esta tesis, colaboré activamente en la puesta a punto de diferentes protocolos de secuenciación, por ejemplo secuenciado de genomas bacterianos, amplicones y microARNs. Esta experiencia fue de gran utilidad para realizar con precisión el secuenciado de las muestras de la presente tesis.

Bibliotecas. Para la preparación de las bibliotecas de ADN se utilizó el kit Ion Xpress™ Plus Fragment (Ion Torrent), así como también el kit Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 (Ion Torrent). Brevemente, el proceso de generación de bibliotecas consiste en los

siguientes pasos: fragmentación enzimática, ligación de adaptadores (con código de barra o barcode para la identificación de las muestras), y selección de los fragmentos de tamaño deseado. Para todas las purificaciones se utilizaron las perlas magnéticas Agencourt XP AMPure (Beckman). Para la selección de fragmentos del tamaño deseado se utilizó el Pippin Prep (Sage Science). Para llevar a todas las bibliotecas a la concentración necesaria para el PCR de emulsión se utilizó el kit Ion Library Equalizer kit (Ion Torrent), el cual mediante unos ciclos de PCR (en este caso 8 ciclos) amplifica la biblioteca. Posteriormente, se realiza una purificación con unas perlas magnéticas, las cuales tienen un tope de capacidad de unión de ADN. De esta manera, se logra llevar la biblioteca a una determinada concentración (100 pM).

Para el paso de fragmentación, se realizaron pruebas del tiempo de fragmentación necesario para obtener fragmentos de aproximadamente 200pb. Se fragmentó una muestra (raíz ventral normal) durante 5, 10, 20 y 30 minutos, y se verificaron los tamaños obtenidos mediante el 2100 Bioanalyzer. Una vez decidido el tiempo de fragmentación se procedió a preparar las bibliotecas de las tres muestras.

PCR de emulsión. Se combinaron las bibliotecas (igual volumen de cada una, 20 uL) y se realizó una dilución (2 uL de las bibliotecas combinadas con 23 uL de agua) para llevar la concentración aproximada de 26 pM finales. Se utilizó el kit Ion PGM Template OT2 200 kit (Ion Torrent), el cual realiza el PCR de emulsión, en el sistema de termociclado One Touch 2 (Ion Torrent). Posteriormente, se cuantificó el porcentaje de perlas con molde amplificado con respecto al total, mediante la utilización del kit Ion Sphere Quality Control kit (Ion Torrent) y el fluorímetro Qubit. Si el porcentaje de perlas con molde se encuentra entre 10-30%, se procede al paso de enriquecimiento, en donde se seleccionan sólo aquellas perlas que poseen molde inserto entre adaptadores. Para esto se utilizó el kit Ion

PGM Template OT2 200 kit (Ion Torrent) y el equipo de enriquecimiento One Touch ES (Ion Torrent).

Secuenciación. Para la secuenciación se utilizó el kit Ion PGM 200 Sequencing kit v2 (Ion Torrent), y los chips Ion 318 Chip v2 (Ion Torrent) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizaron 500 flujos para lograr secuencias de hasta 200 pares de bases. La secuenciación se llevó a cabo en el Ion PGM Sequencer asociado al servidor PGM Torrent Server (Ion Torrent). Se configuró la salida para obtener los datos procesados sin adaptadores y en formato Fastq.

Análisis de resultados de secuenciación

Se realizó un análisis preliminar de las secuencias obtenidas utilizando el software de Ion Torrent Server (Torrent Suite), focalizado principalmente en un análisis de calidad de las secuencias.

Posteriormente se utilizaron los programas libres *sickle* (Joshi & Fass 2011) para realizar el recorte (*trimming*) por calidad de las secuencias, y el *fastqc* (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>) para evaluar los parámetros de calidad de las mismas. El indexado del genoma y alineamiento de las lecturas contra el genoma de *Rattus norvegicus* (GCA_000001895.3) se realizó mediante el programa *bowtie2* (Langmead & Salzberg 2012), con la opción de alineamiento local (*--sensitive-local*).

Para obtener tablas con el número de lecturas que alinearon en cada gen para cada una de las tres muestras se utilizó el programa HTSeq (*htseq-count*) (Anders et al. 2014). Los análisis de expresión diferencial de genes en las distintas muestras se

realizaron utilizando el programa DESeq (Anders & Huber 2010) en la plataforma R. De esta manera se obtuvieron listas de genes con sus valores de expresión para las tres muestras (Figura 2).

Análisis funcional de los ARN identificados mediante estudios de ontología

Para realizar el estudio de la ontología de los genes presentes en las diferentes listas analizadas, se utilizó el programa online *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)* v6.7 ((Huang et al. 2009a; Huang et al. 2009b); <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Los análisis de redes de interacciones y funcionales fueron generados a través del uso de la herramienta *Ingenuity* de QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis (IPA® , QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity).

Del análisis de ontología realizado en la plataforma de *DAVID*, se analizaron las primeras 10 categorías (ordenadas en forma descendente según el número de genes) de cada uno de los tres dominio ontológicos (Procesos Biológicos, Componentes Celulares y Función Molecular). En cada caso se reporta el EASE Score asociado a cada análisis de enriquecimiento (ver Test EASE Score en próxima sección).

Cuando se analizaron vías canónicas y redes de interacción de proteínas (codificadas por los ARNs presentes en las listas de estudio) se utilizó el programa *Ingenuity*, reportándose el p-valor asociado al test de Fisher.

Comparaciones de listas

Test EASE Score. Para todas las comparaciones de listas realizadas, se utilizó el test estadístico EASE Score (Huang et al. 2009a; Huang et al. 2009b) para evaluar si la lista

obtenida tienen conjuntos de genes enriquecidos en genes asociados a una determinada vía. El EASE Score es una modificación del Test Exacto de Fisher, que lo vuelve más conservador. Para realizar este test, se construye una tabla de contingencia (Tabla 2), donde se colocan cuántos genes de la lista de interés están asociados a la vía (valor a), y cuantos no (valor c). Por otro lado, se utiliza el número total de genes asociados a la vía presentes en el genoma en estudio (valor b) y los genes del genoma no asociados a la vía (valor d) (Tabla 2).

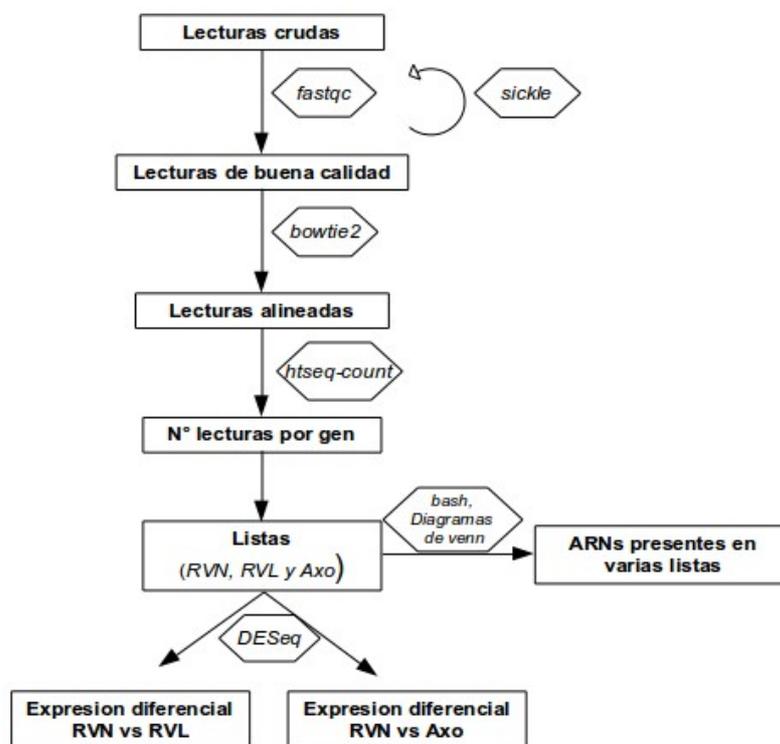


Figura 2. Diagrama de flujo ilustrando el procedimiento de análisis de secuencias llevado a cabo

El Test exacto de Fisher se basa en evaluar la probabilidad asociada a cada una de las tablas 2x2 que se pueden formar manteniendo los mismos totales de filas y columnas (a+b y c+d, respectivamente) que los de la tabla observada. Cada una de estas probabilidades se obtiene bajo la hipótesis nula de independencia de las dos variables

que se están considerando. La probabilidad exacta de observar un conjunto concreto de frecuencias a, b, c y d en una tabla 2x2 cuando se asume independencia y los totales de las filas y las columnas se consideran fijos viene dada por la distribución hipergeométrica:

$$p = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{a! b! c! d! n!}$$

En el caso de la modificación del Test de Fisher (EASE Score), se logra ser más conservador restando un conteo en los genes de mi lista asociados a la vía (valor a-1).

Tabla 2. Tabla de contingencia para el cálculo de enriquecimiento de genes asociados a una vía en una lista

	Genes asociados a la vía	Genes no asociados a la vía	Total fila
Genes lista de interés	a (a-1)	c	a + c
Genoma	b	d	b + d
Total columna	a + b	c + d	n (a + b + c + d)

ARNm axonales. Luego de obtenida la lista de ARNm presentes en el axoplasma se procedió a compararla con la de los ARNm axonales de axones inmaduros cultivados *in vitro* obtenidas por trabajos anteriores (Zivraj et al. 2010; Gummy et al. 2011; Minis et al. 2014). Para lograr este objetivo se utilizaron comandos (grep, wc, awk, cat, etc) del *bash de linux* para la cruce de datos. Los resultados se visualizaron mediante Diagramas de Venn (realizados en la plataforma R). De la lista de mensajeros que cumplen con ser axonales en los tres trabajos mencionados y en la presente tesis se eligieron representantes para realizar la confirmación de la presencia y el nivel de expresión relativo mediante PCR en Tiempo Real en las muestras estudiadas. Además, estos ARNm

seleccionados también se asocian al motor molecular de ARN Miosina Va (Calliari, Farias et al. 2014)

Transporte de ARNm. Con el fin de identificar cuáles de los mensajeros presentes en las preparaciones axonales podrían estar asociados a proteínas de unión al ARN o motoras, se utilizaron las listas de genes que inmunoprecipitan junto a IMP1/ZBP1 (Jønson et al. 2007), Stau2 (Maher-Laporte et al. 2010a; Maher-Laporte & DesGroseillers 2010b) y MyoVa (Calliari, Farias et al. 2014), y se las cruzó con la lista de ARNm axonales. Para evaluar el enriquecimiento de la lista axonal con respecto a los mensajeros asociados a las distintas proteínas se realizó el EASE Score (en la plataforma R).

Proteínas mitocondriales. Para lograr identificar cuántos y cuales ARNs presentes en la muestra de axoplasma codifican para proteínas mitocondriales, se utilizó la información disponible en la base de datos MitoCarta (Pagliarini et al. 2008). También se analizó si esos ARNm eran codificados por el genoma nuclear o por el genoma mitocondrial.

Confirmación de resultados obtenidos por RNA-Seq mediante qPCR

Se diseñaron cebadores para algunos de los genes que se encontraron presentes en el axoplasma, así como también para aquellos que se expresan diferencialmente en la raíz normal y lesionada. Para la amplificación se utilizó el Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Division de Corbett Life Science) y el kit SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems®). En la Tabla 3 se presentan los cebadores utilizados para cada gen.

Tabla 3. Secuencia de cebadores utilizados para la confirmación de resultados

Gen	Nombre	Cebador F	Cebador R
Cytb	Cytocrome b	GTCACCCACATCTGCCGAGACG	ATTGAGGCGCCGTTGGCGTG
Eef1g	Eukaryotic translation elongation factor 1 γ	CTGAGTACCGCTTCCCTGAA	CTGAGTACCGCTTCCCTGAA
Rnf139	Ring finger protein 139	ACGTCTGCTCGGATTACACC	TCTTGAATGTACAGCCATTTCC
Cpeb4	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4	CCAACCATCAAGGATAAACCA	ATATCGTTTTCCGTGGGTCA
Actb	β -actin	TATGTTGCCCTAGACTTCGAGC	CAGCTCATAGCTCTTCTCCAGG
Eif3e	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E	TTATTCTGATGATATCCCTCATGC	TGGATCTTCAAACATCTTCACG

VI. Resultados

Optimización y puesta a punto de la técnica de micro-disección

Con el objetivo de comenzar a caracterizar el transcriptoma de axones miélinicos adultos mediante micro-disección y secuenciación masiva, se optimizó la técnica de extracción del citoplasma axonal desarrollada originalmente por Koenig en 1979 (Koenig 1979) y modificada para aislar cordones axonales (Koenig et al. 2000). Para ello, se modificó la técnica de preparación de cordones axonales, agregando pasos que mejoraran la disminución de remanentes gliales. Dichos pasos fueron: lavados de los axoplasmas antes de la fijación al cubreobjetos, incremento de lavado por traslado de cordones fuera de la solución de pulling; remoción del trozo de tejido remanente en la punta del cordón, y lavados de los axoplasmas previo al despegado de los mismos del cubreobjetos. Una vez puesto a punto este procedimiento y con suficiente entrenamiento en micro-disección, se realizaron 4 preparaciones axonales a partir de 3 animales diferentes en las que estimamos se colectaron aproximadamente 2000 fragmentos axonales (de 4 mm de longitud) por preparación (ver material y métodos).

Extracción de ARN y amplificación lineal

La extracción de ARN a partir de las muestras de raíces ventrales no presentó ningún inconveniente, registrándose rendimientos cuantificables de ARN por fluorimetría (rango de nanogramos/ul). En cambio, el ARN aislado de los cordones axonales (ver materiales y métodos) no fue cuantificable por los métodos convencionales. Esto implica que se obtuvieron cantidades menores a 250 picogramos/ul de ARN axonal. Este molde

tampoco fue útil para evaluar ARNm por qRT-PCR de alta sensibilidad. Sin embargo, estas cantidades fueron suficientes para permitir la amplificación lineal del ARN contenido en el extracto axonal, de forma que se pudo preparar bibliotecas para secuenciar y realizar controles de calidad previos a la misma.

Control de pureza de las muestras de axoplasma: evaluación por qPCR

Utilizando el cDNA amplificado se procedió a realizar el control de pureza de las muestras de axoplasmas mediante PCR en Tiempo Real (qPCR), midiendo los niveles de expresión relativos de marcadores del compartimiento axonal y mielínico con respecto a la muestra de Raíz Ventral Normal (Figura 3).

En la Figura 3A se puede observar el “Fold Change” (expresado como la substracción de los Ct obtenidos para axoplasma y RVN) de cada mensajero evaluado en las cuatro muestras de axoplasmas (Axo). De esta manera se verificó cómo disminuían los marcadores gliales (mensajeros de Pmp22 y MBP), y aumentaban los marcadores axonales (mensajeros de Nefl y Nefm) en todas las muestras de axoplasma. Para el caso de MAG, el mensajero no fue detectado en ninguna de las muestras de Axoplasma, mientras que el mensajero de Nefh, no fue detectado en las muestras de RVN (se marca con * en Figura 3A). Para estos dos mensajeros, se grafica en la Figura 3B la cantidad relativa de cada uno. De las cuatro muestras de axoplasmas que se procesaron, se decidió seguir adelante con la muestra Axoplasma 4 (Axo 4), ya que presentaba la mejor relación entre los marcadores gliales y los neuronales. De la cantidad original que había en las muestras de raíces, en la muestra de axoplasma quedó un remanente aproximado de 1% de Pmp22 y 15% de MBP. Por el contrario, los neurofilamentos liviano (Nefl) y mediano (Nefm) aumentaron más de 50 veces.

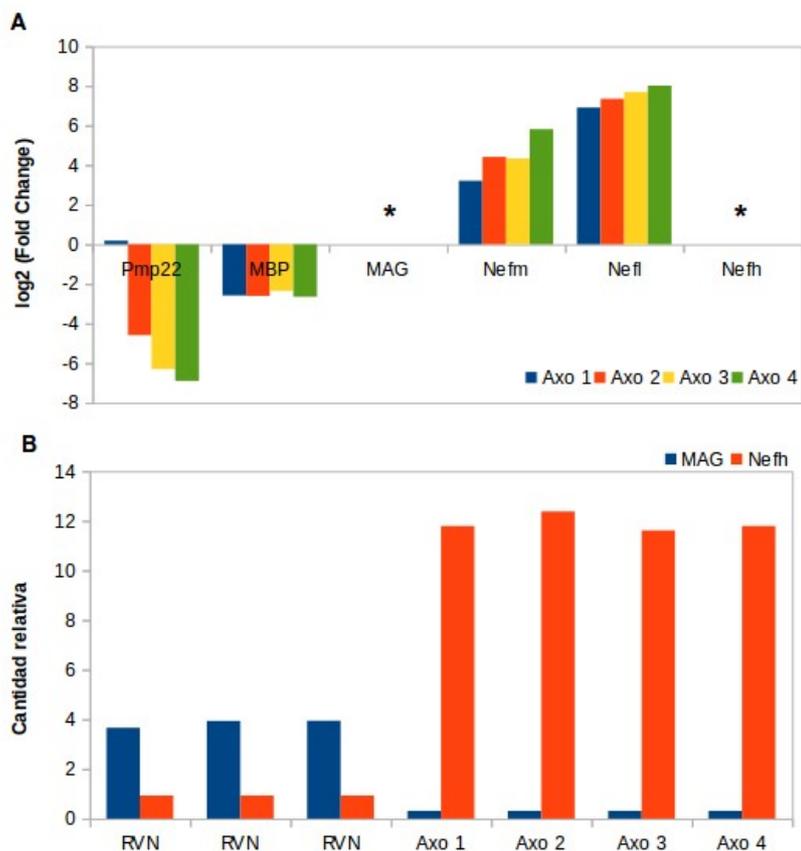


Figura 3. Enriquecimiento en marcadores axonales, y disminución de marcadores gliales en muestras de axoplasmas. **A.** Se muestra el Fold Change (log en base 2) de las cuatro muestras de axoplasma analizadas con respecto a las RVN. **B.** Cantidad relativa de mensajeros de Nefh y MAG, los cuales no pudieron ser detectados en la muestra de RVN y axoplasma, respectivamente. Marcadores axonales: mensajeros codificantes de Nefl, Nefm y Nefh. Marcadores gliales: mensajeros codificantes para MAG. Pmp22 y MBP.

Evaluación de calidad de muestras a secuenciar

Para evaluar la calidad y cantidad del ADNc obtenido luego de la amplificación de las muestras a secuenciar, se utilizó electroforesis capilar de alta sensibilidad en el 2100 Bioanalyzer. En la Figura 4 se observa el gel virtual generado por el Bioanalyzer (Figura 4A), y la superposición de los electroferogramas para las tres muestras (Figura 4B).

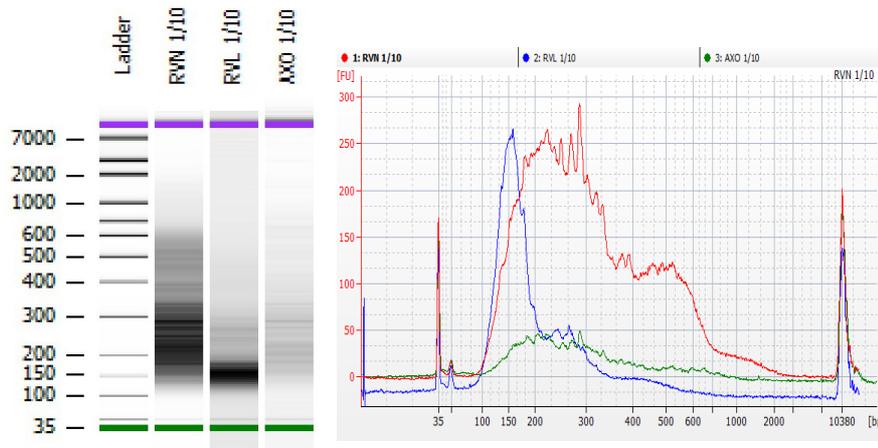


Figura 4. Perfiles de tamaños de los fragmentos de las muestras a secuenciar. Resultado del análisis de una dilución (1/10) de las muestras amplificadas linealmente, por electroforesis capilar. **A.** Gel virtual. **B.** Electroferogramas superpuestos. RVN (Raíz Ventral Normal, rojo), RVL (Raíz Ventral lesionada, azul), Axo (Axoplasma, verde).

De esta manera pudimos evaluar la cantidad de ADNc que obtuvimos luego de la amplificación, y los tamaños de los fragmentos obtenidos para cada muestra. En la Figura 4B se observa que se obtuvieron mejores resultados en la muestra de RVN (rojo), con una distribución de fragmentos similar a lo esperado (de 200 pb a 1500 pb). En la muestra de RVL (azul) se obtuvieron fragmentos más pequeños que lo esperado, mientras que para la muestra de axoplasma (verde), los tamaños de los fragmentos están dentro de lo esperado pero, la cantidad de ADNc obtenido fue inferior a lo esperado. Dado que el mínimo recomendado para realizar la amplificación lineal es de 500pg de ARN total, pensamos que la falta de rendimiento en la muestra axonal se debe a que las cantidades de molde fueron inferiores a las requeridas. No obstante, dado el rango de tamaños de los productos generados, la amplificación funcionó correctamente (comparar perfil de amplificación de RVN con Axo en Figura 3).

Secuenciación a baja profundidad mediante la tecnología Ion Torrent

Para la construcción de las bibliotecas se realizaron pruebas para optimizar la fragmentación del ADNc y obtener fragmentos de 200 pb. Para ello, se fragmentaron enzimáticamente 100 ng de ADNc de la muestra de RVN durante 5, 10, 20 y 30 minutos. Luego, se purificaron las muestras y se corrieron en el Bioanalyzer 2100. En la Figura 5 se puede observar el gel virtual (5A) y los electroferogramas superpuestos de la muestra original (rojo) y los distintos tiempos de fragmentación (5B).

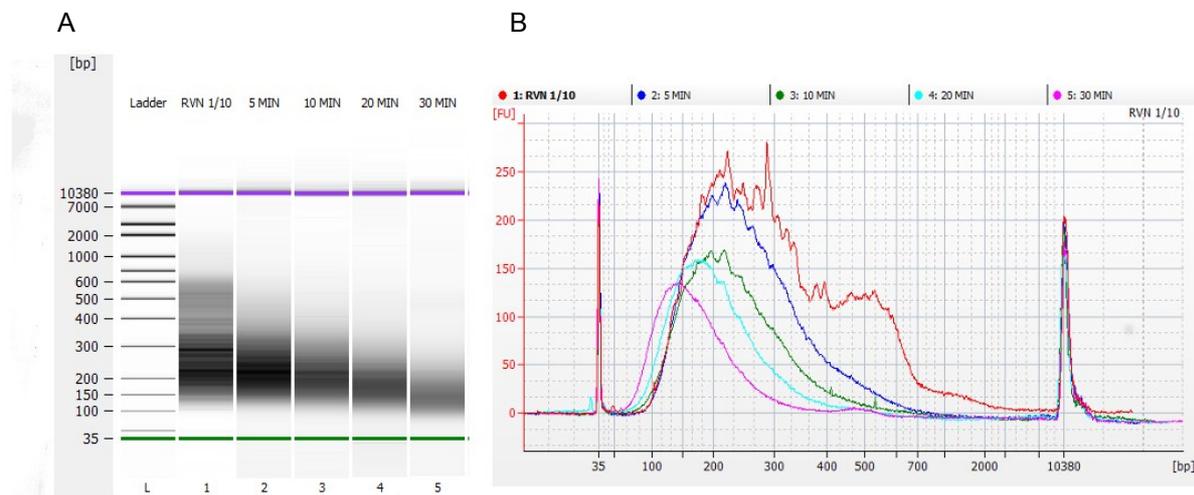


Figura 5. Resultados del Bioanalyzer de la muestra de RVN, y pruebas de distintos tiempos de fragmentación. A. Gel virtual. B. Electroferogramas solapados de la muestra RVN (Raíz Ventral Normal, rojo) y las pruebas de distintos tiempos de fragmentación, 5 (azul), 10 (verde), 20 (cyan) y 30 (violeta) minutos.

Observando los electroferogramas se puede constatar que la fragmentación durante 10 minutos (Figura 5B, verde) es la que genera fragmentos en promedio de 200 pb, que son los que se busca obtener para la generación de las bibliotecas. Por lo tanto, se prosigió a la preparación de las 3 bibliotecas, fragmentando las muestras durante este tiempo.

Una vez fragmentadas las muestras se ligaron los adaptadores (con barcode) y se

seleccionaron los fragmentos de interés (aquellos con un tamaño mayor a 250 pb) mediante electroforesis preparativa en gel de agarosa en el sistema Pippin prep.

Luego de combinadas las bibliotecas y llevarlas a la concentración adecuada, se realizó el PCR de emulsión. Posteriormente, se evaluó el porcentaje de perlas que poseían molde, siendo éste de 27%. El valor esperado debe estar entre 10-30%, por lo que se procedió al enriquecimiento de la muestra (seleccionando principalmente perlas con molde) para su posterior secuenciación.

Culminada la secuenciación se evaluó la calidad de la misma. En la Figura 6 se puede observar el reporte generado por el secuenciador, donde se informa el porcentaje de chip cargado, el total de lecturas obtenidas, y la media, mediana y moda del largo de las lecturas. Con esta información pudimos constatar que se sub-utilizó el chip, ya que se cargó en un 56% (siendo el promedio general obtenido en otras corridas de 80%). También se puede ver que ese 56% de chip cargado corresponde a 6.361.053 lecturas, de las cuales un 99% poseía biblioteca (por lo tanto, el enriquecimiento realizado fue correcto). De esas 6.314.515 lecturas, un 74% poseían una amplificación clonal, mientras que el otro 26% tenían amplificación policlonal (más de un fragmento de ADN en el reactor del PCR de emulsión). La cantidad final de lecturas obtenidas fue de 2.552.575, quitando aquellas de baja calidad, dímeros de adaptadores y perlas control. El largo de las lecturas tuvo un promedio de 134 pb, una mediana de 149 pb y una moda de 154 pb.

En la Tabla 4 se puede observar el número de lecturas obtenido para cada biblioteca, así como también la cantidad de bases y el promedio del largo de las lecturas.

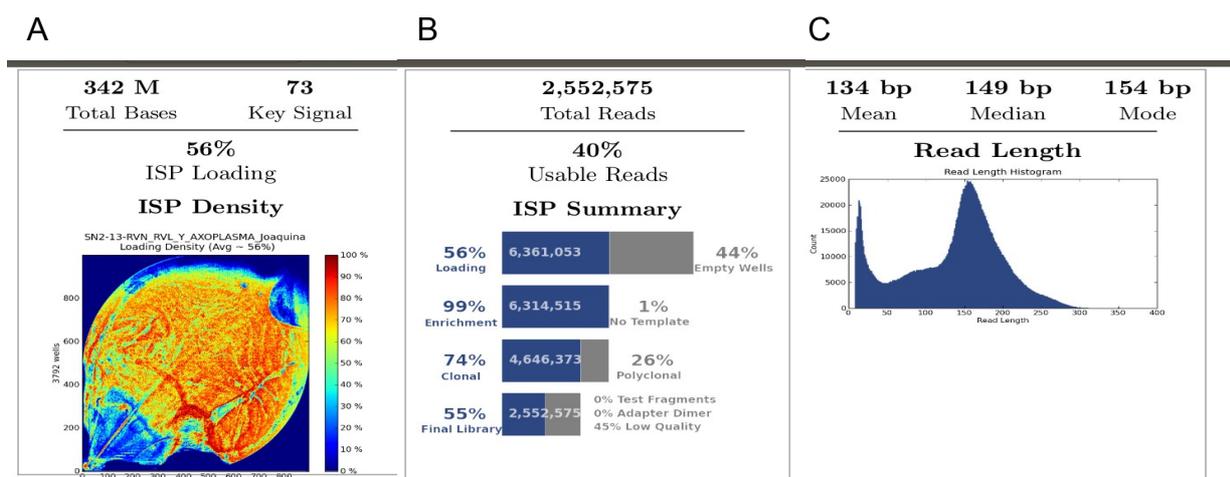


Figura 6. Resultados de la secuenciación. **A.** Imagen mostrando la densidad de perlas en el chip. También se muestra el total de bases obtenido y el porcentaje de chip cargado. **B.** Estadística de las lecturas obtenidas y las utilizables. **C.** Histograma de largo de las lecturas, mostrándose la media, mediana y moda.

Tabla 4. Número de bases, lecturas y media del largo de las mismas para cada biblioteca

Biblioteca	Barcode	Bases	N° lecturas	Media del largo de lecturas
RVN	Ion Xpress_001	148557095	1041567	142 pb
RVL	Ion Xpress_002	85200160	725564	117 pb
Axoplasma	Ion Xpress_003	107279438	768903	139 pb

Análisis de parámetros generales del RNA-Seq.

Calidad de las lecturas

Para cada conjunto de datos, se realizó un análisis de la calidad de las secuencias mediante la utilización del programa *fastQC* (Figura Suplementaria 1, A1, B1, C1). En base a los parámetros que el mismo reporta, se resolvió hacer un recorte (o *trimming*) de las secuencias con el programa *sickle*. Se indicó que la calidad deseada debía ser mayor a 23 ($Q=23$, donde $Q=-10 \cdot \log_{10}(P)$ en escala Phred, siendo P la probabilidad de error en la determinación de una base), y que el largo mínimo de las lecturas luego del recorte debía

ser superior a 30 pb. En la tabla 5 se presenta el número de lecturas antes y después del recorte. Luego, se realizó nuevamente el control de calidad, verificándose que con el recorte realizado se mejoraron problemas de sobre-representación de secuencias cortas (k-mers) (Figura suplementaria 1, A2, B2, C2).

Tabla 5. Número de lecturas de cada biblioteca antes y después del recorte

Biblioteca	N° lecturas	
	Antes	Después
RVN	1.041.567	681.989
RVL	725.564	406.297
Axoplasma	768.903	514.070

Mensajeros presentes en las muestras

Para evaluar qué mensajeros están presentes en las muestras analizadas se realizaron alineamientos de las lecturas con el programa *bowtie2*, tomando como referencia el genoma de *Rattus norvegicus* (GCA_000001895.3). Se utilizó la opción de alineamiento local de las lecturas (*--sensitive-local*). Los resultados de los alineamientos se presentan en la Tabla 6, donde se observa que se obtuvo un buen porcentaje de lecturas alineadas al genoma (en todos los casos mayor al 80%).

Tabla 6. Número de lecturas a alinear y alineadas para cada muestra.

Muestra	N° de lecturas total	N° de lecturas alineadas	Porcentaje de lecturas alineadas
RVN	681.989	638.699	96.65%
RVL	406.297	340.603	83.83%
Axoplasma	514.070	482.583	93.87%

Luego del alineamiento se utilizó el programa *htseq-count* el cual, a partir de los archivos *.sam* (salida del programa *bowtie2*) nos reporta el número de lecturas que

alinean en cada gen. En la Tabla 7 se reporta el número de genes encontrados en cada una de las muestras, utilizando como umbral un mínimo de 5 lecturas alineadas.

Tabla 7. Número de transcritos identificados en cada muestra

Muestra	Nº transcritos (>= 5 lecturas alineadas)
RVN	6310
RVL	2479
Axoplasma	629

En las Figuras 7 y 8 se muestran imágenes del alineamiento de las lecturas en las tres muestras para algunos genes de interés (MBP y Nefl).

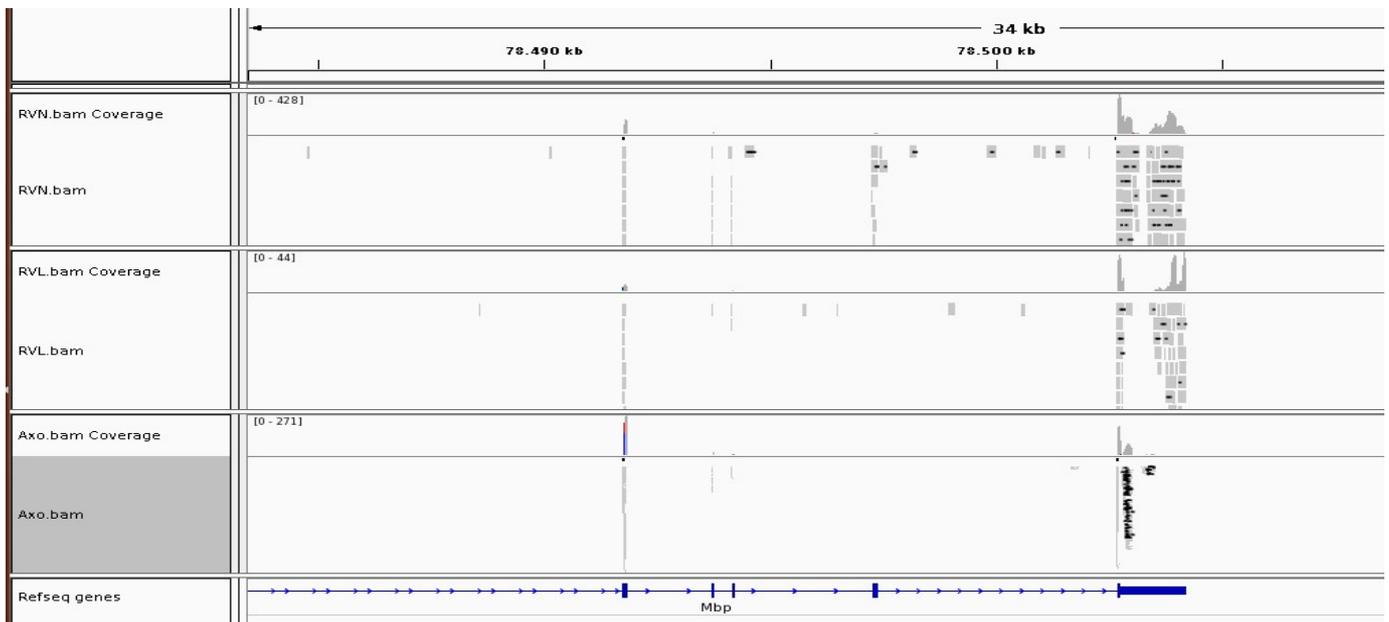


Figura 7. Mapeos de lecturas de las tres librerías en el gen de Mbp. RVN: Raíz Ventral Normal, RVL:Raíz Ventral Lesionada, AXO: Axoplasma.

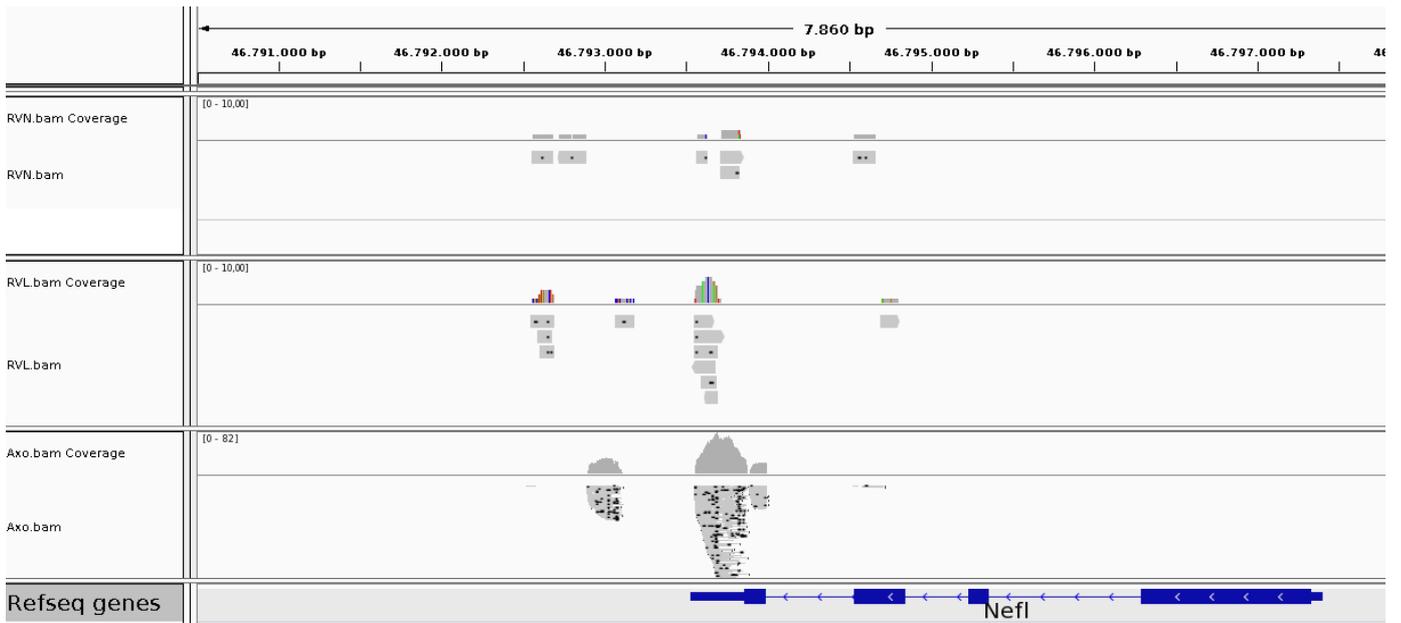
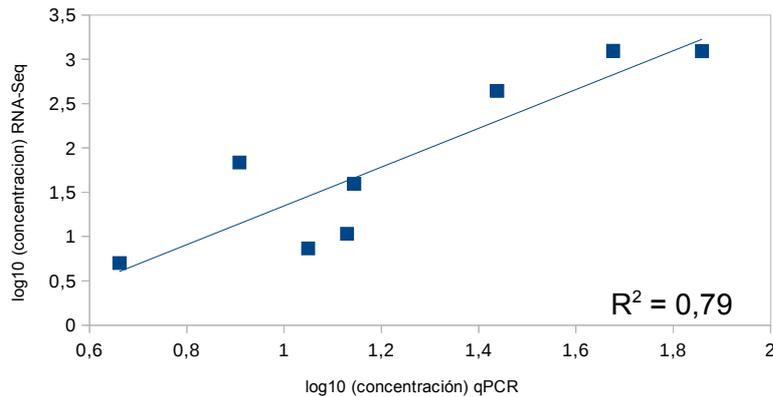


Figura 8. Mapeos de lecturas de las tres librerías en el gen de Nefl. RVN: Raíz Ventral Normal, RVL:Raíz Ventral Lesionada, AXO: Axoplasma.

Verificación de niveles de abundancia de ARNm axonales mediante qPCR

Luego de obtenida la lista de genes identificados en la muestra de axoplasma, se eligieron candidatos para verificar, mediante otra tecnología, los niveles de abundancia de los mismos. Para ello, se realizaron qPCR para los genes Cytb, Nefl, Nefm, Nefh, MBP, Pmp22, Eef1g y Actb. En la Figura 9 se observa un gráfico de puntos, donde se representa la abundancia (en log10) encontrada mediante qPCR en función de la abundancia (log10) encontrada mediante la secuenciación masiva. Se puede observar que el coeficiente de determinación (R^2) encontrado es muy bueno, siendo el mismo de 0.79.



Gen	qPCR	RNA-Seq
Cytb	1,859	3,092
Nefl	1,677	3,095
Nefm	1,129	1,032
Nefh	0,661	0,701
MBP	1,438	2,642
Pmp22	0,908	1,837
Eef1g	1,144	1,595
Actb	1,049	0,865

Figura 9. Los niveles de abundancia de ARNm de la muestra de axoplasma obtenidos mediante qPCR y RNA-Seq poseen una buena correlación. A. Se grafica el logaritmo en base 10 de la concentración del ARNm en la muestra. Se presenta también el coeficiente de detrmación (R^2). B. Tabla con los valores obtenidos para cada gen analizado.

Evaluación de la pureza de la muestra de axoplasma a nivel masivo

La información obtenida de la secuenciación permitió evaluar la técnica de micro-dissección como metodología para obtención de axoplasmas, analizando a nivel masivo los cambios en cantidades relativas de todos los mensajeros identificados. Para ello se realizó un análisis donde se cuantificó y comparó la abundancia relativa de los ARNm presentes en las muestras de axoplasma y la raíz ventral normal. Los resultados obtenidos se muestran en el análisis de cluster de la Figura 10. Se identificaron un total de 495 ARNs que cambian sus niveles al menos 2 veces, de los cuales, 139 de ellos no se identifican en la muestra de RVN y si en axoplasma, 277 poseen niveles mayores en la muestra de axoplasma con respecto a la RVN, y 79 disminuyen sus niveles en el axoplasma con respecto a la RVN. Las vías más representadas entre los ARNs que aumentan su nivel en la muestra de axoplasma son: Huntington's disease (EASE Score = $2.2E-4$, enriquecimiento = 3.1), Alzheimer's disease (EASE Score = $9.1E-3$,

enriquecimiento = 3.0), Ribosome (EASE Score = 2.2E-4, enriquecimiento = 6.3). Las vías más representadas entre los ARNs que bajan sus niveles son: Focal adhesion (EASE Score = 9.4E-3, enriquecimiento = 2.8) y Regulation of actin cytoskeleton (EASE Score = 3.8E-2, enriquecimiento = 2.3). Ejemplos a destacar de los ARNm que bajan sus niveles en la muestra de axoplasma son: *Pmp22*, *Myelin Protein Zero (Mpz)*, *Proteolipid Protein 1 (plp1)*, *Integrin beta 1 (Itgb1)*, todas ellas asociadas a células de Schwann, oligodendrocitos o mielina. En el conjunto de 139 ARNm no detectables en la RVN pero sí en axoplasma no es posible detectar enriquecimiento de vías, sin embargo, alguno de estos ARNs codifican para proteínas asociadas a la transmisión sináptica.

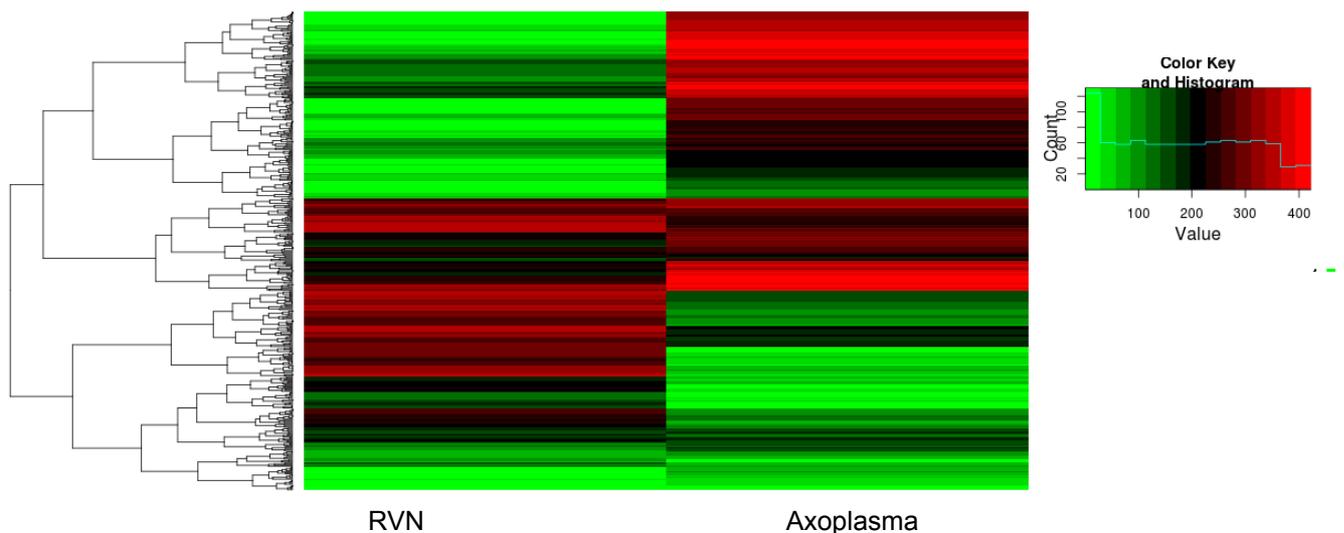


Figura 10. Análisis de cluster de genes expresados diferencialmente en axoplasma con respecto a Raíces Ventrales Normales (RVN)

Análisis funcional-ontológico de ARNm presentes en las distintas muestras

El análisis de la ontología de los genes que se encuentran en cada una de las muestras se realizó utilizando las herramientas bioinformáticas *DAVID* e *Ingenuity*. En la Figura 10 se grafican las primeras 10 categorías de cada dominio utilizando *DAVID*. De la

comparación de las primeras 10 categorías de cada dominio presentadas se puede observar que las provenientes de las muestras de raíces ventrales, ya sean normales o lesionadas, son muy similares entre sí; mientras que las provenientes de la muestra de axoplasma difieren principalmente en el dominio de Procesos Biológicos (comparar barras amarillas en Figura 11A, B y C).

Los ARNm presentes en el axoplasma se asocian principalmente a funciones como cascadas de señalización intracelular incluyendo procesos de fosforilación, transporte de macromoléculas, establecimiento y localización proteica. Se comparte con las otras muestras las categorías relacionadas al metabolismo de fosfato. Motivados por este análisis nos pareció interesante realizarlo en ARNs comunes entre axón y raíces (normales o lesionadas) y ARNs detectados principalmente en axón. Para ello, se realizaron análisis de conjuntos (cruzas de listas) entre las muestras estudiadas y más adelante (ver pagina 48) entre estas y otros datos disponibles de trabajos transcriptómicos axonales previos.

En la Figura 12 se observa un diagrama de Venn resumiendo los resultados obtenidos al comparar las listas de genes obtenidos en cada condición. Se observa que un total de 302 genes están presentes en las tres muestras, y 164 son solamente detectados en la muestra del axón. Para el caso de la RVN y RVL, se detectaron en las dos muestras un total de 2362, de los cuales 2060 no están presentes en el axón.

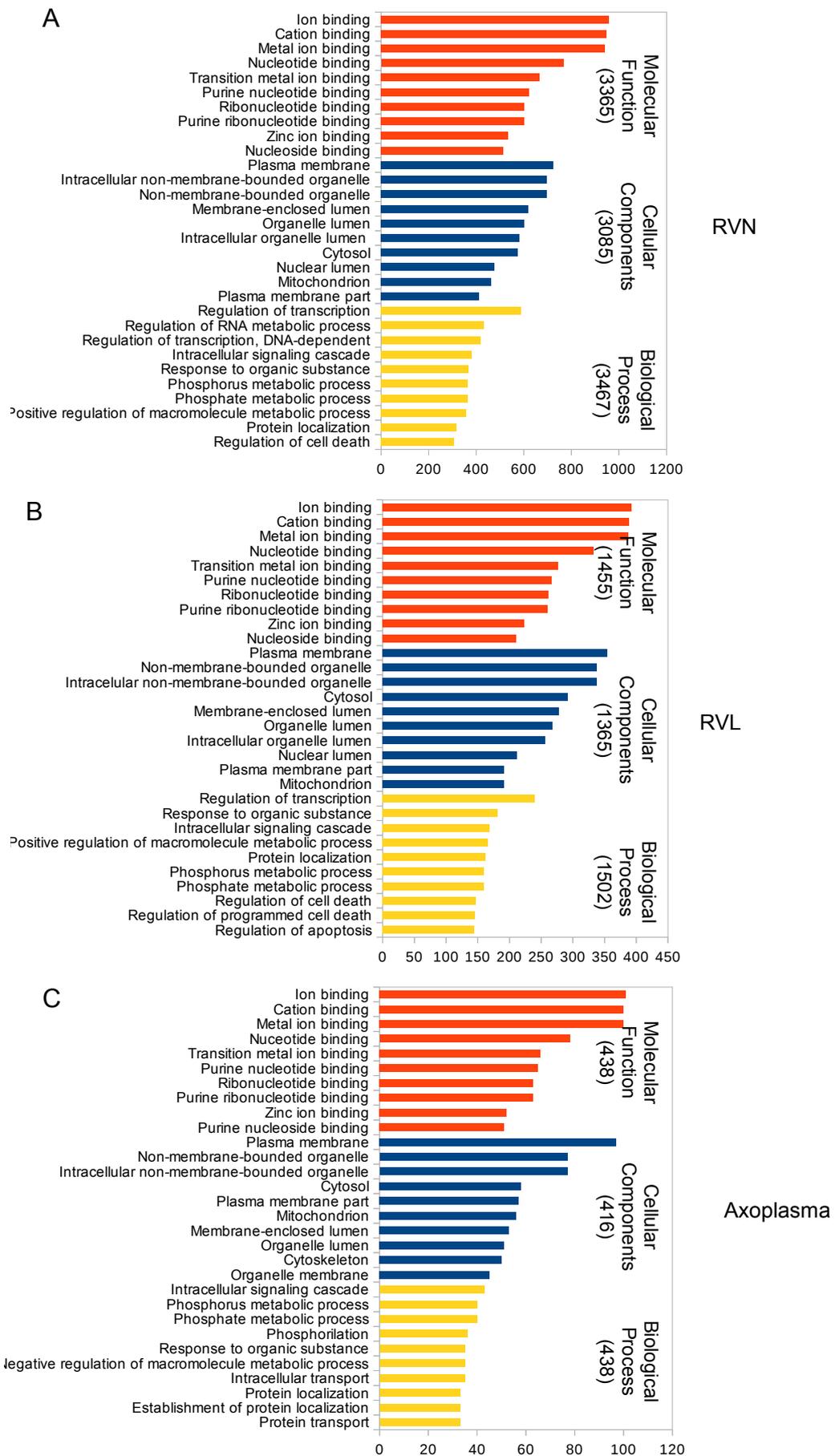


Figura 11. Ontología de los genes identificados en cada muestra analizada. **A.** Raíz Ventral Normal (RVN). **B.** Raíz Ventral Lesionada (RVL). **C.** Axoplasma.

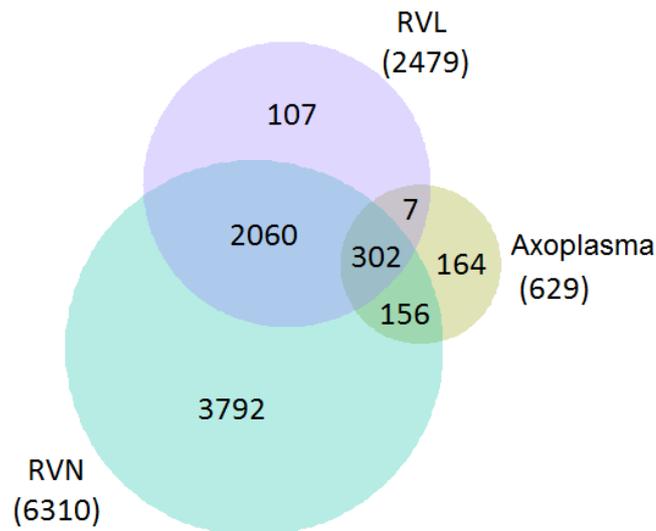


Figura 12. Diagrama de Venn mostrando la cantidad de genes únicos de cada muestra y aquellos compartidos por dos o tres listas. RVN (Raíz Ventral Normal), RVL (Raíz Ventral Lesionada) y Axón (Axoplasma).

A partir de estos resultados, se fue en busca de analizar las principales vías canónicas (Canonical Pathways) presentes en la muestra de axonal, y las redes de interacción génica/proteícas codificadas por los ARNs que se encontraron solo en la muestra de axoplasma. Las vías más representadas en todos los genes encontrados en la muestra axonal fueron: Oxidative Phosphorilation (p -valor = $3.4E-10$), Mitochondrial Dysfunction (p -valor = $5.6E-10$), Axonal Guidance Signaling (p -valor = $1.5E-4$) e Integrin Signaling (p -valor = $2.4E-4$). Las principales funciones de las redes de interacción de proteínas codificadas por los ARN presentes en la muestra de axoplasma son las siguientes: Cell-mediated immune response, cellular movement, developmental disorder (score = 63), cell morphology, cellular assembly and organization, neurological disease (score = 53), cell morphology, cellular assembly and organization, cellular function and maintenance (score = 43), cell morphology, nervous system development and function, tissue morphology (score = 41).

Para el caso de los ARN que solo fueron identificados en el axoplasma, la principal

vía canónicas identificada fue Sonic hedgehog signaling (p-valor = 9.0E-4), y las principales redes de interacciones fueron: nervous system development and function, cell-to-cell signaling and interaction, molecular transport (score = 23) y aminoacid metabolism, molecular transport, small molecule biochemistry (score = 22).

Comparación del transcriptoma de axones maduros con el de axones en cultivo

Para evaluar cuántos de los mensajeros que identificamos como presentes en el axoplasma ya habían sido reportados dentro del compartimiento axonal en estudios previos de transcriptómica, se cruzó la lista obtenida en nuestro trabajo con los datos de los trabajos de Minis, Gumy y Zivraj (Zivraj et al. 2010; Gumy et al. 2011; Minis et al. 2014). En la Figura 13 se puede observar un diagrama de Venn resumiendo los resultados obtenidos. Del total de 629 mensajeros identificados en este trabajo como presentes en la muestra de axoplasma, 368 fueron reportados por alguno de los trabajos mencionados, de los cuales 44 de ellos están presentes en las 4 listas analizadas. Asimismo, 255 mensajeros fueron reportados como presentes en axones solamente en nuestro estudio. Dado que los estudios previos utilizaron axones en crecimiento embrionarios (trabajos de Minis y Zivraj) o neuronas adultas regenerantes en cultivo (Gumy), el hallazgo de 255 ARNs que no fueron reportados previamente, indicaría que el axón maduro posee poblaciones diferentes de ARNm.

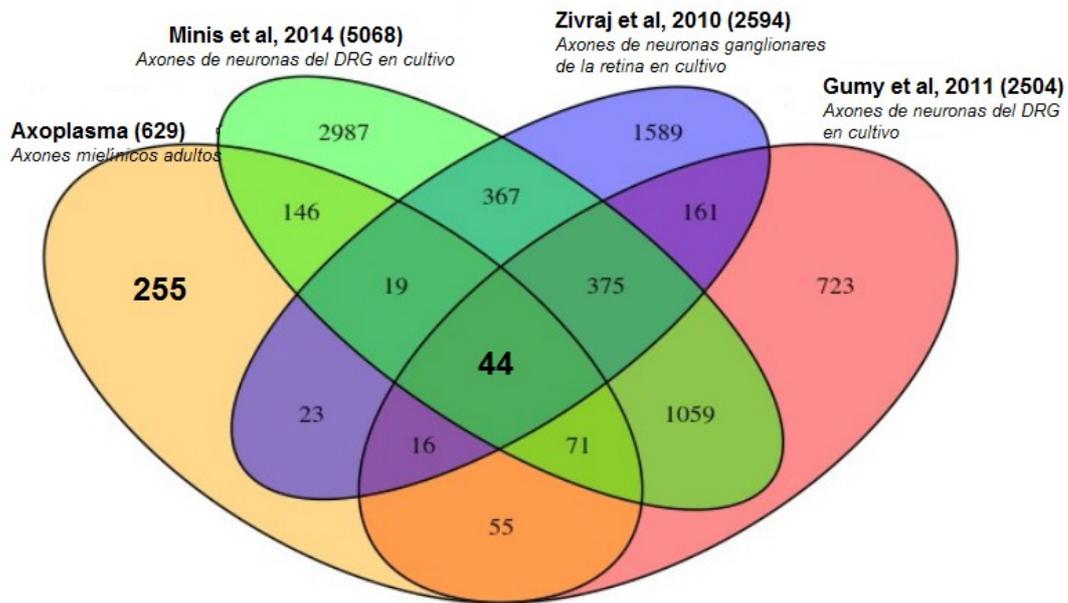


Figura 13. El 60% de los mensajeros identificados en la muestra de Axoplasma ya fueron reportados dentro de axones por estudios previos. En el diagrama de Venn se ilustran los resultados obtenidos del cruce de la lista de mensajeros identificados en la muestra de Axoplasma con los reportados por estudios previos. DRG: ganglio de la raíz dorsal

ARNm que codifican proteínas mitocondriales en axoplasma

Con el objetivo de evaluar que tan representadas estaban las proteínas mitocondriales en el transcriptoma axonal, se analizó cuántos de los mensajeros presentes en el axoplasma codifican proteínas mitocondriales, provenientes tanto del genoma nuclear como del mitocondrial. Se encontraron los 13 mensajeros codificantes de proteínas mitocondriales provenientes del genoma mitocondrial, así como también 29 mensajeros codificados por el genoma nuclear (Figura 14). Del análisis de enriquecimiento se concluye que en la lista de mensajeros axonales existe una sobre-representación de mensajeros codificantes para proteínas mitocondriales (EASE Score < 0.001).

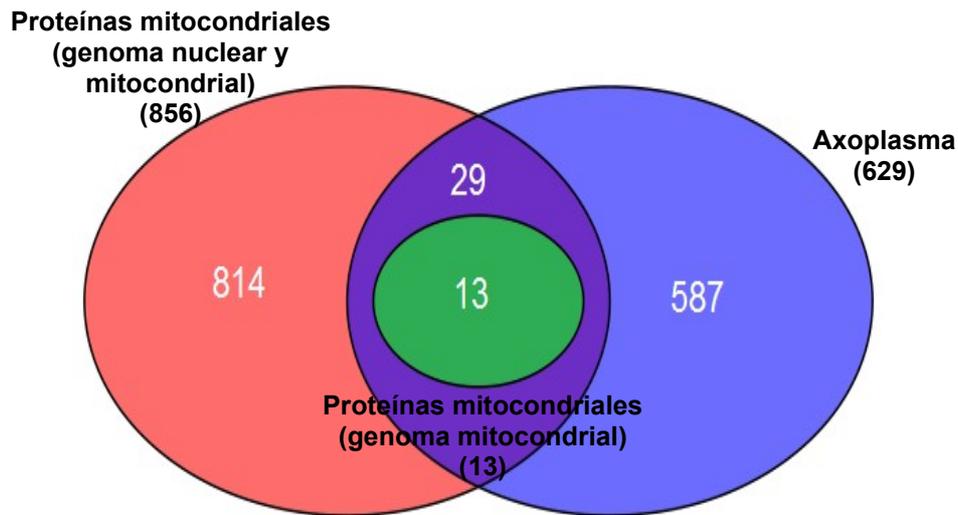


Figura 14. El axoplasma está enriquecido en mensajeros que codifican proteínas mitocondriales. Diagrama de Venn ilustrando cuántos mensajeros axonales codifican proteínas mitocondriales (un total de 42). (EASE Score < 0,001).

Posteriormente, se evaluó la cantidad de lecturas de las tres muestras que alinean al genoma mitocondrial y se lo comparó con lo obtenido en axones en cultivo (Minis et al. 2014). El 50% de las lecturas obtenidas en la muestra de axoplasma alinearon al genoma mitocondrial, mientras que en la raíz ventral normal fue de un 24%, y en la raíz ventral lesionada de 46%. En axones en cultivo, se encontró que más del 20% de las lecturas alinean al genoma mitocondrial, mientras que en la muestra de ganglio de la raíz dorsal (DRG) lo hace solo el 2% (Minis et al. 2014). Esto confirma que las mitocondrias son componentes abundantes tanto en axones maduros como inmaduros.

ARNm axonales asociados a proteínas de unión al ARN

Con el fin de evaluar cuántos de los mensajeros encontrados en los axoplasmas fueron asociados a proteínas de unión al ARN (RBPs, *RNA-binding proteins*), se comparó la lista de genes presentes en el axoplasma con las listas de genes disponibles a partir de

la literatura que recién comienza a reportarse. En el momento estaban disponibles los datos de asociación a IMP1 en células HEK293 (homólogo a ZBP1 en humanos (Jønson et al. 2007), ya descrita en el axón por Sotelo-Silveira et al. 2004; y Stau2 (proteína involucrada en el transporte y la localización de ARNm a diferentes compartimentos subcelulares) en cerebro de ratas (Maher-Laporte et al. 2010a; Maher-Laporte & DesGroseillers 2010b). Se encontraron 12 genes presentes en la lista de ARNm presentes en el axoplasma e IMP1 (EASE Score < 0.005), y 42 en la de Axoplasma y Stau2 (EASE Score < 5.0E-9). Un total de 4 genes están presentes en las tres listas analizadas, siendo éstos *calmodulin 1 (Calm1)*, *60S ribosomal protein L4 (Rpl4)*, *ADP-ribosylation factor 1 (Arf)* y *Ras homolog family member A (RhoA)*.

ARNm axonales asociados a motores moleculares

En busca de entender de una manera más cabal el mecanismo por el cual se transportan los mensajeros hacia el dominio axonal, nuestro grupo inmunoprecipitó RNPs de cerebros de ratones asociadas al motor molecular MyoVa, y se analizaron mediante microarreglos los mensajeros que co-inmunoprecipitaron junto a ella (Calliari, Farias et al. 2014). Paralelamente a la realización de la presente tesis, me incorporé al mencionado proyecto, colaborando en el análisis de los datos de microarreglos (tanto de los generados en el transcurso de la investigación, como los del trabajo de Gumy y colaboradores) (Figura 1 y Tablas 1 y 2 del artículo), así como también realizando las confirmaciones de los resultados obtenidos mediante qPCR (Figura 1, Figura 4). Asimismo, realicé el análisis bioinformático en busca de motivos (a nivel de estructura primaria y secundaria) en el 3' UTR de los mensajeros, que puedan actuar como señales de transporte hacia el dominio axonal (Figura 6 y Figura suplementaria 4). Los principales resultados encontrados fueron

los siguientes: a) se identificaron más de 250 genes asociados a MyoVa, los cuales podrían estar siendo transportados por dicho motor; b) las principales funciones de los genes asociados a MyoVa son: modificaciones post-transcripcionales de ARNs, enfermedades neurológicas, ensamblaje y mantenimiento celular y tráfico de proteínas; c) algunos de los mensajeros asociados a MyoVa (61 de 256) fueron reportados como presentes en axones (según el trabajo de Gumy y colaboradores del 2011); d) los 3' UTR de los mensajeros asociados a MyoVa estarían enriquecidos en *zip-codes* similares a los encontrados en la β -actina y tau (responsables del transporte hacia el dominio axonal) y no así en *zip-codes* similares a los encontrados en el mensajero de la CamKII (responsable de su localización hacia la dendrita); e) se confirmaron mediante qPCR la presencia de algunos mensajeros asociados a MyoVa que fueron reportados en axones en inmunoprecipitados de MyoVa realizados en DRGs.

Utilizando la lista de mensajeros asociados a MyoVa obtenida en el trabajo anteriormente descrito, se verificó cuántos de los mensajeros identificados en el Axoplasma podrían haber sido transportados hasta el dominio axonal mediante este motor molecular. Se encontraron que 14 de los 629 mensajeros presentes en el axoplasma fueron asociados a MyoVa (EASE Score = 0,015), los cuales se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Genes asociados a miosina Va encontrados en el axoplasma

ID Ensembl	Gen	Descripción
ENSRNOG00000001440	Mdh2	Malate Dehydrogenase 2, NAD (Mitochondria)
ENSRNOG00000005290	Ywhae	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon
ENSRNOG00000005330	Crebbp	CREB binding protein
ENSRNOG00000014689	Zbtb4	zinc finger and BTB domain containing 4
ENSRNOG00000019834	Hsp90ab1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
ENSRNOG00000025324	Spire1	spire-type actin nucleation factor 1
ENSRNOG00000014660	Usp53	ubiquitin specific peptidase 53
ENSRNOG00000028756	Ubc	ubiquitin C
ENSRNOG00000031092	Rock1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
ENSRNOG00000034246	Rps27a	ribosomal protein S27a
ENSRNOG00000042233	Rpl41	ribosomal protein L41
ENSRNOG00000027694	Rps7	ribosomal protein S7
ENSRNOG00000016961	Rps27	ribosomal protein S27
ENSRNOG00000011104	Rpl22	ribosomal protein L22

Análisis de expresión diferencial: RVN vs. RVL

Para identificar qué genes se expresan diferencialmente en raíces ventrales luego de una lesión se evaluó cuales de los genes presentes en las muestras de Raíz Ventral Normal y Lesionada presentaban un cambio significativo en su expresión. De los 2469 transcritos presentes en ambas muestras, se encontró que 1489 presentaban un cambio en su expresión mayor a 1 o menor a -1 (en escala logarítmica en base 2). En la Figura 15 se presenta el análisis de cluster realizado para los genes expresado diferencialmente, graficado mediante un heatmap. Los genes que cambian su expresión luego de la lesión están asociados mayoritariamente a las siguientes vías: Ribosoma (27 genes, p-valor = 8.2E-12, enriquecimiento = 4.9), Proteólisis mediada por ubiquitinación (21 genes, p-valor = 2.2E-4, enriquecimiento = 2,5), y Fosforilación Oxidativa (20 genes, p-valor = 1,7E-2, enriquecimiento = 2,2).

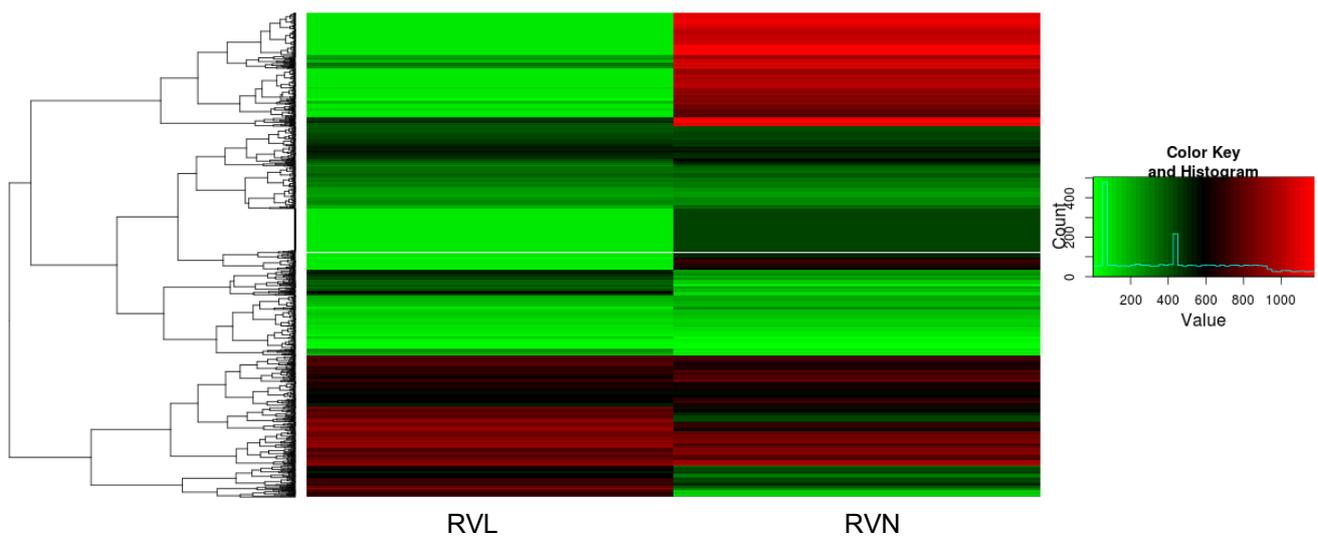


Figura 15. Análisis de cluster de genes expresados diferencialmente en raíces ventrales luego de una lesión. RVN: Raíz Ventral Normal, RVL: Raíz Ventral Lesionada

Para alguno de los genes expresados diferencialmente (Rnf139, Cpeb4, Eef1, Cytb y Nefl), se confirmaron los resultados mediante PCR en Tiempo Real, mostrándose los resultados en la Figura 16. En la misma se puede constatar que todos los cambios observados mediante secuenciación fueron corroborados mediante la PCR cuantitativa.

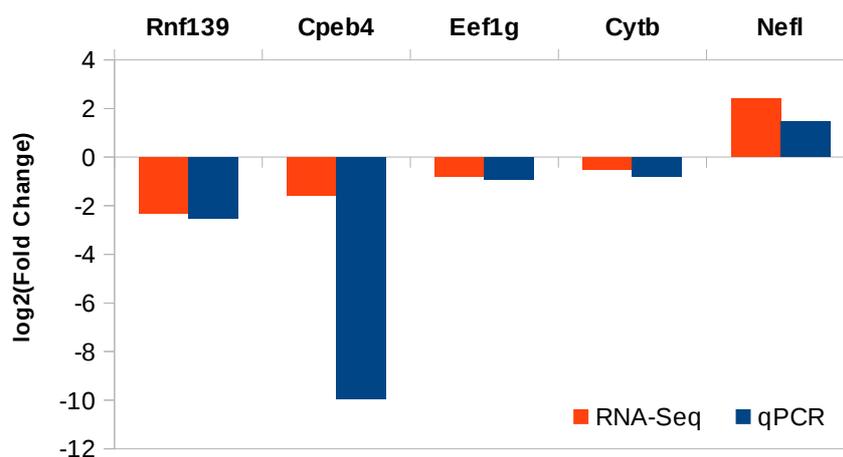


Figura 16. qPCR confirma dirección y magnitud del cambio detectado mediante RNA-seq frente a la lesión de la raíz ventral. Expresión diferencial de genes en Raíz Ventral Lesionada con respecto a Raíz Ventral Normal. Se muestra la diferencia encontrada mediante secuenciación masiva (RNA-Seq, naranja) y PCR en tiempo real (qPCR, azul)

Una vez identificados los genes que se expresan diferencialmente en raíces ventrales luego de una lesión, se evaluó si alguno de ellos también había sido identificado en la muestra de axoplasma. Se encontraron un total de 71 mensajeros que, tras una lesión, se expresan diferencialmente en raíces ventrales, y que también fueron identificados en la muestra de axoplasma. Las categorías de ontología más representadas en el dominio de Procesos Biológicos fueron: elongación de la traducción (p-valor = $2.9E-5$), traducción (p-valor = $5.4E-3$) y transporte mediado por vesículas ($2.5E-2$).

VIII. Discusión

Micro-disección de axones como técnica de obtención de citoplasma axonal de neuronas adultas y mielinizadas para el estudio de su transcriptoma

Hasta el momento, todos los trabajos que buscaron analizar el transcriptoma de axones lo hicieron mediante el cultivo de neuronas, tanto en cámaras compartimentalizadas (Zivraj et al. 2010; Gumy et al. 2011) como en explantos de órganos (Minis et al. 2014). Mediante estos procedimientos, fue posible reunir el material necesario para análisis transcriptómicos realizados mediante microarreglos (para el caso de Gumy y colaboradores 2011 y Zivraj y colaboradores 2010) o secuenciación masiva (Minis y colaboradores 2014), pero los mismos cuentan con el problema de que los axones, ya sean provenientes de embriones o adultos, se encontraban en crecimiento (regenerantes). A su vez, estas aproximaciones experimentales utilizan axones que no están expuestos a sus microambientes naturales, por ejemplo, carecen de la interacción con las células gliales. Es factible postular que un axón mielínico maduro se encuentra en un estado de diferenciación claramente diferente al axón en cultivo.

Con el objetivo de poder contribuir al conocimiento del transcriptoma de axones maduros mielinizados, se buscó optimizar la técnica de micro-disección de axones *in toto* desarrollada originalmente por Koenig en 1979 (Koenig 1979) y modificada por él mismo en el 2000 para lograr obtener axoplasma en mayor cantidad (Koenig et al. 2000). Esta técnica permite obtener el citoplasma axonal de raíces tanto ventrales como dorsales, y fue utilizada en variadas oportunidades para realizar hibridaciones *in situ* e inmunohistoquímica (Koenig & Martin 1996; Koenig et al. 2000; Sotelo-Silveira et al. 2004; Kun et al. 2007; Sotelo-Silveira et al. 2008). Adicionalmente, esta técnica fue utilizada para

preparar ARN de axones de Mauthner y evaluarlo por qPCR (Sotelo-Silveira et al. 2008) y preparar bibliotecas de EST (Sotelo-Silveira 2003). En la presente tesis se optimizó esta técnica para obtener preparaciones de axoplasmas con una menor cantidad de contaminantes gliales, y así poder analizar los ARNs presentes dentro de axones maduros mielinizados. Para llevar a cabo dicho objetivo, se añadieron al protocolo una serie de lavados de los axoplasmas, así como también se removió el trozo de tejido remanente en el extremo de los mismos.

Posteriormente, se extrajo el ARN presente en las muestras con un kit especialmente diseñado para la extracción de ARN a partir de micro-muestras (muestras de tejido menores a 10 mg o tejido microdisecado por captura laser). En esta instancia se combinó el procedimiento de extracción de ARN para tejidos con el de microdisecciones, buscando así obtener un máximo rendimiento y ARN de buena calidad, libre de ADN genómico. Luego se procedió a cuantificar el ARN mediante distintos instrumentos (espectrofotómetro (Nano-drop) y fluorímetro (Qubit)), siendo siempre la cantidad de ARN obtenido menor al límite de detección en dichos instrumentos. Para poder obtener las cantidades necesarias de material para realizar la secuenciación se debió amplificar linealmente las muestras de axoplasma. Asimismo, se procedió a realizar el mismo procedimiento para las otras dos muestras analizadas (RVN y RVL), para poder obtener resultados comparativos.

De esta manera, fuimos capaces de obtener el material necesario para realizar la secuenciación de los ARNs presentes en el axoplasma, y así poder compararlo con el obtenido para la muestra de RVN (el tejido de origen de la muestra de axoplasma), así como también con el transcriptoma de la raíz ventral luego de una lesión (RVL).

Una vez amplificado el ARN, se procedió a realizar controles tanto de calidad como de pureza de las muestras de axoplasmas. Para ello diseñamos un ensayo de qPCR que

nos permitiera evaluar el grado de enriquecimiento de la preparación axonal. El mismo se basa en la detección cuantitativa de varios marcadores gliales y axonales sobre la misma muestra, de forma tal de evaluar tanto el enriquecimiento axonal, así como la disminución de componentes gliales. Posteriormente, al secuenciar muestras con índices aceptables, se pudo evaluar a mayor resolución el grado de enriquecimiento en base a las listas de transcritos obtenidas. Como control de calidad, se buscaron ARNm ya descritos como presentes en el compartimiento axonal, como es el caso de los neurofilamentos y la β -actina (Sotelo-Silveira et al. 2000; Sotelo-Silveira et al. 2008). Para los controles de pureza, se ajustó y optimizó el ensayo de cuantificación mediante PCR en tiempo real de las cantidades relativas de tres mensajeros marcadores gliales (MAG, Pmp22 y MBP) y tres mensajeros marcadores neuronales (Nefl, Nefm y Nefh), y luego se utilizó tanto en las cuatro muestras de axoplasma como en las tres de RVN procesadas. Los mensajeros marcadores gliales fueron elegidos de acuerdo a la localización subcelular que poseen dentro de las células gliales (Figura 1), los mensajeros de MAG y Pmp22 se localizan en la zona perinuclear glial (Griffiths et al. 1989), mientras que el mensajero de la MBP es transportado hacia la mielina compacta, donde se traduce localmente (Müller et al. 2013; Gould et al. 2000). Los marcadores neuronales fueron los tres neurofilamentos, para los cuales, como se mencionó anteriormente, ya ha sido demostrada su localización dentro de axones (Figura 1) (Sotelo-Silveira et al. 2000), observación que fue confirmada en otros estudios (Zivraj et al. 2010; Gummy et al. 2011; Minis et al. 2014)

Mediante el control de calidad realizado, observamos que las muestras de axoplasma poseían mensajeros característicos del axón, comprobando que los pasos de extracción de ARN y amplificación lineal de los mismos habían funcionado correctamente. Posteriormente, cuantificamos el cambio en las cantidades relativas de los distintos marcadores en las muestras de axoplasma con respecto a las de RVN (Figura 3), para

evaluar la eficacia del procedimiento de micro-disección como método de obtención del citoplasma axonal. Como se puede observar en la Figura 3A, en las distintas muestras de Axoplasma analizadas los niveles de neurofilamentos aumentaron respecto a las RVNs, por el contrario, los niveles de los marcadores gliales disminuyeron.

Cabe destacar que, para el caso del marcador neuronal Nefh, no fue posible su cuantificación en las RVN. Esto pudo deberse a que el Nefh tiene una expresión considerablemente inferior a los otros dos mensajeros de neurofilamentos (Pachter & Liem 1984; Cochard & Paulin 1984). Para el caso de MAG, no se obtuvo amplificación en las muestras de axoplasmas, pero si en la de RVNs. Esto puede deberse a que MAG tiene un nivel de expresión considerablemente más bajo que el de los otros dos marcadores elegidos (Woodhoo & Sommer 2008).

Los tres marcadores gliales no solo tienen diferentes patrones de localización en la célula de Schwann, sino que también presentan distintos niveles de expresión. Esto se corroboró analizando los niveles de expresión de estos tres mensajeros en la plataforma de Gene Expression Omnibus del NCBI, utilizando los datos del trabajo de Woodhoo y Sommer (Woodhoo & Sommer 2008). Tanto los ARNm de MAG como de Pmp22 se localizan en la región perinuclear de la glía (Figura 1, (Griffiths et al. 1989), teniendo un nivel más alto de expresión el ARNm de Pmp22 (Woodhoo & Sommer 2008). En cambio, el ARNm de MBP se encuentra tanto en el citoplasma de la glía como en la mielina compacta (Gould et al. 2000; Müller et al. 2013), siendo su nivel de expresión cercano al de Pmp22 (Woodhoo & Sommer 2008). Mediante la técnica de micro-disección claramente se logra aislar al citoplasma axonal de componentes del citoplasma de la célula de Schwann, mientras que se detecta una disminución del marcador de la mielina compacta de menor magnitud. Esto se basa en la disminución diferencial que tienen PMP22 y MBP, cuyos remanentes en el axoplasma, comparado a la cantidad detectada

originalmente en la raíz total, equivalen a 1 y 15%, respectivamente (Axo 4, Figura 3). En cambio, los marcadores axonales aumentaron considerablemente (más de 50 veces para Nefl y Nefm). Por este motivo, creemos que, si bien algunos de los ARNm que se identifiquen mediante la secuenciación pueden provenir de contaminación de la mielina compacta, la muestra está efectivamente enriquecida en ARNm localizados en el compartimiento axonal.

Secuenciación a baja profundidad mediante la tecnología Ion Torrent

Para evaluar la factibilidad del método diseñado y obtener un primer panorama de qué ARNm se encuentran en alta concentración en el material axoplásmico, se realizó secuenciación masiva de baja profundidad en la plataforma Ion Torrent disponible en el IIBCE. Para cada muestra se consiguieron promedialmente unas 500.000 lecturas de alta calidad (ver Figura Suplementaria 1) de un largo promedial de 150 pares de bases y se analizaron siguiendo el *pipeline* presentado en la Figura 2. Al alinear las mismas contra el genoma de *Rattus norvegicus* (más de 26.000 genes) se encontró que para las raíces ventrales normales y lesionadas se detectaron 6310 y 2489 genes transcritos (genes con más de 5 lecturas por gen) respectivamente (ver Tabla 7). La diferencia observada en el caso de la raíz lesionada se debe a que la lesión provoca un gran aumento de la abundancia de ARNm codificados en el genoma mitocondrial (46% de las lecturas son ARNm mitocondriales en RVL contra un 24% en RVN). Adicionalmente detectamos diferencias de amplificación (ver Figura 4) entre ambas muestras. Dado que esta aproximación de secuenciación detecta los genes más expresados en cada muestra, los ARNm mitocondriales ocuparon el espacio utilizable en el chip de secuenciación para otras clonas de menor abundancia. En el caso de la muestra de axoplasma, se detectaron

solo 629 transcriptos (ver Tabla 7). Este número de genes detectados indica posiblemente una complejidad (número de moléculas diferentes) menor a la encontrada en raíces normales y lesionadas, dado que a un nivel de muestreo similar (numero de lecturas alineadas) se detectó una proporción significativamente menor de transcriptos axonales. Es interesante destacar que el porcentaje de lecturas alienadas con genes mitocondriales es similar al de la raíz ventral lesionada, sin embargo se detectan menos de cuarta parte de transcriptos en la muestra axonal. Dicho esto, una razón para subestimar el número de ARNm detectados en la muestra axonal puede deberse también a que la amplificación lineal no funcionase en su óptimo, dado que se necesitaba mayor cantidad de ARN como molde de partida. En contra de esta interpretación, se encuentra el detalle de que el perfil electroforético del ARNm amplificado, es similar al obtenido en condiciones óptimas para la raíz ventral normal (ver Figura 4).

Si bien en un principio se pretendió realizar la secuenciación de las muestras en un servicio externo mediante la tecnología de Illumina para lograr una profundidad adecuada (10 a 20 millones de lecturas por muestra), la escasa cantidad de ADNc obtenido luego de la amplificación y la dificultad de obtener mayores cantidades (en especial en las de axoplasmas) se tornó difícil seguir por esta vía. Esto se debió principalmente a que los proveedores de secuenciación comercial requieren de cantidades mayores de molde y solo trabajan fluidamente con protocolos convencionales. Es así que se decidió procesar las muestras para secuenciarlas mediante la tecnología de Ion Torrent en el instrumento recientemente instalado en el Instituto, dado que se podía manipular y desarrollar protocolos específicos para aprovechar estas muestras dado la cantidad de trabajo previo necesario para conseguirlas. Aunque la cantidad de información que brinda el instrumento permite hacer un análisis parcial de transcriptoma, en nuestro caso no solo nos permitió analizar la calidad de las muestras, sino que también obtuvimos información muy útil de

los mensajeros más abundantes en cada una de las muestras. Ahora que se conoce por primera vez un estimado de la complejidad de moléculas presentes en un axón adulto gracias a los resultados obtenidos, y la validez del método, pretendemos realizar una secuenciación más profunda en breve.

ARNs asociados a funciones neuronales presentan niveles altos de expresión en la muestra de axoplasma, mientras que ARNs asociados a mielina poseen niveles bajos de expresión

De la comparación de los niveles de abundancia de los ARNm presentes en la muestra de axoplasma con respecto a la muestra de RVN, obtuvimos datos a nivel masivo de la pureza de la muestra de axoplasma. Este análisis nos permitió profundizar en el estudio de la técnica de micro-disección de axones como metodología de obtención de citoplasma axonal. Como se observa en el heatmap de la Figura 10, los cambios en los niveles de abundancia entre las dos muestras son considerables. De esta manera observamos que hay ARNs que aumentan mucho su abundancia relativa en la muestra de axoplasma, incluyendo el grupo de 139 genes que no fueron detectados en la muestra de RVN. Los ARNs de este grupo están asociados a enfermedades neuronales, como la enfermedad de Huntington y Alzheimer, lo que indicaría que efectivamente el método utilizado aísla citoplasma axonal. Por otro lado, se encontró un grupo de ARNs que bajan su abundancia relativa en la muestra de axoplasma con respecto a la RVN. Estos ARNs están asociados a categorías de mielina, o funciones típicas de la célula de Schwann. Este hecho apoya los resultados obtenidos en los análisis de pureza realizado mediante qPCR, indicando que el método permite disminuir significativamente contaminantes presentes en la mielina cuando se lo utiliza para la obtención de material axoplásmico.

Análisis funcional-ontológico de las distintas muestras evidencian que los ARNm axonales presentan características diferenciales respecto a las raíces ventrales

Mediante el análisis funcional-ontológico de los ARNs de cada muestra, se pudo constatar que las categorías más representadas en las muestras proveniente de las raíces ventrales son similares entre sí. En cambio, las categorías provenientes de la muestra de axoplasma difieren principalmente en el dominio de Procesos Biológicos (comparar barras amarillas en Figura 11A, B y C). Observamos que los ARNm presentes en el axoplasma se encuentran asociados principalmente a cascadas de señalización intracelular incluyendo procesos de fosforilación, transporte de macromoléculas, y establecimiento y localización proteica. En cuanto a esta última categoría, existen variadas evidencias que indican que este es un proceso muy importante en axones, ya que se necesita transporte hacia el axón no solo de la maquinaria necesaria para la síntesis local de proteínas, sino también los ARNm (en complejos ribonucleoproteicos) que allí se traducirán (Yoo et al. 2010; Michaelievski et al. 2010).

Como se puede observar en la Figura 12, del total de mensajeros identificados en la muestra axoplásmica existen 302 que también fueron identificados en RVN y RVL. Cabe destacar que 164 mensajeros identificados en la muestra axoplásmica no fueron identificados en las otras dos muestras analizadas. El hecho de que estos ARNs no fuesen detectados en el tejido completo implica que tiene baja expresión. Al aislar material axoplásmico es posible detectarlos, dado que no están presentes los mensajeros de alta abundancia correspondientes al tejido de origen de la muestra axonal. Esto es un argumento a favor de que estos 164 ARNs encontrados son específicos del axón. Apoyando esto, está también la observación de que un grupo de estos ARNs se encuentran en el percentil 70 de la abundancia de transcritos en la muestra axonal.

Para todos los ARNs identificados en la muestra de axoplasma, se analizó cuáles eran las principales vías canónicas representadas, encontrándose las de Oxidative Phosphorilation (p -valor = $3.4E-10$) y Mithochondrial Disfunction (p -valor = $5.6E-10$), Axonal Guidance Signaling (p -valor = $1.5E-4$) e Integrin Signaling (p -valor = $2.4E-4$). El enriquecimiento de elementos de la fosforilación oxidativa están relacionados con la abundancia de mitocondrias en la preparación axonal. Las moléculas pertenecientes a la vía de Axonal Guidance Signaling (Figura 17) implican que el axón posee la información para responder a señales o desarrollar funciones dependientes del entorno, como por ejemplo responder a un daño del axón mediante regeneración (Inatani 2005). Varios trabajos han reportado que, la presencia de integrinas y su cascada de señalización en axones del SNP (Figura 18) son los que permiten que, frente a una lesión, los mismos puedan regenerar (Eva et al. 2012; Eva & Fawcett 2014). Por otro lado, se analizaron las redes de interacción de proteínas (codificadas por los ARNs presentes en la muestra), encontrándose varias de ellas asociadas a mantenimiento, desarrollo y función del sistema nervioso. Cuando se analizaron los ARNs presentes sólo en la muestra de axoplasma, se identificó que había un enriquecimiento en mensajeros asociados a la vía Sonic Hedgehog Signaling (Figura 19). Ha sido reportado que, en diferentes tipos de nervios, esta vía es importante en la neuroprotección y una adecuada regeneración de axones luego de una lesión (Barrette et al. 2010; Angeloni et al. 2013). Además, se identificaron redes asociadas al desarrollo y función del sistema nervioso, pero también al transporte de moléculas y metabolismo de aminoácidos. Como se mencionó anteriormente, estas vías y redes de interacciones están muy vinculadas a procesos y funciones de las neuronas, especialmente axones, lo cual apoya los resultados del método de aislamiento de axoplasma desarrollado.

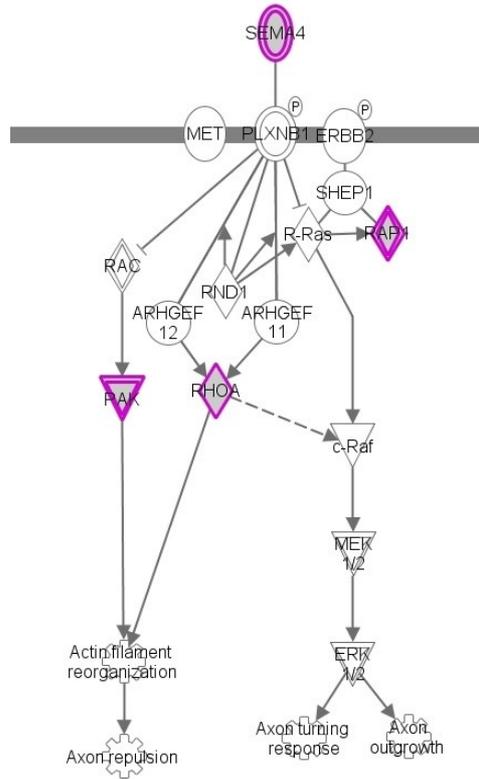


Figura 17. ARNm presentes en la muestra de axoplasma codifican para proteínas asociadas a la vía de señalización de crecimiento axonal. En violeta se marca los ARNm presentes en la muestra de axoplasma.

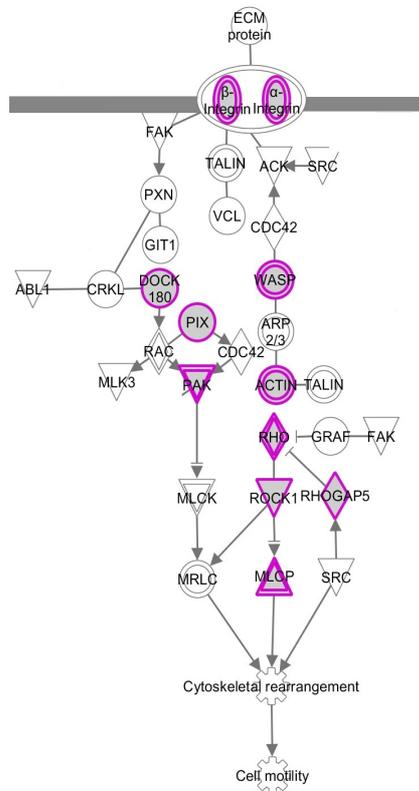


Figura 18. ARNm presentes en la muestra de axoplasma codifican para proteínas asociadas a la vía de señalización mediada por integrinas. En violeta se marca los ARNm presentes en la muestra de axoplasma.

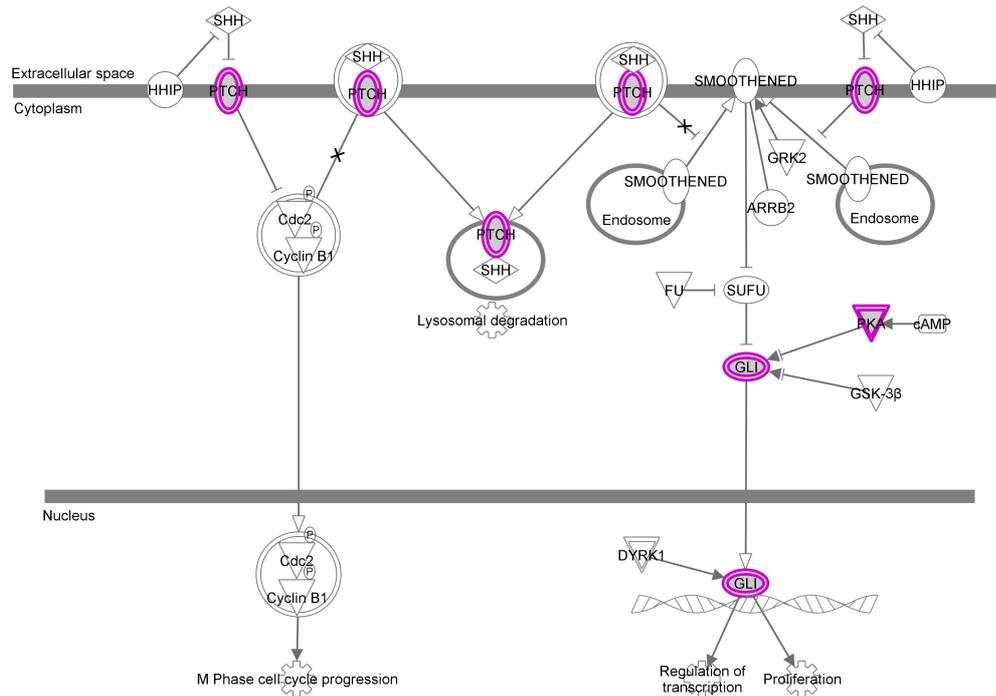


Figura 19. ARNm presentes en la muestra de axoplasma codifican para proteínas de la vía de señalización Sonic Hedgehog. Los ARNm encontrados en la muestra de axoplasma se marcan en violeta.

El transcriptoma de axones maduros difiere, en parte, del reportado para axones en cultivo

Evaluamos cuántos de los ARNs identificados en nuestro estudio ya habían sido reportados como presentes en el compartimiento axonal, encontrando que eran 368 (un 60%, ver Figura 13). Al realizar interpretaciones sobre esta comparación hay que tener varias observaciones en cuenta.

Primero, la muestra analizada en el presente trabajo proviene de axones mielinizados maduros, los cuales fueron obtenidos de ratas adultas, sin un previo pasaje por cultivo. Todos los conjuntos de datos con los cuales se comparó nuestra lista proviene de neuronas en cultivos, por lo tanto, son axones regenerantes.

Segundo, las raíces utilizadas para la obtención de los axoplasmas eran raíces

ventrales (axones provenientes de motoneuronas), mientras que en el trabajo de Gummy y colaboradores, así como el de Minis y colaboradores, los axones provienen de neuronas del DRG (axones principalmente provenientes de neuronas sensoriales). En el trabajo de Zivraj y colaboradores se analizan axones provenientes de las neuronas ganglionares de la retina.

Tercero, el transcriptoma obtenido en la presente tesis no es un transcriptoma completo, sino uno de baja cobertura. A pesar de las diferencias señaladas entre los conjuntos de datos, es interesante destacar que los ARNs que ya fueron reportados como presentes en axones, están asociados a procesos ubicuos de las células en general, como el transporte intracelular, transporte y establecimiento de proteínas, y son componentes localizados en el citosol, mitocondrias o asociados al citoesqueleto. En cambio, el restante 40% de los ARNs identificados en la muestra de axoplasma codifican principalmente para proteínas de membrana, y algunas proteínas mitocondriales no reportadas en estudios previos. Para la síntesis de proteínas de membrana es necesario contar con una maquinaria especial, la cual incluye al Retículo Endoplásmico Rugoso, Liso y al Aparato de Golgi. Hasta el momento no ha sido documentada la presencia de estos organelos en axones por estudios de ultraestructura, pero sí se ha mostrado que axones del SNP en cultivo contienen equivalentes funcionales de esta maquinaria (Merianda et al. 2009). Además, se observó que tras una lesión aumentan los niveles de estas proteínas, sugiriendo que los axones regenerantes poseen una capacidad incrementada de sintetizar proteínas de membrana (Merianda et al. 2009; Merianda & Twiss 2013).

Los mensajeros más expresados en el axón codifican proteínas mitocondriales, codificadas por el genoma mitocondrial

Al analizar los ARNs más expresados en la muestra de axoplasma, se observa que se encuentran en los primeros lugares los ARNm que codifican proteínas mitocondriales, codificadas por el genoma mitocondrial. Estos 13 ARNm se encontraron en la muestra de axoplasma, así como también 29 ARNm que dan lugar a proteínas mitocondriales codificados por el genoma nuclear (Figura 14). El enriquecimiento que existe en la lista de ARNs de la muestra de axoplasma respecto a ARNm codificantes para proteínas axonales, se debe al gran número de mitocondrias presente en este compartimiento subcelular.

Al analizar el porcentaje de lecturas que alinean al genoma mitocondrial, se observó que el mismo difiere entre el axoplasma (50%) en comparación a la RVN (24%). En el trabajo de Minis y colaboradores se encontró que en la muestra de axones, más del 20% de las lecturas alinean al genoma mitocondrial, comparado al 2% que lo hace en la muestra de DRG. Para entender a qué se pueden deber las diferencias encontradas es necesario obtener transcriptomas completos (a una mayor cobertura), y quizá comparación del número de mitocondrias identificadas en axones maduros y en cultivo mediante inmunohistoquímica.

En cuanto al aumento del número de lecturas que alinean al genoma mitocondrial en la raíz ventral lesionada (46%) con respecto a la normal (24%), cabe destacar que está reportado un aumento del número de mitocondrias en axones luego de una lesión (Zambonin et al. 2011).

Mensajeros axonales y su posible asociación a proteínas de unión al ARN

Dado que el transporte de ARN usualmente se encuentra mediado por complejos de ribonucleoproteínas, nos interesó saber cuántos de los ARNs presentes en la muestra de axoplasma habían sido reportados asociados a dos proteínas de unión al ARN, como IMP1/ZBP1 y Stau 2. Se encontró que para los dos casos, existía un enriquecimiento de ARNs asociados a las RBPs (EASE Score < 0.005 para el caso de la IMP1 y EASE Score < 5.0E-9 para el caso de Stau2). Si bien se encontró un enriquecimiento para el caso de IMP1, hay que tener en cuenta que este estudio fue realizado en cultivos de células embrionarias de riñón (HEK293), y quizá a este hecho se deba el bajo número de genes encontrado en los axoplasmas (12 ARNs). Para el caso de Stau2, el estudio se realizó en cerebro de embriones de ratas, y de los mensajeros asociadas a esta proteína se encontraron un total de 42 ARNs en la muestra de axoplasma. De esta manera, se intentó identificar posibles proteínas de unión al ARN que puedan ser responsables de la localización de los mensajeros presentes en el axoplasma en dicho compartimiento subcelular. Adicionalmente conocemos que IMP1/ZBP1 fue descrita en axoplasmas de raíces ventrales en lugares donde se encontraba uno de sus blancos, el ARNm codificante para la β -actina (Sotelo-Silveira et al. 2008). Uno de los ARNm que coinciden en estar presente en la muestra axonal y en el extracto de ARNm asociado a IMP1 en las células HEK es este último caso. Esto apoyaría la idea de que quizás IMP1 participa del transporte de ARNm en axones, pero sería interesante realizar estudios de inmunoprecipitación para IMP1/ZBP1 en extractos de raíces ventrales, combinados con secuenciación de ARN para conocer mejor su composición.

Mensajeros axonales y su posible asociación a motores moleculares

Mediante el estudio de ARNm que co-inmunoprecipitan junto al motor molecular miosina Va, se buscó profundizar en el entendimiento de los mecanismos de transporte y localización de mensajeros en el dominio axonal. De esta manera, identificamos más de 260 ARNm que se asocian a MyoVa. Las principales funciones de dichos ARNs son modificaciones post-transcripcionales de ARNs, enfermedades neurológicas, ensamblaje y mantenimiento celular y tráfico de proteínas. Asimismo, se confirmaron la presencia de mensajeros asociados a MyoVa en inmunoprecipitados de cerebros e identificados en axoplasmas (en el trabajo de Gumy y colaboradores) en muestras de inmunoprecipitados de raíces dorsales. Por último, se encontró que los 3'UTRs de los mensajeros asociados a MyoVa estarían enriquecidos en *zip-codes* similares a los encontrados en β -actina y tau, pero no en *zip-codes* similares a los de CamKII (Ver Material Suplementario) (Calliari, Farías et al 2014).

Comparando la lista de ARNs asociados a MyoVa con la de ARNs presentes en el axoplasma encontramos 14 ARNm en común, los cuales se listan en la Tabla 8. Mediante este análisis buscamos aproximarnos al entendimiento de cuál es el mecanismo de transporte de los ARNs identificados en la muestra de axoplasma. Estudios posteriores, inmunoprecipitando MyoVa y otros motores moleculares en raíces ventrales y realizando la secuenciación masiva de los ARNs que co-inmunoprecipiten junto a ellos, permitirán realizar análisis más completos de los mecanismos de transporte de los ARNs hacia el dominio axonal.

Luego de una lesión en la raíz ventral cambian los niveles de expresión de genes relacionados a ribosomas, proteólisis mediada por ubiquitinación y fosforilación oxidativa

A partir del análisis de expresión diferencial entre las muestras de RVL con respecto a la RVN se identificaron 1489 mensajeros para los cuales, el cambio en el nivel de expresión fue mayor a 2 veces (Figura 15). Cuando se realiza análisis de enriquecimiento en las vías KEGG, se observa una sobre-representación de ARNs asociados a las vías de ribosoma, proteólisis mediada por ubiquitinación y fosforilación oxidativa. Varios trabajos han reportado que, tras una axotomía, aumentan los niveles de mensajeros codificantes para ubiquitina en los somas de motoneuronas, y describen que la proteólisis mediada por ubiquitinación es un proceso involucrado en la elongación de axones regenerantes (Savedia & Kiernan 1994; Tian & Wu 2013).

Por otro lado, se analizó si en la muestra de axoplasma habíamos identificado algún ARNs que cambie su expresión luego de la lesión en la raíz ventral. Se encontraron un total de 71 ARNs en la muestra de axoplasma que, tras una lesión, cambian su expresión en la raíz ventral. Las categorías de procesos biológicos más representadas fueron elongación de la traducción, traducción y transporte mediado por vesículas. Si bien mediante la aproximación experimental realizada en la presente tesis no recabamos la información necesaria para identificar en qué compartimiento celular ocurrió el cambio de expresión, esta información obtenida nos permite elegir candidatos para evaluar, mediante hibridización *in situ* por ejemplo, si luego de una lesión ocurren cambios de expresión del ARN dentro del axoplasma. También se podría analizar de donde provienen dichos ARNs, si desde el soma neuronal o desde las células de Schwann (Court et al. 2011; Lopez-Verrilli & Court 2012; Lopez-Verrilli & Court 2013; Sotelo et al. 2013; Sotelo et al. 2014).

IX. Conclusiones y Perspectivas

En la presente tesis se logró optimizar la técnica de micro-dissección para obtener preparaciones de axoplasmas con una menor cantidad de contaminantes gliales, y mediante la misma poder analizar los ARNs presente en axones maduros mielinizados. Por otro lado, se diseñó un ensayo de control de pureza de las muestras de axoplasma mediante qPCR, evaluando el grado de enriquecimiento de la preparación axonal en marcadores axonales, y la disminución de marcadores gliales en comparación a la RVN. Los resultados de la presente tesis permitieron conocer, por primera vez a gran escala, la diversidad y composición del transcriptoma de axones mielínicos maduros. Si bien el transcriptoma obtenido es de baja cobertura, este análisis nos permitió conocer los ARNs más abundantes en este compartimiento subcelular. El análisis funcional de los ARNm axonales muestra que el axón posee la información para responder a señales o desarrollar funciones dependiente del entorno. Los ARNm presentes en el axoplasma se asocian a proteínas de unión al ARN (ZBP1 y Stau2), así como también a motores moleculares (MyoVa). También observamos que el transcriptoma de axones mielínicos adultos difiere, en parte, del reportado para axones en cultivo. A su vez, los ARNm más abundantes en la muestra axoplasmica codifican proteínas mitocondriales. Del análisis de expresión diferencial de la raíz ventral frente a una lesión, observamos que 1489 mensajeros cambian su expresión. Un total de 71 de estos ARNs están presentes en la muestra de axoplasma.

A modo de perspectivas, consideramos que debemos realizar una secuenciación profunda, mediante otra tecnología de secuenciación, para así obtener el transcriptoma axonal completo. Posteriormente, pensamos que sería importante elegir candidatos entre los ARNm presentes en la muestra de axoplasma, para realizar confirmaciones mediante

hibridización *in situ* sobre preparaciones de axoplasma (obtenidos mediante microdissección), así como también en cortes histológicos de raíces ventrales. De esta manera, seríamos capaces no solo de confirmar si el mensajero se localiza dentro del axón, sino que también se confirmaría si está o no presente en la célula de Schwann.

Por otro lado, nos resultó muy interesante haber encontrado en la muestra de axoplasma un gran número de ARNm que, tras una lesión, cambian su expresión en la raíz ventral. Para profundizar en este tema, y evaluar si dentro del axoplasma existe un cambio en la abundancia de estos mensajeros, también podríamos elegir candidatos y evaluar mediante hibridización *in situ* si, tras una lesión, encontramos más o menos mensajeros dentro de este compartimiento. Siguiendo con la línea trabajada por el grupo (Sotelo et al. 2013; Sotelo et al. 2014), podríamos analizar cuál es la fuente de la cual provienen los mensajeros que aumentan su nivel de expresión, si es el soma neuronal o son transferidos por la célula de Schwann. Si combinamos la técnica de hibridización *in situ* con la incubación de la raíz lesionada en un medio con un análogo de uridina (BrU), podríamos analizar si dicho mensajero proviene de la célula de Schwann.

Para profundizar en el estudio de los mecanismos de transporte de los mensajeros hacia el dominio axonal, nos planteamos realizar inmunoprecipitaciones de motores moleculares (como MyoVA, y alguna quinesina), así como también proteínas de unión al ARN, en muestras de raíces ventrales. Luego de obtenido el ARN asociado a dichas proteínas, se procesa para su secuenciación y las listas de ARN asociados a cada proteína pueden ser comparados con la lista de mensajeros detectados en el axoplasma. Estos estudios planteados son parte de un proyecto de Iniciación a la Investigación 2013 de CSIC, para el cual obtuvimos financiación y está siendo llevado a cabo.

Por último, pensamos que sería muy interesante realizar análisis similares con axones provenientes de distintos tipos de neuronas, como por ejemplo, comparar el

transcriptoma de axones provenientes de raíces dorsales con el de ventrales. Por otro lado, se podría analizar si existen cambios en la complejidad y composición del transcriptoma axonal a lo largo del desarrollo. También, es de nuestro interés realizar aproximaciones similares para evaluar el transcriptoma de muestras axoplásmicas provenientes de nervios de animales utilizados como modelos de estudio para distintas patologías del Sistema Nervioso, como por ejemplo esclerosis lateral amiotrófica (ALS), Charcot-Marie-Tooth (CMT).

X. Bibliografía

- Alvarez, J. & Benech, C.R., 1983. Axoplasmic incorporation of amino acids in a myelinated fiber exceeds that of its soma: a radioautographic study. *Experimental neurology*, 82(1), pp.25–42.
- Alvarez, J., Giuditta, A. & Koenig, E., 2000. Protein synthesis in axons and terminals: significance for maintenance, plasticity and regulation of phenotype With a critique of slow transport theory. *Progress in neurobiology*, 62, pp.1–62.
- Anders, S. & Huber, W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology*, 11(10), p.R106.
- Anders, S., Pyl, P.T. & Huber, W., 2014. *HTSeq A Python framework to work with high-throughput sequencing data*, Cold Spring Harbor Labs Journals.
- Angeloni, N. et al., 2013. Sonic hedgehog is neuroprotective in the cavernous nerve with crush injury. *The journal of sexual medicine*, 10(5), pp.1240–50.
- Barrette, B. et al., 2010. Transcriptional profiling of the injured sciatic nerve of mice carrying the Wld(S) mutant gene: identification of genes involved in neuroprotection, neuroinflammation, and nerve regeneration. *Brain, behavior, and immunity*, 24(8), pp.1254–67.
- Bassell, G.J. & Kelic, S., 2004. Binding proteins for mRNA localization and local translation, and their dysfunction in genetic neurological disease. *Current opinion in neurobiology*, 14(5), pp.574–81.
- Bellingham, S. a et al., 2012. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Frontiers in physiology*, 3(May), p.124.
- Benech, C. et al., 1982. Autoradiographic study of RNA and protein synthesis in sectioned peripheral nerves. *Experimental neurology*, 76(1), pp.72–82.
- Black, M.M. & Lasek, R.J., 1980. Slow components of axonal transport: two cytoskeletal networks. *The Journal of cell biology*, 86(2), pp.616–23.
- Black, M.M. & Lasek, R.J., 1977. The presence of transfer RNA in the axoplasm of the squid giant axon. *Journal of neurobiology*, 8(3), pp.229–37.
- Brown, A., 2003. Axonal transport of membranous and nonmembranous cargoes: a unified perspective. *The Journal of cell biology*, 160(6), pp.817–21.
- Brown, A., Wang, L. & Jung, P., 2005. Stochastic Simulation of Neurofilament Transport in Axons: The “Stop-and-Go” Hypothesis. *Molecular biology of the cell*, 16, pp.4243–4255.
- Calliari, A., 2008. Implicancias de la proteína miosina Va en los procesos de generación de asimetrías y polarización celular. *Tesis de Doctorado. PEDECIBA. Uruguay*.
- Calliari, A., Farías, J., Puppo, A., Canclini, L., Mercer, J.A., et al., 2014. Myosin Va associates with mRNA in ribonucleoprotein particles present in myelinated peripheral axons and in the central nervous system. *Developmental neurobiology*, 74(3), pp.382–96.
- Calliari, A., Farías, J., Puppo, A., Canclini, L., Mercer, J. a, et al., 2014. Myosin Va associates with mRNA in ribonucleoprotein particles present in myelinated peripheral axons and in the central nervous system. *Developmental neurobiology*, 74(3), pp.382–96.
- Calliari, A. et al., 2002. Myosin Va is locally synthesized following nerve injury. *Cell motility and the cytoskeleton*, 51(4), pp.169–76.
- Campenot, R.B., 1982. Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. II Local control of neurite growth by nerve growth factor. *Developmental biology*, 93(1), pp.1–12.
- Campenot, R.B., 1977. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(10), pp.4516–9.
- Campenot, R.B. & Eng, H., 2000. Protein synthesis in axons and its possible functions. *Journal of*

neurocytology, 29(11-12), pp.793–8.

- Canclini, L. et al., 2014. Association of Myosin Va and Schwann cells-derived RNA in mammal myelinated axons, analyzed by immunocytochemistry and confocal FRET microscopy. *Methods (San Diego, Calif.)*, 66(2), pp.153–61.
- Cochard, P. & Paulin, D., 1984. Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 4(8), pp.2080–94.
- Conway, L. & Ross, J.L., 2013. A model system to study transport of self-assembled cargos. *Communicative & integrative biology*, 6(5), p.e25387.
- Court, F. a et al., 2008. Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(43), pp.11024–9.
- Court, F.A. et al., 2011. Morphological evidence for a transport of ribosomes from Schwann cells to regenerating axons. *Glia*, 59(10), pp.1529–39.
- Diefenbach, T.J. et al., 2002. Myosin 1c and myosin IIB serve opposing roles in lamellipodial dynamics of the neuronal growth cone. *The Journal of cell biology*, 158(7), pp.1207–17.
- Doyle, M. & Kiebler, M. a, 2011. Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *The EMBO journal*, 30(17), pp.3540–52.
- Droz, B. & Leblond, C.P., 1963. Axonal migration of proteins in the central nervous system and peripheral nerves as shown by radioautography. *The Journal of comparative neurology*, 121, pp.325–46.
- Duchaîne, T.F. et al., 2002. Staufin2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *Journal of cell science*, 115(Pt 16), pp.3285–95.
- Eva, R. et al., 2012. ARF6 directs axon transport and traffic of integrins and regulates axon growth in adult DRG neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(30), pp.10352–64.
- Eva, R. & Fawcett, J., 2014. Integrin signalling and traffic during axon growth and regeneration. *Current opinion in neurobiology*, 27C, pp.179–185.
- Farina, K.L. et al., 2003. Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *The Journal of cell biology*, 160(1), pp.77–87.
- Foth, B.J., Goedecke, M.C. & Soldati, D., 2006. New insights into myosin evolution and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), pp.3681–6.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D. & Krämer-Albers, E.-M., 2012. Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Frontiers in physiology*, 3(April), p.119.
- Gaete, J., Kameid, G. & Alvarez, J., 1998. Regenerating axons of the rat require a local source of proteins. *Neuroscience letters*, 251(3), pp.197–200.
- Gagnon, J.A. & Mowry, K.L., 2011. Molecular motors: directing traffic during RNA localization. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 46(3), pp.229–39.
- Garner, C.C., Tucker, R.P. & Matus, A., 1988. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature*, 336(6200), pp.674–7.
- Giuditta, A. et al., 1977. Factors for protein synthesis in the axoplasm of squid giant axons. *Journal of neurochemistry*, 28(6), pp.1393–5.
- Giuditta, A. et al., 2002. Gene Expression in the Squid Giant Axon : Neurotransmitter Modulation of RNA Transfer From Periaxonal Glia to the Axon Perchlorate Prevents Sodium Channel Gating and Sodium Protects in the Squid Giant Axon. *The Biological Bulletin*, 203, pp.189–190.

- Giuditta, A., Dettbarn, W.D. & Brzin, M., 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), pp.1284–7.
- Gould, R.M. et al., 2000. Messenger RNAs located in myelin sheath assembly sites. *Journal of neurochemistry*, 75(5), pp.1834–44.
- Griffiths, I.R. et al., 1989. Expression of myelin protein genes in Schwann cells. *Journal of neurocytology*, 18(3), pp.345–52.
- Gumy, L.F. et al., 2011. Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA (New York, N.Y.)*, 17(1), pp.85–98.
- Gunawardena, S. & Goldstein, L.S.B., 2004. Cargo-carrying motor vehicles on the neuronal highway: transport pathways and neurodegenerative disease. *Journal of neurobiology*, 58(2), pp.258–71.
- Hartman, M.A. & Spudich, J.A., 2012. The myosin superfamily at a glance. *Journal of cell science*, 125(Pt 7), pp.1627–32.
- Hirokawa, N., 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5350), pp.519–26.
- Hirokawa, N. & Noda, Y., 2008. Intracellular Transport and Kinesin Superfamily Proteins, KIFs: Structure, Function, and Dynamics. *Physiological Reviews*, 88, pp.1089–1118.
- Hodge, T. & Cope, M.J., 2000. A myosin family tree. *Journal of cell science*, 113 Pt 19, pp.3353–4.
- Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A., 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*, 37(1), pp.1–13.
- Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A., 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1), pp.44–57.
- Inatani, M., 2005. Molecular mechanisms of optic axon guidance. *Die Naturwissenschaften*, 92(12), pp.549–61.
- Ingoglia, N.A. et al., 1983. Incorporation of 3H-amino acids into proteins in a partially purified fraction of axoplasm: evidence protein modification in squid giant axons. *Journal of Neuroscience*, 3(12), pp.2463–2473.
- Jeong, J.-H. et al., 2007. The transport of Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes involves kinesin motor protein and is modulated by mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of neurochemistry*, 102(6), pp.2073–84.
- Jøanson, L. et al., 2007. Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 6(5), pp.798–811.
- Joshi, N.A. & Fass, J.N., 2011. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files. Available at: <https://github.com/najoshi/sickle>.
- Kanai, Y., Dohmae, N. & Hirokawa, N., 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, 43(4), pp.513–25.
- Keene, J.D., 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature reviews. Genetics*, 8(7), pp.533–43.
- Kikkawa, M., 2013. Big steps toward understanding dynein. *The Journal of cell biology*, 202(1), pp.15–23.
- Kindler, S. et al., 2005. RNA transport and local control of translation. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, pp.223–45.
- Koenig, E. et al., 2000. Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along

- mammalian myelinated axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(22), pp.8390–400.
- Koenig, E., 1979. Ribosomal RNA in Mauthner axon: implications for a protein synthesizing machinery in the myelinated axon. *Brain research*, 174(1), pp.95–107.
- Koenig, E. & Adams, P., 1982. Local protein synthesizing activity in axonal fields regenerating in vitro. *Journal of neurochemistry*, 39(2), pp.386–400.
- Koenig, E. & Giuditta, A., 1999. Protein-synthesizing machinery in the axon compartment. *Neuroscience*, 89(1), pp.5–15.
- Koenig, E. & Martin, R., 1996. Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. *The Journal of neuroscience*, 16(4), pp.1400–11.
- Krauss, J. et al., 2009. Myosin-V regulates oskar mRNA localization in the Drosophila oocyte. *Current biology : CB*, 19(12), pp.1058–63.
- Krichevsky, A.M. & Kosik, K.S., 2001. Neuronal RNA Granules : A Link between RNA Localization and Stimulation-Dependent Translation. *Neuron*, 32, pp.683–696.
- Kun, A. et al., 2007. Ribosomal Distributions in Axons of Mammalian Myelinated Fibers. *Journal of Neuroscience Research*, 85, pp.2087–2098.
- Langmead, B. & Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), pp.357–9.
- Lasek, R.J., Dabrowski, C. & Nordlander, R., 1973. Analysis of axoplasmic RNA from invertebrate giant axons. *Nature: New biology*, 244(136), pp.162–5.
- Lasek, R.J., Gainer, H. & Barker, J.L., 1977. Cell-to-cell transfer of glial proteins to the squid giant axon. The glia-neuron protein transfer hypothesis. *The Journal of cell biology*, 74(2), pp.501–23.
- Lasek, R.J., Garner, J. a & Brady, S.T., 1984. Axonal transport of the cytoplasmic matrix. *The Journal of cell biology*, 99(1 Pt 2), p.212s–221s.
- Lopez-Verrilli, M.A. & Court, F. a, 2013. Exosomes: mediators of communication in eukaryotes. *Biological research*, 46(1), pp.5–11.
- Lopez-Verrilli, M.A. & Court, F. a, 2012. Transfer of vesicles from schwann cells to axons: a novel mechanism of communication in the peripheral nervous system. *Frontiers in physiology*, 3(June), p.205.
- Lorenz, T. & Willard, M., 1978. Subcellular fractionation of intra-axonally transport polypeptides in the rabbit visual system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(1), pp.505–9.
- Maher-Laporte, M. et al., 2010. Molecular composition of staufen2-containing ribonucleoproteins in embryonic rat brain. *PloS one*, 5(6), p.e11350.
- Maher-Laporte, M. & DesGroseillers, L., 2010. Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains. *BMB reports*, 43(5), pp.344–8.
- Merianda, T. & Twiss, J., 2013. Peripheral nerve axons contain machinery for co-translational secretion of axonally-generated proteins. *Neuroscience bulletin*, 29(4), pp.493–500.
- Merianda, T.T. et al., 2009. A functional equivalent of endoplasmic reticulum and Golgi in axons for secretion of locally synthesized proteins. *Molecular and cellular neurosciences*, 40(2), pp.128–42.
- Michaevlevski, I. et al., 2010. Axonal transport proteomics reveals mobilization of translation machinery to the lesion site in injured sciatic nerve. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 9(5), pp.976–87.

- Millecamps, S. et al., 2007. Conditional NF-L transgene expression in mice for in vivo analysis of turnover and transport rate of neurofilaments. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(18), pp.4947–56.
- Minis, A. et al., 2014. Subcellular transcriptomics-dissection of the mRNA composition in the axonal compartment of sensory neurons. *Developmental neurobiology*, 74(3), pp.365–81.
- Van Minnen, J. et al., 1997. De novo protein synthesis in isolated axons of identified neurons. *Neuroscience*, 80(1), pp.1–7.
- Monshausen, M., Gehring, N.H. & Kosik, K.S., 2004. The mammalian RNA-binding protein Staufen2 links nuclear and cytoplasmic RNA processing pathways in neurons. *Neuromolecular medicine*, 6(2-3), pp.127–44.
- Morris, A.R., Mukherjee, N. & Keene, J.D., 2010. Systematic analysis of posttranscriptional gene expression. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 2(2), pp.162–80.
- Müller, C. et al., 2013. Making myelin basic protein -from mRNA transport to localized translation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7(September), p.169.
- Muslimov, I. a et al., 2002. Transport of Neuronal BC1 RNA in Mauthner Axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(11), pp.4293–301.
- Pachter, J.S. & Liem, R.K., 1984. The differential appearance of neurofilament triplet polypeptides in the developing rat optic nerve. *Developmental biology*, 103(1), pp.200–10.
- Pagliarini, D.J. et al., 2008. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134(1), pp.112–23.
- Palay, B.Y.S.L. & Palade, G.E., 1955. The fine structure of neurons. *J Biophysic and biochem cytol*, 1(1), pp.69–88.
- Pathak, D., Sepp, K.J. & Hollenbeck, P.J., 2010. Evidence that myosin activity opposes microtubule-based axonal transport of mitochondria. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(26), pp.8984–92.
- Piper, M. & Holt, C., 2004. RNA translation in axons. *Annual review of cell and developmental biology*, 20, pp.505–23.
- Posse de Chaves, E. et al., 1995. Axonal synthesis of phosphatidylcholine is required for normal axonal growth in rat sympathetic neurons. *The Journal of cell biology*, 128(5), pp.913–8.
- Racca, C., Gardiol, A. & Triller, A., 1997. Dendritic and postsynaptic localizations of glycine receptor alpha subunit mRNAs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(5), pp.1691–700.
- Rao, M. V et al., 2002. Myosin Va binding to neurofilaments is essential for correct myosin Va distribution and transport and neurofilament density. *The Journal of cell biology*, 159(2), pp.279–289.
- Rishal, I., Michaelevski, I., et al., 2010. Axoplasm isolation from peripheral nerve. *Developmental neurobiology*, 70(2), pp.126–33.
- Rishal, I., Rozenbaum, M. & Fainzilber, M., 2010. Axoplasm isolation from rat sciatic nerve. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (43).
- Ross, a F. et al., 1997. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Molecular and cellular biology*, 17(4), pp.2158–65.
- Ross, J.L., Ali, M.Y. & Warshaw, D.M., 2008. Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Current opinion in cell biology*, 20(1), pp.41–7.
- Salerno, V.P. et al., 2008. Myosin-Va mediates RNA distribution in primary fibroblasts from multiple organs. *Cell Motil Cytoskeleton*, 65(5), pp.422–433.

- Savedia, S. & Kiernan, J.A., 1994. Increased production of ubiquitin mRNA in motor neurons after axotomy. *Neuropathology and applied neurobiology*, 20(6), pp.577–86.
- Scott, D.A. et al., 2011. Mechanistic logic underlying the axonal transport of cytosolic proteins. *Neuron*, 70(3), pp.441–454.
- Seog, D.-H., Lee, D.-H. & Lee, S.-K., 2004. Molecular motor proteins of the kinesin superfamily proteins (KIFs): structure, cargo and disease. *Journal of Korean medical science*, 19(1), pp.1–7.
- Sharp, D.J., Rogers, G.C. & Scholey, J.M., 2000. Roles of motor proteins in building microtubule-based structures: a basic principle of cellular design. *Biochimica et biophysica acta*, 1496(1), pp.128–41.
- Sotelo, J.R. et al., 2014. Glia to axon RNA transfer. *Developmental neurobiology*, 74(3), pp.292–302.
- Sotelo, J.R. et al., 2013. Myosin-Va-dependent cell-to-cell transfer of RNA from Schwann cells to axons. *PloS one*, 8(4), p.e61905.
- Sotelo, J.R., Benech, C.R. & Kun, A., 1992. Local radiolabeling of the 68 kDa neurofilament protein in rat sciatic nerves. *Neuroscience letters*, 144, pp.174–176.
- Sotelo-Silveira, J. et al., 2008. Myelinated axons contain beta-actin mRNA and ZBP-1 in periaxoplasmic ribosomal plaques and depend on cyclic AMP and F-actin integrity for in vitro translation. *Journal of neurochemistry*, 104(2), pp.545–57.
- Sotelo-Silveira, J.R., 2003. Caracterización molecular de las placas periaxoplasmicas en axones mielínicos de vertebrados. *Tesis de Doctorado. PEDECIBA. Uruguay*.
- Sotelo-Silveira, J.R. et al., 2004. Myosin Va and kinesin II motor proteins are concentrated in ribosomal domains (periaxoplasmic ribosomal plaques) of myelinated axons. *Journal of neurobiology*, 60(2), pp.187–96.
- Sotelo-Silveira, J.R. et al., 2000. Neurofilament mRNAs are present and translated in the normal and severed sciatic nerve. *Journal of neuroscience research*, 62(1), pp.65–74.
- Sotelo-Silveira, J.R. et al., 2006. RNA trafficking in axons. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 7(5), pp.508–15.
- Steward, O. & Fass, B., 1983. Polyribosomes associated with dendritic spines in the denervated dentate gyrus: evidence for local regulation of protein synthesis during reinnervation. *Progress in brain research*, 58, pp.131–6.
- Tang, S.J. et al., 2001. A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron*, 32(3), pp.463–75.
- Tang, Y. et al., 2012. The slow axonal transport of alpha-synuclein-mechanistic commonalities amongst diverse cytosolic cargoes. *Cytoskeleton*, 69(7), pp.506–513.
- Taylor, A.M. et al., 2009. Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. *The Journal of neuroscience*, 29(15), pp.4697–707.
- Tian, X. & Wu, C., 2013. The role of ubiquitin-mediated pathways in regulating synaptic development, axonal degeneration and regeneration: insights from fly and worm. *The Journal of physiology*, 591(Pt 13), pp.3133–43.
- Varshavsky, A., 1996. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), pp.12142–9.
- Wagner, W., Brenowitz, S.D. & Hammer, J.A., 2011. Myosin-Va transports the endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje neurons. *Nature cell biology*, 13(1), pp.40–8.
- Weiss, P. & Hiscoe, H.B., 1948. Experiments on the mechanism of nerve growth. *The Journal of experimental zoology*, 107(3), pp.315–95.

- Willis, D. et al., 2005. Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(4), pp.778–91.
- Woodhoo, A. & Sommer, L., 2008. Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia*, 56(14), pp.1481–90.
- Wu, X. et al., 1997. Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. *Journal of cell science*, 110 (Pt 7, pp.847–59.
- Yaniv, K. & Yisraeli, J.K., 2002. The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis. *Gene*, 287(1-2), pp.49–54.
- Yoo, S. et al., 2010. Dynamics of axonal mRNA transport and implications for peripheral nerve regeneration. *Experimental neurology*, 223(1), pp.19–27.
- Yoshimura, A. et al., 2006. Myosin-Va facilitates the accumulation of mRNA/protein complex in dendritic spines. *Current biology : CB*, 16(23), pp.2345–51.
- Zambonin, J.L. et al., 2011. Increased mitochondrial content in remyelinated axons: implications for multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, 134(Pt 7), pp.1901–13.
- Zivraj, K.H. et al., 2010. Subcellular Profiling Reveals Distinct and Developmentally Regulated Repertoire of Growth Cone mRNAs. *Journal of Neuroscience*, 30(46), pp.15464–15478.

XI. Material Suplementario

Figura Suplementaria 1. Reporte de calidad de las lecturas de la muestra de axolasma

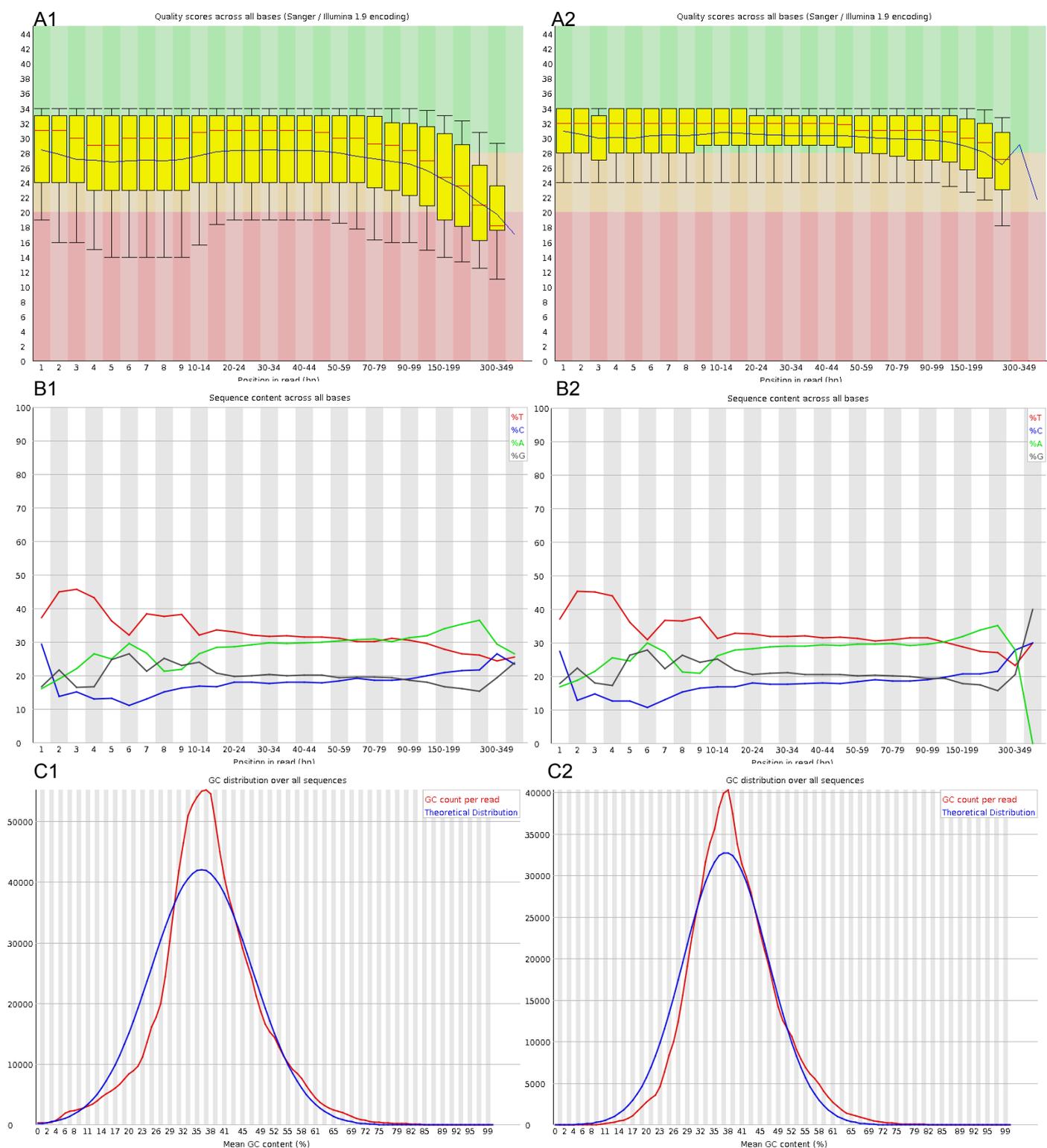


Figura Suplementaria 1. Reporte de calidad de lecturas provenientes de la muestra de axolasma. Se muestran los gráficos de calidad en función de la posición antes (A1) y después del recorte (A2). Contenido GC a lo largo de las lecturas antes (B1) y de después dle recorte (B2). Distribución del contenido en GC en las lecturas antes (C1) y después del recorte (C2).

Myosin Va Associates With mRNA in Ribonucleoprotein Particles Present in Myelinated Peripheral Axons and in the Central Nervous System

Aldo Calliari,^{1,2} Joaquina Farías,³ Agostina Puppo,^{1*} Lucía Canclini,¹ John A. Mercer,⁴ David Munroe,⁵ José R. Sotelo,¹ José R. Sotelo-Silveira^{3,6}

¹ Department of Proteins and Nucleic Acids, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

² Department of Molecular and Cellular Biology, School of Veterinary-UdelaR, Montevideo, Uruguay

³ Department of Genetics, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

⁴ McLaughlin Research Institute, Great Falls MT, USA, and Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, National Centre for Biological Sciences, Bangalore, India

⁵ Cancer Research Technology Program, Leidos Biomedical Research, Inc.-Frederick National Laboratory for Cancer Research, Frederick, Maryland

⁶ Department of Cell and Molecular Biology, School of Sciences-UdelaR, Montevideo, Uruguay

Received 22 May 2013; revised 17 November 2013; accepted 19 November 2013

ABSTRACT: Sorting of specific mRNAs to particular cellular locations and regulation of their translation is an essential mechanism underlying cell polarization. The transport of RNAs by kinesins and dyneins has been clearly established in several cell models, including neurons in culture. A similar role appears to exist in higher eukaryotes for the myosins. Myosin Va (Myo5a) has been described as a component of ribonucleoprotein particles (RNPs) in the adult rat nervous system and associated to ZBP1 and ribosomes in ribosomal periaxoplasmic plaques (PARPs), making it a likely candidate for mediating some aspects of RNA transport in neurons. To test this

hypothesis, we have characterized RNPs containing Myo5a in adult brains of rats and mice. Microarray analysis of RNAs co-immunoprecipitated with Myo5a indicates that this motor may associate with a specific subpopulation of neuronal mRNAs. We found mRNAs encoding α -synuclein and several proteins with functions in translation in these RNPs. Immunofluorescence analyses of RNPs showed apparent co-localization of Myo5a with ribosomes, mRNA and RNA-binding proteins in discrete structures present both in axons of neurons in culture and in myelinated fibers of medullary roots. Our data suggest that PARPs include RNPs bearing the mRNA coding for Myo5a and are equipped with kinesin and Myo5a molecular motors. In conclusion, we suggest that Myo5a is involved in mRNA trafficking both in the central and peripheral nervous systems. © 2013 Wiley

Periodicals, Inc. *Develop Neurobiol* 74: 382–396, 2014

Keywords: RNA transport; ribonucleoprotein complexes; RNP; myosin Va; axon

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*Present address: Telethon Institute of Genetics and Medicine, Naples, Italy.

Correspondence to: J.R. Sotelo-Silveira (jsotelosilveira@iibce.edu.uy).

Contract grant sponsor: I+D Grants of the University of the Republic (CSIC- UdelaR, Uruguay), the Program for the Development of Basic Sciences (PEDECIBA, Uruguay), and the National Agency for Research and Innovation (ANII, Uruguay).

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 22 November 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/dneu.22155

INTRODUCTION

The sorting of specific mRNAs to particular cell locations and the spatial regulation of their translation is

essential to establish cell polarity and thus proper function (Gagnon and Mowry, 2011; Jung et al., 2011). In neurons, mRNA targeting to postsynaptic domains and regulated translation is important in synaptic plasticity (Costa-Mattioli et al., 2007; Westmark and Malter, 2007; Bear et al., 2008). On the presynaptic side, impaired axonal targeting of β -actin mRNA has been postulated to be responsible for spinal motor atrophy in humans (Rossoll et al., 2003). *In vivo*, the 3' UTR of the mRNA coding for β -actin is sufficient to target a GFP transgene into axons (Willis et al., 2011) while the availability of ZBP1, an mRNA binding protein, modulates axonal regeneration (Donnelly et al., 2011). Although the adult axonal transcriptome remains to be characterized, genomic studies revealed a surprising diversity of mRNAs (for review, see Canclini et al., 2012; Deglincerti and Jaffrey, 2013). Recent observations from regenerating unmyelinated axons *in vitro* (Andreassi et al., 2011; Gumy et al., 2011; Zivraj et al., 2011) clearly broaden the possible functionality of the axonal compartment, including a contribution of axonal protein synthesis to neuronal polarity.

While the existence of microtubule-dependent transport of mRNA in neuronal axons is well established (Yoo et al., 2009; Gagnon and Mowry, 2011), the involvement of actin-based motors in RNA transport and localization is less understood. The first, and probably best example of myosin-dependent transport of mRNA was originally described in yeast by Long et al. (1997), where there is an absolute requirement of the class V myosin Myo4p for the transport and localization of *ASH1* mRNA to the bud site (Kruse et al. 2002; for recent review see Paquin and Chartrand, 2008; Gonsálvez and Long, 2012). In metazoans, Myo5a has been implicated in β -actin mRNA localization in cultured fibroblasts (Salerno et al., 2008) but its direct involvement in RNA transport has not been established. More direct evidence was obtained in hippocampal neurons *in vitro*, in which Myo5a was shown to be actively involved in RNA localization through association with specific RNA-binding proteins (Yoshimura et al., 2006; Nalavadi et al., 2012).

In brain extracts, both Myo5a and myosin IIB were found to co-sediment in sucrose gradients and co-immunoprecipitated with the RNA-binding protein Pur-alpha, the S6 ribosomal protein, and mRNAs (Ohashi et al., 2002). In this regard, one of the first characterizations of Myo5a in the axons of the peripheral nervous system showed that this protein is abundant in the axoplasm and in the cytoplasm of the surrounding glia (Calliari et al., 2002). A more detailed study of Myo5a distribution in axons was

carried out by Sotelo-Silveira et al. (2004) using axons of medullary roots, in which it was enriched in periaxoplasmic plaques (PARPs) and co-localizing with ribosomes. Interestingly PARPs also contained ZBP1, the β -actin mRNA-binding protein, together with β -actin mRNA (Sotelo-Silveira et al., 2008). More recently, a Myo5a-dependent Schwann cell-to-axon transfer of RNA was shown (Sotelo et al., 2013).

This evidence strongly supports the hypothesis that the actin cytoskeleton and myosins are involved in RNA compartmentalization in many cell types, including neurons. To better characterize Myo5a-dependent RNA compartmentalization in the nervous system, we have focused on identifying mRNAs associated with Myo5a in both brain and peripheral axons. Combining immunoprecipitation of ribonucleoprotein particles (RNPs) purified from mouse brain with an anti-Myo5a antibody with microarray studies, we identified hundreds of mRNAs associated with Myo5a. These code for proteins that function in multiple pathways. In addition, we used biochemical and immunofluorescence approaches to characterize the association of Myo5a to axonal RNPs *in vitro* and *in vivo*. In the axons forming the rat dorsal medullary roots, RNA was found packed as kinesin-associated RNPs, as evidenced by fluorescence microscopy and immunoprecipitation of Myo5a-containing RNPs. Besides the 18S rRNA, we identified other axonally transported mRNAs (Gumy et al., 2011) included in Myo5a-bearing granules: *actb* (β -actin) and *Snrpg* (nuclear ribonucleoprotein). We also detected the mRNA coding for Myo5a in these RNPs, an observation confirmed by *in situ* hybridization in myelinated axons where it was found co-localizing with ribosomes in PARP domains. Taken together, these findings support the hypothesis that the biochemical identity and the steady state of the axonal compartment rely on a regulated mechanism of selective transport of mRNA, at least partially dependent on Myo5a.

METHODS

Subcellular Fractionation

Purification of RNPs. RNPs were purified from whole brains of young adult Sprague-Dawley rats and C57BL6 mice, as described by Ohashi et al. (2002). Briefly, the brain of a rat or mouse slaughtered by decapitation was immediately washed in ice-cold buffer (Tris pH 7.5, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, EGTA 0.1 mM, cycloheximide 1 μ g/mL, and sucrose 0.32M) chopped in small pieces, and homogenized using a Teflon pestle glass homogenizer. The

homogenate (~10 mL) was centrifuged at 10,000g for 15 min. The resulting supernatant was further ultracentrifuged at 120,000g for 1 h. The pellet was resuspended in 2 mL of the homogenization buffer but with KCl increased to 150 mM. The sample was incubated 15 min on ice to complete the solubilization and finally clarified by centrifugation at 10,000g for 15 min. The supernatant represents the RNP fraction referred below and further used for fractionation by ultracentrifugation in sucrose gradients, Western blot, and immunoprecipitation experiments.

RNP Fractionation by Ultracentrifugation in Sucrose Gradients. Five hundred microliter of the RNP fraction obtained from rat brain was applied onto the top layer of a 15–45% continuous sucrose gradient (4.5 mL). The sucrose was dissolved in 25 mM Tris pH 7.5, 25 mM NaCl, and 5 mM MgCl₂. To avoid the formation of a pellet at the bottom of the tube, a 200 µL cushion of 60% sucrose was added before applying the gradient. The RNP fraction was centrifuged for 1 h at 160,000 g. After centrifugation, the gradient was collected in 300 µL fractions using a peristaltic pump and absorbance at 280 nm was continuously monitored.

Medullary Roots Homogenates. Rat dorsal medullary roots were collected immediately after animal sacrifice and kept on ice. About 200 mg of tissue was collected per animal. If not immediately used, the tissue was kept frozen at –80 degrees. The homogenization buffer was the same as described above, with the addition of 100 µM leupeptin and 50 units per mL of aprotinin. Dorsal roots were resuspended in 1.5 mL of buffer and sonicated for 6 s (three cycles of 2 s). To complete RNP extraction, the tissue was further homogenized using a Teflon pestle homogenizer. The homogenate (about 1 mL) was centrifuged at 10,000 g for 30 min. The resultant supernatant was used for the immunoprecipitation experiments or for protein detection by Western blot.

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation experiments were carried out using Protein A/G agarose (30 µL of 2% per 500 µL of homogenate) and 1 mM PMSF for 4 hours at 4°C. Before immunoprecipitation, total protein concentration in tissue extracts was adjusted to 1 mg/mL.

For microarrays, we used RNPs obtained from whole brain of mice (see “Purification of RNPs,” more above). Then, each RNP fraction was divided into thirds: the first immunoprecipitated using anti-Myo5a antibodies (5 µg of anti-Myo5a), the second immunoprecipitated with an antibody against poly(A) binding protein (PABP, 2 µg of antibody) and the last used for a negative control of immunoprecipitations. Because most eukaryotic mRNAs of nuclear origin interact with PABP at their 3' ends (Kahvejian et al., 2005), we assumed that those mRNAs pulled down with PABP should be representative of the total mRNA population associated with RNPs. As negative con-

trol, we tested two different conditions: an antibody against a protein not related with RNPs (anti-diphtheria toxin; 2 µg of antibody) or no antibody during the immunoprecipitation. The experiments were carried out in triplicate.

For Western blot and qPCR studies, we pulled down Myo5a and ribosomal P proteins from RNP extracted from mouse brain (Ohashi et al., 2002) and homogenates of medullary roots of rats. Myo5a was immunoprecipitated as described above, while ribosomes were immunoprecipitated using 10 µL of anti-P antiserum (10 mg/mL; Immunovision) which recognizes the ribosomal P proteins P0, P1 and P2. As a negative control for Western blot and immunoprecipitates, we used non specific rabbit or human IgGs. After 4 h at 4°C, the Protein A/G Agarose beads were washed with PBS and processed for Western blot or RNA extraction.

Microarray Analysis

A total of three independent microarrays experiments were carried out for each immunoprecipitation condition (anti Myo5a, anti PABP, anti-diphtheria toxin and beads alone; see Supporting Information Fig. 2). The RNA extracted from mouse brain immunoprecipitates was processed for hybridization with GeneChip 3' IVT Express (Affymetrix), in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, cDNA was synthesized from immunoprecipitated RNA using reverse transcriptase followed by second-strand synthesis to generate double-stranded cDNA. An *in vitro* transcription reaction was used to generate biotinylated cRNA. After purification and fragmentation, cRNA was hybridized to the GeneChip® Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array. Post-hybridization washes were performed on an Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450. Arrays were scanned on an Affymetrix GeneChip Scanner 3000. Scanned arrays were normalized using GCRMA in Partek software (Partek Incorporated). Ratios of signal intensity were calculated and genes that had fold change (IP-Myo5a/IP-control) and (IP-PABP/IP control) > 1.4 were listed. The list obtained was used as the input to ingenuity pathways analysis (IPA) to obtain indications of the functional relationships (Network Functions) of the enriched genes. All microarray data were submitted to the gene expression omnibus (GEO) database.

Real Time PCR

qRT-PCR of mRNAs isolated from immunoprecipitated brain RNPs was used to validate the microarray results and was carried out in triplicate. qRT-PCR of mRNAs sampled from medullary roots immunoprecipitates were performed (in quadruplicate) to study the MyoVa-RNA association in mature axons. The RNeasy®-Micro kit (Ambion) was used to isolate RNA from immunoprecipitates of brain RNPs, medullary roots and the total RNPs fraction. After DNase treatment, 0.5 µg of the purified RNA was reverse transcribed using standard conditions and oligo dT₂₀ as primers or random primers to retain ribosomal RNAs. First

strand cDNA was obtained by reverse transcription using the SuperScript® III reverse transcriptase (Invitrogen), according to the instructions of the manufacturer. Candidate genes of interest for qRT-PCR were chosen from the list of genes enriched in immunoprecipitates of Myo5a yielded by the microarrays experiments (see Supporting Information Table 1). Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using iQ™ SYBR® Green Supermix kit (BioRad) and Rotor Gene 6000 and relative gene expression levels were calculated in regards to control conditions (control immunoprecipitations).

Sequences of each primer were designed as follows: Snca forward primer: CATCTTTAGCCATGGATGTGTTC and reverse primer: CACACCCTGCTTGGTTTTCT, St3a forward primer: TCTAAAGCTCCTCATCTGTCCG and reverse primer: TGAGCACAGCAAAAAGACGA, Hsp90aa1 forward primer: GGAGATAAATCCTGATC ACTCCA, and reverse primer: CAAGATGACCAGATCC TTCACA, Rnf139 forward primer: ACGTCTGCTCGGA TTACACC and reverse primer: TCTTGAATGTACAGC CATTTC, Cpeb4 forward primer: CCAACCATCAAG GATAAACCA and reverse primer: ATATCGTTTTCC GTGGGTCA, Eef1g forward primer: CTGAGTACCGCT TCCCTGAA and reverse primer: TCAGTTTGTCCAAT CGCTGA, Skap2 forward primer: ATCTGTGCTCCCGA TAAACG, and reverse primer: CGTCAGATCCCATGT CTTGTAA, Ndufv2 forward primer: CGTTCCTGTC AGCCTAGAG, and reverse primer: TGCACTGCTGTCT TATGCAA, Snrpg forward primer: CTCACTCCTTCGC CGTTG, and reverse primer: AGGGTGGGCTTTGCT CAT, Sfxn1 forward primer: GCCACCCAACATTAATCA, and reverse primer: CTGGGATCAGTAACCGT GAAG, Pmp22 forward primer: GAATTCCTGTTCCT GTTCTTCTGCCAGCTC, and reverse primer: AAGCTTG TAGATGGCCGCTGCACTCATC, Actb forward primer: TATGTTGCCCTAGACTTCGAGC, and reverse primer: CAGCTCATAGCTCTTCTCCAGG, 18S ribosomal RNA forward primer: CCGCAGCTAGGAATAATGGA and reverse primer: GGACGCCGAATTAATACTGAG, Myo5a forward primer: TGTCAGCATGGCATGGAACCCAG, and reverse primer: ATGGCTTCCGCTTCATCGTCAG.

Immunodetection of Proteins. Labeling of Nucleic Acids

Cell Culture. Dorsal root ganglia from young (30 days old) mice were collected in Hanks' Salt Balanced Solution (HBSS) and treated with collagenase 0.25% w/v for 45 min at 37°C. After collagenase digestion, DRGs were washed with HBSS free of calcium and magnesium and treated with trypsin 0.25% w/v for 15 min at 37°C. Mechanical dissociation of neurons was achieved by triturating the ganglia using a fire polished Pasteur pipette to obtain a homogeneous cell suspension. The cells were then applied onto a 30% Percoll solution in HBSS in a 15 mL conical centrifuge tube and centrifuged at 1200 rpm for 10 min. The neurons were recovered from the bottom of the tube, washed with culture medium (Ham's F12 with supplements and 50

ng/mL of NGF) and plated onto poly-L-lysine coated coverslips.

Isolation of Axoplasmic Wholemounds From Myelinated Dorsal Spinal Root Fibers.

Dorsal medullary roots used in the present study were dissected from euthanized rats according to the study by Koenig et al. (2000). The tissues (several nerve root/rootlet) were suspended in a modified gluconate-substituted calcium-free Cortland salt solution (Koenig and Martin, 1996) containing 132 mM Na-gluconate, 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM glucose, 3.5 mM MgSO₄, and 2 mM EGTA, pH 7.2, stored at 4°C. A nerve root/rootlet, 3–5 mm, was immersed in a solution of 30 mM zinc acetate, 0.1M N-tris[hydroxymethyl]methylglycine (Tricine; Sigma, St. Louis, MO), pH 4.8, for 10 min and then was placed in a 35 mm plastic culture dish containing 2 mL of a "pulling" solution (i.e., a solution in which axoplasm was translated out from its myelin sheath). The composition of the pulling solution was 40 mM aspartic acid neutralized by 0.04M Tris at pH 5.5, 1 mM NaN₃, and 0.01% Tween 20 (Bio-Rad, Hercules, CA) to reduce surface tension. For each test, plaques were identified after staining with YOYO-1 (see below). Isolated axoplasmic whole mounts were attached with the aid of eyebrow hair tools to a N° 1 coverslip coated with 1% 3-aminopropyltriethoxysilane (Polysciences, Warrington, PA) in ethanol.

Immunofluorescent Labeling. DRG neurons or axoplasmic wholemounts attached to a coverslip were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline and 0.01% triton X-100, adjusted to pH 7.2 with NaOH, for 15 min. They were washed in PBS (cells) or 0.15M ammonium acetate and 0.1% Tween 20, pH 7.2 (axons wholemounts), three times for 5 min each and then immersed in an immunoblocking solution, composed of 5% normal goat serum in PBS, and 5 mM NaN₃ for 30 min. Incubation with primary antibody was 1 h. Coverslips were washed three times with PBS and incubated for 60 min with a secondary antibody conjugated to one of three Alexa fluorophores (Invitrogen) having an excitation maximum at either 488 nm, 546 nm, or 555 nm. The immunostained specimens were washed three further times for 5 min each before being mounted.

YOYO-1 Staining of Axoplasmic Wholemounds.

One microliter of a 1:10 stock of YOYO-1 iodide in DMSO (491/509, Invitrogen-Molecular Probes) was added to the pulling medium (final concentration, 1:5000) for 15 min. The dye was washed out by brief immersion in acidified 0.15M ammonium acetate (pH-adjusted to 4.5 with acetic acid) and 0.1% Tween 20. For fluorescence microscopy, the coverslip with axoplasmic sprays was mounted on a flow-thru chamber. The chamber was constructed by inverting the coverslip over spacers (0.5–1 mm thick) made of Silastic elastomer (Dow Corning, Midland, MI) attached to a large glass coverslip (35 × 50 mm) taped to a thin, U-shaped metal plate, and the well was filled with acidified ammonium acetate solution.

Antibodies. The immunoreagents used were (1) human polyclonal antibody against human ribosomal P antigen (Immunovision; Springdale, AR), obtained by ammonium sulphate precipitation of immunoglobulins present in whole serum; (2) rabbit affinity-purified polyclonal against a recombinant protein containing the Myo5a head domain (amino acids 5–752), a generous gift of Roy Larson (Espreafico et al., 1992); (3) goat polyclonal affinity-purified anti-Myo5a against the N-terminal domain (sc-17706 from Santa Cruz Biotechnology); (4) rabbit affinity purified polyclonal antibody against a synthetic peptide unique of HuD protein (Mobarak et al., 2000), a generous gift of Nora Perrone-Bizzozero; (5) monoclonal IBII from Sigma-Aldrich that recognizes the heavy chain of Kif5 and Kif3 families of kinesins (Sotelo-Silveira et al., 2004); (6) polyclonal rabbit antibody against poly (A) binding protein (sc-67017, from Santa Cruz Biotechnology); and (7) polyclonal anti-diphtheria toxin from Abcam (Ab 151222). Alexa-conjugated secondary antibodies were obtained from Invitrogen and used according to the manufacturer's instructions in dilutions ranging from 1/2000 to 1/3000.

Probes for Myo5a and In Situ Hybridization. A fragment (nucleotides 3171–6599) of the chicken Myo5a cDNA (clone 32a, kindly provided by Enilza Espreafico) was cloned into pBluescript SK +/–. ISH was carried out according to Sotelo-Silveira et al. (2011) for axonal whole mounts and Sotelo-Silveira et al. (2000) for sciatic nerves. The plasmid was digested at the HPA site and transcribed using the T7 promoter at the 5' end. Transcription was carried out for 30 min using 10 units of T7 polymerase under the conditions provided by the manufacturer (Boehringer Mannheim). To label the probe, we used digoxigenin 11-UTP. The antisense sequence (1027 nucleotides) includes the 3'-UTR and the region coding for the globular tail domain of the protein (COOH end). Residual DNA was eliminated by adding two units of DNase for 30 min at 37°C. Histological sections and naked wholemount axons were equilibrated in hybridization solution composed by 50% formamide, 500 µg/µL denatured salmon DNA, 250 µg/µL of yeast tRNA Denhardt's solution (0.1% w/v Ficoll, 0.1% w/v polyvinylpyrrolidone, 0.1% w/v BSA Fraction V) and SSC 4× (0.6M NaCl, 60 mM sodium citrate, pH 7) for 15 min at 42°C. New hybridization solution containing 1–2 ng/µL of Myo5a antisense probe was added and incubated at 42°C for 4 h (axons) or overnight (histological sections) in a humidity chamber. After that, samples were washed with SSC 4× to 0.25× in 15-min cycles at 42°C. Endogenous peroxidase activity was blocked with 0.01% hydrogen peroxide in PBS for 30 min, followed by blocking unspecific binding sites with 0.5% w/v of Promega blocking reagent for 30 min. Finally, the probe was detected using HRP-labeled anti-DIG antibody (Boehringer Mannheim) and tyramide-Cy3 reagent as substrate.

Microscopy and Image Processing. Epifluorescence imaging was performed with an Olympus BX61 microscope coupled to a DP70 digital camera (Olympus). The

Developmental Neurobiology

confocal system used consisted in an Olympus FV 300 equipped with krypton 488, HeNe 543, and HeNe 633 lasers in combination with an upright Olympus BX61 microscope. High-resolution images were captured using an oil immersion objective Plan Apo x60, with 1.42 NA lens. Co-localization studies were carried out using the Fluoview co-localization tool. Quantization of signal co-localization was performed using MIPAV software (<http://mipav.cit.nih.gov/>) and expressed as orthogonal correlation coefficients among variables.

Study of 3'-UTR Sequences Present in mRNAs Immunoprecipitated With Myo5a

To determine whether cis-acting zipcodes were present in the 3'-UTRs of mRNAs immunoprecipitated with Myo5a, we compared their 3'UTRs with two axonal cis-acting zipcodes: tau (Aranda-Abreu et al., 1999, 2005) and β -actin (Kislauskis et al., 1994; Ross et al., 1997; Patel et al., 2012), and with the dendritic zipcode present in the CaMKII mRNA (Mori et al., 2000). We used ClustalW (Thompson et al., 1994) for pairwise alignments between the mentioned zipcodes and the 3'-UTRs present in our set of mRNAs. Alignments with scores above the 75th percentile were used to create sequence logos (Schneider and Stephens, 1990), predict secondary structures (RNAfold from the Vienna RNA Package, Hofacker, 2003) and common structural motifs (RNApromo program; Rabani et al., 2008).

RESULTS

Myo5a Associates With a Subset of mRNAs in RNPs Obtained From Mouse Brains

To study the quantitative and qualitative extent of the putative association of Myo5a with mRNAs, we performed microarray studies. Messenger RNAs bound to Myo5a, PABP, and negative control immunoprecipitations were purified and identified using microarrays. RNAs with signals at least 1.4-fold increase over control and a *p* value less than 0.05 by one-way ANOVA were scored as positive associations. A total of 1358 and 255 mRNAs associated with PABP and Myo5a respectively were selected under this criterion. Figure 1(A) summarizes these data as a cluster analysis of mRNAs contained in both immunoprecipitates, suggesting that they are different RNA populations. Also, both groups of mRNAs were different from those obtained in negative control conditions. A selected group of genes among those most represented in the array were validated by qPCR [see Fig. 1(C,D) and Table 2]. A Gene Ontology detailed analysis of primary results was performed using

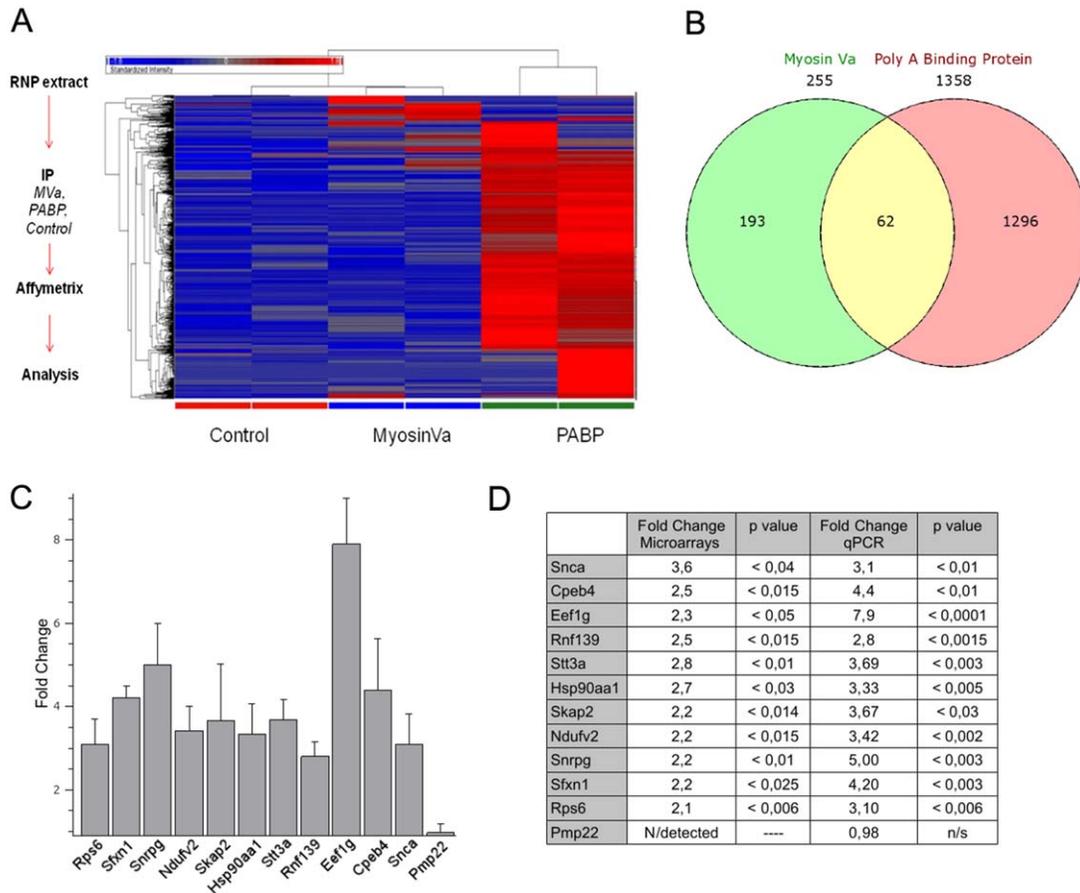


Figure 1 Myo5a associates with a subset of mRNAs in brain RNPs. Microarrays studies of immunoprecipitated fraction using anti-Myo5a and anti-PABP antibodies, respectively demonstrate that each protein associate with a different mRNA population. (A) Cluster analysis of the mentioned group of genes. (B) Venn diagram. (C) A selected group of genes highly represented in the microarray of genes pulled down with Myo5a was validated by qPCR. To further assess the correlation between the microarrays and qPCR results, we included Pmp22 as a negative control. This gene did not meet the cut off criteria for detected genes in microarrays studies and therefore was considered as absent (not associated with Myosin Va). Error bars are SEM of triplicates. (D) The fold change and *p* values of the validated genes are compared with the results yielded by microarrays for the same messengers. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Ingenuity software, which assigned the mRNAs associated with Myo5a to network functions mainly related with RNA post-transcriptional modification, neurological disease, skeletal and muscular disorders, cellular assembly and organization, cellular function and maintenance, and protein trafficking. Some of these functions overlap with those assigned to the mRNAs associated with PABP (Table 1). However, only one-third of the genes pulled down by Myo5a were included among those immunoprecipitated with PABP, [Venn diagram in Fig. 1(B)]. While it is difficult to know if a full representation of associated mRNA was provided by the array, these results sug-

gested that Myo5a associates with a subpopulation of mRNAs.

Myo5a is a Component of RNPs of Different Size and Composition

RNPs isolated from rat brains (Ohashi et al., 2002) were fractionated by sucrose gradient. The RNA peaks shown in the chromatogram of Figure 2(A) suggest that our RNPs are structurally heterogeneous. Our profile is very similar to that reported by Krichevsky and Kosik (2001) using RNPs obtained from primary neurons in culture.

Table 1 Gene Assignment to Canonical Network Functions

Top Networks		
A - <i>PABP</i>		
ID	Associated Network Functions	Score
1	RNA Post-Transcriptional Modification, Neurological Disease, Skeletal and Muscular Disorders	57
2	Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Protein Trafficking	44
3	Cellular Assembly and Organization, Hair and Skin Development and Function, DNA Replication, Recombination, and Repair	37
4	DNA Replication, Recombination, and Repair, Energy Production, Nucleic Acid Metabolism	34
5	Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization, Cellular Development	28
B - <i>Myosin Va</i>		
ID	Associated Network Functions	Score
1	Hematological Disease, Hereditary Disorder, Cell Morphology	48
2	RNA Post-Transcriptional Modification, Dermatological Diseases and Conditions, Developmental Disorder	42
3	Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Metabolic Disease	39
4	RNA Post-Transcriptional Modification. Cellular Assembly and Organization. Cellular Function and Maintenance	39
5	DNA Replication, Recombination, and Repair, Energy Production, Nucleic Acid Metabolism	38

Selected list of genes associated either with Myo5a or PABP were analyzed using *Ingenuity* software. A, correspond to Myo5a and B to PABP.

Because HuD is a neuronal RNA-binding protein that stabilizes labile mRNAs with AU-rich instability elements, we used it as a marker to identify RNPs in the sucrose fractions. Interestingly, a polyclonal antibody raised against this protein revealed the presence of HuD only in particles found in the top layers of the sucrose gradient. Second, we determined the distribution of Myo5a amongst the RNA-containing fractions. Western blot analysis showed that this motor is concentrated both in the heavier as well as in the lighter fractions, being less abundant in the intermediate fractions [Fig. 2(A)]. The ribosome marker P0 also was detected in the heavier fractions. To test for a Myo5a-ribosome association, we pulled down Myo5a from RNPs and thus probed for ribosomal markers in the immunoprecipitate fraction. As Figure 2(B) shows, ribosomes were pulled down with Myo5a. Moreover, the presence of both S6 and P0 ribosomal proteins (belonging to the small and large ribosomal subunits respectively) suggested the presence of assembled ribosomes. To confirm the putative Myo5a-ribosome interaction, we carried out the converse immunoprecipitation experiment, using anti-ribosomal P protein antibody and detecting Myo5a and S6 [Fig. 2(B)]. Interestingly, under these conditions we also detected two kinesin heavy chains, Kif3 and Kif5, among the immunoprecipitated proteins [Fig. 2(C)].

Subcellular Localization of RNPs Containing Myo5a in Mature Axons

The association of ribosomes with HuD in neurites and growth cones of PC12 cells differentiated into

neurons has previously been reported (Smith et al., 2004). We observed that such organization appears to be preserved in axons and growth cones of DRG neurons in culture (Supporting Information Figs. S1 and S2). On the other hand, immunoprecipitation of RNPs obtained from brain suggested that kinesin and Myo5a may be associated with ribosomes. Thus, we investigated if RNPs found in peripheral axons had a similar pattern. Because it was extremely difficult to obtain pure axonal samples in a sufficient amount to do immunoprecipitation experiments, we took advantage of the axonal wholemount preparation in combination with fluorescence microscopy. Axonal wholemounts obtained by our methods are essentially free of glial contamination (Koenig and Martin, 1996; Keonig et al., 2000). We therefore probed for Myo5a and RNPs in axonal wholemounts obtained from medullary dorsal roots. We found co-localization of Myo5a, kinesin and ribosomes [Fig. 3(A)]. Triple co-localization of these three markers in discrete granular structures (arrows) was suggested in the axoplasm and in the peripheral region of PARPs. We also noticed what appeared to be a gradient of granular components from the PARP to the axoplasm. This was particularly evident when particles were labeled using the anti-ribosomal P protein antibody [Fig. 3(A), second row]. Myo5a also co-localized with HuD and the YOYO-1 nucleic acid probe [arrows in Fig. 3(B)]. Some discrete triple and many double (Myo5a-HuD) co-localizations were detected both in axoplasm and PARPs [asterisk in Fig. 3(B), Yoyo-1]. The latter raises the possibility of

Table 2 A Representative List of mRNAs Enriched in the Immunoprecipitate Fraction of Myo5a From Mouse Brain

Gene Symbol	Gene Title	RefSeq Transcript ID	Fold-Change
SncA	synuclein, alpha	NM_001042451 III NM_009221	3.6
E2f8	E2F transcription factor 8	NM_001013368	3.0
Atp6ap2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2	NM_027439	2.7
Hsp90aa1	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	NM_010480	2.7
Cpeb4	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4	NM_026252	2.5
Eif3e	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E	NM_008388	2.4
Eef1g	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	NM_026007	2.3
Ndufv2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	NM_028388	2.2
Sfxnl	sideroflexin 1	NM_027324	2.2
Rps6	40S ribosomal protein S6	NM_009096	2.1
Cox4i1	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	NM_009941	2.1
Pfn1	profilin 1	NM_011072	2.1
Mdh2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	NM_008617	2.0
Cetn4	centrin 4	NM_145825	1.9
Ptp4a2	protein tyrosine phosphatase 4a2	NM_001164745 /// NM_008974	1.9
Rpl22l1	ribosomal protein L22 like 1	NM_026517	1.9
Ptp4a1	protein tyrosine phosphatase 4a1	NM_011200	1.9
Vdac3	voltage-dependent anion channel 3	NM_011696	1.9
Ubb	ubiquitin B	NM_011664	1.9
Rps27	ribosomal protein S27	NM_027015	1.9
Rpn1	ribophorin I	NM_133933	1.9
Kcnn4	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N,	NM_001163510 /// NM_008433	1.8
Selplg	selectin, platelet (p-selectin) ligand	NM_009151	1.8
Sf3b1	splicing factor 3b, subunit 1	NM_031179	1.8

Selected group of genes obtained from the complete list depicted in Supporting Information Table T1. The present list illustrates the nature and relative abundance of prototypical genes; i.e., those engaged with protein processing pathways and ribosome integrity.

the existence of a HuD-bearing particle lacking RNA.

Myo5a Associates With Axonal mRNAs

We then focused on the putative association of Myo5a with mRNA in mature axons. To do so, we pulled down Myo5a from dorsal medullary root homogenates, then performed qPCR of the immunoprecipitate using specific primers to amplify several mRNAs [Fig. 4(A,C)]. Transcripts were selected among those previously identified as associated to Myo5a in RNPs from brain (Fig. 1, Supporting Information Table 1). In addition, to demonstrate the axonal origin of the mRNAs co-precipitated by Myo5a, we looked for mRNAs that also were expressed in axons (Gumy et al. 2011). Evidence for co-immunoprecipitation of ribosomes (18S RNA pulled down together with P proteins) was also found [Fig. 4(A,C)].

The axonal localization of the mRNA coding for Myo5a was further confirmed by hybridization. These experiments revealed that Myo5a mRNA pri-

marily co-localized with PARPs [Fig. 5(A,B)]. When hybridization was combined with immunolabeling of ribosomes, some punctate signals positive for both signals were detected not only on PARPs but also in the axoplasm [Fig. 5(A) inset]. Images from cross sections of sciatic nerve show that the mRNA encoding Myo5a was present in periaxoplasmic cortical regions, where the contribution of glia or axons as a source of label was difficult to discriminate (*bottom left*, thin arrows); however, an abundant labeling of clearly axonal origin could be occasionally observed (*bottom left*, inset). In addition, re-analysis of the data obtained by Gumy and cols (2011) suggested that Myo5a is a prominent mRNA present in cultured DRG axons among the mRNAs coding for motor proteins [Fig. 5(D) for myosins and E for kinesins].

Tau and β -actin 3'-UTR Zipcodes are Present in mRNAs Associated With Myosin Va

To detect sequences that may direct axonal or dendritic targeting in the 3'-UTR of mRNAs immunoprecipitated by Myo5a, we aligned these 3'-UTRs with the

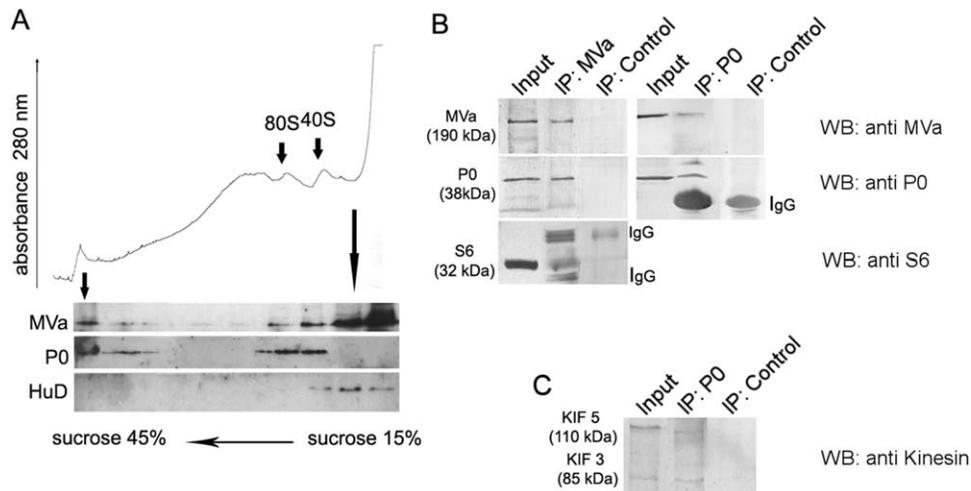


Figure 2 Ribonucleoprotein particles (RNPs) are heterogeneous in size and composition. (A) RNPs purified from whole rat brain were sedimented through a 15–45% sucrose gradient; fractions were collected with continuous monitoring at 280 nm. Anti-Myo5a, ribosomal P0 and HuD proteins antibodies were probed in each fraction by Western blot. The peak on the left (tube bottom) corresponds to the heaviest RNPs with ribosomes and Myo5a protein. The less dense particles (right part of the chromatogram) are rich in Myo5a and HuD proteins. 80 and 40S denote the peaks corresponding to free ribosomes, according to their sedimentation coefficient and P0 detection in Western blots. (B) Myo5a and ribosomal P0 proteins co-immunoprecipitated from the RNP fraction obtained from brain using anti-Myo5a as well as anti-P0 antibodies. Besides P0, the ribosomal S6 protein could also be detected in the immunoprecipitated fractions. IP controls were done using non-specific IgGs. (C) The microtubule based motors kif 5 and 3 were pulled down using anti-ribosomal proteins antibodies. IP control was done similarly as in B.

cis-acting zipcodes present in the mRNAs coding for tau, β -actin, and CAMKII. A total of 17 3'-UTRs had scores greater than the 75th percentile in alignments with β -actin and tau zipcodes. Interestingly, the zipcode that targets CAMKII to dendrites was not found among this set of mRNAs. To evaluate the conservation of the zipcodes in these sequences we constructed sequence logos [Fig. 6(A–C)]. To find common structural motifs among the selected set of 17 3'-UTRs, we used the program RNApromo (Rabani et al., 2008). As a result, we identified a significant motif (AUC = 1, p -value < 0.01), predicted to fold into a stem-loop structure with a relatively short loop [Supporting Information Fig. 4(A)]. An extended set of generated secondary structures are displayed in Supporting Information Fig. 4(B–R), with the conserved motif highlighted circled.

DISCUSSION

The presence of RNA in the axonal compartment of mature axons, once extremely controversial, is now largely accepted (for comprehensive reviews, see Giuditta et al., 2002, Twiss and van Minnen, 2006,

Sotelo-Silveira et al., 2006, and others in this special issue). Currently, it is known that axons of neurons grown *in vitro* contain all the components of the translational machinery and that local translation of at least some mRNAs indeed occurs (Eng et al., 1999; Willis et al., 2005). According to recent reports, a large variety and number of mRNAs are present in axons. By microarray analyses of cortical axons in culture, Taylor et al. (2009) detected the presence of more than 300 different transcripts, while other studies suggested that this population is probably larger (Willis et al., 2005, Gumy et al., 2011). While considerable progress has been made in characterizing the axonal transport of RNA along microtubule tracks (Olink-Coux and Hollenbeck, 1996; Bassell et al., 1998), much less is known about the involvement of myosins and microfilaments in RNA mobilization along axons. Previous studies have suggested that Myo5a is important for proper localization of mRNA and the RNA-binding proteins TLS and ZBP-1 in hippocampal neurons in culture (Yoshimura, et al., 2006; Nalavadi et al., 2012). Myo5a also was identified in RNPs immunoprecipitated from brain extracts (Ohashi et al., 2002) and as component of P-bodies in multiple cell lines (Lindsay and McCaffrey, 2011).

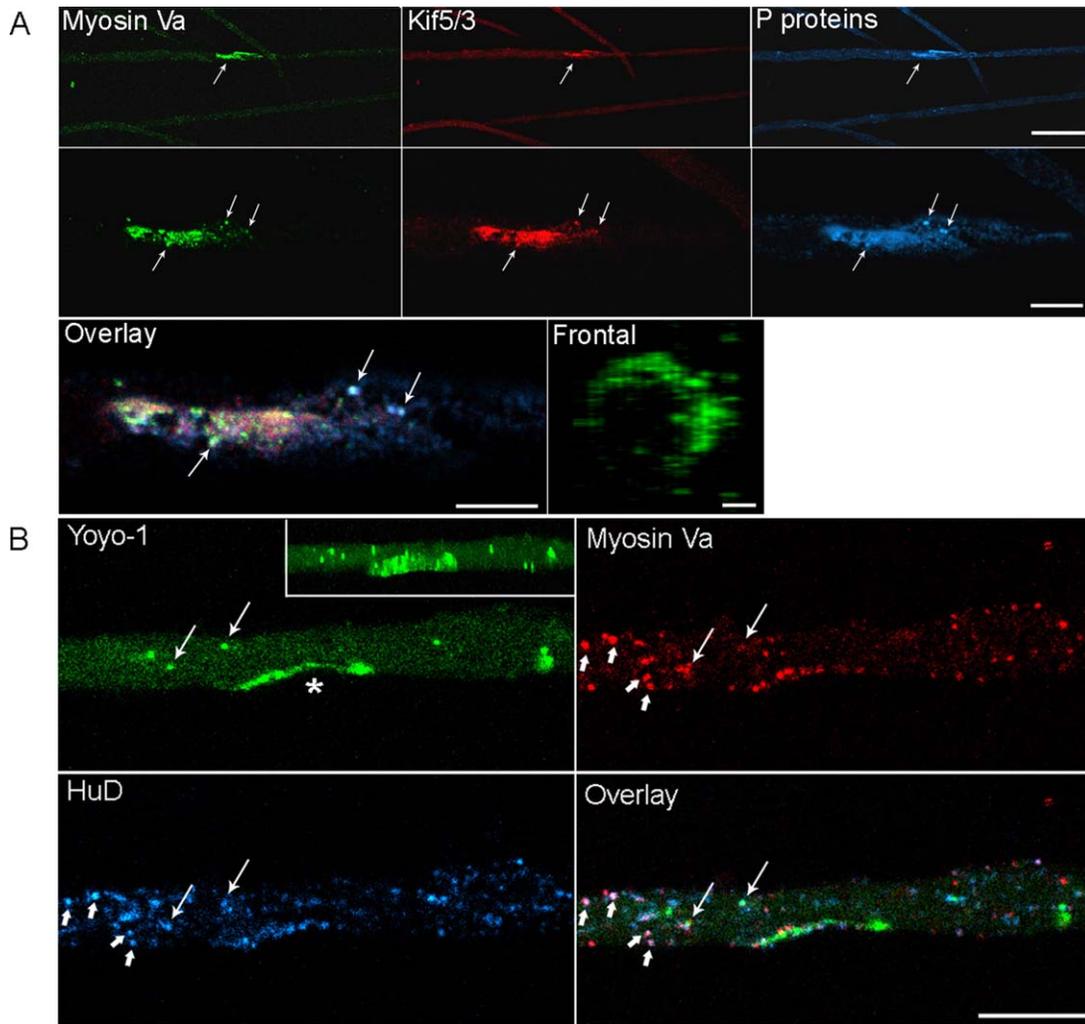


Figure 3 High-resolution confocal microscopy of RNPs in myelinated axons. (A) RNPs containing ribosomal and motor proteins are structurally related with the Peri Axoplasmic Ribosomal Domains (PARPs). *Upper row*; low magnification images of axoplasmic wholemounts labeled for Myo5a, Kinesin 5/3 and ribosomal P proteins, respectively. Arrow depicts two axonal PARPs. Bar is 20 μm . *Middle row*; confocal single optical plane containing one of the PARPs shown by the arrows above. Arrows show visible individual granules labeled by the three different antibodies. Bar is 5 μm . *Overlay*; merged image. Bar is 5 μm . *Frontal*; a 3D reconstruction of the PARP labeled with anti-Myo5a antibody. Bar is 1 μm . (B) *YOYO-1* labeling of a single optical Z-plane image of an isolated axoplasm labeled with the *YOYO-1* probe. Positive granules (arrows) are RNA rich structures (PARP, asterisk). Inset: A 3D reconstruction of the same axoplasm; The Z-stack was slightly rotated onto its X axis to better appreciate the PARP domain. *Myosin Va* and *HuD*; anti-myosin Va and anti-ELAV *HuD* protein antibodies labeling of axoplasm. Long arrows depict those particles where *YOYO*, *Myo5a* and *HuD* apparently co-localize, whereas the short arrows designate positive particles for *Myo5a* and *HuD* only. Such double and triple co-localizations are better appreciated in the *Overlay* frame. Bar is 10 μm . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Here, we present data demonstrating that myosin-Va is a component of a heterogeneous population of RNPs of different sizes and composition, both in brain and PNS. The extent of this association was assessed using microarrays hybridized to cRNA

made from mRNA present in RNPs immunoprecipitated with Myo5a. Ingenuity software analysis clustered the identified transcripts in network functions dealing mainly with RNA post-transcriptional modification, neurological disease, cellular assembly and

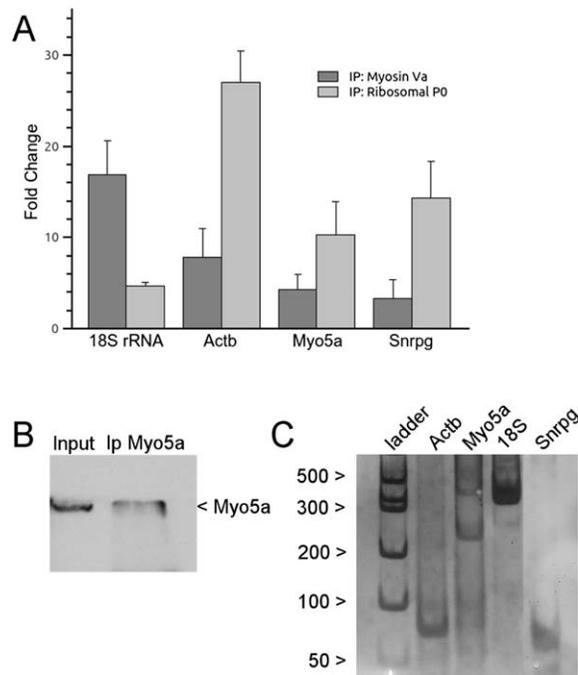


Figure 4 Quantitative PCR of RNA extracted from immunoprecipitates of Myosin Va and ribosomes from homogenates of medullary roots. (A) Biochemical analysis of myosin Va-bearing RNPs reveals that this fraction contains ribosomes (18S rRNA) and mRNAs. The results are expressed as fold change with respect to the negative control condition (immunoprecipitation using non-specific IgGs). The 18S rRNA as well as the same mRNAs can be detected in immunoprecipitates obtained using anti-ribosomal P proteins antibody. (B) Western blot showing that Myo5a protein is immunoprecipitated from homogenated dorsal roots, using anti-Myo5a antibodies. (C) The PCR products were identified according their expected size (in base pairs).

organization, cellular function and maintenance, and protein trafficking (Table 1). The association of Myo5a with these groups of mRNAs suggests that this motor protein participates in the localization of a specific subset of mRNAs (Table 2 and Supporting Information Table 1). Alpha-synuclein was the most enriched mRNA among those associated with Myo5a. Although this finding requires a great deal of further study, it implies that RNA localization and local protein synthesis may be involved in neurodegenerative disorders such as Parkinson disease. Interestingly, mRNAs encoding proteins involved in protein translation and processing, molecular transport, and mitochondrial maintenance were major categories in previous independent screens using neurons from different sources (Taylor et al., 2009; Zivraj et al., 2010; Gumy et al., 2011). Further work and additional experimental approaches (i.e., RNA

sequencing) will be needed to exhaustively evaluate the extent and identity of the mRNA population associated with myosin Va in neurons.

When subjected to velocity sedimentation through sucrose gradients, the isolated RNPs were a heterogeneous population of particles [Fig. 2(A)]. These particles resembled the “RNA granules” and the “messenger ribonucleoprotein complexes” described in cultured neurons by Krichevsky and Kosik (2001). Here we showed that RNPs purified from brains and immunoprecipitated using anti-Myo5a antibodies contained ribosomes, RNA-binding proteins (HuD protein), kinesins [Fig. 2(A,C)] and mRNAs (Fig. 1). The presence of mRNAs in the immunoprecipitated fractions suggests that Myo5a may participate in the transport or localization of mRNAs subjected to arrest during translation.

Because we are especially interested in the dynamics of RNA transport in mature axons, we next investigated the interaction of motor proteins with RNPs in this neuronal territory. Again, Myo5a co-localized at least partially with structures containing RNA (in some cases identified as ribosomes) but also with the RNA-binding protein HuD and mRNA (Fig. 3). This was similar to what we observed in axons and growth cones of DRG neurons in culture (Supporting Information Figs. S1 and S2). In this regard, previous reports demonstrated that besides binding and stabilizing the mRNA coding for GAP43, HuD also associates with ribosomal protein S6 in neurites of differentiated PC12 cells (Smith et al., 2004). This study also showed that the localization of this complex in grown cones is dependent on F-actin. In this regard, Myo5a arose as a potentially relevant molecule for ribosome translocation or localization. Evidence supporting this hypothesis was obtained upon metaanalysis of the raw data provided by Gumy et al. (2011), in which the transcript coding for Myo5a was one of the most abundant myosin mRNAs [Fig. 5(D)].

To better understand the role of Myo5a in mRNA localization, we analyzed the localization sequences (zipcodes) in the 3'-UTRs of the mRNAs pulled down with Myo5a. β -actin mRNA was identified in RNPs containing Myo5a. Both β -actin and tau zipcodes have been experimentally demonstrated to be responsible for mRNA targeting to axons (Willis et al., 2011; Aranda-Abreu et al., 1999) and the zipcode of CAMKII to dendrites (Mori et al., 2000). Thus, we looked for similar zipcodes present in the 3'-UTR of mRNAs enriched in the immunoprecipitate of Myo5a. Interestingly, we found a good alignment for the case of tau and β -actin, but negative results for dendrite targeting sequences. While these

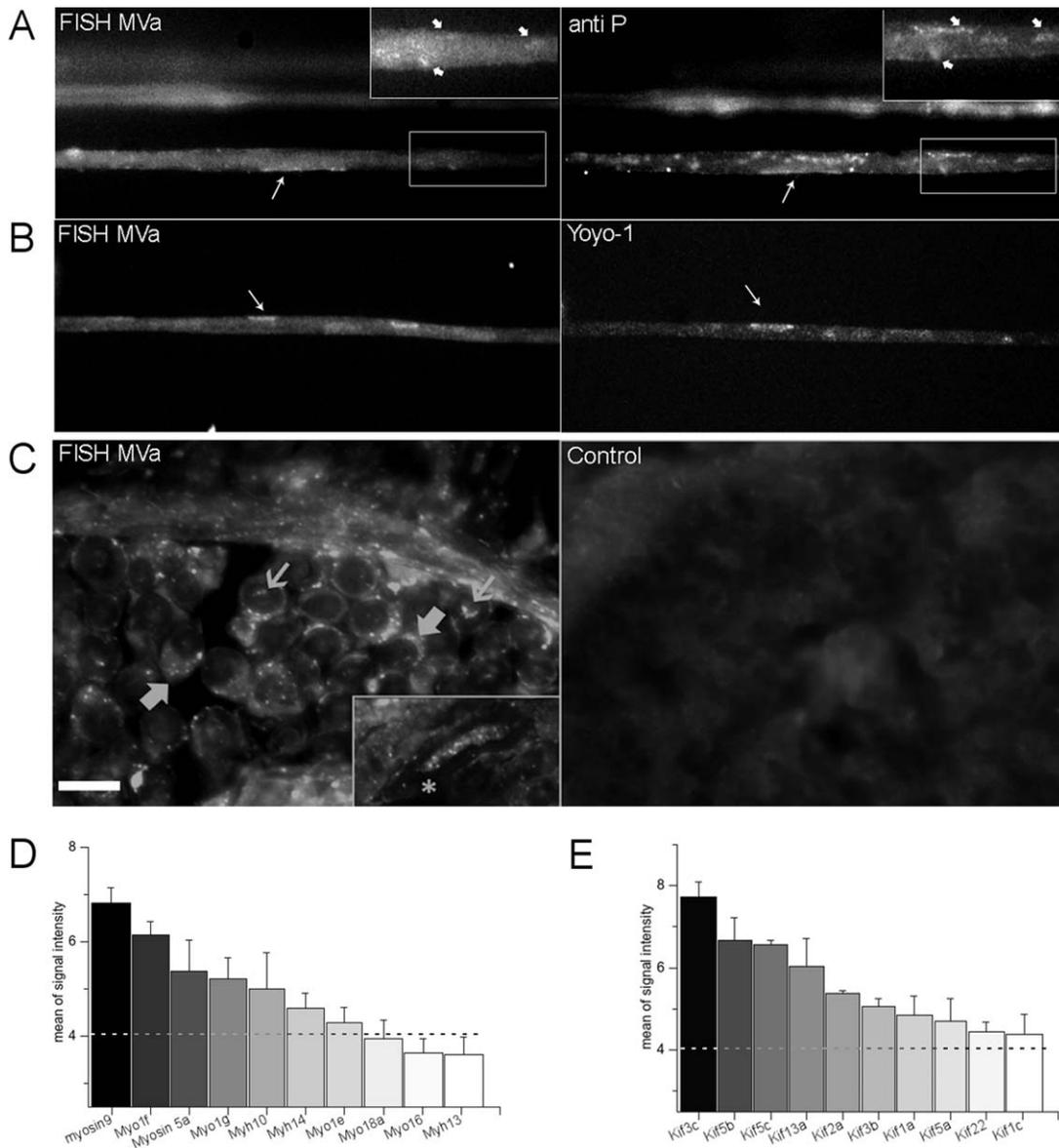


Figure 5 The mRNA coding for Myo5a is detected both in RNPs and PARPs by *in situ* hybridization in axons of the peripheral nervous system. (A) *Upper row*, The same PARP present in an individualized axon is evidenced with an antisense digoxigenin labeled probe (arrow, left) or anti-ribosomal P antibody (*right*). The reaction is mainly concentrated on PARPs, but some granular reaction is also observed in the axoplasm (arrows in the insets). (B) Labeling of a group of PARPs in a single selected axoplasm using fluorescence *in situ* hybridization (left) and YOYO-1 staining (*right*). (C) The mRNA for Myo5a was also detected in sciatic nerve (*left*). The signal is compartmentalized between axoplasm (thin arrows) and glial cells (thick arrows). The inset displays a semi longitudinal section of a nerve fiber which axoplasm was heavily labeled; the asterisk depicts the myelin sheath. *Right*; Negative control experiment done without probe. Bar is 10 μm. (D) and (E) the data from Gumy et al. (2011) were reanalyzed to determine the relative abundance of specific mRNAs in the context of the total transcripts coding for myosins or kinesins heavy chains. Only the 10 most abundant are displayed. The dashed line indicates the background level of signal for Affimetrix chips.

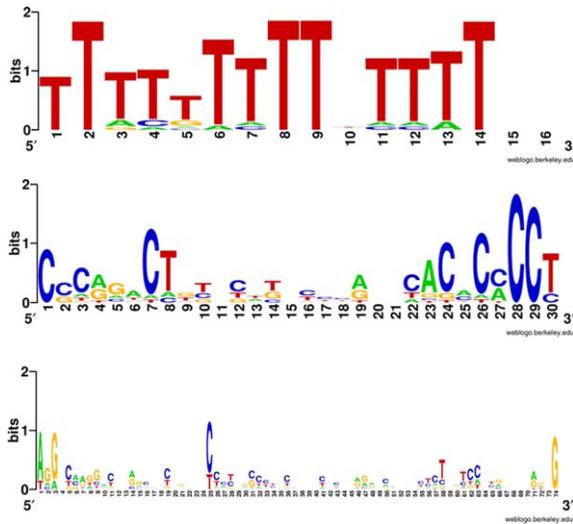


Figure 6 Tau and β -actin zipcodes are present in Myo5a-associated mRNAs. Sequence logos obtained after the alignment of 3'UTRs of the mRNA immunoprecipitated with Myo5a against tau (A), β -actin (B), and CamKII (C) zipcode sequences. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

data do not address direct or indirect interaction among Myo5a and messengers, they further suggest the involvement of Myo5a in RNA mobilization/tethering in mature axons. It is worth noting that the RNA-binding proteins HuD [Fig. 3(B)] and ZBP1 zipcodes have been found in mature myelinated axons (Sotelo-Silveira et al., 2008).

Despite its processivity, Myo5a appears to function only along short distances (Langford, 2002). Thus, its presence in RNPs is likely insufficient to explain how these structures can be transported to axonal regions localized millimeters or even centimeters away from the soma. The co-immunoprecipitation of the kinesin heavy chain together with Myo5a in brain RNPs, coupled with the co-localization of kinesin with Myo5a on the same RNPs in axons of medullary roots [Fig. 3(A)], is consistent with the hypothesis of an interdependent role of microtubules and microfilaments for RNA localization in the axonal territory. Moreover, using hippocampal neurons in culture, Nalavadi et al. (2012) demonstrated that when Myo5a is knocked down with RNAi, the speed of anterograde transport of RNPs is increased. This result strongly suggests that Myo5a acts more as an anchor or tether, a phenomenon previously observed with myosin Vb for endosomal compartments in fibroblasts (Provance et al., 2008). In this hypothesis, large distances are covered by kinesins while the myosins are specially needed to localize the particle in actin-rich regions. This dual motor complex

hypothesis for the transport of cargoes was initially advanced by Langford (Langford, 1995) and further evidence has been found in multiple models (Langford, 2002; Muslimov et al., 2002). In mammalian axons, this type of RNP was found concentrated on the PARP itself as well as in the axoplasmic regions surrounding it, suggesting that PARPs are dynamic structures able to interchange components with other regions of the axoplasm. In this regard, we have recently demonstrated that Myo5a is necessary for the cell-to-cell transfer of RNA from the adaxonal Schwann cell to axons of the sciatic rat nerve (Sotelo et al., 2013, see also a review by Sotelo et al., 2014). This observation provides an alternative origin of PARPs and axonal RNPs and contributes to our understanding of the role of the actin-based transport of RNA in mature axons.

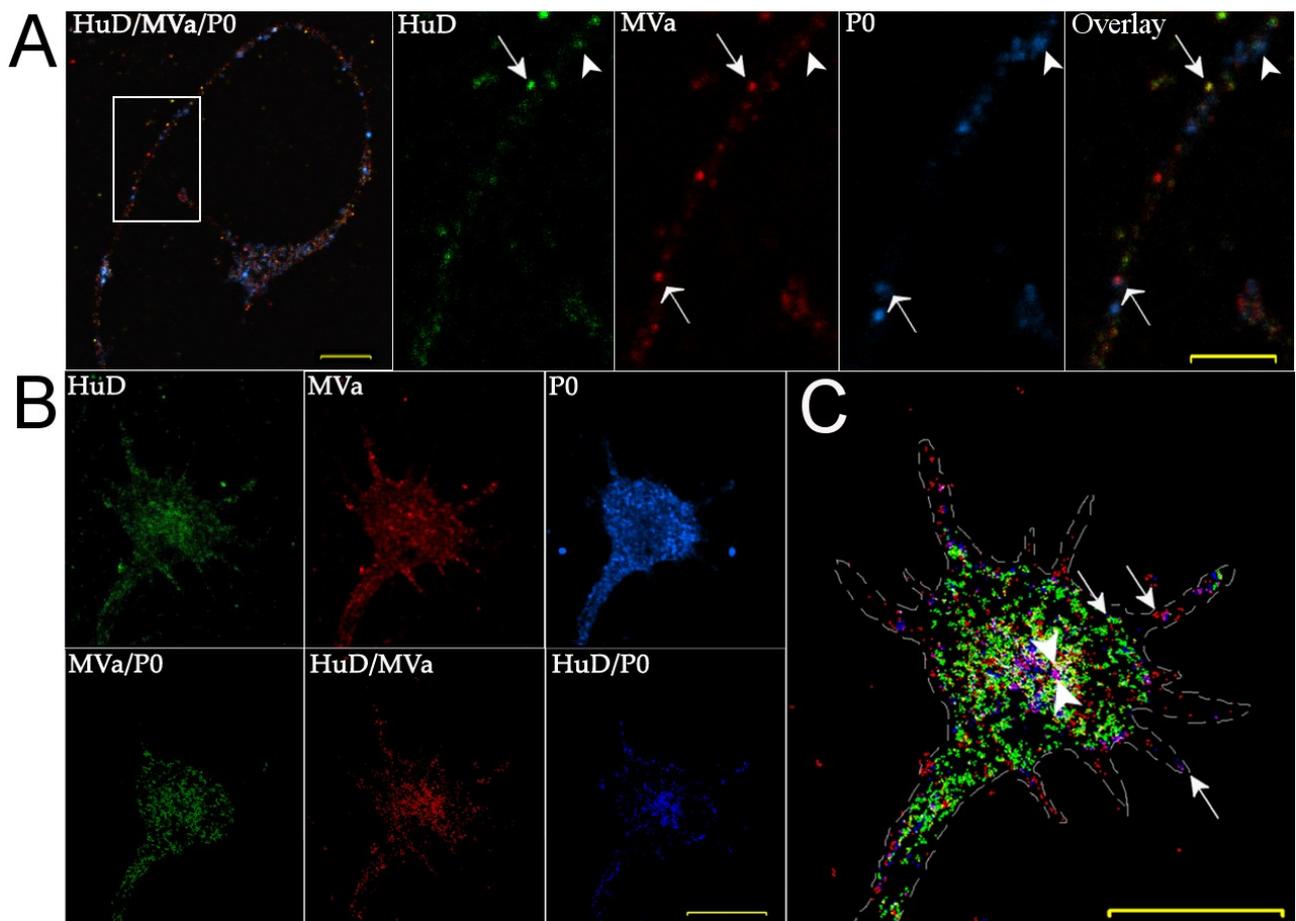
REFERENCES

- Amrute-Rayak M, Bullock SL. 2012. Single-molecule assays reveal that RNA localization signals regulate dynein-dynactin copy number on individual transcript cargoes. *Nat Cell Biol* 14:416–423.
- Andreassi C, Zimmermann C, Mitter R, Fusco S, Devita S, Saiardi A, Riccio A. 2010. An NGF-responsive element targets myo-inositol monophosphatase-1 mRNA to sympathetic neuron axons. *Nat Neurosci* 13:291–301.
- Aranda-Abreu GE, Behar L, Chung S, Furneaux H, and Ginzburg I. 1999. Embryonic lethal abnormal vision-like RNA-binding proteins regulate neurite outgrowth and Tau expression in PC12 cells. *J Neurosci* 19:6907–6917.
- Aranda-Abreu GE, Hernández ME, Soto A, Manzo J. 2005. Possible Cis-acting signal that could be involved in the localization of different mRNAs in neuronal axons. *Theor Biol Med Model* 2:33–42.
- Bassell GJ, Zhang H, Byrd AL, Femino AM, Singer RH, Taneja KL, Lifshitz LM, Herman IM, Kosik KS. 1998. Sorting of β -actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J Neurosci* 18:251–265.
- Bear MF, Dölen G, Osterweil E, Nagarajan N. 2008. Fragile X: Translation in action. *Neuropsychopharmacology* 33:84–87.
- Calliari A, Sotelo-Silveira J, Costa MC, Nogueira J, Cameron LC, Kun A, Benech J, Sotelo JR. 2002. Myosin Va is locally synthesized following nerve injury. *Cell Motil Cytoskeleton* 51:169–176.
- Canclini L, Kun Alejandra, Calliari A, Mercer JA, Sotelo JR, Sotelo-Silveira JR. 2011. The axonal transcriptome: RNA localization and function. *Curr Chem Biol* 5:99–107.
- Costa-Mattioli M, Gobert D, Stern E, Gamache K, Colina R, Cuello C, Sossin W, Kaufman R, Pelletier J, Rosenblum K, Krnjević K, Lacaille JC, Nader K, Sonenberg N. 2007. eIF2 α phosphorylation

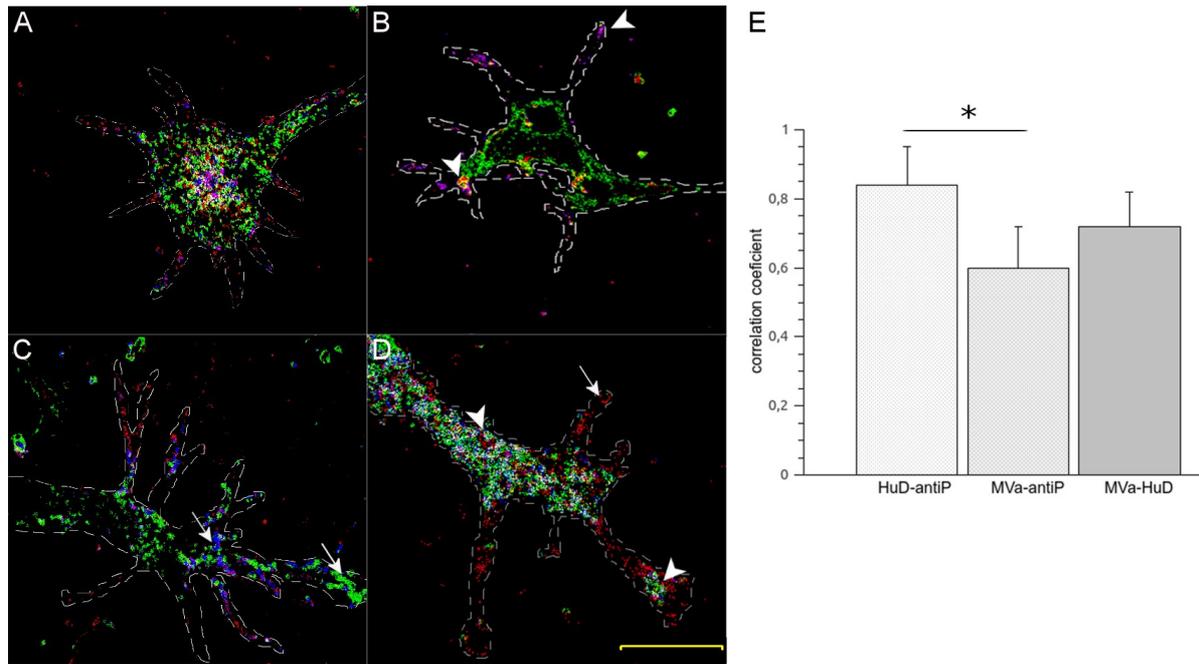
- bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 129:195–206.
- Deglincerti A, Jaffrey SR. 2012. Insights into the roles of local translation from the axonal transcriptome. *Open Biol* 2:120079.
- Donnelly CJ, Willis DE, Xu M, Tep C, Jiang C, Yoo S, Schanen NC, Kirn-Safran CB, van Minnen J, English A, Yoon SO, Bassell GJ, Twiss JL. 2011. Limited availability of ZBP1 restricts axonal mRNA localization and nerve regeneration capacity. *EMBO J* 30:4665–4677.
- Eng H, Lund K, Campenot RB. 1999. Synthesis of beta-tubulin, actin, and other proteins in axons of sympathetic neurons in compartmented cultures. *J Neurosci* 19:1–9.
- Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AA, De Camilli PV, Larson RE, and Mooseker MS. 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol* 119:1541–57.
- Gagnon JA, Mowry KL. 2012. Molecular motors: Directing traffic during RNA localization. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 46:229–239.
- Giuditta A, Kaplan BB, van Minnen J, Alvarez J, Koenig E. 2002. Axonal and presynaptic protein synthesis: New insights into the biology of the neuron. *Trends Neurosci* 25:400–404.
- Gonsalvez GB, Long RM. 2012. Spatial regulation of translation through RNA localization. *F1000 Biol Rep* 2012;4:16.
- Gumy LF, Yeo GSH, Tung Y-CL, Zivraj KH, Willis D, Coppola G, Lam BY, Twiss JL, Holt CE, Fawcett JW. 2011. Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA* 17:85–98.
- Hofacker IL. 2003. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res* 31:3429–3431.
- Jung H, O'Hare CM, Holt CE. 2011. Translational regulation in growth cones. *Curr Opin Genet Dev* 21:458–464.
- Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou M-N, Sonenberg N. 2005. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* 19:104–113.
- Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH. 1994. Sequences responsible for intracellular localization of β -actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol* 127:441–451.
- Koenig E, Martin R. Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. 1996. *J Neurosci* 16:1400–1411.
- Koenig E, Martin R, Titmus M, Sotelo-Silveira JR. Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. 2000. *J Neurosci* 20:8390–8400.
- Krichevsky AM, Kosik KS. 2001. Neuronal RNA granules: A link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* 32:683–696.
- Kruse C, Jaedicke A, Beaudouin J, Bohl F, Ferring D, Guttler T, Ellenberg J, Jansen RP. 2002. Ribonucleoprotein-dependent localization of the yeast class V myosin Myo4p. *J Cell Biol* 159:971–982.
- Langford GM. 1995. Actin- and microtubule-dependent organelle motors: Interrelationships between the two motility systems. *Curr Opin Cell Biol* 7:82–88.
- Langford GM. Myosin-V. 2002. a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic* 3:859–865.
- Lindsay AJ, McCaffrey MW. 2011. Myosin Va is required for P body but not stress granule formation. *J Biol Chem* 286:11519–11528.
- Long RM, Singer RH, Meng X, Gonzalez I, Nasmyth K, Jansen RP. 1997. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* 277:383–387.
- Mobarak CD, Anderson KD, Morin M, Beckel-Mitchener A, Rogers SL, Furneaux H, King P, Perrone-Bizzozero NI. 2000. The RNA-binding protein HuD is required for GAP-43 mRNA stability, GAP-43 gene expression, and PKC-dependent neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol Biol Cell* 11:3191–203.
- Mori Y, Imaizumi K, Katayama T, Yoneda T, Tohyama M. 2000. Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of α -CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat Neurosci* 3:1079–1084.
- Muslimov I, Titmus M, Koenig E, Tiedge H. 2002. Transport of neuronal BC1 RNA in mauthner axons. *J Neurosci* 22:4293–4301.
- Nalavadi VC, Griffin LE, Picard-Fraser P, Swanson AM, Takumi T, Bassell GJ. 2012. Regulation of zipcode binding protein 1 transport dynamics in axons by myosin Va. *J Neurosci* 32:15133–15141.
- Ohashi S, Koike K, Omori A, Ichinose S, Ohara S, Kobayashi S, Sato TA, Anzai K. 2002. Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J Biol Chem* 277:37804–37810.
- Olink-Coux M, Hollenbeck PJ. 1996. Localization and active transport of mRNA in axons of sympathetic neurons in culture. *J Neurosci* 16:1346–1358.
- Paquin N, Chartrand P. 2008. Local regulation of mRNA translation: New insights from the bud. *Trends Cell Biol* 18:105–111.
- Patel VL, Mitra S, Harris R, Buxbaum AR, Lionnet T, Brenowitz M, Girvin M, et al. 2012. Spatial arrangement of an RNA zipcode identifies mRNAs under post-transcriptional control. *Genes Dev* 26:43–53.
- Provance DW Jr, Addison EJ, Wood PR, Chen DZ, Silan CM, Mercer JA. 2008. Myosin-Vb functions as a dynamic tether for peripheral endocytic compartments during transferrin trafficking. *BMC Cell Biol* 9:44.
- Rabani M, Kertesz M, Segal E. 2008. Computational prediction of RNA structural motifs involved in posttranscriptional regulatory processes. *PNAS* 105:14885–14890.
- Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH. 1997. Characterization of a β -actin mRNA Zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol* 17:2158–2165.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M. 2003. Smn, the spinal muscular

- atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of β -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163:801–812.
- Salerno VP, Calliari A, Provance DW Jr, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR, Mercer JA. 2008. Myosin-Va mediates RNA distribution in primary fibroblasts from multiple organs. *Cell Motil Cytoskeleton* 65:422–433.
- Schneider TD, Stephens RM. 1990. Sequence logos: A new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 18:6097–6100.
- Smith CL, Afroz R, Bassell GJ, Furneaux HM, Perrone-Bizzozero NI, Burry RW. 2004. GAP-43 mRNA in growth cones is associated with HuD and ribosomes. *J Neurobiol* 61:222–235.
- Sotelo JR, Canclini L, Kun A, Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cal K, Bresque M, et al. 2014. Glia to axon RNA transfer. *Dev Neurobiol* 74:292–302.
- Sotelo JR, Canclini L, Kun A, Sotelo-Silveira JR, Xu L, Wallrabe H, Calliari A, et al. 2013. Myosin-Va-dependent cell-to-cell transfer of RNA from Schwann cells to axons. *PLoS ONE* 8:e61905.
- Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Kun A, Elizondo V, Canclini L, Sotelo JR. 2011. Localization of mRNA in vertebrate axonal compartments by in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 714:125–138.
- Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Kun A, Benech JC, Sanguinetti C, Chalar C, Sotelo JR. 2000. Neurofilament mRNAs are present and translated in the normal and severed sciatic nerve. *J Neurosci Res* 62:65–74.
- Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cárdenas M, Koenig E, Sotelo JR. 2004. Myosin Va and kinesin II motor proteins are concentrated in ribosomal domains (periaxoplasmic ribosomal plaques) of myelinated axons. *J Neurobiol* 60:187–196.
- Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Kun A, Koenig E, Sotelo JR. 2006. RNA trafficking in axons. *Traffic* 7:508–515.
- Sotelo-Silveira J, Crispino M, Puppò A, Sotelo JR, Koenig E. 2008. Myelinated axons contain beta-actin mRNA and ZBP-1 in periaxoplasmic ribosomal plaques and depend on cyclic AMP and F-actin integrity for in vitro translation. *J Neurochem* 104:545–557.
- Taylor AM, Berchtold NC, Perreau VM, Tu CH, Li Jeon N, Cotman CW. Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. 2009. *J Neurosci* 29:4697–4707.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680.
- Twiss JL, van Minnen J. 2006. New insights into neuronal regeneration: The role of axonal protein synthesis in pathfinding and axonal extension. *J Neurotrauma* 23:295–308.
- Mikl M, Vendra G, Klieber MA. 2011. Independent localization of MAP2, CaMKII α and β -actin RNAs in low copy numbers. *EMBO Rep* 12:1077–1084.
- Westmark CJ, Malter JS. 2007. FMRP mediates mGluR5-dependent translation of amyloid precursor protein. *PLoS Biol* 5:e52.
- Willis D, Li KW, Zheng JQ, Chang JH, Smit AB, Kelly T, Merianda TT, et al. 2005. Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. *J Neurosci* 25:778–791.
- Willis DE, Xu M, Donnelly CJ, Tep C, Kendall M, Erenstheyn M, English AW, et al. 2011. Axonal Localization of transgene mRNA in mature PNS and CNS neurons. *J Neurosci* 31:14481–14487.
- Yoo S, van Niekerk EA, Merianda TT, Twiss JL. 2010. Dynamics of axonal mRNA transport and implications for peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 223:19–27.
- Yoshimura A, Fujii R, Watanabe Y, Okabe S, Fukui K, Takumi T. 2006. Myosin-Va facilitates the accumulation of mRNA/protein complex in dendritic spines. *Curr Biol* 16:2345–2351.
- Zivraj KH, Tung YCL, Piper M, Gumy L, Fawcett JW, Yeo GSH, Holt CE. 2010. Subcellular profiling reveals distinct and developmentally regulated repertoire of growth cone mRNAs. *J Neurosci* 30:15464–15478.

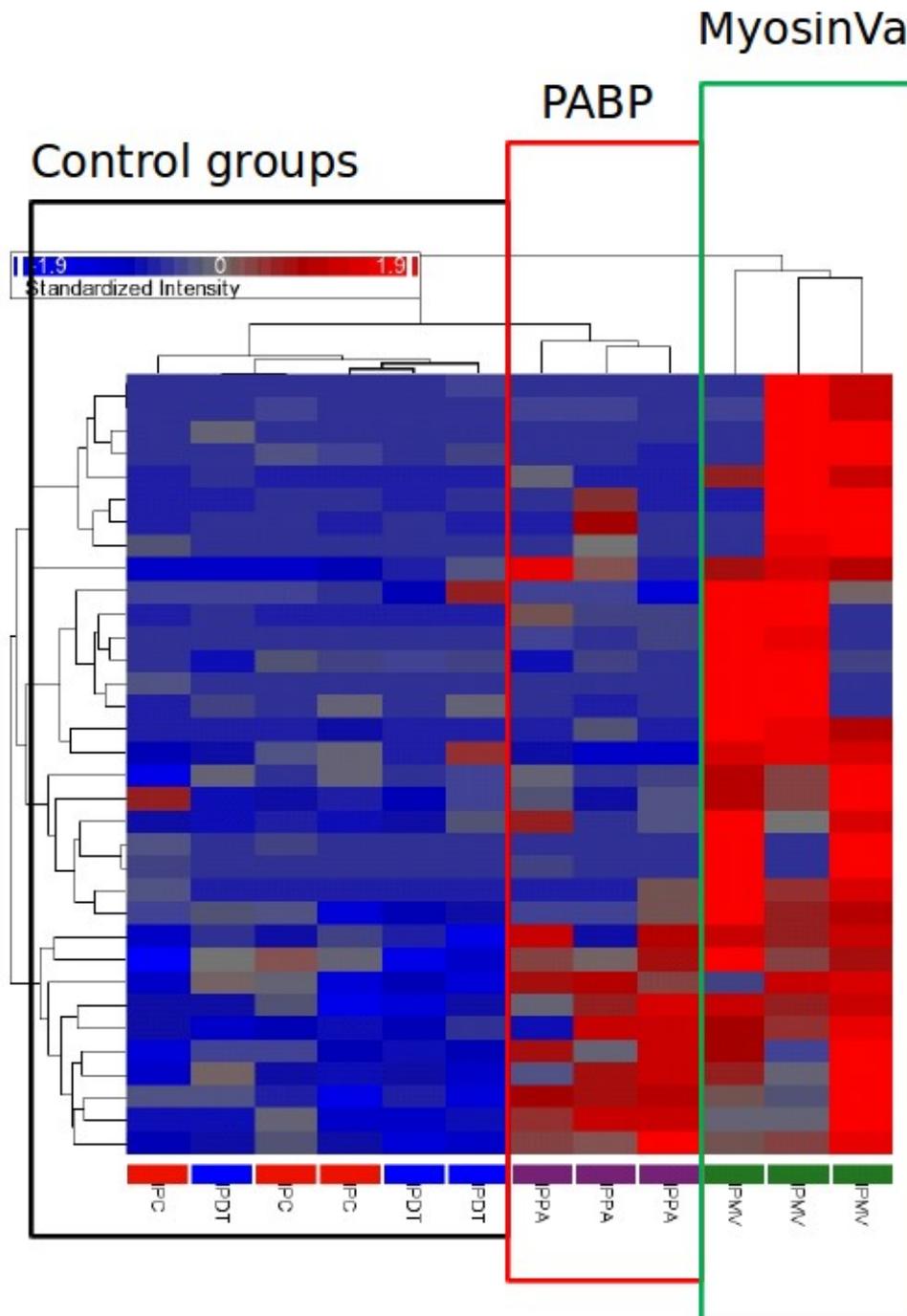
Supplementary Figure 1. RNP markers in axons and growth cones of DRG neurons in culture. A; localization of HuD, Myo5a (MVa) and P0 in a representative axon. The framed area of the leftist figure of the row was expanded to show the co-localization of each component in a RNP. The arrows points to double co-localization (HuD-MVa and MVa-P0), while arrowheads denotes triple co-localization. B; Upper row; localization of HuD, Myo5a and P0, respectively. Lower row; co-localization between pairs of markers. All the three markers co-localize in any extent, but each interaction seems to be differentially distributed in the growth cone. C; Figures in 1B (lower row) were combined to depict different grades of triple triple co-localization (arrowheads). White dots represent triple co-localization of signals of equivalent intensity; magenta and yellow also indicate triple co-localization, but in this case the contribution of each signal is not equivalent. Arrows denote apparent double co-localizations. Bars are 10 μ m.



Supplementary Figure 2. Quantification of Myosin Va, HuD and ribosomal P0 protein co-localization in growth cones. Images co-localization were generated from raw files using the Fluoview co-localization tool. A-D; Representative growth cones utilized for the quantification. Arrows denote apparent double co-localization, while arrowheads denote apparent triple co-localization of markers. E; Co-localization scores were calculated using the Co-localization Orthogonal Regression algorithm instead of the Pearson's traditional linear correlation coefficient.



Supplementary Figure 3. General heat map of the microarray data. A total of four different experimental conditions were assayed by microarrays. Myosin Va and PABP depicts those conditions where RNA was immunoprecipitated with an anti Myo5a antibody and an anti Poly-A Binding Protein antibody, respectively. Control conditions (referred as Control Groups in the figure) were done by means of an anti-diphtheria toxin antibody (as a control of antibody specificity) or beads alone (as absolute negative control).



Supplementary Figure 4. Secondary structure of 3' UTRs that contains tau and β -actin zipcode sequences. A, Common structural motif shared by the 17 3' UTRs scoring above the 75th percentile in the alignment with tau and β -actin zipcodes. Grey scale represents the degree of structural conservation and color scale the conservation of base composition. B-R; Secondary structure of Abhd14a (B), Bola3 (C), Mapk1ip1l (D), Cap1 (E), Celf1 (F), Crebbp (G), Rsad (H), Crk (I), Dhx36 (J), Hibch (K), Hsp90ab1 (L), Med28 (M), Ncapd3 (N), Nfia (O), Ptpn11 (P), Stradb (Q) and Ywhaz (R) 3 UTRs, respectively. The circle indicates motif localization.

