

***Implicancias de la proteína miosina Va
en los procesos de generación de
asimetrías y polarización celular.***

Aldo Calliari

Implicancias de la proteína *miosina Va* en
los procesos de generación de asimetrías y
polarización celular.

Tesis de Doctorado de Aldo Calliari

Orientador: José R. Sotelo

Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos (IIBCE).

PEDECIBA.

Noviembre, 2008

Índice

Resumen

Presentación del Trabajo

| | |
|--|----|
| Introducción | 1 |
| Un nuevo concepto: La síntesis proteica local como herramienta celular para la diferenciación y la compartimentalización celular..... | 2 |
| Bases del transporte y la localización subcelular de los ácidos nucleicos..... | 6 |
| <i>Señalización de los ARNm</i> | 6 |
| <i>Factores Trans</i> | 7 |
| <i>Dinámica y organización de las RNPs</i> | 9 |
| <i>Proteínas motoras</i> | 11 |
| Las miosinas de la Clase V..... | 13 |
| <i>Características generales y estructura: Características generales y estructura</i> | 13 |
| <i>Aspectos biológicos de interés particular</i> | 15 |
| La miosina Va como protagonista de los procesos de polarización celular..... | 17 |
| Hipótesis de trabajo..... | 18 |
| Capítulo I: Presencia y distribución de la miosina Va en el Sistema Nervioso | |
| Periférico | 20 |
| Introducción..... | 20 |
| Artículo " <i>Myosin Va is locally synthesized following nerve injury</i> "..... | 21 |
| Experimentos adicionales. Resultados y discusión..... | 22 |
| Localización del ARN mensajero codificante para MVa en el nervio ciático..... | 22 |
| Discusión general del Capítulo..... | 23 |
| Material y Métodos (no incluidos en el artículo precedente)..... | 25 |
| Producción de la sonda antisentido..... | 26 |
| Hibridación in situ..... | 26 |
| Marcación fluorescente de la sonda hibridizada y observación microscópica..... | 26 |
| Capítulo II: Significado biológico de la presencia de miosina Va en los axones periféricos | 27 |
| Introducción..... | 27 |
| Artículo " <i>Myosin Va and kinesin II motor proteins are concentrated in ribosomal domains (periaxoplasmic ribosomal plaques) of myelinated axons.</i> "..... | 31 |
| Experimentos adicionales. Resultados y discusión..... | 32 |
| La colocalización de MVa con HuD, confirma que algunos de los gránulos axonales MV- positivos corresponden a RNPs..... | 32 |

| | |
|--|----|
| La miosina Va y la kinesina (kif3A) colocan dentro y fuera de las PARPs..... | 32 |
| Las PARPs contienen ARNm..... | 36 |
| La interacción de miosina Va con ribosomas y ARNm puede demostrarse bioquímicamente..... | 37 |
| a) <i>Cosedimentación de la MVa con ribosomas</i> | 38 |
| b) <i>Purificación de RNPs por afinidad con anticuerpos anti proteínas P y anti miosina Va (inmunoprecipitación)</i> | 40 |
| Discusión general del Capítulo..... | 43 |
| Material y Métodos (no incluidos en el artículo precedente)..... | 46 |
| Inmunohistoquímica..... | 46 |
| a) <i>YOYO- MVa- HuD</i> | 46 |
| b) <i>MVa- kinesina- proteínas P</i> | 47 |
| Hibridación <i>in situ</i> y marcación de PARPs en axones <i>in toto</i> | 47 |
| Microscopía..... | 48 |
| Identificación de la MVa, proteínas P y ARNm a partir de ribonucleo partículas y lisados de raíces medulares..... | 48 |
| a) <i>Purificación de RNPs a partir de cerebro (total) de rata</i> | 48 |
| b) <i>Ultracentrifugación de RNPs en gradiente de sacarosa</i> | 48 |
| c) <i>Lisado de raíces medulares</i> | 49 |
| d) <i>Inmunoprecipitación de MVa y proteínas P</i> | 49 |
| e) <i>Identificación de proteínas P y MVa</i> | 50 |
| f) <i>Retrotranscripción y PCR</i> | 50 |
| Capítulo III: Movilización de ácidos nucleicos por miosina Va | 52 |
| Introducción..... | 52 |
| Artículo " <i>Myosin Va mediates RNA distribution in Primary Fibroblasts from multiple organs</i> "..... | 56 |
| Experimentos adicionales. Resultados y discusión..... | 57 |
| La miosina Va se asocia con ribosomas citoplásmicos, pero su ausencia no afecta la localización ribosomal..... | 57 |
| Expresión génica global en ausencia de miosina Va..... | 59 |
| Perfil de expresión de proteínas en ausencia de MVa..... | 65 |
| Discusión general del Capítulo..... | 71 |
| Material y Métodos (no incluidos en el artículo precedente)..... | 76 |
| Detección de proteínas ribosomales y del citoesqueleto en fibroblastos. | 76 |
| <i>Inmunofluorescencia en cultivos</i> | 76 |
| <i>Inmunoprecipitación de ribosomas de fibroblastos y detección de proteínas</i> | 76 |
| Micro arrays de DNA..... | 76 |
| <i>Preparación de la muestra</i> | 76 |

| | |
|--|-----|
| <i>Hibridación</i> | 77 |
| <i>Lectura y análisis de datos</i> | 78 |
| Arrays de anticuerpos..... | 79 |
| <i>Preparación de la muestra</i> | 79 |
| <i>Arrays de anticuerpos</i> | 79 |
| <i>Reconocimiento antígeno-anticuerpo</i> | 79 |
| <i>Lectura del array y análisis de datos</i> | 79 |
| <i>Procesamiento de la Información</i> | 80 |
| Capítulo IV: Desensamblaje de Ribonucleopartículas en respuesta al Calcio | 81 |
| Introducción..... | 81 |
| Resultados experimentales y discusión..... | 84 |
| a) Ensayo de hidrólisis Calcio- dependiente de la MVa..... | 84 |
| b) Efecto del Calcio sobre la interacción MVa-RNP..... | 85 |
| c) El calcio promueve el desensamblaje general de la RNP..... | 87 |
| Discusión general del Capítulo..... | 89 |
| Material y Métodos..... | 92 |
| Purificación de ribonucleopartículas de cerebro de rata..... | 92 |
| Ensayo de digestión de la MVa por calpaína..... | 92 |
| Desensamblaje de RNPs en respuesta a calcio..... | 92 |
| Cuantificación por densitometría de las proteínas..... | 93 |
| Centrifugación de RNPs incubadas con y sin calcio en gradientes de sacarosa..... | 93 |
| Conclusiones | 94 |
| Referencias | 95 |
| Agradecimientos | 103 |

Resumen.

Salvo en muy contadas excepciones, todas las células eucariotas, desde las levaduras hasta las neuronas, desarrollan en forma temporal o permanente, asimetrías morfológico-funcionales mas o menos evidentes. A éstas, las denominamos “polarizaciones celulares”. El ejemplo más paradigmático tal vez sean las neuronas, con sus clásicos territorios dendrítico, somático y axonal. El desarrollo de dicha polaridad implica en primer lugar la definición de un territorio sub celular con características bioquímicas y estructurales propias. En segundo lugar, implica una serie de mecanismos mediante los cuales la célula adquiere la capacidad para desarrollar una función específica. En el ejemplo de una neurona, el territorio sináptico es el responsable y especializado en la comunicación intercelular; para una célula que migra en un medio de cultivo o en un tejido, el borde de avance se organiza como un territorio en sí mismo, con características funcionales propias. Detrás de la generación de estas polarizaciones celulares, existen una serie muy variada de mecanismos que la mantienen y las regulan. Tienen como fin la distribución asimétrica de una serie de componentes específicos, tales como enzimas, receptores o proteínas estructurales, los que de esta forma, confieren a este territorio su peculiaridad funcional. Esa distribución asimétrica de componentes, descansa básicamente en dos mecanismos. Uno de ellos es el clásico transporte activo de proteínas desde su sitio de síntesis hacia su sitio de acción, el cual es dependiente de microfilamentos y microtúbulos. El otro, de valoración más reciente, es el transporte de los precursores de estos componentes proteicos, los ARN mensajeros (ARNm). El transporte de ARN mensajeros, su posterior localización y su traducción local, es una estrategia sumamente versátil pues no solo es más eficiente que el transporte de las proteínas sino que le permite a la célula respuestas rápidas ante cambios locales. Las claves del mantenimiento de la estructura definida como territorio axonal han sido motivo de elaboración teórica y debate desde hace mucho tiempo. Esta tesis intenta evaluar la existencia y eventual importancia que el transporte axonal de ARNm pueda tener en el establecimiento de este territorio.

En el desarrollo de este trabajo se comprueba en primer término, la existencia en el axón maduro de un componente que el tesista considera clave en esta historia: la proteína motora miosina Va. En segundo lugar se intenta dimensionar la real

importancia de este motor molecular, así como conocer más sobre su función local. En ese sentido se establece claramente su asociación con complejos de ribonucleoproteínas, a los cuales se sugiere que transporta. Si bien no se demuestra directamente que existe un transporte de ARNm a cargo de MVa, sí se demuestra que en fibroblastos, la localización definitiva que estos ARN alcanzan, dependen del buen funcionamiento de este motor. Finalmente, el trabajo culmina con el estudio de un aspecto que resulta de interés no solo en sí mismo, sino porque representa una proyección potencial del trabajo más allá de la tesis: la transición entre la localización final de la partícula de ARN y la expresión de su mensaje. En ese sentido, se estudia brevemente el efecto que el ión calcio ejerce sobre esa super estructura molecular y se especula sobre el significado fisiológico que este efecto pudiera tener.

En conclusión, el presente trabajo incorpora información original sobre el significado biológico de la miosina Va, una proteína de funciones diversas y parcialmente caracterizadas. Al tiempo, profundiza en los mecanismos responsables del mantenimiento de la estructura axonal, reforzando la hipótesis hasta hace poco subestimada sobre la existencia de mecanismos de transporte de ARNm y síntesis proteica local axonal como determinantes de la polaridad axonal.

Presentación del Trabajo.

Si bien el título así como los objetivos planteados originalmente en el Proyecto de Tesis sugerían a la proteína miosina Va como el eje y objeto mismo del estudio, lo cierto es que el propio desarrollo del trabajo fue tendiendo hacia metas más generales y también algo más ambiciosas, al menos en su marco conceptual. El trabajo resultó entonces en el abordaje de un aspecto puntual, que creemos forma parte de un problema biológico mucho más relevante y todavía no resuelto. Este contexto o sea, ese “problema biológico relevante”, representa el conjunto de mecanismos que subyacen a los fenómenos que determinan la compartimentación y la polarización celular. Si bien estos conceptos nos remiten inmediatamente hacia el aspecto morfológico-estructural, (la organización celular interna en organelos o la asimetría que presentan algunas células), la compartimentación y la polarización también tienen su correlato bioquímico-metabólico. El caso de la compartimentalización bioquímica es fácil de visualizar, ya que es bien conocida desde hace mucho la especialización bioquímica de la que hace gala cada organelo. Sin embargo, ¿qué es lo que hace que la cara basal y la apical de una célula secretora sean metabólicamente tan diferentes entre sí aún perteneciendo a regiones celulares que no solo se encuentran en continuidad, sino que son topológicamente equivalentes?. ¿Cómo se genera esa polarización metabólica? Uno de los mecanismos claves parece ser el transporte, la localización precisa y la expresión regulada de un grupo característico de ARN mensajeros, cuyos productos (las proteínas), ejercerán una función específica en un sitio y en un momento definido.

En este contexto y relacionada con este último aspecto, fue que se planteó como hipótesis de la presente tesis y se comprobó finalmente, la participación de la miosina Va en procesos relacionados con el transporte de ácidos nucleicos. Se eligió como modelo de estudio el Sistema Nervioso Periférico. Sin perjuicio del tradicional interés que ha representado este modelo para el Laboratorio donde se desarrolló la tesis, el principal motivo de su elección fue que el tipo neuronal que lo constituye se presenta como el ejemplo más extremo de polarización y asimetría, no sólo morfológica, sino también metabólica. Pero este modelo tiene también serias limitaciones, debido a lo cual hubo que recurrir a aproximaciones alternativas, como lo fueron por ejemplo los cultivos celulares de estas mismas neuronas y también de fibroblastos.

Las conclusiones a las que arribamos con la finalización de este trabajo de tesis representan el final de un recorrido experimental que partió del estudio de aspectos sumamente básicos y descriptivos y terminó con aproximaciones más funcionales, resueltas con cierto grado de sofisticación. Por esta razón he considerado oportuno presentar la tesis organizada en capítulos. De esta forma intento recrear en el texto esa evolución experimental-intelectual, reflejada en las sucesivas hipótesis de trabajo que se fueron planteando, así como en la resolución experimental propuesta para cada una de ellas. En el primer capítulo se aborda la pregunta sobre la presencia y la función de la miosina Va en el Sistema Nervioso Periférico; su aparente abundancia relativa y su localización nos generaron nuevas preguntas y algunos experimentos adicionales nos dan las primeras respuestas a esas preguntas. Estos resultados merecieron la publicación de un artículo, el cual se incluye y comenta en este capítulo. El segundo capítulo trata un aspecto más específico, pues se plantea una hipótesis, que si bien era bastante atrevida en ese momento, algunos de los elementos que la sostenían ya se insinuaban a nivel de la literatura científica: deberían existir en los axones maduros, complejos ribonucleo proteicos que contuvieran miosina Va. Aquí se presentarán, con una variada serie de aproximaciones experimentales, evidencias que demuestran que esta asociación existe en axones maduros motores y sensitivos. Se identifican también algunas otras proteínas claves que irán definiendo una hipótesis sobre el significado funcional de esta asociación y en particular de la miosina Va. Para la discusión del material presentado en esta sección, se incluye un nuevo artículo científico, así como muchos otros resultados no incluidos en la mencionada publicación ni en ninguna otra. Los resultados obtenidos hasta aquí permitieron generar un modelo de trabajo en torno al cual se podían plantear nuevas hipótesis, sin embargo ese mismo modelo era el resultado de experimentos que daban una idea todavía bastante estática del fenómeno en estudio. El tercer capítulo enfoca la misma temática que la sección anterior y se aclara un poco más qué tan relevante sería la miosina Va en los procesos de transporte y polarización celular, así como cuáles son los puntos claves donde interviene. Sin embargo, para realizar los experimentos necesarios y llegar a las conclusiones comentadas, hubo que dar un salto importante hacia un modelo más simple y reduccionista: los cultivos de fibroblastos *in vitro*. Por esa razón, los resultados resumidos en este capítulo, no pueden ser considerados una continuidad de los anteriores sin antes tener bien presente las particularidades de ambos modelos a la hora de hacer extrapolaciones. Como en los

capítulos anteriores, se incluye para la discusión, un nuevo artículo científico así como datos complementarios no publicados.

La comprobada asociación de la miosina Va con complejos ribonucleoproteicos que contienen ARN mensajero, así como la aparente participación de esta proteína en el transporte o anclaje del complejo a los micro filamentos nos llevó a preguntarnos sobre los mecanismos involucrados en su desensamblaje, requisito previo para que el ARNm se torne traduccionalmente activo. Utilizando una aproximación más bioquímica (complejos ribonucleoproteicos purificados, *in vitro*), se aportan y se discuten datos que sugieren que el calcio por sí solo es capaz de desencadenar el desensamblaje de la partícula y que la miosina Va es uno de los componentes liberados de ella.

Para finalizar, se presenta una breve conclusión, donde se pretende resumir lo que en opinión del autor son los aspectos más relevantes del trabajo, así como las perspectivas que se abren para el futuro.

Introducción.

El estudio de los mecanismos responsables de la generación y el mantenimiento de estructuras celulares tales como los axones neuronales, ha sido un tema clásicamente de interés dentro de la neurobiología. No es para menos, puesto que la generación de una base teórica sólida capaz de explicar satisfactoriamente como se logra el mantenimiento del “estado estacionario” axonal y su identidad como territorio sub celular especializado, constituiría una herramienta conceptual esencial para comprender otros aspectos relacionados al primero y de gran interés práctico. Entre esos otros mecanismos, están aquellos que se despiertan cuando la neurona es “sacada” de ese estado estacionario y llevada a un nuevo equilibrio, clásicamente cuando el axón degenera crece o regenera. Las neuronas componentes del Sistema Nervioso Periférico son las células más polarizadas y asimétricas que existen, donde la relación axoplasma:soma puede ser de miles de veces y las distancias entre sus extremos de centímetros o metros, según la especie considerada. En razón de lo antedicho, parece claro que el interés por estas cuestiones, mismo en el plano más básico, resulta sumamente pertinente. Y así ha sido desde hace mucho tiempo. Sin embargo, el desarrollo de la teoría no solo estuvo estancado durante casi 5 décadas, sino que además las ideas prevalentes no explicaban satisfactoriamente las observaciones del laboratorio, la clínica ni la fisiología normal. Se pueden reconocer una o dos razones por las cuales este estancamiento teórico ocurrió. La principal probablemente haya sido el concepto sumamente arraigado, según el cual los axones carecían de ribosomas y por lo tanto de capacidad para sintetizar proteínas, o sea de realizar su propio recambio estructural (1). Como consecuencia y atendiendo a esa restricción inicial, se generó todo un modelo teórico basado en la hipótesis del *transporte axoplásmico lento de proteínas* (componentes estructurales del axón), que se movían anterogradamente desde el soma neuronal (único sitio posible de síntesis), hacia el extremo del axón. Este modelo intentaba explicar (y de alguna forma explicó) el mantenimiento del estado estacionario axonal, así como los fenómenos que se observan cuando se sale de ese estado estacionario (2). El modelo tenía muchas restricciones, algunas muy serias como ser la velocidad del transporte lento de esas proteínas estructurales (0,5-5 mm / día), las cuales en axones largos no tendrían tiempo de llegar nunca a destino. Por esta razón, al supuesto inamovible de la inexistencia de ribosomas axonales, hubo que agregar

muchísimos supuestos más que explicaran observaciones tan diversas como la incompatibilidad de las vidas medias de las proteínas transportadas con su velocidad de movimiento anterógrado, la homogeneidad que presenta el calibre axonal todo a lo largo de su trayecto, la no acumulación de material transportado en el extremo distal del axón, la inexistencia de motores moleculares con cinéticas compatibles con las velocidades de transporte entonces descritas, las velocidades de regeneración axonal o la axogénesis durante el desarrollo, etc. Si bien no era explícito, de la lectura de los trabajos de la época y de algunos no tan lejanos en el tiempo, se desprendía que el “transporte axoplásmico lento” era visualizado como un fenómeno de la biología celular privativo de las neuronas, algo que la desarrollaron ellas mismas y que no le pertenecía a ninguna otra célula. No se pensaba que las estrategias de mantenimiento, reparación y crecimiento axonal podrían representar un conjunto de herramientas biológicas preexistente y presente en otras variedades celulares, herramientas que la neurona, en razón de sus características tan particulares, había llevado a un grado de perfeccionamiento o de sofisticación máximo. He ahí, tal vez la segunda causa por la cual la ciencia se empeñó durante buena parte del siglo pasado en un conjunto de ideas sin mayores sustentos experimentales. Este fenómeno particular, que no es raro en la historia de la ciencia, llegó a llamar la atención de intelectuales no necesariamente vinculados al tema, dando lugar inclusive a consideraciones de tipo epistemológicas (3).

Actualmente sabemos que los axones maduros, efectivamente, poseen ribosomas.

Un nuevo concepto: La síntesis proteica local como herramienta celular para la diferenciación y la compartimentación.

Casi tan antigua como la hipótesis del transporte axoplásmico lento de proteínas estructurales como explicación central de la génesis y mantenimiento axonal, fue también la de la *Síntesis Local de Proteínas* en el propio axón (4). Al menos de las proteínas estructurales. Si bien las evidencias experimentales que sustentaban esta hipótesis alternativa (aunque no necesariamente contrapuesta), eran abundantes y fueron planteadas desde un principio, la incapacidad de demostrar en forma directa la existencia de ribosomas en el compartimento axonal, le quitaba credibilidad a la idea.

Como consecuencia, no fue tomada en cuenta seriamente a pesar de ser conocida por la comunidad científica especializada.

Paralelamente, aunque en forma más tardía y totalmente desvinculada de lo anterior, una línea de trabajo enfocada en la dilucidación de los determinantes de la polaridad antero-posterior y ventro-dorsal durante la ovogénesis en *Drosophila*, revelaba algunos mecanismos sumamente novedosos e interesantes vinculados al proceso de polarización celular. El desarrollo de esa polaridad en el oocito de los insectos, es crítica ya que las polaridades del embrión, la larva y el adulto, dependerán sucesivamente cada una de las anteriores. Dicho de otra forma, la ubicación de dónde estará ubicada la cabeza del insecto adulto, respecto al tórax y al abdomen, está determinada ya cuando el individuo consiste en una célula única. Hasta fines de la década del '80, se especulaba que el fenómeno estaba gobernado por gradientes químicos a lo largo del cuerpo celular del oocito y que eran estos micro ambientes los que generaban las condiciones locales que propiciaban los fenómenos subsecuentes (5). No se conocía la naturaleza ni el origen del gradiente de esos *morfógenos* o *determinantes* de la polaridad celular. La aproximación genética, comienza a resolver el problema cuando Christiane Nüsslein-Volhard (6), demuestra que un muy reducido grupo de genes codificaban para esos morfógenos responsables de la generación del gradiente. Un grupo de productos génicos determinará el polo anterior (básicamente el gen conocido como *bicoid*), otro el polo posterior (*nanos* y *caudal*) y un tercer grupo será el responsable de las futuras estructuras intermedias (principalmente el gen *hunchback*). También resultó que el gradiente no era otro que el generado por la difusión de las proteínas resultantes de la traducción de este reducido grupo de ARN mensajeros, los cuales debían haber sido previamente localizados en sitios específicos: los futuros centros generadores del gradiente, por ejemplo el polo anterior o el posterior del oocito. Este, tal vez sea el primer ejemplo, sobre cómo la traducción local de ARNm genera un proceso de polarización celular, condicionado a su localización previa (7). Otro aspecto sumamente interesante y novedoso es que en el curso de estos estudios, quedó claro que al menos la polaridad del eje antero posterior (que es el primero en definirse), es un fenómeno independiente de la actividad del núcleo del oocito. Esto significa que el verdadero origen de los mensajeros codificantes para esos determinantes de la polaridad no es el propio oocito, sino que son las células nodrizas quienes las transfieren (en una etapa más temprana del desarrollo), al entonces pro-oocito. Nótese que esta transferencia de genes desde una célula nodriza al oocito, implica que el control de la expresión génica

de esta última es realizado por una célula ajena, lo cual es algo totalmente novedoso y contravino en su momento algunos de los dogmas vigentes en la biología celular. Otro aspecto interesante de destacar es que el proceso de la transferencia de los ARNm hacia el oocito así como su posterior localización, son responsabilidad del citoesqueleto de tubulina y de un grupo de proteínas motoras con características retrógradas y anterógradas. El tema de la transferencia intercelular de transcriptos, así como el descubrimiento de que la localización específica y la posterior traducción local de los ARNm eran la génesis de los gradientes de los determinantes de la polaridad fueron conceptos muy removedores en ese momento, al punto tal que le valieron a Nüsslein-Volhard y sus colegas el premio Nobel de Medicina en 1995.

Los procesos que se dan en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como preparativos del proceso de división celular, también son ilustrativos acerca de la gran difusión que tienen en la escala biológica los fenómenos de transporte y localización de ARN mensajeros como mecanismo de polarización. Concretamente, la localización asimétrica en el polo de gemación tanto del ARNm *ASH1* y consecuentemente su producto de traducción, fue el primer ejemplo conocido a nivel de individuos unicelulares que mostró cómo la localización de un ARNm contribuye a la determinación del futuro fenotipo. La proteína Ash 1p reprime la transcripción de *HO*, que codifica para una endonucleasa de ADN y que resulta determinante para que la levadura mantenga su capacidad para cambiar de “sexo” o “tipo” (“mating type”), de “a” a “ α ” y viceversa (8). Ambos tipos son haploides, los cuales al unirse entre sí, reproducen un individuo diploide. Así, el ARNm transportado al polo en gemación y que será heredado por la célula hija, da origen a Ash1p, el represor de la actividad de *HO* y por lo tanto mantendrá a esta nueva célula con su tipo original. Debido a esto, una vez finalizado el proceso de gemación, normalmente sólo la célula madre conserva la capacidad para cambiar el tipo. Esta mecánica es importante para mantener la diversidad en la colonia. La correcta localización de este ARNm depende de la expresión de cinco genes, conocidos genéricamente como genes *SHE*. El clonado y secuenciado de uno de ellos, *SHE1*, reveló ser el codificante para Myo4p, una proteína motora asociada a los microfilamentos y perteneciente a la clase V de las miosinas. Myo4p es localizada también en el polo de gemación, es inmunoprecipitada con la proteína Ash1p y en los *knock out* para *myo4p*, Ash1p permanece en la célula madre. Mas aún, la visualización directa del movimiento de la ribonucleo partícula conteniendo *SHE1* (marcada fluorescentemente), demostró que su velocidad de movimiento (~ 400

nm/s) era compatible con las cinéticas de las miosinas V caracterizadas previamente en otras especies (9, 10). Myo4p fue la primera y hasta ahora la única miosina identificada como responsable directo del transporte de ácidos nucleicos.

En este contexto, la ocurrencia de síntesis local de proteínas en el territorio axoplásmico no debería ser visto solo como la solución a un problema puramente “logístico” o sea, el mecanismo por el cual el axón “compensa” esa incapacidad que tiene el soma para proveerlo de todo el material necesario para su mantenimiento. La hipótesis original ha estado tradicionalmente sesgada en ese sentido. La información acumulada hasta ahora en una gran variedad de modelos, demuestra que la síntesis local de proteínas es una estrategia ampliamente difundida y que tiene como función esencial la generación y el mantenimiento de la individualidad funcional de un territorio subcelular, independientemente de la dimensiones celulares. Como la forma y la función son tributarias una de la otra, es frecuente observar que la polarización bioquímico-metabólica, tiene como contrapartida ya sea la compartimentación celular o la polarización morfológica generadora a su vez, de células morfológicamente asimétricas. El transporte de ARN mensajeros específicos, su localización y posterior traducción local tiene varias ventajas sobre el transporte de la proteína pre fabricada (mecanismo tradicionalmente reconocido como generador de polarización celular). Además de las ventajas energéticas obvias (es mas “económico” transportar un ARNm que decenas de proteínas), hay otras quizás mas importantes que tienen que ver con la plasticidad y funcionalidad que tiene el proceso. En este caso, tanto la cantidad de proteínas que se sintetizan, como el momento en que éstas se tornan funcionantes, serán reflejo de regulaciones locales. De esta forma, la expresión local de una proteína así como su regulación en mas o en menos, ya no depende de un centro de decisión alejado como el núcleo y como contrapartida se convierte en un proceso más flexible y rápido. Finalmente, el transporte del ARNm y su síntesis local previene la expresión de una proteína en cualquier sitio de la célula, lo que en algunos casos puede ser dañino para la célula; por ejemplo la proteína Tau puede potencialmente unirse a los microtúbulos dendríticos, pero en la practica lo hace solo con los microtúbulos axonales en virtud de que su síntesis es local. Exactamente lo mismo ocurre con MAP2 y su selectividad por los microtúbulos dendríticos (11).

El presente trabajo fue planteado y desarrollado, apoyándose en un supuesto básico, el de la existencia del fenómeno de síntesis proteica local en los axones que constituyen el Sistema Nervioso Periférico. Bajo la óptica de lo descrito hasta aquí, la

síntesis proteica local es concebida y analizada más como herramienta celular para mantener la identidad de su compartimento axonal, que como responsable de mantener su volumen físico. Esto último no va en desmedro de lo primero en términos de importancia, simplemente es el enfoque particular que se le dio a este trabajo.

Bases del transporte y la localización subcelular de los ácidos nucleicos.

Los fenómenos de transporte, localización y ulterior metabolismo de los ARNm, son procesos que aún tienen muchos aspectos pobremente comprendidos. El “formato” bajo el cual se transportan es el de complejos macromoleculares de ribonucleo proteínas. Estos complejos representan una población muy heterogénea en composición y tamaño, por lo cual se las denominará genéricamente “complejos Ribo Núcleo Proteicos” o “RNPs”. Esta heterogeneidad tal vez dé cuenta de los posibles estados funcionales en los cuales se especula, se encontrarían esos ARNm: en tránsito, en depósito (reprimidos, en vías de eliminación), o en su localización definitiva a la espera de su traducción. Hay partículas que contienen ribosomas y otras que no. Sin embargo, lo que todas tienen en común es que el ARN mensajero, mientras esté incluido en ellas, es traduccionalmente inactivo (12).

Señalización de los ARNm. Teóricamente todos los transcriptos que una célula dada produce, son potencialmente integrantes de estos complejos de ribonucleo proteína. Recordemos que los ARNm no pasan “desnudos” a través del complejo del poro nuclear, sino que siempre están asociados a alguna proteína. Lo que sí sería posible, de acuerdo a la hipótesis de la compartimentalización mas arriba comentada, es encontrar poblaciones de mensajeros cualitativamente diferentes (bajo la forma de RNPs), según el territorio celular observado. Los datos comentados en referencia a los procesos de polarización en los oocitos, embriones de insecto, así como los de levaduras, son consistentes con esta idea. El ejemplo de la distribución del ARNm codificante para β -actina en diversos tipos celulares en cultivo, también es ilustrativo al respecto. En fibroblastos por ejemplo, está bien establecido desde hace tiempo que este transcripto se localiza preferente en el lamelipodium. Esta distribución tiende a perderse

ante algún estímulo que inhiba la actividad plástica o migración celular, como por ejemplo el retiro del suero o de factores tróficos del medio de cultivo (13). Un fenómeno muy similar ocurre en neuronas de hipocampo o corteza en cultivo, donde este mismo ARNm se localiza en la región más periférica de los conos de crecimiento, localización que es dependiente de neurotrofinas NT3 y BDNF, pero no de NGF (14). Localizaciones preferentes de otros ARNm en otros tipos celulares, también han sido reportadas.

Asociado a este fenómeno, se han buscado los factores determinantes de esta especificidad en la localización del mensajero. Se ha demostrado que la mencionada localización del ARNm de la β -actina, no es afectada por la acción de inhibidores de la síntesis proteica (15). Esto es relevante, pues sugiere que los procesos que definen su localización, son previos y diferentes a los que obedecen al mecanismo conocido como “péptido señal”. Todas las evidencias apuntan a que la información para esta localización espacial está en la propia secuencia del ARN, concretamente dentro de las llamadas “regiones no traducidas” (o “UTR”, del inglés) generalmente en el extremo 3' de la molécula. Estos sub dominios, “o señales de localización” pueden ser tan cortos como unas pocas decenas de nucleótidos; tal es el caso de la señal responsable de la localización en la lamelipodium del mensajero codificante para la β -actina. Esta secuencia suelen ser necesaria y suficiente para la localización final del mensajero. Su eliminación lleva a la total alteración de la distribución, mientras que la secuencia aislada es capaz de ubicarse con la misma distribución que el mensajero íntegro (16). En otros casos, las señales de localización son más complejas e implican sub regiones dispuestas en tandem, con información complementaria entre sí y formación de estructuras secundarias de doble cadena. Tal es el caso de la señal de localización en la mielina del mensajero que codifica para la proteína básica de la mielina (MBP), en los oligodendrocitos (17). Estos sub dominios son denominados “elementos cis” y representan zonas reconocidas y a las que se unen proteínas específicas. Estas proteínas se conocen como “factores trans” y tienen como principal función decodificar la información contenida en la secuencia, a información espacial.

Factores Trans. Se han descrito hasta ahora una gran cantidad y variedad de proteínas asociadas a las RNPs. Estas incluyen un grupo de proteínas de unión directa con el ARNm y con funciones tan diversas como la estabilización de la cadena del ARN, la promoción de su empaquetamiento, el oficiar de adaptador entre una segunda proteína y el mensajero, o como participante en los mencionados procesos de

localización (estas últimas, factores trans). Un aspecto interesante y hasta cierto punto sorprendente es la presencia en las RNPs, de proteínas clásicamente nucleares como las hnRNPs. Estas proteínas que se consideraban muy transitoriamente asociados al ARNm, nos indican claramente el origen nuclear de las RNPs. Más aún, algunas proteínas de unión al ARNm y asociadas directamente con su transporte y localización final se ensamblan ya estando en el núcleo. Tales son los casos de ZBP-1 (responsable de la localización del ARNm de la β -actina en fibroblastos y el de tau en neuronas, o el de Vg1 en el oocito de *Xenopus*) (18, 19) o de SMN, responsable de la localización del ARNm de la β -actina en conos de crecimiento de motoneuronas y cuyo mal funcionamiento causa la enfermedad conocida en humanos como *atrofia músculo-espinal* (20).

El ejemplo de la proteína involucrada en la localización del mensajero que codifica para MBP en oligodendrocitos “in vitro”, es ilustrativo sobre cómo a pesar de seguir una misma lógica, estos mecanismos adquieren variados niveles de sofisticación según cada caso. En éste, una señal de localización de sólo 11 nucleótidos es reconocida por su factor trans, la hnRNPA/B lo cual es suficiente para localizar este mensajero a nivel de los “procesos” del oligodendrocito. Sin embargo, su localización final (a nivel del compartimento donde se está sintetizando la mielina), depende de una segunda secuencia, ubicada a continuación de la anterior (17). Esto ilustra algo que es muy frecuente: la localización del mensajero como un proceso de múltiples etapas sucesivas y con diferentes elementos participando en cada una de ellas. Para finalizar, el ejemplo de la proteína conocida como staufen (con homólogos ampliamente distribuidos en toda la escala zoológica), ilustra otro aspecto diferente de la interacción cis-trans. Esta proteína contiene 5 dominios de unión a ARN doble cadena denominados “dsRBDs”, lo que significa que es capaz de reconocer estructuras secundarias o terciarias además de secuencias nucleotídicas. En el conocido caso de *Drosophila*, se sabe que uno de esos motivos está involucrado en la localización microtúbulo-dependiente en el polo posterior del oocito, del mensajero para oskar. Otro de estos dominios responde por la localización del mensajero de bicoid en el polo anterior. Finalmente, la localización actina-dependiente del mensajero de prospero está a cargo de un tercer dominio diferente. De esta forma, una misma proteína reconoce diferentes secuencias de diferentes mensajeros y es capaz de ubicarlos tanto sobre los microtubulos, como sobre los microfilamentos.

Dinámica y organización de las RNPs. Como se mencionó, la composición es heterogénea y además abundante en variedad. Sin embargo, hay ciertos componentes que están clásicamente presentes en ellas y que de alguna forma las definen (21). A propósito de esto, Sossin y DesGroseillers han propuesto para las RNPs, la nomenclatura y clasificación resumida en la Tabla 1. Allí se definen 6 diferentes categorías según su composición molecular, reflejo a su vez de diferentes estados funcionales.

| | P bodies* | Gránulos de estrés | Partículas de miRNAs | Polisomas | Gránulos de RNA | Partículas de transporte |
|---------------------------------|-----------|--------------------|----------------------|-----------|-----------------|--------------------------|
| Staufen 1 | Si | Si | ND | Si | Si | Si |
| Staufen 2 | Si | ND | Si | Si | Si | Si |
| Ddh1 y homólogos | Si | Si | ND | ND | Si | ND |
| Enzimas removedoras del Cap 3´. | Si | No | ND | No | No | ND |
| G3BP | No | Si | ND | Si | Si | ND |
| eIF4Esi | Si | Si | ND | Si | No | Si |
| CPEB | Si | Si | ND | ND | Nd | Si |
| ZBP1 | ND | ND | ND | ND | Si | Si |
| FMRP | Si | Si | Si | Si | Si | Si |
| TIA-1/R si | Si | No | No | | No | No |
| Pumilio | No | Si | ND | ND | ND | Si |
| PolyA-binding Protein | No | Si | Si | Si | Si | Si |
| Sub unidad ribosomal 40S | No | Si | A veces | Si | Si | No |
| Sub unidad ribosomal 60S | No | No | A veces | Si | Si | No |
| Argonauta | ND | Si | Si | ND | ND | ND |
| HuD | | | | | Si | |
| Proteínas motoras | | | | | Si | Si |

Esquemáticamente y de acuerdo a lo sugerido en la figura 1, una partícula de ARNm, luego de salir del núcleo, puede seguir varios caminos; puede tornarse transcripcionalmente competente (uniendo eIF4E y eIF4G, por ejemplo) o alternativamente, unir una molécula represora. Esta última opción puede representar el camino hacia su almacenamiento y eventual degradación. Por ejemplo, los “gránulos de

procesamiento” (“P-bodies”), son consideradas estructuras donde el ARN se encuentra almacenado, reprimido o en vías de degradación pues contienen endonucleasas y enzimas que remueven el “cap” en el extremo 5'. En estas estructuras no se encuentran ribosomas, lo cual parece lógico si se las valora como estructuras donde el ARN está reprimido o en vías de degradación. Esto ha llevado a suponer que los ribosomas y el sistema de reclutamiento del ARNm a los P-bodies (representados por las proteínas Ddh1 y sus homólogos) compiten por el ARNm. Lo anterior no quiere decir que los complejos que contengan ribosomas sean necesariamente activos. Por ejemplo, los “gránulos de estrés” son consecuencia de la fosforilación de eIF2 α lo cual detiene el proceso de iniciación de la traducción cuando ya se ha formado el complejo de pre-iniciación (sub unidad menor del ribosoma, ARNm, met-ARNt y eIF2 α inhibiendo de esta forma el ensamblaje de la subunidad mayor del ribosoma al resto del complejo y el comienzo de la elongación. Precisamente, la sub unidad ribosomal 60S no está presente en el granulo de estrés. Este proceso es reversible. Por ejemplo, los estímulos que en las neuronas generan LTP, son acompañados simultáneamente de la desfosforilación de eIF2 α (22) y la consecuente activación de la síntesis proteica local responsable de la fase tardía de la LTP.

La unión de una partícula de ARN a una molécula represora, alternativamente a su ransformación en un “P-body”, puede convertirla en una “partícula de transporte” mediante la incorporación de la maquinaria necesaria para su transporte activo (proteínas motoras y sus adaptadores) y ser luego enviada a un compartimento específico. El caso de la “partículas de micro RNAs”, miRNP (también llamadas RNA *interfering silencing complex*, RISC), es interesante en el sentido que representan una forma adicional (o tal vez alternativa) de reprimir la traducción. Están caracterizadas por la presencia de micro RNAs (miRNAs) además de proteínas asociadas a la represión de mensajeros tales como TRBP, DICER y argonauta. La asociación de la partícula de ARN con una miRNP, podría ocurrir antes o después de su transporte, razón por la cual se las concibe como parte de un estado “pívor” entre el P-body o la partícula de transporte. Finalmente, se definen dos estados más en los cuales se puede encontrar el ARN; éstos representan los clásicos “polisomas” (activos traduccionalmente) y los polisomas reprimidos en la etapa de elongación, denominados “gránulos de RNA”. Poseen decenas o centenas de ribosomas y debido a su gran tamaño (hasta 1 μ m), (12, 23) estos gránulos son tal vez los únicos morfológicamente distinguibles de los demás.

Estas estructuras (que poseen proteínas motoras), son consideradas móviles y una vez localizadas, su represión podría ser revertida (12).

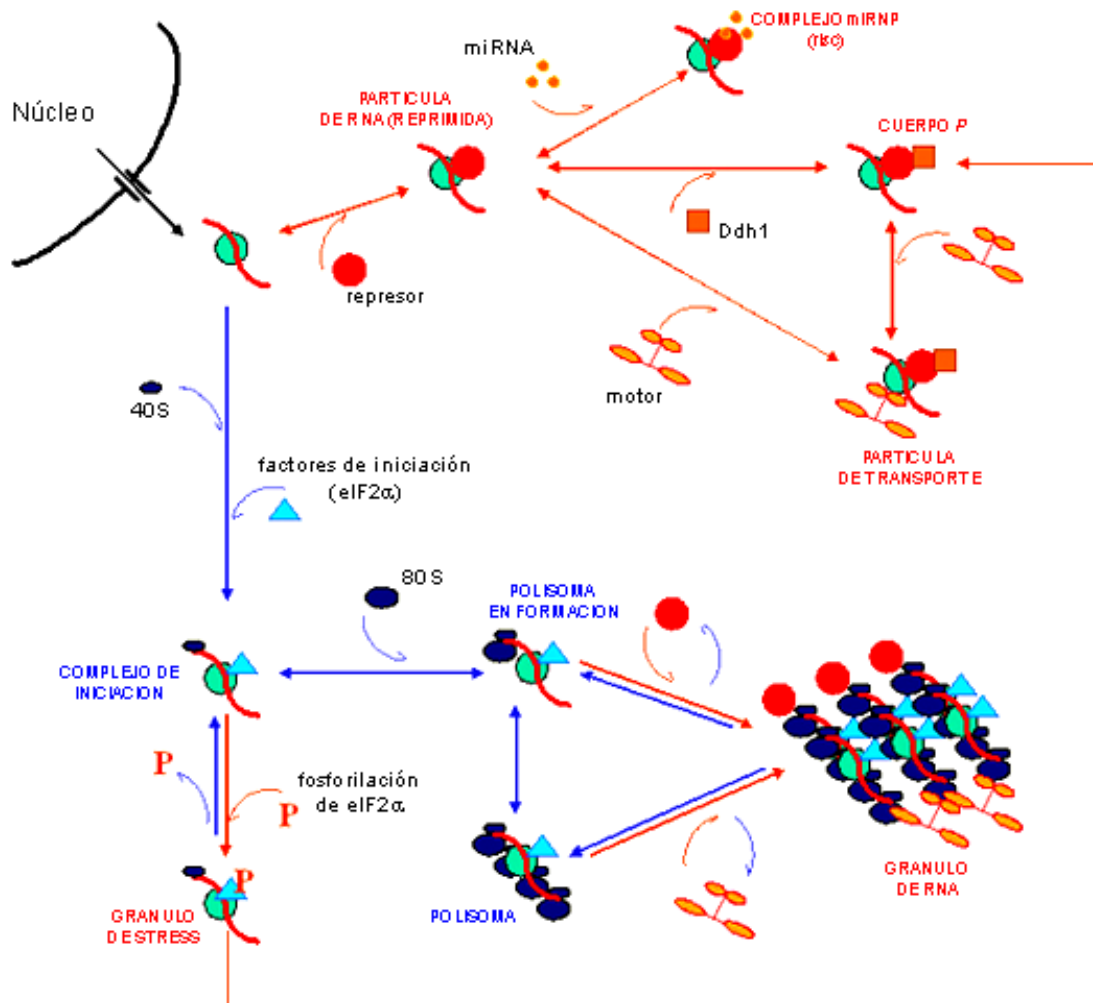


Figura 1. Diferentes vías y formatos en los que puede encontrarse el ARN mensajero en una célula. Una vez que el ARNm sale del núcleo, varios caminos son posibles. Las flechas rojas significan vías básicamente represivas, mientras que las azules, representan caminos que llevan a la expresión del mensaje. Nótese que casi todas las interacciones (sino todas), son potencialmente reversibles y están intercomunicadas entre sí. Tomado y adaptado de Sossin and DesGroseillers, *Traffic* 2006. 7:1581-1589.

Proteínas motoras. El transporte activo de mensajeros es el mecanismo de movilización propuesto para la gran mayoría de ellos, aunque la responsabilidad directa de las proteínas motoras en su transporte ha sido demostrada en relativamente pocos casos. Se ha descrito la presencia de proteínas motoras dependientes de microtúbulos (kinesina y dineína)(24, 25) y microfilamentos (miosinas tipo II y V)(24) en las RNPs. La observación concerniente a los motores microtúbulo-dependientes, resulta

concordante con reportes anteriores donde mediante el uso de sondas fluorescentes en células en cultivo (el colorante vital, *Syto 14*), se mostraba que partículas conteniendo ARN mensajeros y ribosomales eran capaces de moverse anterógrada o retrógradamente, en forma direccionada. Sus velocidades resultaban compatibles con las de un transporte activo ($0,1 \mu\text{m/s}$), aunque menor al de mitocondrias ($0,3 \mu\text{m/s}$). Estos movimientos eran bloqueados por drogas depolimerizantes de los microtúbulos (23). La participación de las kinesinas en la movilización de RNPs ha sido estudiada de otras diversas formas. Utilizando fragmentos recombinantes de KIF5 inmovilizados en columnas, representando diferentes regiones carboxilo terminales de la proteína, se purificaron por afinidad además de los ARNm de CaMKII y Arc, un grupo de 40 proteínas diferentes a partir de cerebros de ratón. (25). Muchas de ellas, que resultaron ser conspicuos componentes de ribonucleo partículas, se localizaban en neuronas de hipocampo en cultivo, con KIF5 y Pur α . Esta última proteína es un factor trans y está implicada con los fenómenos de regulación de la transcripción en el núcleo pero también de transporte en el citoplasma. Los ARNm de CaMKII y Arc también colocalizaron con Pur α en dendritas. En esas mismas células la localización de estos mensajeros en las regiones más distales de la neurona, podía abolirse al transfectar los cultivos con formas truncadas para KIF5 (dominantes negativos), o aumentarse mediante la sobre expresión de las formas nativas.

El caso de las miosinas es menos claro. Con la excepción comentada en ocasión de la descripción del transporte de ARN en levaduras, no se ha demostrado en forma inequívoca otro ejemplo de transporte de “largas distancias” mediado por miosinas. Sí se han documentado varios ejemplos en los que es clara la necesidad de miosinas y de microfilamentos para la correcta localización de los ARN mensajeros. Algunos ejemplos son el de la miosina de la clase II-B para la correcta localización del mensajero de β -actina en fibroblastos en cultivo (26), el de la MVa para el movimiento de partículas conteniendo TLS (una proteína de unión al ARNm) desde la dendrita a la espina dendrítica, en neuronas de hipocampo en cultivo (27), el de las miosinas II y VI para la localización de un ARNm conocido como “prospero” en neuroblastos de *Drosophila* (28) o los mensajeros codificantes para la prolamina y la glutelina en las células del endospermo del grano de arroz (29), entre otros.

Si bien es clara la implicancia de las miosinas en la localización de algunos ARNm, esto no significa que estemos ante un transporte basado necesariamente en

microfilamentos, o dicho de otra forma, propulsado activamente por miosinas. Por ejemplo, la localización del mensajero Vg1 en el polo vegetal del oocito de *Xenopus*, es dependiente de microfilamentos, pero solo en el trayecto final del viaje; originalmente disperso en el citoplasma, su movimiento direccional hacia el polo vegetal, es responsabilidad de los microtúbulos (30). Además, el mecanismo de transporte (o al menos la localización final), de un mensajero dado como por ejemplo el de β -actina, aparentemente varía según el modelo de estudio: mientras en fibroblastos las miosinas y los microfilamentos parecen esenciales (26), en neuronas en cultivo éstos parecen ser prescindentes y los microtúbulos tornarse esenciales (14). El hecho que el factor trans conocido como ZBP, el cual es crítico para la correcta localización del mencionado mensajero tanto en neuronas como fibroblastos (31), posea información capaz de determinar la unión del mensajero a microfilamentos o microtúbulos tal vez explique estas diferencias. Por estas razones, la necesidad de miosinas como motores de gránulos de ARN no resulta obvia a menos que las visualicemos como moléculas encargadas del anclaje de la partícula al citoesqueleto o de su movimiento a muy cortas distancias. Esto último estaría relacionado con el requerimiento de la partícula, de una localización espacial final y precisa.

Las miosinas de la Clase V

Características generales y estructura: Las miosinas son enzimas cuya actividad magnesio ATPasa es estimulada en presencia de filamentos de actina. Existen otras características que las distinguen de otras ATPasa, tales como su actividad en presencia de K-EDTA y 0,5 M de KCl. Pero su característica mas notable es su capacidad de traducir la energía química de la hidrólisis del ATP en energía mecánica, ya sea desarrollo de fuerzas de tensión o movimiento.

Desde el punto de vista evolutivo, son muy antiguas, lo cual explica la diversidad y la amplia difusión que alcanzan entre los seres vivos, estando excluidas tal vez, solamente de los organismos procariotas. (32). La “Familia” de las miosinas está compuesta por 18 “Clases”. Cada una de éstas alberga diferentes “Formas” de miosinas (cada forma representa un gen) que a su vez dan lugar a “isoformas” (variantes de *splicing* de esas formas), generando así una diversidad inmensa (33). La primera y

mejor estudiada de las miosinas es la conocida miosina de músculo. Esta molécula, que pertenece a la clase II, posee características bioquímicas y biofísicas realmente singulares. Paradójicamente y por cuestiones históricas, esta miosina es denominada “convencional”, mientras el resto de las miosinas son denominadas “no convencionales”.

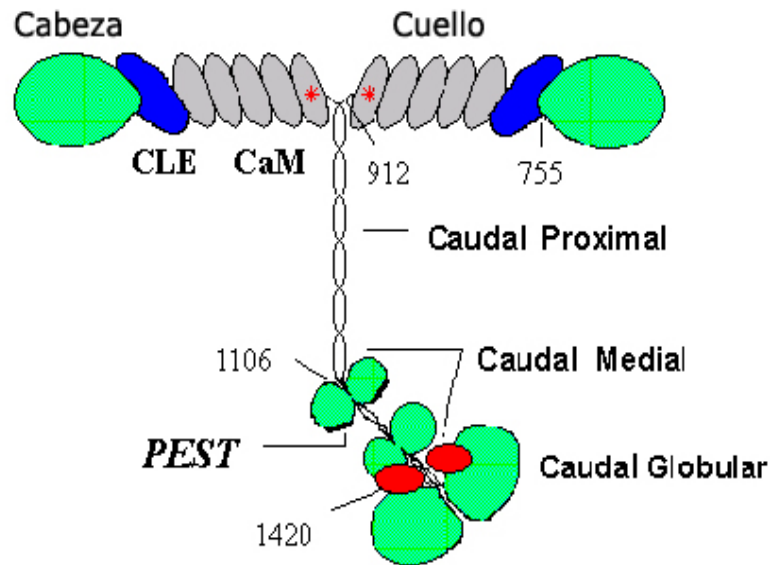


Figura 2. Representación esquemática de la miosina Va. En verde se esquematizan los dominios globulares, los cuales ocupan los extremos amino terminales (“cabeza”) y los globulares distales en el extremo carboxilo. La región del “cuello” alberga 6 motivos IQ por cada cadena pesada, cinco de los cuales ligan calmodulina (CaM) y uno cadenas livianas elementales (CLE). Cada cadena pesada consta de 1830 aminoácidos, de los cuales los primeros 755 forman el primer dominio globular. Los demás números representan los límites de los dominios cuello y caudal. Estos últimos son válidos para la secuencia de la MVa aviar.

La miosinas de la clase V también 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 (como es el caso típico de la miosina muscular), o de translocar una carga de un sitio a otro adyacente pero sin moverse del punto de anclaje, las miosinas procesivas son las capaces de desplazarse sobre el filamento de actina, llevando la carga consigo. De hecho, realizan un trabajo análogo al de las kinesinas o dineínas. Las miosinas de la clase V con actividad biológica son complejos multiproteicos relativamente importantes (600 kDa, aproximadamente) compuestos por dimeros de dos cadenas pesadas iguales de 210 kDa cada una, codificadas en el locus llamado *dilute* (34-37). Ambas cadenas pesadas, poseen independientemente de su estado dimerizado o no, actividad ATPasica en su extremo amino proximal ubicado en

una región globular que comprende también el sitio de unión a actina. Debido a que ambas cadenas están orientadas en la misma dirección, las regiones se disponen paralelas una junto a la otra (figura 2). Esto es importante, pues tiene implicancias funcionales importantes. La llamada región caudal proximal de la proteína es la responsable de la dimerización de molécula, ya que los casi 500 aminoácidos que componen este dominio predicen la formación de α hélices. Este dominio se continúa con una región globular caudal distal, con funciones bien específicas ya que es la responsable (via adaptadores) de la unión de la carga que transporta. Finalmente, las regiones amino terminal globular y caudal proximal, están conectadas entre sí por un dominio característico de las miosinas, que contiene sitios para la unión de cadenas reguladoras de calmodulina y similares. Estos sitios son llamados “motivos IQ” pues consisten en la región consenso IQXXRGXXR(K), repetidas en tándem. El número de motivos IQ existente en el tándem determina que tan importante es efecto “palanca” o el largo del paso que da la molécula entre cada ciclo catalítico. Las miosinas V poseen 6 motivos IQ en tandem en cada cadena pesada, lo que le dará un largo de paso de unos 30 a 38 nm de longitud. Esto es consistente con los 36 nm de largo que tienen las seudo repeticiones que presenta el filamento de actina y que le posibilitaran a la MV, desplazarse sobre el microfilamento sin espiralarse (38).

Aspectos biológicos de interés particular. El carácter procesivo de la MV, despertó un inusitado interés por la molécula durante la década pasada. Este comportamiento ha sido observada *in vivo* y directamente en algunas ocasiones (el transporte de ARNm *ASH1* por Myo4p en levaduras o el de retículo endoplásmico por MVa en axoplasma de axón gigante de calamar (39, 40)); no está claro que el recorrido de distancias relativamente largas (superiores a una micra, por ejemplo), sea el comportamiento habitual de la proteína.

La mayoría de los ejemplos conocidos referentes al papel biológico de la miosina Va tienen relación con un aspecto anteriormente mencionado: 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. Esto ocurre más allá del modelo y el tipo de carga. Un caso muy claro y al que se le ha dedicado mucha atención por tratarse de un modelo muy accesible, es el del anclaje de los melanosomas a la red de microfilamentos de la región más periférica del melanocito, el cual es dependiente de una isoforma de MVa ligeramente diferente a la que se expresa en sistema nervioso (41). Este es un paso

previo y necesario para la transferencia del pigmento desde esta célula al queratinocito presente en el folículo piloso. Estos melanosomas también tienen asociada a la kinesina Kif5 (también KHC o KIF I, según la nomenclatura) y a la dineína, como parte de un complejo motor múltiple. De esta forma, ante la ausencia de la miosina Va o alguna molécula adaptadora de ésta con el melanosoma, el organelo termina localizándose perinuclearmente, muy alejado de la periferia. Existen varias mutaciones naturales de este tipo que reproducen este fenotipo tanto en animales como en seres humanos. Mecánicamente lo que sucede es que ante la incapacidad para anclarse en el citoesqueleto de F-actina cortical (donde llegan, gracias a la kinesina), los melanosomas son devueltos retrógradamente en virtud de un mecanismo dependiente de dineína (42). En este modelo y en individuos normales, la MVa ejerce una función primordialmente de anclaje, siendo secundaria (si es que existe) la actividad estrictamente de transporte ¿Podría la miosina Va del tejido nervioso funcionar con las RNPs de forma análoga a cómo lo hace con los melanosomas o seguirá un patrón mas parecido al observado en levaduras?

Esta proteína también puede movilizar material vesicular diverso y particularmente retículo endoplásmico (39), también aparentemente en forma mas vinculada a su localización precisa (anclaje o movimientos de muy cortas distancias) que a su desplazamiento efectivo por microfilamentos a distancias relativamente largas. Esto concuerda con la observación de que en ratones mutantes nulos para la isoforma que se expresa en las neuronas (mutación *dilute letal*, 34), las espinas dendríticas de la neurona de Purkinje carecen de retículo endoplásmico (43). Normalmente, las espinas dendríticas no solo contienen retículo endoplásmico, sino también MVa. Este tipo de mutantes, no son viables y mueren pocos días luego de nacer en medio de un cortejo sintomático básicamente neurológico, caracterizado por accesos convulsivos que se desencadenan ante estímulos que normalmente deberían implicar respuestas de tipo motoras. La ausencia de retículo endoplásmico en las espinas dendríticas, sumado a la incapacidad de desarrollar LTD que presentan las células de Purkinje en estos animales, ha sido tradicionalmente asociada con esta sintomatología (43-45). Sin prejuicio de lo anterior y teniendo en cuenta la gran diversidad de funciones que se le adjudican a la MVa, así como la variedad de células capaces de expresarla en sus diferentes isoformas, la patogenia de la enfermedad y las causas de su presentación clínica, son seguramente más complejas.

La miosina Va como protagonista de los procesos de polarización celular.

Los fenómenos de transporte y comunicación intracelular son importantes en todas las células, pero son particularmente críticos en aquellas que presentan territorios claramente diferenciados y distantes entre sí, como lo son las neuronas. No es casualidad por ejemplo, que la primera proteína motora descrita de carácter procesivo, la kinesina, lo haya sido en los axones. El análisis de la información comentada hasta aquí, permite visualizar claramente la importancia cualitativa que tiene el transporte de ARN y de otros componentes de la maquinaria traduccional, para la determinación y el mantenimiento de la polaridad celular así como sus consecuencias. Así, al menos una fracción de todo el tráfico de información y materiales que ocurre entre los diferentes compartimentos y territorios de una célula de este tipo, debería corresponder a procesos vinculados al transporte de componentes que sostengan esa polarización morfológica y funcional. Sin embargo, la existencia de este fenómeno en neuronas fue ignorado, o en el mejor de los casos, puesto en duda por la mayoría de los neurobiólogos y biólogos celulares hasta hace muy poco (46). La extrapolación de estos conceptos a neuronas maduras componentes de tejidos, como por ejemplo es el caso de las neuronas motoras o sensoriales componentes de los nervios periféricos, fue aún más resistida.

Esta controversia ha comenzado a ser zanjada, el tema es estudiado sin prejuicios y la síntesis local de proteínas ya es aceptada en dendritas y a nivel de axones de neuronas mantenidas en condiciones in vitro. Es razonable, entonces hipotetizar que este fenómeno también debiera ocurrir en axones maduros. Sin embargo esto último no ha podido ser demostrado inequívocamente todavía, por lo que permanecen dudas al respecto. Tanto en los casos anteriores (dendritas y axones en cultivo), pero principalmente en axones maduros, quedan aún por resolver los aspectos más mecanísticos del proceso. No basta con saber que la síntesis proteica local existe, sino que también es importante saber cómo es que ese proceso se lleva a cabo y cómo se regula. En ese sentido, el caso particular de los axones que constituyen el sistema nervioso periférico representa un desafío, no solo porque se trata del menos conocido de todos estos modelos, sino porque dada la inusual asimetría soma:axón, los mecanismos subyacentes que sostienen la síntesis proteica axonal y los otros procesos responsables del mantenimiento de la compartimentalización, no pueden ser tan fácilmente

trasladables a partir de lo que ocurre en dendritas, axones en cultivo u otros tipos celulares.

La miosina Va fue descrita en el año 1988 (47) y las primeras caracterizaciones indicaron algunos aspectos de interés. Una de ellas era su gran abundancia en el sistema nervioso, al punto que por un tiempo se la consideró neuroespecífica; otro aspecto de interés era la predicción teórica, generada a partir de estudios bioquímicos e histológicos, de su carácter procesivo y su tendencia a asociarse a organelos membranosos diferentes de mitocondrias o lisosomas (35-38). La aparición del modelo *dilute*, demostró que la ausencia de esta molécula es incompatible con la vida del animal, aunque éste nace y transcurre los primeros días de vida asintomático. Algunas de estas observaciones iniciales podían sugerir, entre muchas otras, un papel relativo al transporte intracelular de materiales y comunicación entre organelos; resultados posteriores referidos a su localización compartimentalizada en algunos tipos celulares o su asociación con vesículas sinápticas en las terminales nerviosas, abonaron esta idea. Hasta ese momento no había estudios que desde la perspectiva anterior, se enfocaran en el sistema nervioso periférico. Para ese momento, el actual Departamento de Proteínas y Acidos Nucleicos comenzaba a interesarse tanto en los aspectos relativos al origen y la regulación de la maquinaria de síntesis proteica axonal, como a otros aspectos también relacionados con la compartimentalización axonal, como por ejemplo el transporte axoplásmico.

Hipótesis de trabajo.

En este contexto, y atendiendo a las propiedades biológicas entonces descritas para la miosina V, nuestra hipótesis de trabajo inicial planteaba que si efectivamente esta proteína estuviera vinculada al transporte, la comunicación o la señalización intracelular (genéricamente, el tráfico de información), entonces, *ésta debería estar presente en el compartimiento axonal de las neuronas del Sistema Nervioso Periférico*. En segundo lugar, *estas mismas propiedades, la transformarían en una proteína cualitativamente importante para la biología del axón*. La primera parte de la hipótesis, fue abordada en forma directa y es el motivo del primer capítulo, mientras que la segunda parte de la hipótesis, mas compleja pues implica investigar el significado biológico de la proteína, ocupa todo el resto del trabajo de tesis. Allí se intenta

demostrar que esa función cualitativamente relevante, *estaría referida a los procesos de mantenimiento axonal, particularmente la síntesis local de proteínas y más específicamente a la dinámica de los ácidos nucleicos presentes en ese compartimiento.* A medida que se avance en el desarrollo del trabajo, se irá definiendo mejor el significado de esta segunda parte de la hipótesis, precisando algunos conceptos y profundizando en los mecanismos que se proponen.

Capítulo I:

Presencia y distribución de la miosina Va en el Sistema Nervioso Periférico.

Introducción.

Esta sección representa un grupo de resultados experimentales que significan el sustento de una parte importante del trabajo posterior de la tesis. Consiste en una primera caracterización de la presencia y distribución de la miosina Va básicamente a nivel axonal, que es el compartimiento de interés.

Como se comentó en la introducción esta miosina presenta características bioquímicas que sugerían propiedades interesantes como por ejemplo, la procesividad. Por otro lado, su abundancia en el sistema nervioso, así como su colocación con organelos y su tendencia a localizarse polarizadamente dentro de algunas células, nos sugirió como muy factible su presencia en los axones periféricos y su hipotética participación en fenómenos relacionados en alguna forma, con el mantenimiento del estado estacionario del compartimiento en cuestión. El mantenimiento de ese estado estacionario axonal, implica un abanico muy amplio de vías metabólicas posibles, las cuales van desde aspectos típicamente plásticos como pudiera ser la movilización de retículo endoplásmico (39, 48) la dinámica local del citoesqueleto de actina y hasta la participación en fenómenos de traducción de señales. Esto último era motivo de especulación puesto que la miosina Va se encuentra en el medio de una vía de señalización que implica al calcio, la calmodulina y la calmodulin-kinasa II (49). También había que considerar aquellas únicas y curiosas características descritas para Myo4p, (una miosina V de levadura) vinculadas con el transporte de ARN mensajeros.

Estas consideraciones, los experimentos y sus resultados están incluidos en el artículo científico que se incluye. Al comienzo de este artículo como también de los siguientes, se explicita el grado de participación que el tesista tuvo en el trabajo publicado.

A continuación de este grupo de resultados, se incluyen otros que aunque no publicados, complementan esta etapa descriptiva a la vez que contestan algunas

interrogantes no resueltas en el artículo mencionado. La información referida a los materiales y métodos no descritos en el artículo, es proporcionada al final de la exposición de los resultados. Para terminar, se intenta integrar toda la información presentada en una breve discusión final.

Participación específica del tesista en el artículo que se presenta a continuación.

La idea original, plasmada en la hipótesis de trabajo así como en la estrategia experimental planteada, correspondió a JR Sotelo, mientras que la ejecución de todos los experimentos y la redacción final del artículo fue responsabilidad del tesista. La participación de J Sotelo-Silveira fue determinante para obtener los resultados de la figura 5 y de hibridación *in situ* incluida en los resultados anexos.

Myosin Va Is Locally Synthesized Following Nerve Injury

A. Calliari,^{1,2} J. Sotelo-Silveira,^{2,5} M.C. Costa,³ J. Nogueira,² L.C. Cameron,⁴
A. Kun,² J. Benech,^{1,2} and J.R. Sotelo^{2*}

¹*Departament of Molecular and Cell Biology, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay*

²*Laboratory of Proteins & Nucleic Acids, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay*

³*Departament of Biochemistry, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

⁴*Laboratory of Protein Biochemistry, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

⁵*Laboratory of Biochemistry, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay*

The presence of Myosin Va (an actin-based molecular motor) in the peripheral nervous system was examined and its subcellular distribution within the axons of the sciatic nerve was demonstrated via immunocytochemistry. Myosin Va (M-Va) in the nerve was detected by using SDS-PAGE and Western blot techniques with a polyclonal antibody specifically raised against the M-Va globular tail domain. In addition, purification of M-Va from the rat sciatic nerve prior to immunoblotting yielded a M-Va standard band. Likewise, optical immunocytochemical procedures revealed the presence of M-Va, particularly in the cortical axoplasmic territory, but also in the Schwann cell soma. The above experiments were carried out both on intact as well as on severed sciatic nerves with similar results. The proximal stumps of severed sciatic nerves (from 0 to 72 h after injury) were labelled *in vivo* with ³⁵S-methionine. SDS-PAGE autoradiography of the immunoabsorbed M-Va from the radiolabelled homogenized nerve tissue showed a significant increment of the radioactive intensity of M-Va heavy chain band through time. Moreover, a significant increment of transcripts coding for M-Va heavy chain was detected through time using RT-PCR after nerve injury and compared to intact nerves. This data suggest that M-Va is up-regulated in a time-dependent manner. The latter suggests a possible involvement of M-Va in nerve regeneration processes. *Cell Motil. Cytoskeleton* 51:169–176, 2002. © 2002 Wiley-Liss, Inc.

Key words: local protein synthesis; calmodulin; sciatic nerve; cellular transport; nerve regeneration

INTRODUCTION

Myosins are proteins capable of catalyzing the splitting of ATP and then either moving cargo along actin filaments, or moving actin filaments themselves [Sellers and Goodson, 1995]. To date, 17 myosin classes have been found in the myosin super-family [Hodge and Cope, 2000]. Of these, Myosin-V (M-V) is particularly interesting because it was found to be abundantly expressed in the brain. Myosin V is a multimeric protein composed of two heavy chains (HC), each with three functional domains: the head (N terminal) containing both the actin-binding site and the catalytic site; the neck, which has 6 IQ sites (consensus domains for the binding of calmodulin and other regulatory light chains); and the tail, the most variable of its domains, where the cargo is

attached [Espreafico et al., 1992; Cheney et al., 1993; Reck-Peterson et al., 2000].

Contract grant sponsor: PEDECIBA; Contract grant sponsor: MEyC; Contract grant sponsor: OAS; Contract grant sponsor: JICA; Contract grant sponsor: Universidad de la República (CSIC and CIDEc).

Abbreviations used: CaM = calmodulin; DTT = dithiothreitol; EDTA = ethylenediamine-tetraacetic acid; EGTA = ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid; PMSF = phenylmethylsulfonyl fluoride.

*Correspondence to: J. R. Sotelo, Laboratory of Proteins and Nucleic Acids, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Av. Italia 3318, Montevideo, Uruguay. E-mail: sotelo@iibce.edu.uy

Received 27 June 2001; Accepted 14 November 2001

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/cm.10017

This protein (p190, brain myosin V, BM-V), was initially characterized as a Ca^{2+} and Mg^{2+} -dependent molecule whose ATPase activity was induced by calmodulin (CaM) and actin [Larson et al., 1988]. M-V is also phosphorylated by calmodulin kinase II (CaM K II) in the tail segment [Coelho and Larson, 1993]. The symbiotic behavior of M-V and CaM K II suggests that M-V might be responsible for the activation of the kinase through the donation of CaM molecules [Costa et al., 1999]. In the presence of actin, Ca^{2+} leads CaM to bind to the M-V heavy chain, but it also leads CaM to dissociate from BM-V if actin is absent [Cameron et al., 1998].

Endoplasmic reticulum vesicles were shown to be transported on actin filaments by Myosin-V in isolated squid axoplasm [Tabb et al., 1998]. Earlier results provided by electron microscopy analysis have revealed that the extensions of smooth endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje cells were absent in *dilute* mice [Takagishi et al., 1996]. On the other hand, as there is a close association between the location of Myosin-V and the tubulin cytoskeleton [Evans et al., 1998; Wu et al., 1998; Espreafico et al., 1998]; it has been proposed that Myosin-V might be moved within cells in a passenger-like form via microtubule-based motors (kinesin), switching thereafter to the actin network, where it will act as a motor [Evans et al., 1997; Wu et al., 1998]. Moreover, a dynein-like light chain has been found to bind to Myosin V tail [Espindola et al., 1996].

Myo4p, a yeast member of Myosin V family, has the ability of transporting mRNA molecules [Long et al., 1997]. Although not yet proven in vertebrates, the study of this model of RNA transport might make it possible to understand the movement and location of rRNA and mRNA within the distinct regions of the neuron, including the axonal territory [Bassell et al., 1998; Koenig and Martin, 1996; Olink-Coux and Hollenbeck, 1996; Sotelo-Silveira et al., 2000].

Cargo transport and plastic changes in cells (including axons) seem to be closely related functions [Igarashi et al., 1996]. In this study, new data in support of the hypothesis that Myosin-V is present in the peripheral nervous system are discussed in conjunction with the possible implications of the protein in peripheral axonal distribution. It is also demonstrated that both the messengers coding for myosin V and the radiolabeled protein are increased in injured nerves compared to intact ones. This result might mean that myosin V is one of the several proteins that are synthesized after local injury [Benech et al., 1982; Sotelo et al., 1992; Sotelo-Silveira et al., 2000]. In any case, at the same time, there are indications that Myosin Va might also take part in the resulting plastic changes within the nerve. Considering these data as a whole, the results so far suggest that M-Va

may play a key role in neuroplasticity during the regenerative process.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

ATP, EDTA, EGTA, PMSF, buffers, electrophoresis reagents, molecular weight markers, protease inhibitors, anti-rabbit IgG HRP conjugate, and di-amino benzidine were purchased from Sigma Chemical Co. Anti-rabbit IgG AP conjugate as well as the substrates for the detection method were purchased from the Promega Chemical Co. Chromatography resins and Protein A-Sepharose were obtained from Pharmacia Biotech Inc. Radioactive methionine was supplied by Amersham International. All solutions were prepared with Milli-Q (Millipore Corp.) deionized water.

Antibody

An affinity purified polyclonal antibody against the C-terminal domain (931 amino acid residues) of chicken brain Myosin Va [Espreafico et al., 1992] was kindly donated by Dr. Roy Larson. This antibody was used for Western blots as well as immunohistochemical and immunoprecipitation assays.

Animals and Nerve Radiolabeling

Young Wistar rats (150–200 g) were ether anaesthetized and both sciatic nerves severed at the mid thigh, 4.0 cm distal to the dorsal root ganglion (DRG). After the surgery, in a set of assays considered as time "0 hour" ($n = 2$), the tip of the proximal stump (0.5 cm) was placed in vivo and in situ in a 10-mm-long polyethylene tube cut in half longitudinally to form a trough (inner diameter 2 mm; length 5 mm). Both ends of the trough were sealed with silicone grease, after which the chamber thus formed was filled with 100 μl of a Ringer solution (pH 7.4) containing 0.1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ of $\text{L}^{-35}\text{-S}$ methionine ($>1,000 \text{ Ci}/\text{mmol}$). After a 1-h incubation period, free radioactive methionine was eliminated by washing each nerve five times with Ringer solution. Then, each proximal stump was excised, desheathed, and stored (-20°C) or immediately processed. In another set of animals, the wound was sutured and the animals remained alive for varying hours: 24 ($n = 5$), or 72 h ($n = 4$). Finally, the proximal stumps were subsequently re-exposed under pentobarbital anesthesia and labelled as described above.

Proteins

Radiolabelled right and left proximal stump nerves (0.5 cm long) were homogenated in a Teflon glass homogenizer (Wheaton, Millville, NJ) in 5 ml of freshly prepared ice cold buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.7, 10 mM ATP, 10 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 0.3

mM PMSF). The homogenate was centrifuged ($40,000g_{max}$, 45 min) and the supernatant obtained was collected and concentrated approximately $7\times$ prior to performing the immunoprecipitation assay.

To study the presence of myosin-V in normal (non-injured) sciatic nerves, 3-cm-long pieces were used. The connective sheath (epineurium) was mechanically removed and the nerve tissue homogenized and centrifuged as previously described. The pellet and supernatant fractions were then analysed by electrophoresis and Western blot.

The fifth supernatant (S5) of chick brain myosin V purification (25 mM Tris-HCl, pH 8.2, 600 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10 mM ATP, 20 mM $MgCl_2$, and 2 mM DTT) was obtained as previously described [Cameron et al., 1998] and used as an enriched preparation of the protein as well as a control in electrophoresis and Western blot.

Total RNA Isolation, RT-PCR Amplification, and Semiquantification

Proximal stumps of sciatic nerves (0.5 cm long) were excised at 24 and 72 h after injury, and normal nerves (0.5 cm long) were dissected as time 0 h. RNA was extracted following the guanidinium-acid-phenol extraction protocol [Chomczynski and Sacchi, 1987]. Purified RNA was resuspended in 20 μ l of water (nuclease free) and 5 μ g of RNA was taken for DNase I (Promega) treatment (5 U, 30 min, 37°C). After this, 1 μ g of RNA was retro-transcribed according to the Reverse Transcription System Kit protocol (Promega) using poly(dT)₁₅ as a primer. Semiquantitative PCR analysis of Myosin Va mRNA levels was performed according to Jaegle et al. [1996]. Amplification of cDNA corresponding to different conditions was carried out in separate tubes (using 1 μ l of cDNA per tube). Tubes were taken at different cycles as follows: condition 0 h, cycles 28, 30, and 36; conditions 24 and 72 h, cycles 26, 28, and 30. Oligonucleotide primers were designed to amplify specifically rat Myosin Va isoform according to the sequences available at the GenBank (5'-primer TGTCAGCATGGCATGGACCCAG and 3'-primer ATGGCTTCCGCGTCATCGTCAG). The amplification cycle consisted of initial denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec, and extension at 72°C for 30 sec using Taq DNA polymerase from Promega. In the first cycle, the denaturation was prolonged for 5 min at 95°C. The resulting DNA fragments were electrophoresed on a 6% polyacrylamide gel, stained with ethidium bromide and photographed using a digital photographic camera (EDAS 120, Kodak Digital Sciences). To confirm the identity of PCR products, the fragments were sequenced directly using BIGDYE terminator (Applied Biosystem) and an ABI 377 sequencer (Applied Biosystem).

Immunoprecipitation Assays

The supernatant of enriched nerve proteins underwent reaction via incubation with 2% protein A-Sepharose beads for 4 consecutive hours under gentle agitation in an immunoprecipitation media composed of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM NaN_3 , 100 μ M PMSF, and Triton X-100, 0.25% (high stringency buffer) or 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 30 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaN_3 , 100 μ M PMSF, and Triton X-100, 0.25% (low stringency buffer) in order to eliminate contaminants from the sample (pre-clearing step).

Protein A Sepharose-anti-myosin antibody complexes were simultaneously prepared by incubating an appropriate dilution of anti-myosin antibody (2 or 5 μ g/ml anti-myosin antibody) in 400 μ l of 2% protein A-Sepharose bead suspension prepared in either a low or a high stringency buffer for 2 consecutive hours by way of gentle agitation. The unbound antibody was then eliminated by washing the protein A-Sepharose five times in reaction media.

Finally, the immunoprecipitation assay was carried out by incubating the pre-cleared sample with the protein A-Sepharose-antibody complex (obtained under the same buffer conditions) overnight via gentle agitation at 4°C. Control samples were incubated in the absence of the primary antibody. Immunocomplexes were pelleted by centrifugation (10,000 rpm, 15 sec) and washed with reaction media five times to eliminate unbound proteins. The pellet was then recovered for further experiments.

Electrophoresis and Western Blot Assays

SDS-PAGE was performed on 10% acrylamide minigels that had been stained with Coomassie blue. The apparent molecular weight was calculated by way of a Sigma molecular weight marker (SDS-7B, 190, 125, 88, 65, 56, 38, and 33.5 kDa). Immunoblotting on nitrocellulose membranes (0.22 μ m, BioRad) was performed, as previously described by using the alkaline phosphatase detection method [Towbin et al., 1979]. The transference of proteins was performed for 1 h, 250 mA, 4°C, and 10% methanol.

Autoradiography and M-Va Quantification

Immunoprecipitated Myosin-V was recovered by adding 50 μ l of Laemmli's sample buffer to the protein A-Sepharose immunocomplex pellet and then boiled for 1 min.

In order to visualize the radiolabelled immunoprecipitated nerve proteins, the sample was electrophoresed and subsequently transferred to nitrocellulose membranes (as detailed above). Transferred proteins were autoradiographed by exposing the nitrocellulose membrane against an X-ray Kodak film in the dark at -80°C .

The films were developed at different exposure times (for 1-, 2-, or 3-week periods) to assure the best images, after which they were fixed, dried, and photographed.

The developed X-ray films were scanned for transparent material with an AGFA Arcus II scanner and the proteins bands analyzed by way of Scion Image software. The amount of radiolabelled M-Va was calculated as the ratio between M-Va integrated optical density and total integrated optical density present in the same lane. The results were normalized against the ratio obtained at 0 h (basal radiolabeling).

Immunocytochemistry

Young animals (150–200 g) were anaesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate saline buffer pH 7.2 (PBS). Intact normal sciatic nerves and dorsal root ganglia from the lumbar region were removed and post-fixed for 1 h in 4% paraformaldehyde in PBS. Afterwards, the samples were equilibrated overnight at 4°C in PBS containing 30% of sucrose and then included in Tissue Tek OCT compound. Frozen sections (5 to 10 μ m) were mounted on gelatine-coated cover slips. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the sections in PBS containing 0.01% hydrogen peroxide for 30 min. The specimen was subsequently washed three times with PBS, incubated for 2 h with normal goat serum (1:30 in PBS) for 30 min in order to block non-specific epitopes, and then incubated overnight with anti-chicken Myosin-Va antibody raised in rabbit at a dilution of 10 μ g/ml in PBS. Immunostaining was carried out with an anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (2-h incubation period), di-amino benzidine (0.2 mg/ml in PBS), and hydrogen peroxide (0.01%, final concentration) as substrate. Control sections were processed in the same way as above except that, instead of using anti-Myosin antibody, either pre-immune sera or no primary antibody was used. Sections were mounted on Entellan (Merck), examined under a light microscope, and photographed with commercial Kodak 400-ASA film.

RESULTS

Myosin Va Is Present in the Peripheral Nervous System

Western blot of sciatic nerves. The Western blot of the supernatant fraction of nerve homogenate incubated with anti-Myosin Va antibody showed a clear 200-kDa band, coincident with the expected myosin Va molecular weight and the chick myosin Va standard (see Materials and Methods and Fig. 1). Myosin Va is mostly in the supernatant fraction and, hence, clearly recognized by the antibodies. On the other hand, the pellet tends to contain very low concentrations of the protein (data not shown). This observation

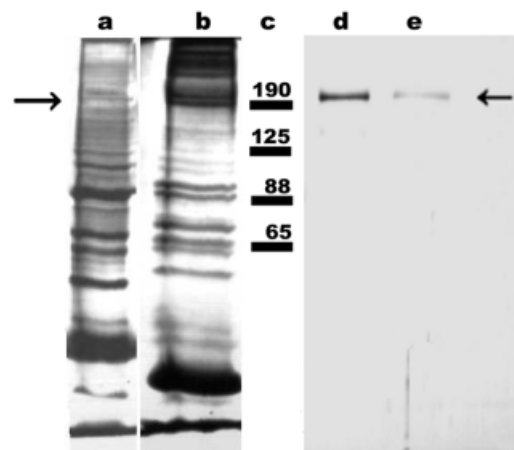


Fig. 1. SDS-PAGE nerve profiles (a, b) and Western blot (d, e) showing M-Va in not-injured normal nerves. Sciatic nerves were homogenized using a 7-ml Teflon on glass homogenizer with 5 ml of a buffer composed of 25 mM Tris-HCl pH 7.7, 10 mM EDTA, 10 mM ATP, 2 mM 2-mercaptoethanol, 300 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, and centrifuged at 40,000 g_{max} (45 min). The supernatant and pellet fractions obtained were mixed with Laemmli's sample buffer and aliquots were applied to the gel. This fraction was transferred to nitrocellulose membrane after SDS-PAGE, incubated with the anti Myosin-Va antibody thereafter, and finally immunostained using a secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase. **a:** Supernatant fraction enriched in M-Va by addition of ATP. **b:** Pellet fraction. The *left arrow* shows the position where the heavy chain of M-Va should be (200 kDa). **c:** Molecular weight standards (kDa). **d:** Standard chick brain (S5). **e:** Sciatic rat nerve (supernatant fraction). The *right arrow* shows the heavy chain of M-Va.

indicates, as it has been already reported, that the protein is soluble in the presence of ATP without any need for detergents [Espindola et al., 1992].

Immunocytochemical analysis. Dorsal root ganglion neurons were used as a positive control of the antibody specificity. The cells are widely and quite homogeneously labelled (Fig. 2b). In some images, the peroxidase precipitates were concentrated in the perinuclear region (Fig. 2b,c and arrows). No reaction was observed in control sections (Fig. 2a).

The morphological study of the nerves reveals the presence and sub cellular localization of the protein in the peripheral nervous system. Di-amino benzidine precipitates in nerve sections appear mainly in the area of the cortical axoplasm and the internal edge of the myelin (Fig. 2e, arrow), although the rest of the myelin sheath appears to be clear of reaction (Fig. 2e, asterisk). Abundant precipitates occupying the axoplasmic area can be appreciated in some fibers. Among the smaller fibers, a clear reaction filling the axoplasmic space is more frequently observed (Fig. 2g); Schwann cells were also heavily labelled in the soma (Fig. 2e, arrowhead).

Myosin-Va Is Locally Synthesized After Injury

The autoradiography of the immunoprecipitate fraction previously electrophoresed and transferred to

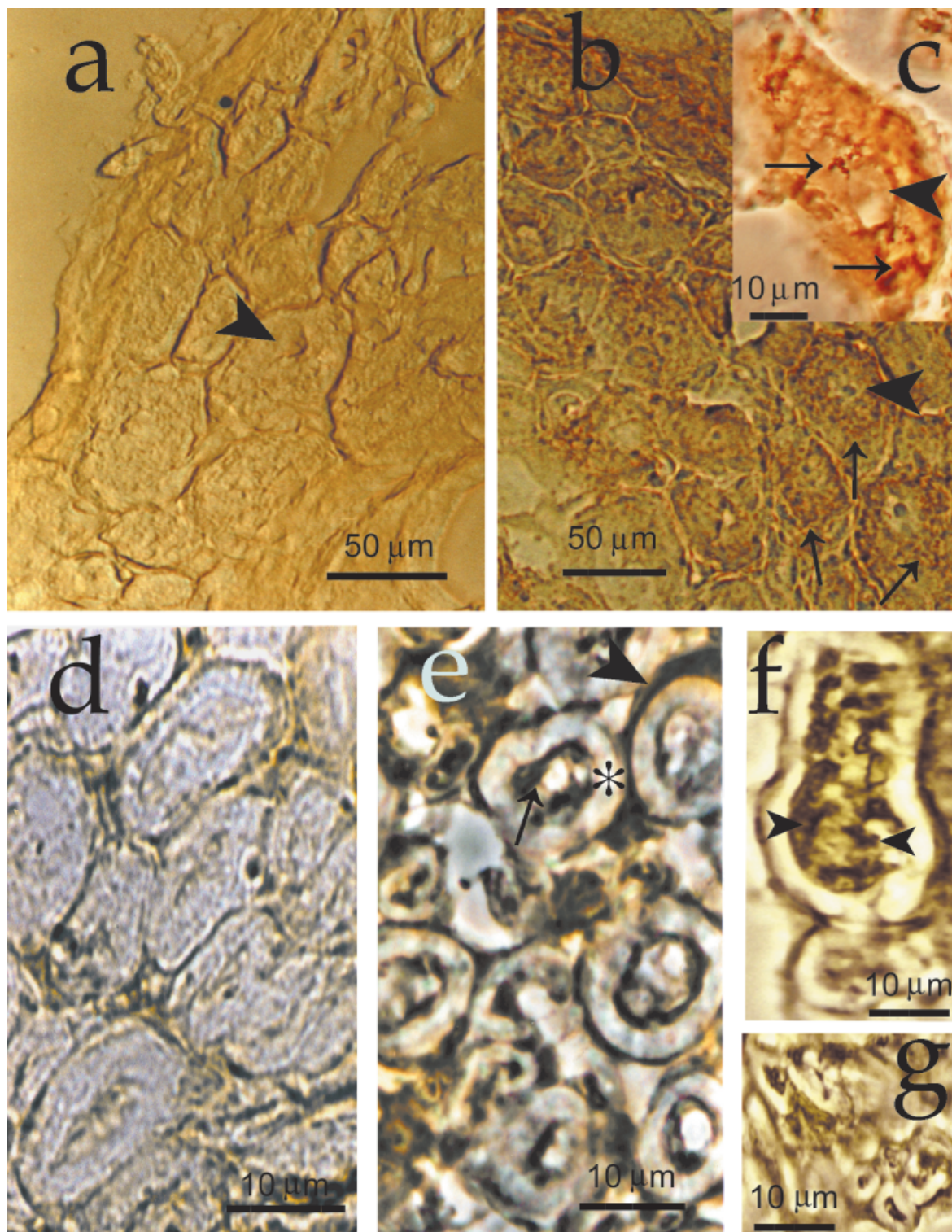


Fig. 2. Immunocytochemistry of M-Va at dorsal root ganglion and intact normal sciatic nerves (5–10 μm frozen sections) using a primary antibody against M-Va. The secondary antibody was conjugated to Peroxidase. **a:** Dorsal root ganglion (DRG) sections without primary antibody (negative control, *arrowheads* indicate the nuclear region). **b:** Low magnification of DRG neurons stained with primary antibody. **c:** High magnification. The distribution of M-Va granules can be appreciated widely spread at the cytoplasm (*arrows*). Note that the

nuclear region appears to be free of reaction (*arrowheads* in b and c). **d–g:** Sciatic nerve cross sections. **d:** Negative control without primary antibody. **e:** Another cross section incubated with the primary antibody. In some cases, the Diamino Benzidine (DAB) precipitates can be observed at the external edge (Schwann cells) of the myelin sheath (*arrowhead*) and the myelin-axon boundary (*arrow*). Asterisk (*) indicates the myelin free of precipitate. **f,g:** Intraganglionic fibers showing immunoreaction filling all the axoplasm (*arrowheads* in f).

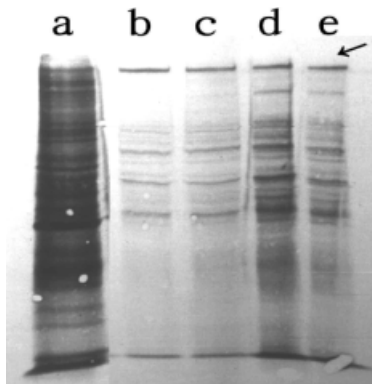


Fig. 3. M-Va was locally radiolabelled 24 h after nerve injury. Sciatic nerves were severed 4 cm distal to the ganglion and incubated in a medium containing $0.1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ of ^{35}S -methionine for 1 h. After this, the nerves were homogenized, centrifuged, and the supernatant was used for immunoprecipitation assays with different antibody concentrations and different stringency washing conditions. After immunoprecipitation, the samples were electrophoresed and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was autoradiographed. **a**: Total locally synthesized protein profile; **b,c**: immunoprecipitated M-Va using 150 mM NaCl-buffer (high stringency buffer), with either (b) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or (c) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antibody against M-Va. **d,e**: Immunoprecipitated M-Va using 30 mM NaCl-buffer (low stringency buffer), with either (d) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or (e) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of antibody against M-Va.

nitrocellulose membranes yielded a clear and sharp 200-kDa band on the X-ray film. This band was always similar in intensity despite the immunoprecipitation conditions (Fig. 3, arrow). Interesting, the amount of radioactivity incorporated to M-Va after the injury was increased with time (100% at 0 hour, 260% after 24 h and 559% after 72 h; Fig. 4). The cell of origin of newly synthesized myosin Va cannot be determined from this experiment.

Other radioactive proteins were co-purified during the immunoprecipitation assay, some of which were eliminated upon the increase in the stringency conditions during the antigen-antibody recognition, leaving at least three faint bands (Fig. 3b and c). Control experiments were carried out in the absence of the antibody. The background levels of radioactivity were not high enough to produce any band or background reaction on the X-ray film (data not shown).

Amount of Myosin Va Transcripts Is Incremented After Nerve Injury

The content of myosin Va mRNA present in the proximal stump increases through time after injury. The lowest level of messenger were found at time "0 hour," while a higher level was present at time "24 hours," and increased at "72 hours" (see Fig. 5).

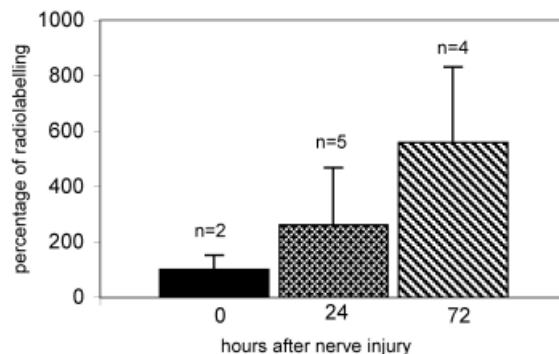


Fig. 4. Myosin V radiolabeling is time dependent. ^{35}S -methionine incorporation 72 h after the nerve lesion is more than five times higher than the radioactive incorporation of normal (0 h) not injured nerves ($P < 0.05$). It is almost three times higher than the incorporation 24 h after injury ($P < 0.05$). Data are means \pm SEM.

DISCUSSION

Intracellular compartment communication and transport are crucial functions in the nervous system. This fact is most evident in the peripheral nervous system, where axons are normally very long. In the present study, we show that a molecular motor (Myosin Va) dealing with transport functions is present in the peripheral nervous system. Previously, there have been several suggestions about Myosin V possible function, including participation in filopodia extension of growth cones and movement of synaptic vesicles in nerve terminals [Wang et al., 1996, Prekeris and Terrian, 1997]. However, these putative roles do not account for the apparent widespread distribution of Myosin-V into the peripheral axons and Schwann cells shown in the present study.

The *dual filament model of transport* hypothesis has been used to explain the movement of vesicles from a functional compartment to a closely adjacent microtubule domain or from this domain to an actin-rich cortical territory of cells [Langford, 1995]. Myosin V biological properties and sub cellular localization into axons fit very well with this model. Furthermore, in the case of peripheral axons, such vesicles could be ER components as suggested by Tabb et al. [1998] for squid axons but, probably different from the kind of vesicles conveyed by the fast anterograde transport system. The presence of Myosin-V in actin-rich domains was already reported in mammalian neurons [Evans et al., 1997], associated with some small organelles (50–100 nm) and plasma membrane, but not associated with larger organelles such as mitochondria or clathrin-coated vesicles. It is also remarkable that the same type of organelles to which the Myosin seems to be associated was visualized both on tubulin and actin structures, suggesting that a given organelle could be transported from one network system to the other. In concordance with this idea, a co-localization of kinesin and Myosin-V has been found by Evans et al.

[1997], as well as the association of Myosin-V with the tubulin cytoskeleton in a variety of cell types including neurons [Wu et al., 1998].

The immunochemical labeling of the cortical region of the axoplasm can be appreciated in several images. This region is normally occupied by the actin cytoskeleton. It could be considered as indirect evidence of an actin-myosin-Va functional association also in the axonal territory. The functional significance of an actin-myosin-Va association within axons has not been established, but it suggests the possibility of a role in any mechanism of transport. In some fibers, mainly in those with a small diameter, the reaction was shown to fill all the axoplasmic space, showing that at least in some cases Myosin V is not restricted to the cortical actin-rich zone. Indeed it may be associated with other structures, such as the microtubule network, probably while they are transported through it.

An intriguing hypothesis to explain the peripheral distribution within axons could be some functional association of M-Va with the novel structures known as Peri-Axoplasmic Plaques (PAP). These structures were described in Mauthner axons as well as in rabbit and rat dorsal or ventral root fibers, as discrete peri-axoplasmic cortical zones containing rRNA and mRNA. Furthermore, the higher density of F-actin subjacent to the plaque suggested to the authors that the actin cytoskeleton may govern the plaque morphology, distribution, and components [Koenig and Martin, 1996; Koenig et al., 2000]. This possibility was not explored in the present work (no isolation of axons from myelin was made to visualize the so-called PAP), but the peripheral distribution of M-Va immunoreaction in axons should not be disregarded.

The movement of the ER membranes is very important during growth and the regeneration process. Regarding M-Va putative roles in axoplasmic territory, this protein could be implicated in such functions. Moreover, its intense local radiolabeling a few hours after experimental injury suggests that the enhanced vesicles transport found during regeneration processes may need an active participation of newborn Myosin V molecules. Our experimental design excludes the soma as the origin of this newly synthesized proteins. On the other hand, it is not possible to discriminate either the axoplasmic (local translation of pre-existing mRNA), or glial source. Although controversial, both possibilities have been reported earlier [Sotelo et al., 1992]. The Schwann cell origin (despite not excluding the axoplasmic source), seems to be most likely because this cell is also able to express the protein.

Coincidentally, the amplification by RT-PCR of mRNAs from normal nerves as well as from the proximal stump of sciatic severed nerves, showed that they contain the M-Va heavy chain coding mRNA. The latter is in

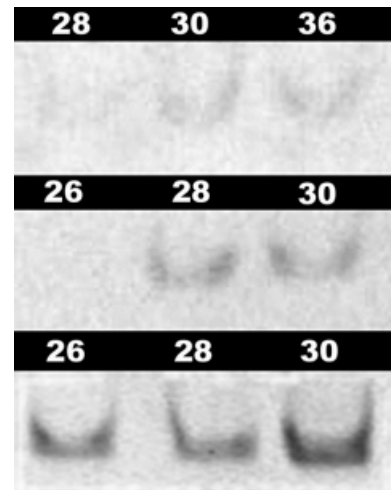


Fig. 5. Semiquantitative PCR analysis of expression level of Myosin Va mRNA in sciatic nerve of the rat. For each condition (normal, **top**; 24 h after injury, **middle**; 72 h, **bottom**) samples were taken at different cycles (as indicated by the numbers). Note that in injured condition, PCR products are observed at earlier amplification cycles, suggesting that the amount of mRNA coding for Myosin Va increases after lesion.

agreement with the findings of Sotelo-Silveira et al. [2000], which showed the presence of the three neurofilament subunits coding mRNAs in normal and severed rat sciatic nerves. Furthermore, the content of M-Va transcript increased with time after injury in the same way as its translation product content (M-Va protein).

However, even in the latter case the significance of a local response to nerve injury by Schwann cells must be emphasized because it could mean that the M-Va of glia is involved in the degeneration-regeneration process of nerves. The existence of a local response by the injured nerve characterized by an increase in the amino acid incorporation into TCA precipitable fraction has been reported [Benech et al., 1982]. This phenomenon that is maximal about 24 h after injury and occurring mainly in the proximal stump region (Fig. 3, lane a) is a local response. Myosin-Va seems to be one of these proteins.

The identification of the Myosin-Va as the main radiolabeled protein among those immunoprecipitated with the anti-myosin antibody was clearly established. However, the meaning of the other weakly labelled proteins co-purified with Myosin appearing in the autoradiography was difficult to establish. On the one hand, the presence of those weakly labelled proteins could be due to a normal specific interaction with Myosin Va, occurring during cell life. On the other hand, a non-specific cross-reaction with the antibody, or the interaction with Protein-A Sepharose, could be ruled out regarding the specificity showed by the same antibody on Western blot experiments (see Fig. 1), as well as in control experiments in which the homogenate was incubated alone

with Protein A Sepharose without the primary antibody (data not shown).

To establish the identity of such newly synthesized co-purified proteins should be the next step in our attempt to determine the role of Myosin-V in the peripheral nervous system.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. R. Larson for the gift of the anti-Myosin V antibody and Dr. E. Brown for the critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Bassell GJ, Honglai Z, Byrd AL, Femino AM, Singer RH, Taneja KL, Lifshitz LM, Herman IM and Kosik KS. 1998. Sorting of β -actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J Neurosci* 18:251–265.
- Benech C, Sotelo JR, Menendez J and Correa-Luna R. 1982. Autoradiographic study of RNA and protein synthesis in sectioned peripheral nerves. *Exp Neurol* 76:72–82.
- Cameron LC, Carvalho RN, de Araújo JRV, Martins-Teixeira F, Santos AC, Tauhata S, Larson RE, Sorenson M. 1998. Calcium-induced quenching of intrinsic fluorescence in Brain Myosin V is linked to dissociation of Calmodulin light chains. *Arch Biochem Biophys*. 355:35–42.
- Cheney RE, O'Shea MK, Heuser JE, Coelho MV, Wolenski JS, Espreafico EM, Forscher P, Larson RE, Mooseker MS. 1993. Brain Myosin-V is a two headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* 75:13–23.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159.
- Coelho MV, Larson RE. 1993. Ca^{2+} -dependent phosphorylation of the tail domain of Myosin-V, a Calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. *Braz J Med Biol Res* 26:465–472.
- Costa MC, Mani F, Santoro W Jr, Espreafico EM, Larson RE. 1999. Brain Myosin-V, a Calmodulin-carrying myosin, binds to Calmodulin-dependent Protein Kinase II and activates its kinase activity. *J Biol Chem* 274:15811–15819.
- Espindola FS, Cheney RE, King SM, Sutter DM, Mooseker MS. 1996. Myosin-V and dynein share a similar light chain. *Mol Biol Cell* 7:372a.
- Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AA, De Camilli PV, Larson RE, Mooseker MS. 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain Myosin V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol* 119:1541–1557.
- Espreafico EM, Coling DE, Tsakraklides V, Krogh K, Wolenski JS, Kalinec G, Kachar B. 1998. Localization of Myosin-V in the centrosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8636–8641.
- Evans LL, Hammer J, Bridgman PC. 1997. Subcellular localization of Myosin-V in nerve growth cones and outgrowth from *dilute-lethal* neurons. *J Cell Sci* 110:439–449.
- Evans LL, Lee AJ, Bridgman PC, Mooseker MS. 1998. Vesicle-associated Brain Myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J Cell Sci* 111:2055–2066.
- Hodge T, Cope J. 2000. A myosin family tree. *J Cell Sci* 113:3353–3354.
- Igarashi M, Kosaki S, Terakawa S, Kawano S, Ide C, Komiya Y. 1996. Growth cones collapse and inhibition of neurite growth by botulinum neurotoxin C1: A t-SNARE is involved in axonal growth. *J Cell Biol* 134:205–215.
- Jaegle M, Mandemakers W, Broos L, Zwart R, Karis A, Visser P, Grosveld F, Meijer D. 1996. The POU factor Oct-6 and Schwann Cell differentiation. *Science* 273:507–510.
- Koenig E, Martin R. 1996. Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. *J Neurosci* 16:1400–1411.
- Koenig E, Martin R, Titmus M, Sotelo-Silveira JR. 2000. Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J Neurosci* 20:8390–8400.
- Langford GM. 1995. Actin and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr Opin Cell Biol* 7:82–88.
- Larson RE, Pitta DE, Ferro JA. 1988. A novel 190 kDa Calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. *Braz J Med Biol Res* 21:213–217.
- Long RM, Singer RH, Meng X, Gonzalez I, Nasmyth K, Jansen RP. 1997. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH-1 mRNA. *Science* 277:383–387.
- Olink-Coux M, Hollenbeck PJ. 1996. Localization and active transport of mRNA in axons of sympathetic neurons in culture. *J Neurosci* 16:1346–1358.
- Prekeris R, Terrian D. 1997. Brain Myosin-V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca^{2+} -dependent interaction with the Synaptobrevin-Synaptophysin complex. *J Cell Biol* 137:1589–1601.
- Reck-Peterson SL, Provance DW Jr., Mooseker MS, Mercer JA. 2000. Class V myosins. *Biochim Biophys Acta* 1496:36–51.
- Sellers JR, Goodson HV. 1995. Motor proteins II: myosins. *Protein Profile* 2:1323–1423.
- Sotelo JR, Benech CR, Kun A. 1992. Local radiolabelling of the 68 kDa neurofilament protein in rat sciatic nerves. *Neurosci Lett* 144:174–176.
- Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Benech JC, Kun A, 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.
- Tabb JS, Molyneaux BJ, Cohen DL, Kuznetsov SA, Langford GM. 1998. Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *J Cell Sci* 111:3221–3234.
- Takagishi Y, Oda S, Hayasaka S, Dekker-Ohno K, Shikata T, Inouye M, Yamamura H. 1996. The *dilute lethal (dl)* gene attacks a Ca^{2+} store in dendrite spine of Purkinje cells in mice. *Neurosci Lett* 215:169–172.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350–4354.
- Wang FS, Wolensky JJ, Cheney RE, Mooseker MS, Jay DG. 1996. Function of Myosin-V in filopodial extension in neuronal growth cones. *Nature* 273:660–663.
- Wu X, Kocher B, Wei Q and Hammer JA III . 1998. Myosin-V associates with microtubule-rich domains in both interphase and dividing cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 40:286–303.

Experimentos adicionales. Resultados y discusión.

Localización del ARN mensajero codificante para MVa en el nervio ciático.

Los experimentos de marcación radioactiva de la miosina Va a nivel del cabo proximal del nervio ciático seccionado, mostraban claramente que esta proteína se sintetizaba localmente. Sin embargo, la presencia de la proteína tanto en la glía como en el axoplasma, no permitió mayores especulaciones referentes al origen de esa neo síntesis. Este punto es de interés puesto que podría arrojar luz sobre las funciones biológicas de la proteína. Por ejemplo, la posibilidad de su síntesis local axonal y su aumento conforme pasa el tiempo post lesión, apoyaría la hipótesis de su involucramiento en funciones plásticas en el axón. Por otro lado, una síntesis a cargo de la célula de Schwann, que podría tener diversas interpretaciones, no aportaría mayormente al punto de interés. Con el fin de esclarecer el sitio de síntesis se estudió la localización del ARN mensajero codificante para la miosina Va.

La hibridación *in situ* fue realizada en nervio ciático y raíces medulares. La marcación fluorescente resultó estar presente, tanto en glías de Schwann como en axones. La intensa marcación a nivel glial parece restringida al soma (flecha gruesa); una vez más, la mielina aparece esencialmente libre de reacción. Este resultado es perfectamente coherente con las inmunohistoquímicas. A nivel de axones, la reacción también es clara. Aunque la técnica tal como fue realizada no puede considerarse cuantitativa, la intensidad y la extensión de la reacción parecen claramente menores que a nivel glial. Como se aprecia en la microfotografía, la mayor parte de la reacción axoplásmica se distribuye periaxoplásmicamente, en una región donde con el nivel de resolución obtenido, se hace muy difícil discriminar si estamos observando reacción estrictamente axoplásmica o a nivel del borde interno de la mielina (flecha delgada). De todas formas, en algunos casos se aprecian perfiles axoplásmicos con marcación claramente interior (figura inserta). Se podría afirmar que la distribución del mensajero de miosina Va, sigue un patrón groseramente similar al que presenta la propia proteína, tal como fue evidenciada por el uso de anticuerpos.

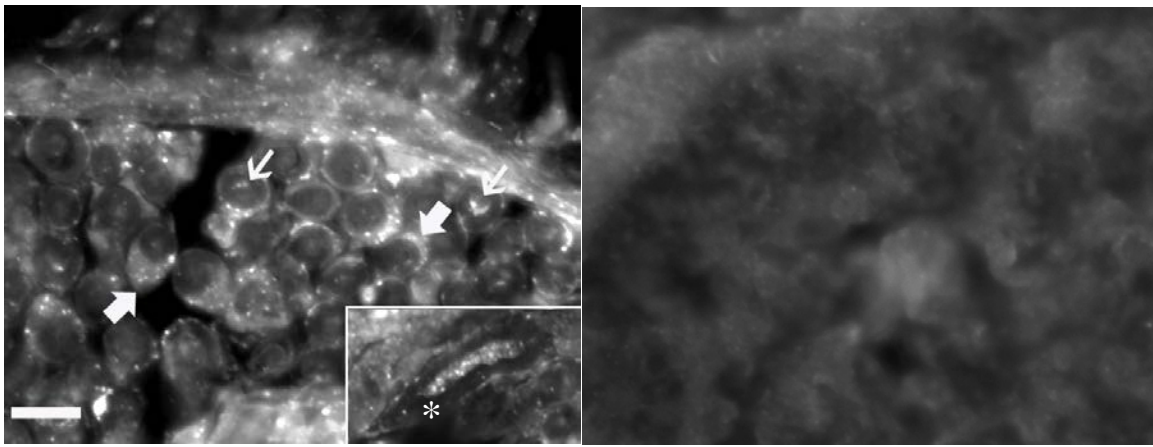


Figura 1. Distribución del ARNm codificante para miosina Va en el nervio ciático. *Izquierda;* la sonda antisentido fue incubada en el tejido durante 8 a 10 horas y evidenciada en base a una señal fluorescente. Las flechas gruesas señalan la marcación correspondiente a los somas de las glías de Schwann, mientras que las flechas delgadas señalan reacción axoplásmica. En estos últimos casos la señal es básicamente periférica aunque parece proyectarse hacia la parte más medular. En algunos casos la señal ocupa sectores claramente axoplásmicos, mientras que la mielina (asterisco) no evidencia reacción, tal como lo demuestra el corte semi longitudinal de la figura inserta. *Derecha;* corte histológico de similares características al anterior, tratado de manera idéntica pero sin ser expuesto a la sonda. Barra, 10 μ m.

Discusión general del Capítulo.

La confirmación de la presencia de la MVa en los nervios y particularmente en los axones, podría considerarse como el resultado principal de esta serie de resultados pues alrededor de esta cuestión giraba la hipótesis central del trabajo planteado. Resultan también de interés algunos aspectos puntuales y menos esperables que ayudarán a orientar la hipótesis sobre la supuesta participación de la miosina Va en los mecanismos de mantenimiento axonal. Por ejemplo, de los experimentos de inmunohistoquímica surgen dos aspectos que en principio, no eran esperados. Uno de ellos es la aparentemente importante presencia de la proteína en las células de Schwann; la otra es la marcada localización periaxoplásmica de la proteína axonal.

La conocida asociación física de la miosina Va con kinesina (50) explica la razón por la cual ésta es frecuentemente encontrada unida a microtúbulos (40, 51). El modelo conocido como *Hipótesis del transporte dual por filamentos*, intenta explicar esta evidencia experimental. Según dicho modelo, este complejo motor doble permite a una misma carga a la que está incorporado, moverse por territorios ricos tanto en microtúbulos como en microfilamentos, utilizando para ello kinesina o miosina V según el caso (52). Esta posibilidad fue efectivamente estudiada en axones de neuronas del Ganglio Cervical Superior en cultivo, donde se comprobó que la miosina Va axonal está

asociada a vesículas sinápticas y otros componentes membranosos no identificados, los cuales se mueven bidireccionalmente por transporte rápido axonal entre el soma y las regiones más distales del axón. (53). Este modelo, llevado a nuestros axones periféricos predice la compartimentalización de la MVa entre un sector medular del axón, rico en microtúbulos y otro sector rico en microfilamentos, por ejemplo las alejadas regiones sinápticas o las regiones axonales ubicadas inmediatamente contra la membrana axoplásmica. Asumiendo que la MVa fuera transportada unida a kinesina por transporte axoplásmico rápido desde el soma neuronal y fuera siendo depositada junto a su carga a lo largo del trayecto, entonces debería verse señal anti MVa distribuída en la región axial. Sin embargo en nuestro modelo, los resultados evidenciados por la inmunohistoquímica, no encajan exactamente con esta predicción, ni reproducen lo observado en cultivos celulares. Una parte muy importante de la señal de miosina axonal es periaxoplásmica. Esto no necesariamente contradice el modelo, pero sugiere posibilidades ligeramente diferentes. En primer lugar, la escasa señal presente en la región axial del axón sugiere por un lado que el aporte somático de proteína sería escaso al tiempo que la región periférica secuestra prácticamente todo lo suministrado, explicando así su compartimentalización más cortical. Otra posibilidad (aunque no excluyente) es que sea el propio axón la fuente de la proteína y que ésta no requiera transporte a largas distancias por los microtúbulos, permaneciendo en la periferia pues es allí donde actúa. La hibridación *in situ*, sugiere que el axón podría ser uno de los orígenes de la proteína radioactiva detectada en los experimentos de síntesis local, pues allí está su ARNm.

Respecto a sus posibles funciones, la localización subcelular sugiere que allí podría estar asociada a actina o a membranas. Hay evidencia reportada de su interacción indirecta con membranas derivadas del retículo endoplásmico y Golgi (39, 43, 48). A su vez, esta tendencia a compartimentalizarse en la región más cortical, indica que podría estar desempeñando actividades específicas en ese sitio del axón. El aumento local de su expresión inducida por la lesión nerviosa, es coherente con esta idea al tiempo que sugiere su importancia en los procesos de remodelación del tejido. Existe una última posibilidad apenas insinuada en la discusión del artículo, compatible con su localización y con su hipotética participación en procesos plásticos: su asociación con unos dominios discretos de localización periaxoplásmica ricos en ribosomas y descritos poco tiempo antes en axones del Sistema Nervioso Periférico, las llamadas “Placas Ribosomales Peri Axoplásmicas”.

En resumen, la miosina Va está presente en el sistema nervioso periférico y particularmente en el compartimiento axonal. Su localización preferentemente cortical sugiere que la proteína presente en los axones está desarrollando funciones locales específicas y no en tránsito hacia o desde el soma. La síntesis local de la proteína así como la presencia axoplásmica de su ARNm, sugiere que el axón tal vez posea la capacidad de producir su propia miosina Va en respuesta a requerimientos locales.

Material y Métodos (no incluidos en el artículo precedente).

Producción de la sonda antisentido: La sonda utilizada para la detección del mensajero codificante para la miosina Va en el nervio ciático, fue sintetizada a partir de un vector (pBluescript SK +/-) en el que se clonó un inserto correspondiente a una región que representa el extremo carboxilo (dominio caudal específico, nt 1057-6599) del gen que codifica para la miosina Va de pollo. Este clon (clon 32a), fue cedido gentilmente por la Dra E. Espreafico, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de San Pablo en Ribeirao Preto). El plásmido conteniendo el inserto fue cortado en el sitio HPA, dejando la secuencia de interés unida al promotor T7 en el extremo 5', el cual fue usado para la transcripción. De esta forma, la región transcrita incluyó parte del extremo 3'UTR (unos 1027 nt) mas una región de unos 1360 nt que corresponden a la región globular caudal (carboxilo terminal) de la proteína. La reacción fue realizada por 30 minutos a 37 °C en un medio conteniendo 10 unidades de ARN polimerasa T7 (Boehringer Mannheim), Tris 40 mM, pH 8, MgCl₂ 8 mM, NaCl 50 mM, espermidina 2 mM y DTT 30 mM. Los ribonucleótidos trifosfato (Boehringer Mannheim), fueron adicionados a una concentración final de 0,4 mM cada uno. El ribonucleótido de uracilo utilizado fue el digoxigenina 11-UTP, el cual producirá una sonda de ARN marcada con digoxigenina.

Terminada la reacción, el ADN fue eliminado usando 2 unidades de DNAsa incubada a 37 °C, durante 30 minutos y el ARN fue posteriormente repurificado por precipitación en LiCl 0,4 M en alcohol absoluto (2,5 volúmenes respecto al volumen original de sonda), durante 8 horas a -20 °C. El ARN precipitado es recuperado por centrifugación a 10000g por 10 minutos y lavado una vez con etanol absoluto. Finalmente, el alcohol es retirado completamente y la sonda resuspendida en un volumen variable de agua libre de RNAsas (20 µl, por ejemplo).

Hibridación *in situ*. Para la hibridación *in situ*, se utilizaron los mismos cortes que para las Inmunohistoquímica. Los cortes (previamente hidratados y lavados en buffer fosfato salino), fueron equilibrados en solución de hibridación por 15 minutos a 42°C. La composición y concentración final de cada uno de ellos es: Formamida desionizada al 50 %, ADN de espermatozoos de salmón desnaturalizado a 500 ug/ul, ARNt de levadura a 250ug/ul, Denhardt (0,1 % p/v de Ficoll, 0,1 % p/v de polivinilpirrolidona, 0,1 % p/v de BSA Fracción V) y SSC 4x (NaCl 0,6 M, citrato de sodio 60 mM a pH 7). Finalizada esta etapa, la solución de hibridación es sustituida por otra nueva conteniendo la sonda antisentido (previamente desnaturalizada por 3 minutos a 95 °C, centrifugada y llevada inmediatamente al hielo a la espera de su uso) a razón de 1-2ng/μl. Los cortes son incubados en este medio, a 42 °C en cámara húmeda con formamida 50%, SSC 4x, de un día para el otro. Terminada la incubación los cortes son lavados con SSC en ciclos de 15 minutos, con agitación suave y en concentraciones sucesivamente decrecientes desde 4x a 0,25x por dos veces cada una. Todos los lavados fueron realizados a temperatura ambiente, con la excepción del último que se realizó a 42 °C.

Marcación fluorescente de la sonda hibridada y observación microscópica.

Para el revelado de la sonda se procedió en primer lugar al bloqueo de actividad peroxidasa endógena del tejido, incubando los cortes en peróxido de hidrógeno al 0,01% en buffer fosfato salino (PBS), por 30 minutos. Como etapa preparativa del inmunoreconocimiento de la digoxigenina incorporada a la sonda, se bloquearon los sitios inespecíficos con TNB (Tris 0,1 M, NaCl 0,15 M, tween 0,05%, pH 7,5 y 0,5% de bloqueante comercial), por 30 minutos a temperatura ambiente.

La Incubación con anticuerpo específico (antidigoxigenina-HRP de Boehringer Mannheim), fue a una dilución 1:500 de la solución comercial, en TNB, 45 minutos a temperatura ambiente. Finalizada, los cortes son lavados 3 veces con TNT (Tris 0,1 M, NaCl 0,15 M y tween 0,05% a pH 7,5) a temperatura ambiente. El revelado fue realizado utilizando la tiramida-Cy3 como sustrato de la peroxidasa y así obteniendo un precipitado fluorescente en el sitio de localización de la enzima. El tiempo de reacción fue de aproximadamente 1 minuto.

La observación fue realizada utilizando microscopía de epifluorescencia convencional, en un microscopio Olympus BX61, equipado con un filtro estándar para rodamina. Para la adquisición de las imágenes se utilizó una cámara CCD enfriada Olympus DP70.

Capítulo II

Significado biológico de la presencia miosina Va en los axones periféricos.

Introducción

Las hipótesis de trabajo planteadas en esta sección se apoyan en el supuesto según el cual la proteína en cuestión, se encuentra en el compartimiento axonal llevando adelante funciones locales específicas y no solo de paso por el axón. Este supuesto se apoya a su vez, en los resultados discutidos en el capítulo anterior.

A diferencia de lo que ocurre con otras proteínas motoras, las cuales participan en la reorganización del citoesqueleto (tal el caso de algunas miosinas) o eventualmente en su dinámica de polimerización, (como algunas kinesinas y la dineína citoplásmica 53), la miosina V no ha sido asociada con estas funciones. Por otro lado, en el sistema nervioso, sí es conocido su papel relativo a la movilización de membranas internas, lo cual es de tal importancia, que la disfunción producida por la mutación del gen que la codifica, es considerada responsable de la letalidad.

Evolutivamente muy alejado de los individuos que poseen sistema nervioso está *S. cerevisiae* y su miosinas V (Myo2p y Myo4p). Como se ha mencionado, una característica distintiva de Myo4p, es el transporte de partículas de ARN mensajero. Tal vez esa distancia evolutiva, así como una apenas moderada homología secuencial con las MV de eucariotas superiores, sea la razón por la cual hasta hace relativamente poco tiempo nadie especulaba con la posibilidad de que éstas últimas, también pudieran participar del tráfico de ARN. Sin embargo, desde algunos años atrás se cuenta con numerosa evidencia que indica claramente que los microtúbulos y los motores moleculares microtúbulo-dependientes (las kinesinas y dineínas), están involucrados en el transporte de ARNm o gránulos de ARN. Esto ha sido observado en los más variados modelos (54).

La presencia de los tres tipos de ARN en axones maduros de células nerviosas es conocida desde hace mucho tiempo (55). Sin embargo, sólo en modelos de neuronas en

cultivo se ha logrado establecer claramente que la presencia de partículas de ARNm en el axón depende de la integridad de los microtúbulos (56) y su transporte, de las kinesinas (57). Es importante destacar que en algunos de estos casos, el ARNm axonal ha sido observado no sólo sobre los microtúbulos, sino también sobre las regiones ricas en microfilamentos. Tal es el caso del mensajero para β -actina. Dicho ARNm es transportado anterogradamente por el axón desde el soma neuronal para ubicarse preferentemente en los lamelipodia de los conos de crecimiento, ricos en actina. En este caso se deduce que la ribonucleopartícula conteniendo el ARNm de la actina está equipada con la maquinaria necesaria para translocarse de los microtúbulos a los microfilamento y una vez allí redistribuirse localmente. Su localización polarizada en esta región es potenciada por los mismos factores tróficos que promueven el crecimiento axonal (14); esto sugiere claramente que estamos ante un proceso en el cual el transporte del ARN, su localización específica y su posterior (aunque supuesta) traducción local, estarían relacionadas con los cambios plásticos y el mantenimiento de la polaridad celular.

Actualmente no hay pruebas definitivas sobre el origen y la dinámica del ARNm presente en los axones maduros de invertebrados como de vertebrados. Una de las pocas pistas sobre lo que realmente podría estar ocurriendo, han sido aportadas por Muslimov et al (58), quienes estudiaron la dinámica del ARN BC1 en el axón de Mauthner del pez dorado. Este ARN había sido previamente descrito en las dendritas y en los axones (59). Se trata de un pequeño transcripto de la polimerasa III de funciones probablemente regulatorias durante el proceso de traducción. Cuando esta molécula marcada radioactivamente es inyecta en el soma de la célula de Mauthner, es rápidamente transportada hacia el axón (2 $\mu\text{m}/\text{seg}$) por un mecanismo que requiere de microtúbulos intactos para su movimiento anterógrado. En una etapa posterior, depende del citoesqueleto de microfilamentos para alcanzar su localización periaxoplásmica final. Estas observaciones son sumamente interesantes por varias razones. En primer, lugar porque parece validar el modelo conceptual derivado de los experimentos con neuronas en cultivo en relación a su mecanismo de transporte. En segundo lugar, por las implicancias que tiene en relación con nuestras hipótesis de trabajo. El hecho que el ARN BC1 se localice en el axón en dos etapas sucesivas, una dependiente de microtúbulos y otra dependiente de microfilamentos, es muy sugerente de la dependencia de kinesina en la primera etapa (reforzado por la dirección y velocidad de transporte observado), y de un componente de unión a actina, en la segunda. Debemos

mencionar, aunque en un plano más especulativo, el hecho que coincidentemente con la localización de miosina Va en los axones del nervio ciático, la ubicación final de BC1 sea también periaxoplásmica. A propósito de esto, los autores señalan en su artículo lo sugestivo que resulta la distribución de la señal producida por la molécula radioactiva en la autorradiografía, con la distribución de las Placas Ribosomales Periaxoplásmicas (PARPs), descritas en esos mismos axones. De todas formas y debido a las características poco convencionales del ARN BC1, estos resultados deberían ser evaluados con cautela antes de extrapolarlos a los ARN mensajeros.

Esa dependencia dual que muestran algunos ARN para su correcto transporte y localización, podría ser satisfactoriamente explicada por su asociación en la partícula que forman, con aquellos elementos necesarios para su movilización. La asociación entre componentes de la maquinaria traduccional y proteínas motoras (kinesina 5 y miosinas V y II), fue bioquímicamente demostrada inicialmente a partir de RNPs purificadas de cerebro de rata (24). Utilizando la inmunoprecipitación de esos complejos con anticuerpos contra algunos de sus componentes, se demostró en ese artículo la asociación física entre proteínas motoras, ARNm, proteínas de unión al ARN (Pur α , FMRP y stauferin) y ribosomas. Si bien la aproximación experimental usada no permitía concluir cual era el verdadero origen de estos complejos (si eran neuronales o no, o de qué región de la neurona proceden), lo importante era la demostración que al menos algunas RNPs estaban equipadas con ese complejo motor doble, tal como había sido descrito en algunos organelos (60). La existencia de la asociación MVa/kinesina 5/RNPs en neuronas resulta coherente con la ya descrita dinámica del transporte del ARN BC1. Por otro lado, los datos publicados en neuronas en cultivo referidos a la asociación del ARNm con kinesinas, su transporte por microtúbulos y la localización sobre zonas ricas en microfilamentos, también son concordantes con lo anterior. Queda por demostrar la existencia de RNP en axones maduros así como su asociación con proteínas motoras. La demostración de su existencia no solo constituye una novedad en sí misma, sino que la posible presencia de ARNm específicos en las RNPs constituye una base sólida para comenzar a comprender tanto los fenómenos de síntesis local de proteínas como los mecanismos responsables del mantenimiento de la identidad axonal.

Como se mencionó, la presencia de ARN en axones maduros es conocida de larga data. Sin embargo el descubrimiento de las PARPs (61) puso a disposición una herramienta que permitió, quizás por primera vez, el estudio sistemático de la presencia y significado de los ribosomas axonales. Esta novedosa estructura, descrita primero en

el axón gigante de Mauthner del pez dorado (61) y luego en los axones mielínicos de las raíces espinales de los nervios lumbares de rata y conejo (62), consiste en zonas discretas, ricas en ARN (positivas a la tinción con YOYO-1, un fluoróforo de muy alta afinidad para ácidos nucleicos), aparentemente organizadas en base a una estructura subyacente de microfilamentos. Su pequeño tamaño en los axones de mamífero (10 μm de largo por 2 μm de ancho, promedialmente), su distribución aparentemente aleatoria, así como la compleja y meticulosa metodología necesaria para obtener una preparación en la que se las pueda evidenciar, sean tal vez las razones por las cuales hayan pasado desapercibidas hasta su descubrimiento por Koenig et al, en 1996. Una de las claves para estudiar la PARPs (además del uso del YOYO-1) es la preparación de axoplasmas de raíces medulares. Estos axoplasmas son obtenidos *in toto*, mayormente desprovistos de su vaina de mielina, luego de una desnaturalización moderada del tejido con acetato de zinc. Esta preparación es muy conveniente para realizar en ellas reacciones de inmunoreconocimiento, ya que su alteración estructural es mínima y sus estructuras internas son muy asequibles a los anticuerpos o sondas que se planea usar. Finalmente, al consistir de axoplasmas enteros, la perspectiva espacial que se obtiene de sus subestructuras es mucho más clara y rica que la de cortes histológicos, donde el área de observación es bidimensional.

El alto contenido de ARN detectado en las PARPs, sugirió inmediatamente que ese podría ser el sitio donde probablemente ocurra la síntesis local de proteínas. Al mismo tiempo, la dinámica del ARN en los axones maduros y su organización en RNPs conteniendo ribosomas, ARNm y proteínas motoras, generaron la idea según la cual partículas similares a éstas, también deberían existir como tales en los axones maduros del sistema nervioso periférico. Asimismo, sería muy probable que entre éstas y las PARPs exista una dependencia funcional y estructural muy estrecha.

En resumen, los datos aquí discutidos llevaron a redefinir y ajustar las hipótesis discutidas en el capítulo I. Reafirmando la idea según la cual la miosina Va sería una molécula clave en relación a los fenómenos responsables del mantenimiento del estado estacionario y de las respuestas plásticas del axón, en este capítulo planteamos demostrar que *al menos una fracción de la miosina Va compartimentalizada en el axón, podría estar formando parte también de las RNPs*. Lo anterior genera a su vez dos predicciones que se investigarán, la primera es que *probablemente, la MVa se encuentre asociada con la kinesina en esas RNPs*. La segunda es que *ambos motores moleculares deberían estar presentes tanto en el axoplasma como en las PARPs*.

Al igual que en el capítulo anterior, parte de las respuestas referidas a las hipótesis planteadas están presentes en el artículo que se incluye a continuación. El resto de las respuestas son contestadas con experimentos analizados y discutidos aparte.

Participación específica del tesista en el artículo que se presenta a continuación.

Correspondió al tesista el planteo original de la hipótesis central del artículo: la posibilidad que las proteínas motoras miosina Va y kinesina fueran constituyentes de las PARPs. También correspondió al tesista la evidencia experimental inicial que indicaba la veracidad del planteo. Si bien se ha estado involucrado en todo el trabajo experimental, solo las figuras 1, 3E1, 3E2, 4 y 5 fueron obtenidas en experimentos donde se participó directamente y junto a Sotelo-Silveira. Participación en la redacción del manuscrito.

Myosin Va and Kinesin II Motor Proteins Are Concentrated in Ribosomal Domains (Periaxoplasmic Ribosomal Plaques) of Myelinated Axons

José R. Sotelo-Silveira,^{1,2} Aldo Calliari,^{2,3} Magdalena Cárdenas,^{2,3} Edward Koenig,⁴ José R. Sotelo²

¹ Department of Cell & Molecular Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay

² Laboratory of Proteins & Nucleic Acids, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

³ Department of Molecular & Cell Biology, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

⁴ Physiology & Biophysics, State University of New York at Buffalo, Buffalo, New York 14214, USA

Received 7 November 2003; accepted 2 December 2003

ABSTRACT: Periaxoplasmic ribosomal plaques (PARPs) are discrete ribosome-containing domains distributed intermittently along the periphery of axoplasm in myelinated fibers. Thus, they are structural formations in which translational machinery is spatially organized to serve as centers of protein synthesis for local metabolic requirements and perhaps repair as well. Because of evidence that RNA is transported to putative PARP domains, involving both microtubule- and actin-based mechanisms, it was of interest to investigate whether cytoskeletal motor proteins exhibit a nonrandom localization within PARP domains. Axoplasm, from large Mauthner fibers and rat or rabbit spinal ventral nerve root fibers, removed from the myelin sheath in the form of an “axoplasmic whole-mount” was used for this analysis. PARP domains were identified either by specific immunofluorescence of rRNA, ribosomal P antigen, or by nonspecific RNA fluorescence using RNA binding dyes YOYO-1 or POPO-1. A polyclonal antibody (pAb)

against the motor domain of myosin Va showed prominent nonrandom immunofluorescence labeling in PARP domains. Similarly, monoclonal antibodies (mAb) against kinesin KIF3A and a pan-specific antikinesin (mAb IBII) also showed a preponderant immunofluorescence in PARP domains. On the other hand, H2, a mAb antikinesin KIF5A, exhibited only random immunofluorescence labeling in axoplasm, as was also the case with pAb antidynein heavy chain immunofluorescence. Several possible explanations for these findings are considered, primary among which is targeted trafficking of translational machinery that results in local accumulation of motor proteins. Additional possibilities are trafficking functions intrinsic to the domain, and/or functions that govern dynamic organizational properties of PARPs. © 2004

Wiley Periodicals, Inc. *J Neurobiol* 60: 187–196, 2004

Keywords: myosin V; kinesin; RNA localization; axons; local protein synthesis

Correspondence to: J.R. Sotelo (sotelo@iibce.edu.uy).

Contract grant sponsor: PEDECIBA.

Contract grant sponsor: CSIC.

Contract grant sponsor: CIDEAC.

Contract grant sponsor: NSF; contract grant number: IBN 0118368 (E.K.).

© 2004 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 22 April 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/neu.20015

INTRODUCTION

A systematic periodic occurrence of restricted periaxoplasmic ribosomal plaques (PARPs) was documented in axoplasmic whole-mounts isolated from myelinated fibers (Koenig and Martin, 1996; Koenig et al., 2000). PARPs contain a ribosome-associated ultrastructural matrix, localized in the actin-rich cortical zone, and can be seen as protruding plaque-like structural correlates. Thus, PARPs can account for earlier metabolic studies documenting protein synthesis in myelinated vertebrate axons (Tobias and Koenig, 1975; Benech et al., 1982; Koenig, 1991; Sotelo et al., 1992; Sotelo-Silveira et al., 2000; see Alvarez et al., 2000 for review). As discrete loci of potential protein synthesis, there is likely to be bidirectional macromolecular trafficking associated with these domains. Indeed, transport and localization of BC1 RNA depends on microtubules for long-range axial transport and actin filaments for local radial transport to putative PARPs in the periphery of the Mauthner axon (Muslimov et al., 2002).

We showed previously that myosin Va has a cortical localization in axons of rat sciatic nerves (Calliari et al., 2002). Because PARPs are localized in the actin-rich cortex (Koenig and Martin, 1996; Koenig et al., 2000), transport within this zone may depend on a molecular motor that interacts with the actin cytoskeleton. Thus, it is possible that myosin Va plays a role in trafficking and/or in organizational dynamics of PARPs, because it has been shown to transport cargo on actin filaments (Tabb et al., 1998), and to participate in transport to axons and dendrites (Langford, 2002). Interestingly, Myo4p, a member of the myosin V class in yeast, has been shown to mediate specific mRNA transport to the bud tip (Long et al., 1997; Kruse et al., 2002).

Cargoes targeted to PARPs from remote sites would probably utilize a kinesin-dependent microtubule pathway. New additional cargoes and functions of kinesins are now emerging (Hirokawa, 1998; Goldstein and Yang, 2000; Miki et al., 2001). Also, as shown by Aronov et al. (2002) in axons of P19 neurons, and Ohashi et al. (2002) in CNS, kinesins may be involved in RNA transport. In the former study, KIF3A kinesin is a component of tau ribonucleoprotein (RNP) transport granules, while in the latter study, mRNA coding for FMRP protein is bound to RNP particles together with KIF5A/C kinesin and myosin Va. Furthermore, these motor proteins interact with each other, forming a "heteromotor complex" (Huang et al., 1999; Stafford et al., 2000).

The main goal of this study was to investigate the distribution of motor proteins in relation to PARPs in vertebrate myelinated axons. We used immunofluorescence to examine axoplasmic whole-mounts isolated from myelinated fibers from rat and rabbit spinal ventral nerve roots, and goldfish Mauthner neuron. Western blots were used to evaluate immunospecificity. Our results indicate that while neither conventional kinesin I nor dynein is localized in PARPs, myosin Va and the KIF3A kinesin are concentrated in PARP domains. These findings suggest that these molecular motors may play important roles associated with trafficking of key components, including mRNA in these domains. As such, they may also govern the dynamic spatial organization of PARP domains.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Axoplasmic Whole-Mounts from Myelinated Spinal Root Fibers

Lumbar spinal nerve roots that were used in the present study were dissected from euthanized rabbits. The tissues (several nerve root/rootlet) were suspended in a modified gluconate-substituted calcium-free Cortland salt solution (Koenig and Martin, 1996; Koenig et al., 2000) containing 132 mM Na-gluconate, 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM glucose, 3.5 mM MgSO₄, and 2 mM EGTA [ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid], pH 7.2, stored at 4°C. A nerve root/rootlet, 3–5 mm, was immersed in a solution of 30 mM zinc acetate, 0.1 M 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) of aspartic acid neutralized by Tris at pH 5.5. A "critical permissive concentration" (CPC) of the "pulling" media was determined for each animal. The CPC usually was sharply defined for a given animal in a range of concentrations of 35–45 mM with respect to aspartate. The pulling media were made from a stock solution containing 0.2 M aspartic acid (Sigma), 0.192 M Tris, 5 mM NaN₃, and 0.1% Tween 20 (Bio-Rad, Hercules, CA) to reduce surface tension, pH 5.5. For each test, plaque occurrence was evaluated after staining with YOYO-1 (see below). Isolated axoplasmic whole-mounts were attached with the aid of eyebrow hair tools to number 1 coverslips coated with 1% 3-aminopropyltriethoxysilane (Polysciences, Warrington, PA) in ethanol.

Isolation of Axoplasmic Whole-Mounts from the Mauthner Cell

Common goldfish (4–5 inches; Grassy Forks Fisheries, Martinsville, IN) were used. The goldfish was anaesthetized

by cooling in ice water and all procedures with native tissues were performed in an ice bath. The dissected spinal cord and lower brain stem (Koenig and Martin, 1996) were suspended in Cortland solution (see above). After Zn denaturation (see above), Mauthner cell axoplasm in 5 to 8 mm tissue segments was isolated as described for spinal nerve roots above.

YOYO-1 and POPO-1 Staining of Axoplasmic Whole-Mounts

Recovery of PARPs was assessed by staining of the whole-mounts with YOYO-1 iodide (491/509) or POPO-1 iodide (434/456) (Molecular Probes, Eugene, OR). One microliter of a 1:10 stock of YOYO-1 or POPO-1 in DMSO was added to the pulling medium (final concentration, 1:5000) for 15 min. The dye was washed out by brief immersion in acidified 0.15 M ammonium acetate (i.e., NH₄OAc; 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-through 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 NH₄OAc solution.

Immunofluorescence Staining

Axoplasmic whole-mounts attached to a coverslip were fixed by immersion in 3.75% paraformaldehyde in 0.1 M sodium diethylmalonate [0.1 M diethylmalonic acid (Aldrich, Milwaukee, WI), adjusted to pH 7.2 with NaOH] and 0.1% Tween 20 for 15 min. They were washed in 0.15 M ammonium acetate and 0.1% Tween 20, pH 6.7, three times for 5 min each and then immersed in an immunoblocking solution composed of 25 mM Tris HCl, 0.9% NaCl, 3.75% glycine, 1% of normal goat and/or donkey serum, 0.05% Tween 20, and 5 mM NaN₃ for 15 min. Incubation with primary antibody was for 1 h on a rocker. Coverslips were washed three times with a working buffer (i.e., blocking buffer with 0.1% serum) and incubated for 45 min with a secondary antibody conjugated to one of three Alexa fluorophores (Molecular Probes) having an excitation maximum at either 488, 546, or 555 nm. The immunostained specimens were washed a further three times for 5 min each before being mounted over spacers of the flow-through chamber for microscopic examination (see above).

Antibodies

The immunoreagents that were used were as follows:

1. Monoclonal antibody Y-10B, against the large ribosomal subunit RNA (a generous gift of Dr. Joan A. Steitz, Yale University, New Haven, CT; see Lerner et al., 1981).

2. Polyclonal antibody against human ribosomal P antigen (US Biological, Swampscott, MA).
3. Rabbit affinity purified polyclonal against a recombinant protein containing the myosin Va head domain (amino acids 5 to 752) and a rabbit affinity purified polyclonal against the myosin Va carboxy terminal domain (931 amino acids; a generous gift of Dr. Roy Larson, Universidade Sao Pablo, Riberao Preto, Brazil; Espreafico et al., 1992).
4. Monoclonal IBII against kinesin heavy chain (Sigma-Aldrich).
5. Monoclonal H2 against kinesin KIF5A/C (Chemicon).
6. Monoclonal antikinesin KIF3A (clone 28; Transduction Laboratories, BD Biosciences Pharmingen).
7. Rabbit polyclonal R-325 against dynein (Santa Cruz Biotechnology).

Primary antibodies were used at 1:200. Alexa conjugated secondary antibodies were obtained from Molecular Probes and used according to manufacturer's instructions in dilutions ranging from 1/1000 to 1/2000.

Microscopy

For routine fluorescence microscopy axoplasmic whole-mounts were observed in an Olympus BHS microscope equipped with an air-cooled CCD camera (DAGE-MTI) or a Nikon Diaphot inverted microscope. The confocal microscope was a Bio-Rad MRC-1000 (Hercules, CA) with a krypton-argon laser in combination with an upright Nikon Optiphot microscope.

Electrophoresis and Western Blot Assays

SDS-PAGE was performed in extracts from ventral roots and central nervous system on 10% acrylamide minigels and stained with Coomassie blue. The apparent molecular weight was calculated using Sigma molecular weight markers (SDS-7B; 190, 112, 88, 65, 56, 38, and 33.5 kDa). Immunoblotting on nitrocellulose membranes (0.22 μm; Bio-Rad) was performed as previously described by using the alkaline phosphatase detection method (Towbin et al., 1979). The transfer of proteins was performed for 1 h, 250 mA, 4°C, and 10% methanol.

RESULTS

Specificity of the Antibodies Used in Protein Extracts from Rat Ventral Roots and Goldfish Brain

The cross-reactivity of the antibodies to myosin Va and kinesin proteins used for immunofluorescence cytochemistry was evaluated by Western blot analysis

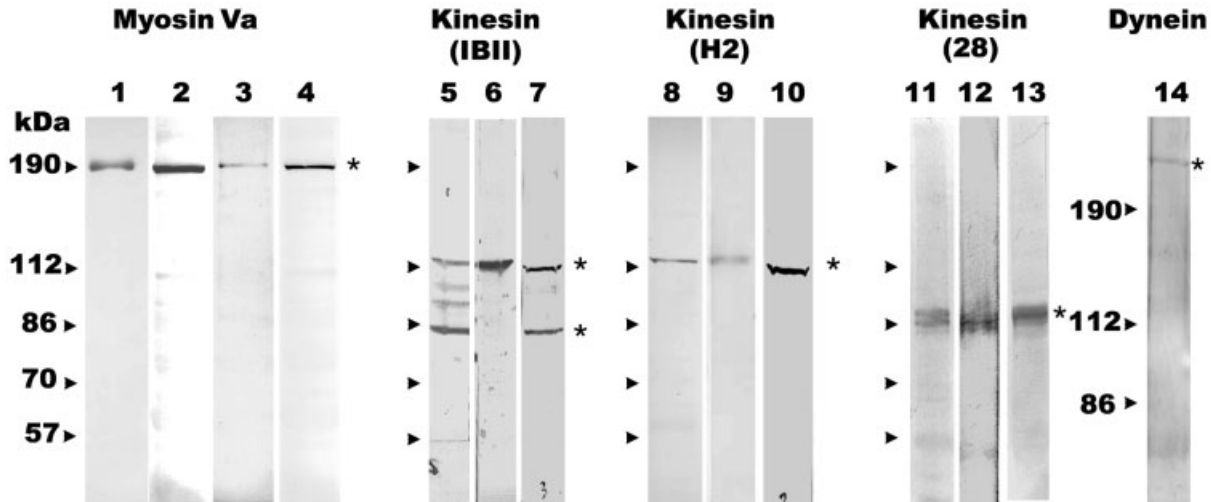


Figure 1 Myosin Va and kinesin are present in protein extracts from ventral roots and goldfish spinal cord. Western blots of different protein extracts evaluating the specificity of the antibodies used. The protein extracts used were the following: lane 1, purified myosin Va from chick brain; lanes 2, 5, 8, 11, and 14 total protein from rat brain; lanes 3, 6, 9, and 12, total protein from rat ventral roots; lanes 4, 7, 10, 13, total protein from goldfish brain. Each extract was probed with the following antibodies: lanes 1 to 4 were probed with a polyclonal antibody against myosin Va; lanes 5 to 7 were probed with the monoclonal antibody IBII, which exhibits a pan-specific recognition of kinesins I and II; lanes 8 to 10 show the pattern obtained when a monoclonal anti-KIF5A/C (H2) was used (note that IBII antibody detects a single band of 125 kDa in common with H2 antibody); lanes 11 to 13 were probed with a monoclonal antibody anti-KIF3 (note that the KIF3A antibody recognizes a band of about 85 kDa, which has the same molecular weight as the band detected by the IBII antibody in rat and goldfish CNS); lane 14 was probed with a polyclonal antibody against dynein heavy chain. Molecular weights standards shown on the left of the figure are the same for all lanes except for lane 14 where they are specified. Asterisk shows the specific immunoreaction for each antibody used.

of rat and goldfish CNS protein extracts. The antibody against the head domain of myosin Va, previously characterized by Espreafico et al. (1992), showed the expected 190 kDa band in rat and goldfish extracts (Fig. 1, lanes 1 to 4).

The monoclonal IBII, against kinesin, recognized two bands of approximately 125 and 80 kDa in rat brain extracts (Fig. 1, lane 5). When a lane containing the rat protein extract was probed with a monoclonal antibody that recognized KIF5A and C (clone H2; Chemicon; Kanai et al., 2000), it labeled the same 125 kDa band that was recognized by the IBII clone (Fig. 1, lanes 8 and 9). A monoclonal antibody against KIF3A (clone 28) subsequently revealed that the 80 kDa band was the KIF3A kinesin isoform (Fig. 1, lanes 11 to 13). Thus, the KIF5A/C and KIF3A isoforms were both recognized by the IBII antibody. When IBII, H2, and KIF3A antikinesins were tested on protein extracts from goldfish CNS, the pattern observed was similar to that obtained with rat protein extracts (Fig. 1, lanes 7, 10, and 13). Dynein Western blots of rat ventral roots showed the expected high

molecular band of the heavy chain of cytoplasmic dynein (Fig. 1, lane 14).

Myosin Va Localization in Mammalian and Mauthner Axoplasmic Whole-Mounts

To analyze the distribution of myosin Va in the axonal compartment, advantage was taken of the isolated axoplasmic whole-mount preparation, which consists of axoplasm that is translated out from its myelin sheath with a pair of micro forceps (Koenig, 1965). We performed immunofluorescence cytochemistry using a specific antibody against the head domain of myosin Va. Representative confocal laser microscope images are shown in Figure 2. Double labeling with YOYO-1 and myosin Va antibody on rat ventral root axons [Fig. 2(A1–3)] showed colocalization in PARP domains, which can be seen in the merged image [Fig. 2(A3)]. An enrichment of the myosin V signal over the PARP region was observed but discrete signals in other areas of the axons could also be observed.

Similar results were obtained using the antibody that recognized the C terminal tail domain of myosin Va (data not shown).

The PARP domains reported for the unusually large diameter myelinated axon of the Mauthner cell (Koenig and Martin, 1996) provided an opportunity to study the distribution of myosin Va in PARPs with improved resolution. In this series of experiments, either the monoclonal antibody Y10B against the large rRNA subunit or YOYO-1 fluorescence staining was used to identify PARP domains. As shown in Figure 2, either myosin Va with Y10B immunofluorescence signals [Fig. 2(B1–3)] or myosin Va immunofluorescence with dye binding YOYO-1 fluorescence signals [Fig. 2(C1–2)] colocalizes in PARP domains. The confocal laser image [Fig. 2(B)] revealed that the immunolabeling in PARPs was particulate in character.

Kinesin Localization in Mammalian and Mauthner Axoplasmic Whole-Mounts

To study the distribution and localization of kinesin immunoreactivity we used the same approach as was used for myosin Va experiments. Rat or rabbit axoplasmic whole-mounts were doubly labeled with a nucleic acid binding dye, YOYO-1 or POPO-1, and one of the three different monoclonal antibodies against kinesin characterized in Western blot experiments: namely, clone IBII, anti-KIF3A (clone 28), or anti-KIF5A/C (clone H2; Fig. 3). Monoclonal antibodies IBII and anti-KIF3A each showed a prominent nonrandom labeling of PARP domains in rat [Fig. 3(A)] and rabbit axons [Fig. 3(C)], although some diffuse or punctate fluorescence was also apparent extrinsic to the PARP domains. In contrast, the H2 antibody labeled axoplasm in a rather homogeneous fashion without nonrandom localization [Fig. 3(E)].

The same pattern of labeling was obtained when large axoplasmic whole-mounts from Mauthner fibers were studied. Both the IBII [Fig. 3(B)] and the anti-KIF3A monoclonal antibodies [Fig. 3(D)] labeled the cortical zone in a discrete pattern that colocalized with labeled ribosomes, suggesting a preferential localization of the protein in PARP domains. On the other hand, the H2 antibody showed a punctate immunofluorescence pattern that typically failed to colocalize with YOYO fluorescence staining of PARPs [Fig. 3(F)].

Myosin Va and Kinesin Colocalize in PARPs

When the experimental conditions were adjusted for each antibody, both antibodies were tested on the same axoplasmic whole-mounts from rat ventral roots. As shown in Figure 4, pAb myosin Va and mAb kinesin IBII colocalized in periaxoplasmic ribosomal plaques.

Dynein Localization in Mammalian Axoplasmic Whole-Mounts

Dynein immunofluorescence was distributed throughout the axoplasmic whole-mount and showed no preferential localization in ribosomal domains identified by YOYO-1 fluorescence labeling (Fig. 5).

DISCUSSION

Interest in RNA trafficking and localization in dendrites and axons has grown considerably in recent years. The “axoplasmic whole-mount” preparation has provided an unconventional approach to studying localization of translational machinery and RNA trafficking in mature myelinated axons (Koenig and Martin, 1996; Koenig et al., 2000; Muslimov et al., 2002). Thus, the existence of a systematic distribution of ribosomal machinery in myelinated axons was unknown until PARPs were revealed after axoplasm was removed from the myelin sheath (Koenig and Martin, 1996; Koenig et al., 2000).

PARPs are restricted domains, spaced at periodic random intervals around the periphery of axoplasm in the actin-rich cortex, and are marked in least disrupted preparations by a structural correlate protruding at the surface of the axoplasmic whole-mount. Although PARP domains have not been analyzed in detail, they contain an amorphous matrix to which ribosomes are bound, and F-actin codistributes with putative polyosomes that may extend below the cortical layer (Koenig and Martin, 1996; Koenig et al., 2000). In the latter studies Electron Spectroscopic Imaging (ESI), a method that reliably localizes and maps ribosomal phosphorus signals at an ultrastructural level, and immunofluorescence were used to document the distribution of ribosomes, rRNA, and ribosomal proteins in PARP formations. Actin mRNA was also shown by ISH to be localized in PARP domains (Sotelo-Silveira and Koenig, 2000). In this respect, it should be noted that actin was among the proteins exhibiting cycloheximide-sensitive metabolic radiolabeling in axoplasm (Koenig, 1991). Thus, these reports, in addition

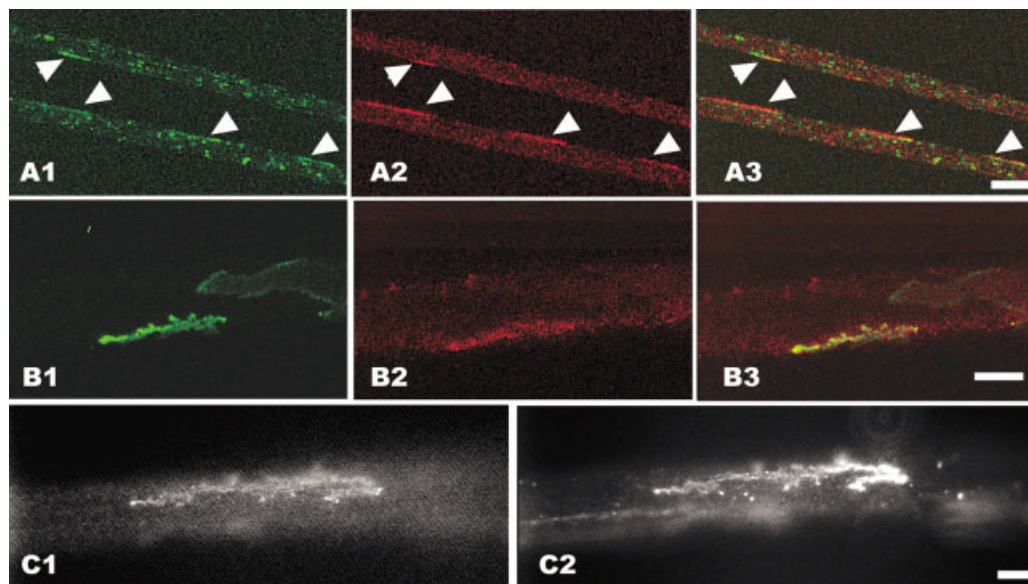


Figure 2

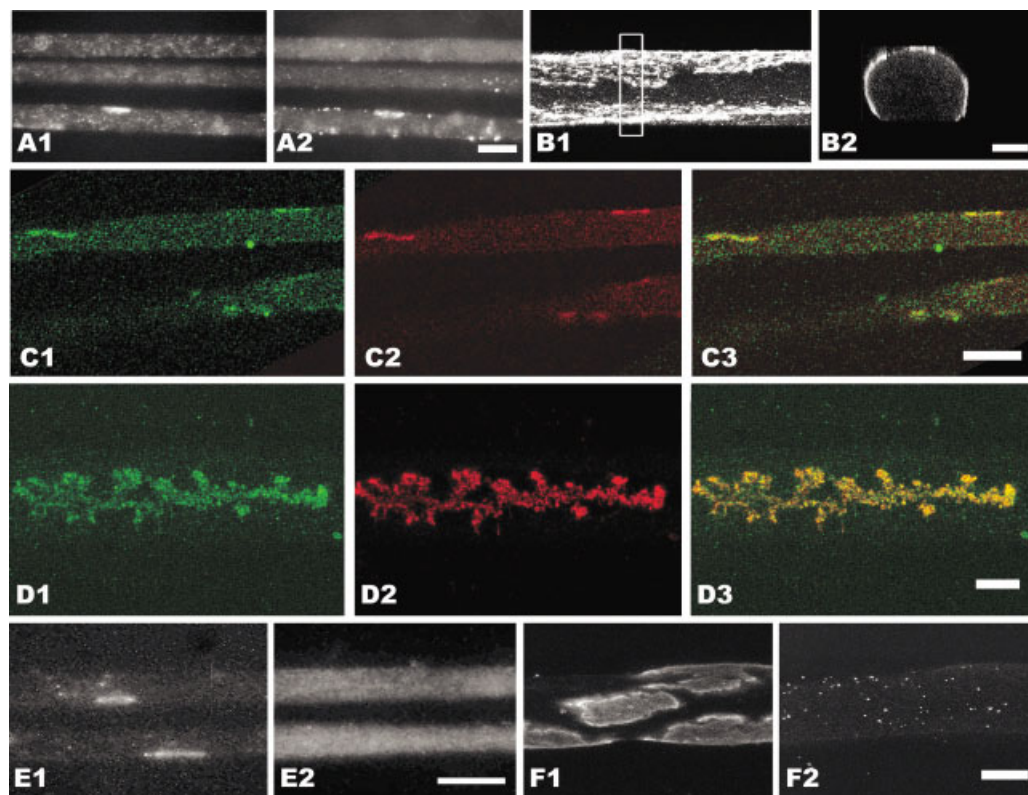


Figure 3

to results discussed elsewhere (see Koenig and Guiditta, 1999; Alvarez et al., 2000; Guiditta et al., 2002), strongly support the assumption that PARPs are local centers of protein synthesis in myelinated axons. As such, they are likely to be dynamic structures wherein components of translational machinery are localized and turnover. As described in a preliminary report (Sotelo-Silveira et al., 2002) and in detail here, we show for the first time that myosin Va and kinesin motor proteins are enriched in these domains.

Molecular Motors Are Enriched in PARP Domains

As shown in Figure 2, the polyclonal antibody against the motor domain of myosin Va yielded an immunolabeling pattern of axoplasmic whole-mounts that was concentrated in PARPs (identified by YOYO-1 fluorescence of RNA), with some diffuse labeling within the axoplasmic core. According to previous reports (Espreafico et al., 1992), and shown by the Western blot in this report, the antibody recognized only a 190 kDa band that corresponded to myosin Va (Fig. 1, lanes 1 to 4). Another antibody against a midsegment of the tail region of this protein showed essentially the

same pattern in axoplasmic whole-mounts (data not shown). Dispersed punctate immunofluorescence within the axoplasmic core (Fig. 2) was consistent with previous reports of myosin Va in axons, including binding to vesicle cargo (Bridgman, 1999), to light neurofilament subunit (Rao et al., 2002), and labeling of axoplasm in sciatic nerve fibers (Calliari et al., 2002).

Localization of kinesin in axoplasmic whole-mounts was performed using monoclonal antibodies against KIF3A, KIF5A/C, and IBII, a pan-specific antibody. The latter antibody labels a band of approximately 125 kDa, and an additional 85 kDa band in rat brain and rat ventral roots protein extracts (Fig. 1, lanes 5 and 6). These bands were recognized by KIF5A/C and KIF3A mAbs, respectively. Comparable results were obtained when protein extracts from goldfish CNS tissue were probed with the same antibodies, except that the mobility of the heavier band in the latter case was slightly faster on Western blots than that from rat (Fig. 1, lanes 7 and 10). The different patterns of protein labeling in the Western blot experiments may explain the different immunofluorescence staining patterns in the axons. While both anti-KIF3A mAb and the pan-specific mAb

Figure 2 Myosin Va localization in mammalian and Mauthner axoplasmic whole-mounts. (A) and (B) Confocal laser microscopy of doubly labeled whole-mounts. (A) A rat ventral root axon doubly stained with YOYO-1 (A1) and myosin Va antibodies (A2), the merged image is shown in (A3) (optical section thickness 0.5 μm ; scale bar, 10 μm). Arrowheads indicate PARP domains. (B) Mauthner axon stained with rRNA (Y10B) monoclonal (B1) and myosin Va polyclonal antibodies (B2); the merged image is shown in (B3) (optical section thickness 0.5 μm ; scale bar, 50 μm). (C) Additional example of a Mauthner axon PARP stained with YOYO-1 (C1) and antimyosin Va (C2), using epifluorescence microscopy (scale bar, 20 μm). Note that in each example shown, there is a high correlation of myosin localization with PARP domains.

Figure 3 Kinesin localization in mammalian and Mauthner cell axoplasmic whole-mounts. Kinesin localization in rat axons as evidenced with monoclonal antibody IBII using epifluorescence microscopy. (A1) Rat ventral root axons stained with YOYO-1; (A2) the same area stained with monoclonal IBII. Scale bar, 10 μm . (B) Kinesin localization in the large Mauthner axon. (B1) A z-projection of 45 confocal optical sections (0.5 μm) of kinesin mAb IBII immunofluorescence, rotated 90° on the x-axis. (B2) The area framed in (B1) rotated 90° on the y-axis to show that the immunofluorescence is restricted to the axonal cortex. (C) Confocal microscopy showing KIF3A distribution in PARP domains in rabbit axons. (C1) KIF3A detected by specific monoclonal antibodies. (C2) PARP domains detected by POPO-1 fluorescence. (C3) The merged image. Scale bar, 10 μm . (D) A confocal z-projection of 15 0.5- μm optical sections showing KIF3A localization in a large PARP domain of a Mauthner axon. (D1) mAb KIF3A was detected by specific monoclonal antibodies. (D2) A PARP domain, identified by human ribosomal P antigen immunofluorescence; (D3) the merged image. Scale bar, 20 μm . (E) KIF5A/C kinesin in rat axons, detected by H2 antibody. (E1) PARP domains shown by YOYO-1 fluorescence. (E2) H2 immunofluorescence showing no colocalization with YOYO-1 signals. Note that the immunofluorescence distribution pattern obtained with this antibody is very different from that of IBII, in that it does not localize in PARP domains. Scale bar, 10 μm . (F) The same experiment as that in (E), but carried out in Mauthner axons. (F1) represents the YOYO-1 fluorescence of PARPs, and (F2) shows the absence of corresponding H2 immunofluorescence labeling on PARPs.

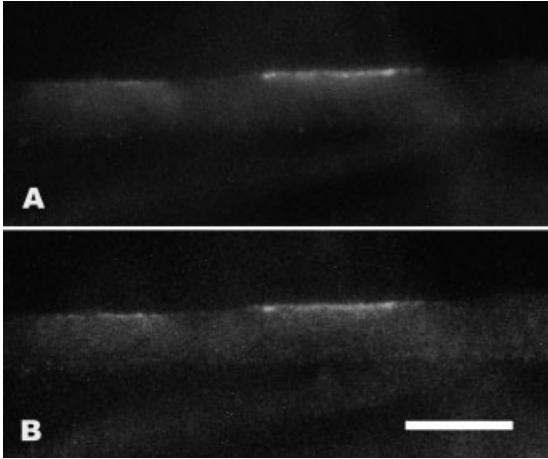


Figure 4 Cortical colocalization of myosin Va and kinesin in putative rat PARPs. Myosin Va and kinesin colocalize in discrete cortical domains resembling periaxoplasmic plaques. Corresponding region of a rat axon labeled (A) with myosin Va pAb, and (B) with IBII mAb for kinesin demonstrates that both proteins are present in the same domain, and that they share a very similar pattern of distribution. Scale bar, 10 μ m.

yielded intense fluorescence labeling of PARPs and distributed punctate fluorescence in the Mauthner and rat axons, H2 mAb yielded only a diffuse fluorescence distribution in axons [Fig. 3(E,F)]. This indicates that the KIF3A kinesin isoform is present in PARP domains, and that IBII mAb also recognizes the 85 kDa KIF3A heavy chain of heterotrimeric kinesin II.

In contrast to myosin Va and kinesin immunoreactivities in PARP domains, a polyclonal antibody against the carboxy terminus of rat dynein heavy chain, which yielded a single band in Western blots, appeared only as random punctate fluorescence signals in axoplasm (Fig. 5). It appears unlikely that there is a direct dynein function dedicated specifically to the biology of PARPs.

Putative Roles of Molecular Motors in Ribosomal Domains of Myelinated Axons

Evidence indicates that a variety of cargoes, including mRNAs, ribosomes, and RNPs, can interact either directly with the heavy chain, with light chains, or indirectly through adaptor proteins, and then be transported by myosin Va and kinesin molecular motor proteins (Rogers and Gelfand, 2002; Palacios and St Johnston, 2001; Karcher et al., 2002). Myosin Va can also interact directly with the kinesin heavy chain (Huang et al., 1999), and there are reports of other cooperative interactions of actin- and microtubule-

based transport systems (see Vale, 2003). Recently, radiolabeled rat neuronal BC1 RNA was shown to be rapidly transported *in vivo* in the Mauthner neuron after intracellular injection, and to localize in cortical “foci” along the Mauthner axon that were inferred to be PARP domains (Muslimov et al., 2002). It was further shown that the localization of BC1 in the axon was a two-step process that required the sequential participation of microtubules for long-range axial transport and of actin filaments for local radial transfer and focal accumulation in cortical domains.

Inasmuch as PARPs are discrete domains to which RNA-containing translational machinery is likely to be translocated from the cell body and docked locally, it is noteworthy that some potential motor proteins have been identified that could serve such functions. Myo4p, a yeast myosin V ortholog, was the first example of mRNA transport dependence on a class V myosin (Long et al., 1997). She2p mediates RNA binding to Myo4p and apparently directs the complex to its final destination (Kruse et al., 2002), and, as shown by Ohashi et al. (2002), moreover, this type of interaction is not just restricted to yeast. Both KIF5A or C (125 kDa) and KIF3A (\approx 80 kDa) are found in neurons associated with ribosomes (Ohashi et al., 2002) and mRNA (Aronov et al., 2002, respectively). In the former report, RNP complexes containing mRNA, ribosomes, RNA binding proteins, myosin Va, and kinesin were shown in mouse brain extracts and rat hippocampal neurons in culture. Furthermore, RNP granules that contained tau mRNA, kinesin KIF3A, and HuD mRNA binding protein were shown to be targeted to axons of differentiated P19 neurons

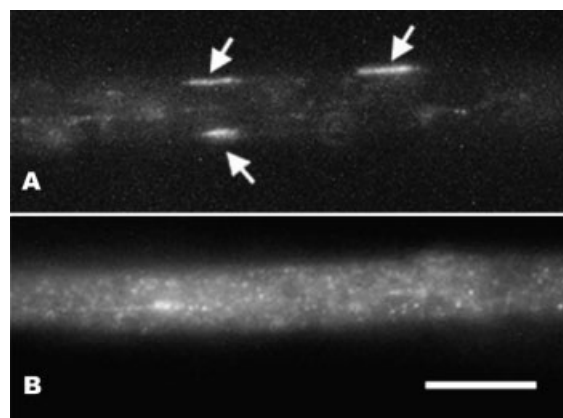


Figure 5 Dynein localization in mammalian axoplasmic whole-mounts. (A) PARPs labeled with YOYO-1. (B) Dynein immunofluorescence shows a typical pattern of fine and diffuse punctate signals in axoplasm without preferential localization in PARPs shown in (A) (arrows). Scale bar, 10 μ m.

(Aronov et al., 2002). The latter is consistent with a potential kinesin II-mediated microtubule-dependent mechanism of RNA translocation to the immature axon.

What is the significance of the novel preferential localization of myosin Va and of kinesin in PARP domains? Clearly, RNA trafficking to these targeted domains would presumably represent a major activity of molecular motor proteins. Thus, a concentration of molecular motor proteins may reflect off-loading of cargoes from distant sources leading to a local accumulation. In addition, on the basis of available ultrastructural and immunocytochemical information (see above), PARPs appear to be highly organized domains. Thus, molecular motor proteins may also mediate trafficking intrinsic to the domain, along with their cognate cytoskeletal systems. Another possibility is that molecular motors may govern the domain's dynamic organizational properties, as is exemplified in the case of the Golgi complex (De Matteis and Morrow, 1998).

We thank Dr. Roy Larson and Dr. Luciana Cassaletti for the gift of the antisera against myosin Va head domain and the antibody against the myosin Va medial tail domain, respectively. We thank Dr. Wade Sigurdson for the assistance in confocal imaging.

REFERENCES

- 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. *Prog Neurobiol* 62:1–62.
- Aronov S, Aranda G, Behar L, Ginzburg I. 2002. Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J Cell Sci* 115:3817–3827.
- Benech C, Sotelo JR Jr, Menendez J, Correa-Luna R. 1982. Autoradiographic study of RNA and protein synthesis in sectioned peripheral nerves. *Exp Neurol* 76:72–82.
- Bridgman PC. 1999. Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex. *J Cell Biol* 146:1045–1060.
- 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.
- De Matteis MA, Morrow JS. 1998. The role of ankyrin and spectrin in membrane-transport and domain formation. *Curr Opin Cell Biol* 10:542–549.
- Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AA, De Camilli PV, Larson RE, Mooseker MS. 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol* 119:1541–1557.
- 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.
- Goldstein LS, Yang Z. 2000. Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* 23:39–71.
- Hirokawa N. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279:519–526.
- Huang JD, Brady ST, Richards BW, Stenolen D, Resau JH, Copeland NG, Jenkins NA. 1999. Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature* 397:267–270.
- Kanai Y, Okada Y, Tanaka Y, Harada A, Terada S, Hirokawa N. 2000. KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *J Neurosci* 20:6374–6384.
- Karcher RL, Deacon SW, Gelfand VI. 2002. Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends Cell Biol* 12:21–27.
- Koenig E. 1965. Synthetic mechanisms in the axon. II. RNA in myelin-free axons of the cat. *J Neurochem* 12:357–361.
- Koenig E. 1991. Evaluation of local synthesis of axonal proteins in the goldfish Mauthner cell axon and axons of dorsal and ventral roots of the rat in vitro. *Mol Cell Neurosci* 2:384–394.
- Koenig E, Giuditta A. 1999. Protein-synthesizing machinery in the axon compartment. *Neuroscience* 89:5–15.
- Koenig E, Martin R. 1996. Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. *J Neurosci* 16:1400–1411.
- Koenig E, Martin R, Titmus M, Sotelo-Silveira JR. 2000. Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J Neurosci* 20:8390–8400.
- 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. 2002. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic* 3:859–865.
- Lerner EA, Lerner MR, Janeway CA Jr, Steitz JA. 1981. Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2737–2741.
- Long RM, Singer RH, Meng XH, Gonzalez I, Nasmyth K, Jansen RP. 1997. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* 277:383–387.
- Miki H, Setou M, Kaneshiro K, Hirokawa N. 2001. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7004–7011.
- Muslimov IA, Titmus M, Koenig E, Tiedge H. 2002. Transport of Neuronal BC1 RNA in Mauthner Axons. *J Neurosci* 22:4293–4301.

- Ohashi S, Koike K, Omori A, Ichinose S, Ohara S, Kobayashi S, Sato T, Anzai K. 2002. Identification of mRNA/Protein (mRNP) Complexes Containing Pur α , mStaufen, Fragile X Protein, and Myosin Va and their Association with Rough Endoplasmic Reticulum Equipped with a Kinesin Motor. *J Biol Chem.* 40:37804–37810.
- Palacios IM, St Johnston D. 2001. Getting the message across: the intracellular localization of mRNAs in higher eukaryotes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:569–614.
- Rao MV, Engle LJ, Mohan PS, Yuan A, Qiu D, Cataldo A, Hassinger L, Jacobsen S, Lee VM, Andreadis A, et al. 2002. Myosin Va binding to neurofilaments is essential for correct myosin Va distribution and transport and neurofilament density. *J Cell Biol* 159:279–290.
- Rogers SL, Gelfand VI. 2002. Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 12:57–62.
- Sotelo JR, Benech CR, Kun A. 1992. Local radiolabeling of the 68 kDa neurofilament protein in rat sciatic nerves. *Neurosci Lett* 144:174–176.
- Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cardenas M, Koenig E, Sotelo JR. 2002. Myosin V and Kinesin motor protein are enriched in ribosomal domains (periaxoplasmic plaques) of myelinated axons. *Mol Biol Cell* 13:2678 Suppl.
- 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, Koenig E. 2000. Localization of beta-actin mRNA in cryptic ribosomal periaxoplasmic plaque domains of myelinated axons. *Mol Biol Cell* 11:800 Suppl.
- Stafford P, Brown J, Langford GM. 2000. Interaction of actin- and microtubule-based motors in squid axoplasm probed with antibodies to myosin V and Kinesin. *Biol Bull* 199:203–205.
- Tabb JS, Molyneaux BJ, Cohen DL, Kuznetsov SA, Langford GM. 1998. Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *J Cell Sci* 111:3221–3234.
- Tobias GS, Koenig E. 1975. Axonal protein synthesizing activity during the early outgrowth period following neurotomy. *Exp Neurol* 49:221–234.
- Towbin H, Staeheling T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350–4354.
- Vale RD. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112:467–480.

Experimentos adicionales. Resultados y discusión.

La colocalización de MVa con HuD, confirma que algunos de los gránulos axonales MV- positivos corresponden a RNPs. HuD es una proteína de la familia de proteínas Hu, las cuales se unen a los ARN mensajeros que contienen elementos ricos en adenina y uracilo (*AREs*, según su sigla en inglés) en las regiones UTR de su secuencia (63), aumentando su estabilidad. Son a los efectos de los siguientes experimentos, marcadores de RNPs.

La figura 1 muestra un axón procedente de una raíz dorsal el cual fue simultáneamente marcado con anticuerpos anti MVa, anti HuD y la sonda fluorescente YOYO-1. Las señales de los anticuerpos anti MVa y anti HuD marcan levemente la placa ribosomal periaxoplásmica evidenciada por el YOYO-1. Los aspectos más destacables de esta microfotografía son en primer lugar, la señal de HuD sobre la placa. Esto sugiere la presencia de ARNm en esa región. En segundo lugar, es interesante el alto grado de colocalización que se aprecia a la simple inspección visual, entre MVa y HuD, indicando a su vez que una parte importante de la MVa presente en el axón estaría formando parte de RNPs y que muchas de éstas contienen ARNm. En contraposición, es llamativa la poca colocalización que muestra la señal de YOYO con cada una de las otras dos. Debido a que el YOYO-1 es una sonda que emite una señal que es lábil y muy dependiente de la integridad del ARN presente en el tejido (inclusive luego de fijado con PFA), este aspecto debería ser relativizado. Algunas señales intensas de YOYO que permanecen en la preparación muestran co localización con miosina y HuD; el tamaño aparente de las estructuras marcadas triplemente, así como la composición (ARN, HuD y MVa) son muy indicativas de RNPs del tipo “gránulos de ARN”, según la clasificación comentada. Es difícil interpretar el significado de la fracción de YOYO-1 que no colocaliza con nada; podría tratarse de mitocondrias, las cuales contienen ARN ribosomal u otros ARNs.

La miosina Va y la kinesina (kif3A) colocalizan dentro y fuera de las PARPs. El hecho que ambas proteínas motoras co localicen en las PARPs, no implica necesariamente que ellas estén formando parte de un complejo motor doble, tal como se especula que estén funcionando. Para explorar esta posibilidad, sería necesario demostrar por un lado, su co localización a nivel de partículas (RNPs), o sea identificar RNPs en el axón y ver si ambas proteínas cohabitan en esa estructura. En segundo lugar

y mas allá que se verifique esa co localización, debería intentarse verificar que exista interacción física (directa o no) entre ambos motores.

La figura 2 es una aproximación en ese sentido. En ella se estudia la hipotética interacción entre ambos motores dentro y fuera de la PARP, evidenciada con una inmunomarcación con anticuerpos anti proteínas ribosomales *P*.

La presencia simultánea de ambos tipos de motores moleculares ya ha sido comentada en el artículo precedente. Sin embargo la figura 2, por ser de mejor calidad y resolución que la publicada en ese artículo, nos permite visualizar que mas allá de la coincidencia topológica que hay entre ambas proteínas en la placa, parece existir una colocalización real entre ellas.

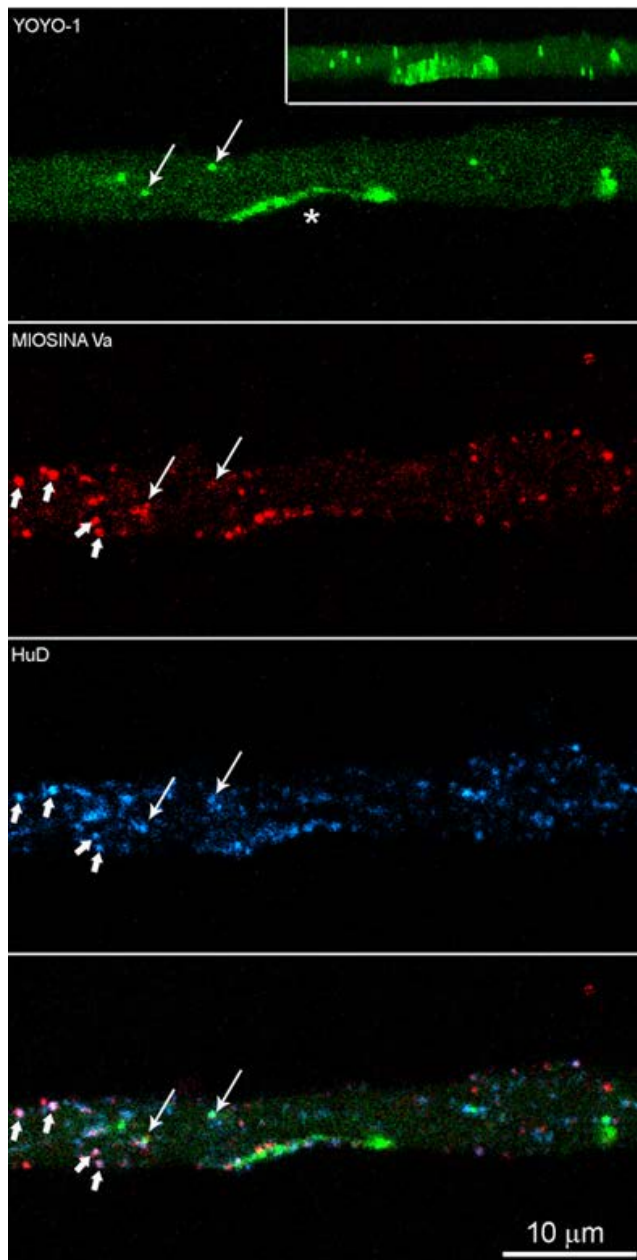


Figura 1: Relación entre ARN, MVa y HuD en axones de raíces dorsales. Microscopía láser confocal donde en un único plano del eje Z, se estudia la relación entre los tres marcadores. YOYO-1, señal correspondiente a ARN total presente, el cual está concentrado principalmente en la PARP (asterisco). Las flechas largas señalan estructuras en las que colocalizan los otros dos marcadores. El cuadro inserto representa la reconstrucción tridimensional del axón con todas sus capas y ligeramente rotado a fin de mostrar con más claridad la Placa. *Miosina Va* y *HuD* (cuadros centrales), muestran un patrón de marcación similar entre sí y con alto grado de colocalización; algunos ejemplos se destacan con flechas cortas. La última imagen de la serie resume las dobles y las triples colocalizaciones. Nótese el tamaño de éstas últimas estructuras.

Eso es apreciable sobre las señales granulares que se definen en la periferia de la placa y en aquellas partículas que se encuentran “libres” en el axoplasma. La coincidencia de una tercera señal (ribosomal) sobre alguna de ellas, vuelve a indicarnos la posibilidad que estemos ante un “gránulo de ARN”, única RNP que además de contener motores moleculares contiene la subunidad ribosomal 60S, donde residen las proteínas *P*. La presencia de gránulos con la triple marcación tanto dentro como fuera de la placa (encontrándose éstos últimos en las regiones inmediatamente periféricas así como en otras más alejadas), es muy sugestiva de un proceso dinámico, en el que la acumulación del material axonal disperso en forma de gránulos en zonas discretas del axón estaría en la génesis de las PARPs.

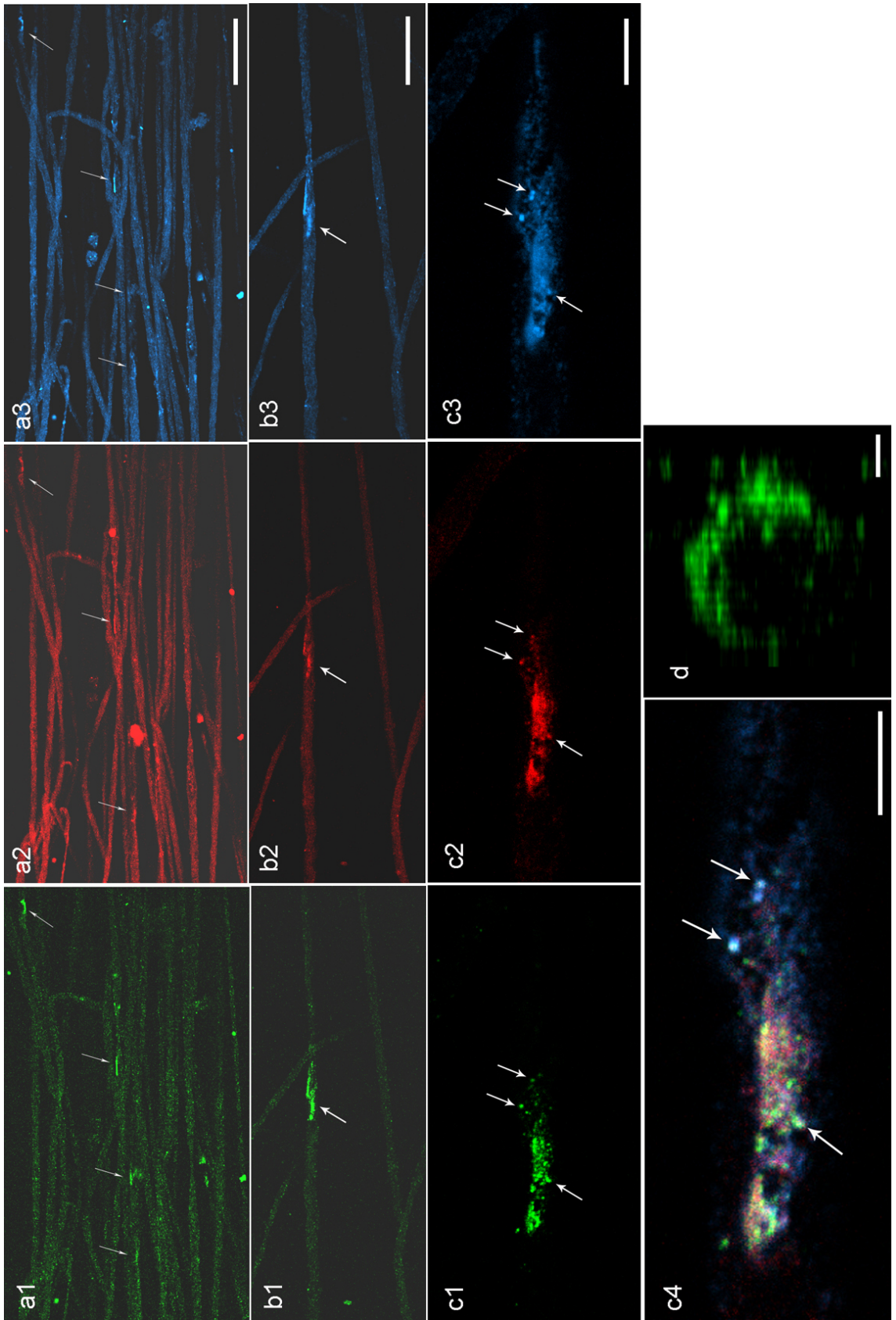


Figura 2. Miosina Va, kinesina y ribosomas en relación a las PARPs. Imágenes obtenidas por microscopía laser confocal donde las series *a, b y c* representan secciones ópticas únicas. **a1-3**, grupo de axones obtenidos *in toto* donde se observa panorámicamente la distribución de la Miosina Va, la kinesina y las proteínas ribosomales P (respectivamente) en un mismo plano confocal. Las flechas destacan algunas placas identificadas por los tres anticuerpos. Barra, 40 μm . **b1-3**, Grupo de axones similar al anterior donde se destaca una región (flecha) con dos placas periaxoplásmicas vecinas bien conservadas, ambas marcadas con los tres anticuerpos antes mencionados. Barra, 30 μm . **c1-4**, representa la misma región destacada en “*b*”, pero a gran aumento. De las dos placas, la que se estudia aquí es la señalada directamente con la flecha en “*b*”. La mayor resolución obtenida por el aumento empleado, permite resolver mejor las estructuras en el eje “*Z*”, razón por la cual cuando se analiza una sección óptica simple, una de las placas queda fuera de la imagen. Nótese que la colocalización de las tres señales es importante a nivel de la placa (regiones de color blanco), aunque las imágenes correspondientes a cada canal no son idénticas. Es de particular interés el estudio de la inmunomarcación en las regiones más periféricas donde se resuelven mejor los gránulos (flechas) y la colocalización de las señales es más claramente establecida. Barra, 10 μm en *c1-3* y 5 μm en *c4*. **d**, imagen del axón en la misma región estudiada en “*b*” y “*c*” reconstruida por la suma de todos los planos confocales. La imagen fue rotada en el plano X-Y de forma tal de ver el axón “cortado” transversalmente. La señal corresponde a la inmunomarcación anti MVa; nótese que la imagen resultante es sugerente de las obtenidas mediante cortes histológicos de nervio ciático y raíces medulares inmunomarcadas con anti MVa y revelada con di amino benzidina (ver figura 2e-g en el artículo incluido en el capítulo I). Barra, 1 μm .

Las PARPs contienen ARNm. La posible presencia de ARN mensajeros en las PARPs resulta una predicción lógica, de acuerdo al modelo teórico que venimos desarrollando y a la vista de los resultados ya comentados aquí. Es en ese sentido que se intentó probar la existencia en las PARPs del otro elemento clave necesario para la síntesis proteica, los ARNm. Se estudió el ARNm codificante para la miosina Va. Se eligió este mensajero por varias razones. En primer lugar, ya se conocía su presencia y localización axonal, la cual resultó similar a la de la proteína que codificaba. En segundo lugar, sabíamos que la MVa se sintetizaba localmente, lo que podía llevar a pensar que si las PARPs son sitios de síntesis local de proteínas y el ARN de la MVa estuviera allí, entonces la marcación radioactiva observada en el nervio post-lesión podría tener allí su origen. Finalmente, si consideramos a la síntesis local de proteínas como un mecanismo que sustenta el mantenimiento axonal y la MVa como un protagonista del mismo, entonces tenemos una tercera razón para predecir la localización de su ARN mensajero en ese lugar.

La figura 3 muestra que efectivamente, el mensajero en cuestión se encuentra sobre las PARPs. Como la imagen corresponde a una observación de epifluorescencia convencional y la señal de YOYO-1 no es totalmente tolerante al proceso de hibridación *in situ*, la calidad de la imagen y la resolución final obtenida no son óptimas. En ese sentido, resulta difícil arriesgarse a especular sobre si la señal correspondiente a la hibridación está presente dentro o fuera de la Placa. Sin embargo en algunas microfotografías parece apreciarse señal de la sonda proyectándose desde los bordes de la PARP hacia componentes particulados más periféricos (flechas gruesas en figura 3). Estos podrían ser los mismos “gránulos” ya comentados.

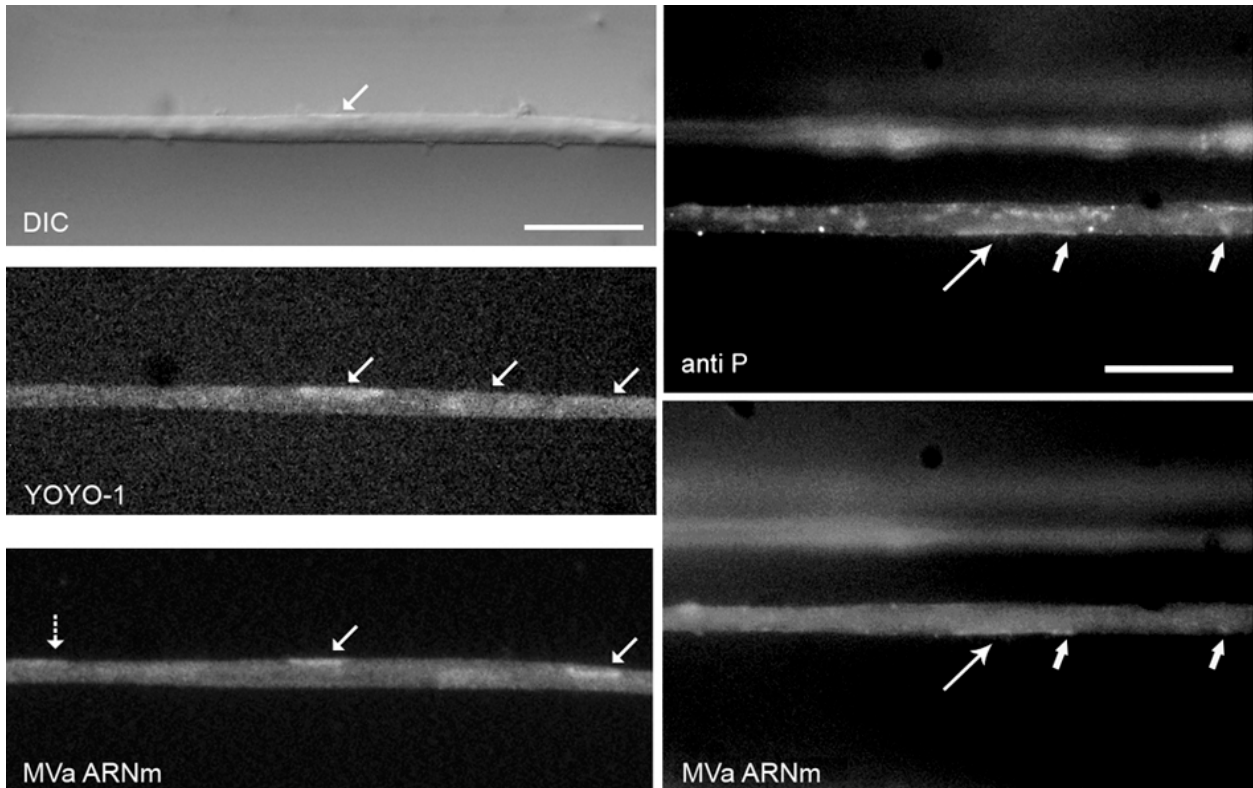


Figura 3. Presencia y distribución del ARNm de la miosina Va en el axón. Imágenes de hibridación *in situ* utilizando una sonda que se une a la región 3' del mensajero de la MVa, visualizado con microscopía de epifluorescencia convencional. *Izquierda*, axón aislado donde se observan PARPs (flechas) evidenciadas de tres formas diferentes: por su correlato morfológico en DIC, la tinción con YOYO-1 y la presencia en las placas, del ARN de la miosina Va. *Derecha*, serie similar a la anterior, pero en este caso la placa es puesta en evidencia usando un anticuerpo anti ribosomas (proteína P0). La inmunotinción es mucho mas apropiada que la utilización de YOYO, cuando se las quiere combinar con una hibridación *in situ*. La flechas gruesas muestran probables gránulos de ácidos nucleicos fuera de la PARP (ver discusión en el texto). Barra, 10 μ m.

La interacción de miosina Va con ribosomas y ARNm puede demostrarse bioquímicamente. Como se mencionó anteriormente, para demostrar la interacción de la miosina Va con los demás componentes de la RNP, no basta con la aproximación morfológica sino que es necesaria una aproximación bioquímica. En este caso, por medio de centrifugaciones en gradientes de sacarosa o de inmunoprecipitaciones de MVa o ribosomas a partir de homogeneizados de tejidos (raíces medulares y cerebro), se estudió la interacción entre los componentes de las RNPs. La inclusión del sistema nervioso central en el estudio tuvo un doble propósito. Por un lado podría considerarse un control positivo, teniendo en cuenta la conocida asociación de proteínas motoras (miosina Va y kinesina 5) a RNPs de cerebro de rata (24). No se sabía si esas RNPs provenían de neuronas o de otro tipo celular presente en el tejido, o de que parte de la neurona fueron aisladas. Sin embargo, el complejo macromolecular estaba allí y esto permitiría compararlo con los axones de las raíces medulares, que resultaba un material biológico muchísimo mas dificultoso de manejar y con un panorama de resultados

incierto. En segundo lugar, la utilización del cerebro en paralelo a las raíces, permitió hacer algunas comparaciones así como profundizar en algunos aspectos que no habían sido explorados todavía, con la esperanza de poder extrapolarlos a los axones periféricos.

a) *Cosedimentación de la MVa con ribosomas.* Las imágenes de microscopía indican que la MVa se asocia con ribosomas y con ARNm (o al menos con HuD). Por otro lado, si bien la triple co localización es clara, también es parcial. La microscopía demuestra, por ejemplo que la co localización MVa-HuD, es aparentemente, mas frecuente. Considerando que las RNPs son complejos macromoleculares de naturaleza muy heterogénea, esta observación es compatible con una interpretación según la cual la MVa integra más de una población de RNPs. El estudio de la distribución de estos tres componentes a lo largo de un gradiente que separe la población de RNPs de acuerdo a su tamaño, puede arrojar más información respecto a esta idea. Para ello, se utilizó una preparación enriquecida en RNPs (Ohashi et al, 2002 24) purificada a partir de cerebro de rata. Esta preparación está libre de organelos celulares y citoesqueleto, pero contiene membranas, probablemente derivadas del retículo endoplásmico.

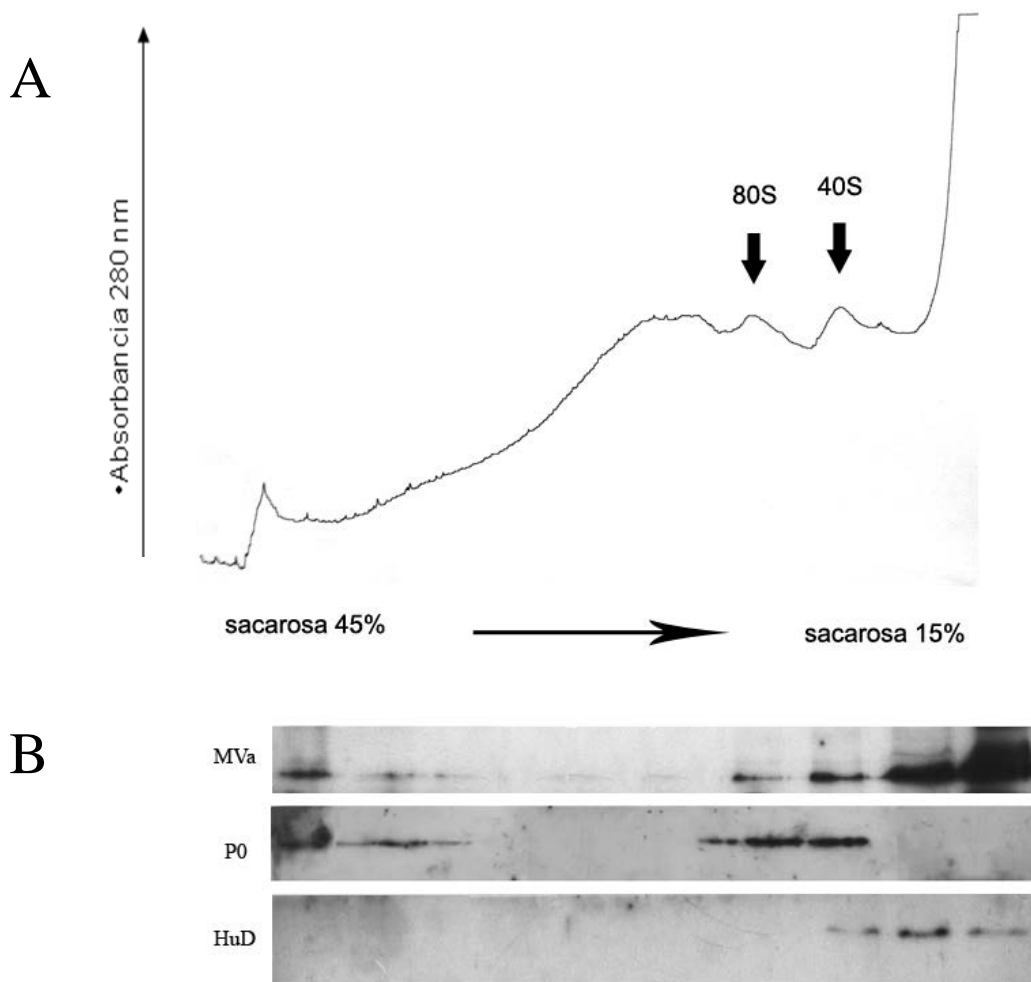


Figura 4. Sedimentación de ribonucleopartículas a lo largo de un gradiente de sacarosa. *A.* Cromatograma resultante de la medida continua de la densidad óptica a 280 nm, desde las regiones más densas (extremo izquierdo) a las menos densas del gradiente. Los diferentes “picos” que se resuelven en el gradiente sugieren que la población de RNPs contenidas en la preparación es heterogénea en tamaño y probablemente en estructura. Por ejemplo, es interesante constatar que existe un subgrupo de complejos muy densos, representados por un “pico” al principio (izquierda) del cromatograma. *B.* Los diferentes lugares ocupados en el gradiente por tres componentes previamente identificados (MVa, HuD y ribosomas), denota que la heterogeneidad de tamaño de las RNPs también tiene un correlato de heterogeneidad estructural. Por ejemplo, las partículas más pesadas que contienen ribosomas y miosina Va representan tal vez, “gránulos de ARN”. Mientras tanto, las estructuras que comparten solo MVa y HuD corresponderían a “partículas de ARNm” (mRNPs).

El análisis de las proteínas específicas en las diferentes fracciones de un gradiente continuo muestra dos detalles de interés. En primer lugar, que dada una proteína, ésta ocupa más de una fracción en el gradiente. Si tenemos en cuenta que las proteínas que se encuentran solubles o formando parte de complejos relativamente pequeños, deberían situarse al comienzo del gradiente e ir sedimentando a medida que se asocian a partículas más pesadas, entonces podemos concluir que cada una de las tres proteínas forman simultáneamente parte de estructuras de diferentes tamaños (o más correctamente, masa). El caso de los ribosomas es claro, estos están distribuidos en dos

o tres regiones en el gradiente lo que equivale a tres tipos de partículas: sumamente pesadas (“pellet”), polisomas y monosomas (figura 4); tal distribución había sido descrita previamente en condiciones experimentales muy similares (12). Nótese que no hay señal en las partes superiores del gradiente; tal vez no existan proteínas *P* no ensambladas o se hayan perdido en las etapas iniciales de la purificación de las partículas. Es interesante notar la distribución de la MVa la cual sedimenta en la zona más pesada del gradiente (fondo del tubo), con los ribosomas y luego en regiones menos densas del gradiente donde ya no hay ribosomas. Es claro que la MVa podría estar compartiendo algunas partículas con los ribosomas, pero también que forma parte de otras claramente diferentes. La distribución de HuD también es sugestiva; sedimenta en las fracciones más livianas, superponiéndose parcialmente con la MVa. Salvando las distancias que pudiera haber entre partículas purificadas de cerebro y lo que pueda estar ocurriendo en los axones periféricos, estos resultados son coherentes con lo observado en las inmunocitoquímicas discutidas hasta ahora. De todas formas, hay que tener presente que la cosedimentación de dos proteínas en un gradiente de este tipo puede interpretarse tanto como la coexistencia de ambas en una misma estructura o como su asociación a dos o más grupos de partículas diferentes que compartan la misma masa y densidad.

b) Purificación de RNPs por afinidad con anticuerpos anti proteínas P y anti miosina Va (inmunoprecipitación). Si bien las purificaciones por inmunoprecipitación rinden muy poco material para estudios ulteriores, significan una preparación de máxima pureza. Así, si se utiliza un anticuerpo anti proteínas ribosomales *P*, las partículas entonces purificadas representan la subpoblación de RNPs que solo contienen ese componente. De esta forma, es posible confirmar si existe interacción del componente directamente inmunoprecipitado con otro hipotético, dependiendo si éste último es detectado o no junto al primero. Se realizaron inmunoprecipitaciones de ribonucleo partículas purificadas de cerebro de rata (las mismas usadas para los experimentos de cosedimentación), así como de extractos de raíces espinales. En ambos casos se pudo confirmar la interacción ribosomas- MVa (figura 5). De los ribosomas, se pudo comprobar que estaban constituidos por ambas subunidades (40 y 60S), pues contenían la proteína S6 de la subunidad menor en el caso de las partículas inmunoprecipitadas a partir de cerebro de rata, o el ARN 18S co purificado con las partículas de raíces medulares. Debido a que las inmunoprecipitaciones de partículas provenientes de cerebro rinden mucho más material que las provenientes de raíces, fue

posible en las primeras, explorar la presencia o no de kinesina co purificada con miosina Va y ribosomas. Como muestra la figura 5, la kinesina está presente en la fracción. Esto no debería sorprender, ya que la presencia de kinesina 5 ya había sido reportada previamente en condiciones similares (24). Lo que sí resultó novedoso fue que junto a la kinesina 5, también se detectó la kinesina 3. Esta proteína ha sido tradicionalmente asociada al transporte axoplásmico rápido de organelos, pero no al metabolismo del ARN. Recientemente, Aronov y col (57) demostraron su presencia en RNPs conteniendo HuD y el ARNm codificante para la proteína tau, en axones de células P-19 diferenciadas en cultivo. El otro grupo de resultados que sugieren un papel para kif 3 en el transporte de ARN, pero en axones maduros, son los detallados en el artículo incluido en este capítulo. Finalmente, los resultados hasta aquí discutidos también refuerzan esa posibilidad ya que demuestran por inmunohistoquímica que kif 3 colocaliza con ribosomas. Aparentemente, tanto kif 5 como kif 3 pueden ser reclutadas a RNPs en neuronas del sistema nervioso central, mientras que en axones de raíces medulares, la kinesina asociada con RNPs es la kif 3.

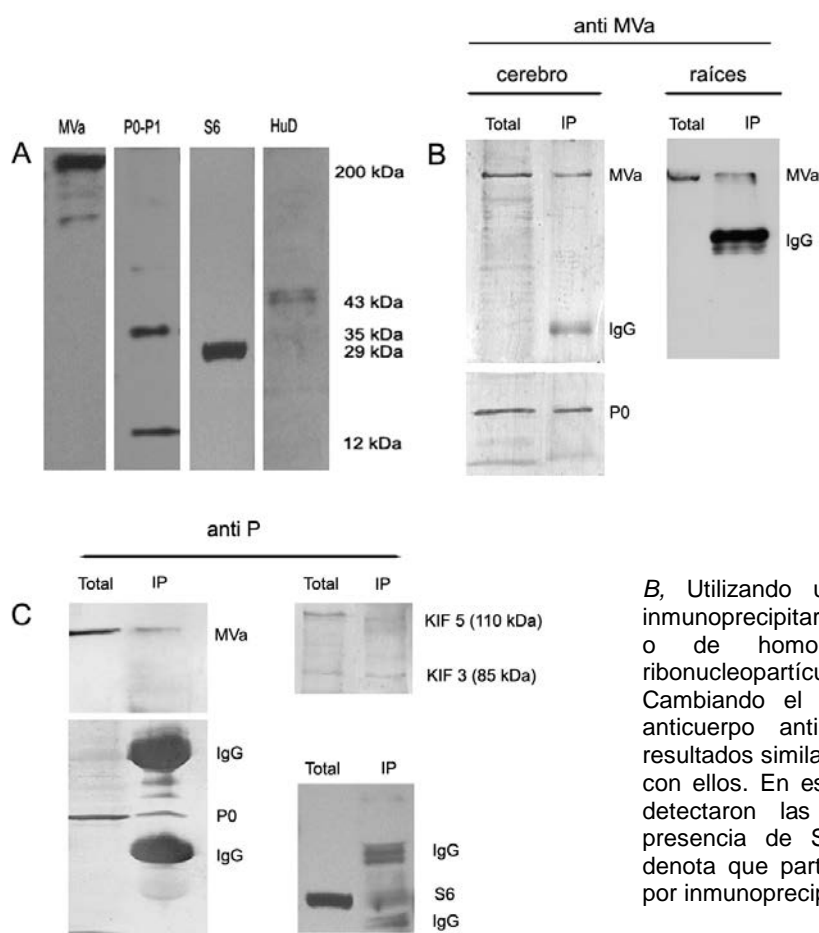


Figura 5. Composición de las ribonucleoproteínas asociadas a miosina Va. A, Presencia de proteínas de interés en la fracción total de RNPs, obtenidas de cerebro de rata. Mientras que las proteínas *P* son constituyentes de la subunidad mayor ribosomal, S6 lo es de la subunidad menor. Las proteínas identificadas en cada western blot, son indicadas arriba de cada figura.

B, Utilizando un anticuerpo anti MVa, se inmunoprecipitaron a partir de RNPs de cerebro o de homogenado total de raíces, ribonucleoproteínas conteniendo ribosomas C, Cambiando el anticuerpo anti MVa por un anticuerpo anti proteínas *P*, se obtienen resultados similares, pues la MVa se co purifica con ellos. En esta misma fracción también se detectaron las kinesinas 5A y 3A/C. La presencia de S6 en la fracción purificada, denota que parte de los ribosomas purificados por inmunoprecipitación están ensamblados

Otro aspecto importante que también se pudo aclarar es la existencia de la interacción MVa-ARN mensajeros, así como ribosomas-ARN mensajeros (figuras 6 y 7). Los ARN mensajeros fueron detectados por RT-PCR a partir de esos mismos inmunoprecipitados. La inclusión del mensajero para anquirina G dentro de los buscados tuvo como objetivo (asumiendo que este transcripto es neuro específico), confirmar que las partículas inmunoprecipitadas tuvieran origen neuronal y particularmente axonal en el caso de las raíces medulares. Los mensajeros de miosina Va y actina fueron incluidos por haber sido antes detectados en las PARPs y por lo tanto se transformaron en buenos candidatos a ser ARNm constituyentes de las RNPs axonales.

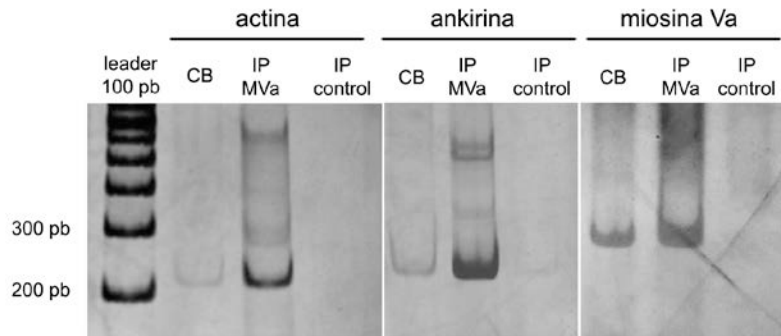


Figura 6. RT-PCR del ARN aislado de partículas de cerebro purificadas por afinidad (inmunoprecipitación), utilizando anticuerpos anti MVa. Se muestran productos de amplificación obtenidos utilizando primers específicos para los mensajeros de β - actina, ankirina G y miosina Va, los cuales producen fragmentos de 212, 224 y 274 pares de bases respectivamente (*IP MVa*). *CB*, amplificación a partir de ARN obtenido de cerebro competo (control positivo); En *IP control* se partió de una inmunoprecipitación realizada sin anticuerpo anti MVa. La confirmación de la existencia del ARNm codificante para ankirina G en la fracción de RNPs inmunopurificadas sugiere el origen neuronal del material utilizado.

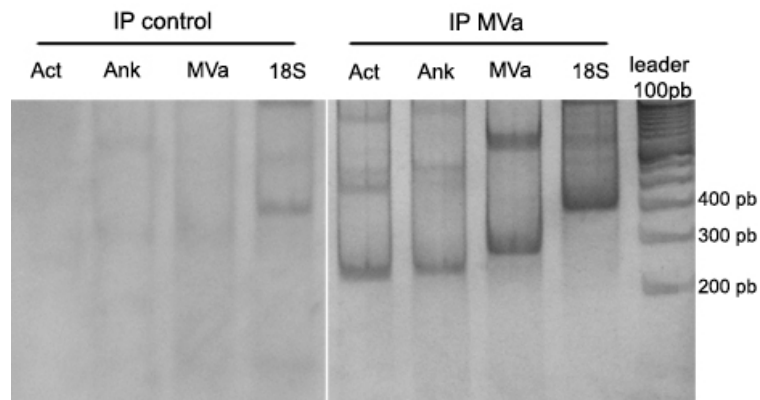


Figura 7. RT-PCR del ARN aislado de partículas axonales purificadas por afinidad (inmunoprecipitación), utilizando anticuerpos anti MVa. Se muestran productos de amplificación obtenidos utilizando primers específicos para los mensajeros de β - actina, ankirina G y miosina Va, los cuales producen fragmentos de 212, 221 y 274 pares de bases respectivamente (*IP MVa*). La presencia del ARN ribosomal 18 S (evidenciado por un producto de PCR de 400 pb), revela la co-purificación de ribosomas junto a estos mensajeros. La confirmación de la existencia del ARNm codificante para ankirina G en la fracción de RNPs inmunopurificadas sugiere el origen axonal del material utilizado. En *IP control* se partió de una inmunoprecipitación realizada sin anticuerpo anti MVa.

Es muy posible que una triple interacción entre estos componentes (es decir, que todos formen parte de la misma estructura) explique los resultados desplegados en las figuras 4 y 5. De todas formas, hay que tener en cuenta que la inmunoprecipitación no descarta que la proteína directamente inmunoprecipitada se encuentre en complejos macromoleculares diversos de forma tal que en algunos interaccione con un elemento particular y en otro con otros. De esta forma, no habría tal triple asociación, aunque los tres co sedimenten juntos. De todas maneras, considerando todos los resultados en su conjunto (los morfológicos y los bioquímicos), se podría arriesgar a decir que los axones maduros del sistema nervioso periférico son recorridos por “gránulos de ARN” del tipo de los descritos por Ohashi et al (24), lo cuales de acuerdo a estos mismos resultados, llegan a distancias considerablemente alejadas del soma neuronal. El hecho que estos componentes se hayan descrito tanto en las PARPs como en las partículas aisladas es muy sugestivo del origen de las placas, su dinámica y también su significado biológico.

Discusión general del Capítulo.

Como se ha mencionado, la existencia en los axones maduros de buena parte de la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas, es conocida de tiempo atrás. Este conocimiento está basado en hallazgos muchas veces ocasionales, como lo han sido las descripciones de ribosomas axonales por microscopía electrónica (64- 68). Este abordaje experimental y las características inherentes a la técnica, hace difícil un estudio sistemático y mucho menos dinámico. Si bien la aproximación experimental aquí utilizada es también de base descriptiva, el uso de la preparación de axones *in toto* ofrece algunas ventajas sobre la propia microscopía electrónica, los cortes histológicos o los cultivos celulares. Los resultados expuestos en este capítulo innovan en esta área del conocimiento en la medida que contribuyen a clarificar la naturaleza y el “formato” en el que se encuentran los ácidos nucleicos axonales. Se configura así, un panorama que permite considerar al axón como un territorio en cierta forma equivalente al resto de los territorios neuronales e inclusive a los presentes en otros tipos celulares. Esto quiere decir que esta región celular, al igual que otras, es alimentada en forma permanente por ácidos nucleicos empaquetados (ARNm, ribosomas y proteínas asociadas); éstos utilizarían sistemas de transporte activo para llegar a destino, donde muy probablemente

expresen su mensaje con el fin último de colaborar con el mantenimiento de la polaridad funcional y estructural, o generar cambios plásticos (69).

Un aspecto interesante a destacar es la presencia de componentes que son comunes tanto para las PARPs como para una subpoblación definida de RNPs. Estas últimas tienen todas las características de los llamados “gránulos de ARN”, pues contienen ribosomas ensamblados (proteínas *P* y RNAr 18S), proteínas motoras (Kif 3A/B y miosina Va) y presumiblemente ARNm (pues contienen HuD). De acuerdo con la literatura, estas estructuras, se caracterizarían además por ser móviles y no ser traduccionalmente activas. El hecho de posean ribosomas además de ARNm, indica que la represión de la traducción en estas partículas ocurre durante la etapa de iniciación.

¿Qué relación existe entre las PARPs y los gránulos de ARN? Las figuras 1 y 2 son particularmente sugestivas de un origen común o al menos una relación muy estrecha basada, por ejemplo en el intercambio de componentes. Eso explicaría por ejemplo, que todos los componentes que hemos descrito aquí en los gránulos, se hayan encontrado también en las PARPs. Otro aspecto que explicaría también esa hipótesis es la apariencia que adquiere la PARP en su región más periférica, la cual da la impresión de estar “desgranulándose”, confundiéndose en su periferia lo que corresponde a la placa con lo que son RNPs propiamente dichas. El hecho que las PARPs y los gránulos de ARN derivasen uno del otro no debería implicar que concebamos a la PARP necesariamente como un sitio de almacenamiento o de represión de ARNm y ribosomas. Si bien esta hipótesis es plausible, no podemos descartar las otras posibilidades (ya sea como sitio de síntesis de proteínas, hasta como un destino previo a la degradación de ARNm). Una alternativa para comenzar a descartar posibilidades es a través de la búsqueda en las PARPs de diferentes marcadores tanto de represión como de des represión del mensaje que transportan. Sabemos, por ejemplo que ZBP-1 se encuentra allí (70). Esta proteína, que como se discutió, está involucrada con el transporte y la localización final de algunos ARNm en neuronas y otros tipos celulares; es también responsable de la represión del mensaje durante su transporte. La fosforilación Src-dependiente de ZBP-1, implica la pérdida de la afinidad de la proteína por su elemento *cis* en el ARNm (71) y el consecuente levantamiento de la represión. Parece claro entonces que la sola presencia de la proteína ZBP no genera mucha información adicional. Sin embargo, la presencia de Src sería indicativa de actividad traduccional, mientras que su ausencia, sugeriría lo contrario. Finalmente, si tanto las PARPs como las RNPs axonales representaran la existencia de la maquinaria

responsable de establecer y mantener la identidad axonal, la población de ARNm contenida en ellas debería representar un conjunto selecto de genes y sus productos de expresión, su correlato funcional en el axón. Esto está aún por probarse.

¿Qué papel juega la miosina Va en todo este proceso? A pesar de todo lo investigado y discutido respecto a la asociación de esta proteína con los ácidos nucleicos en el axón, no está para nada clara su verdadera función. Mientras el transporte de las RNPs a largas distancias sería exclusivo de las kinesinas, la función de las miosinas (particularmente la MVa), estaría restringida al transporte local de las ribonucleopartículas desde y hacia la PARP, por ejemplo. De todas formas, es de destacar que no es claro que la placa posea una matriz de actina y que en todo caso, la actina que existe, estaría subyacente a la placa (61).

Las hipótesis aquí planteadas han girado en torno a la idea básica de la asociación (indirecta) de la MVa con ARNm. Su justificación está basada en el hecho, perfectamente conocido e inequívocamente demostrado, que la Myo4p tiene esa función específica. Sin embargo no se ha aportado ninguna prueba ni aquí ni en la literatura, que descarte la posibilidad de su eventual asociación y transporte preferente de ribosomas. La evidencia bioquímica, así como la inmunohistoquímica aquí discutida, podría interpretarse también en base a esta hipótesis alternativa. El hecho que la única forma conocida de transporte de ribosomas sea los gránulos de ARN, no descarta otras formas posibles como por ejemplo la de sus sub unidades independientes. Es claro que al menos durante un período breve de la existencia ribosomal esto ocurre, puesto que los ribosomas no salen del núcleo (luego de su ensamblaje en el nucleolo) como “gránulos de ARN”, sino como sub unidades. Por otra parte, la categoría referida como “granulo de ARN” está aún pobremente definida, por lo cual es muy probable que bajo esa denominación existan complejos macromoleculares de muy diversa estructura.

Finalmente, debiera evaluarse la posibilidad según la cual, la MVa pudiera estar involucrada con actividades no motoras. Si bien esta hipótesis no tiene sustento fáctico fuerte detrás, es importante tener presente que existen en la literatura numerosos reportes en los cuales se involucran proteínas motoras en funciones dudosamente relacionadas con la motilidad. Tal es el caso de la kinesina Kif4; esta proteína está involucrada en funciones muy diversas tales como el transporte de vesículas, de complejos macromoleculares y la segregación cromosómica durante la mitosis. Sin embargo, en neuronas juveniles esta proteína es capaz de interactuar en el núcleo celular con la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), un factor anti apoptótico. Así,

esta kinesina es capaz de regular la entrada de la neurona en apoptosis al disociarse de este factor en respuesta a señales provenientes de la membrana plasmática. La liberación de PARP-1, protege a la neurona y desencadena la translocación de la KIF4 desde el núcleo al citoplasma, lugar donde recupera sus funciones “clásicas” (72). Entre las miosinas, la primera que se ha descrito con funciones “no convencionales”, fue una isoforma de la clase Ic, la *miosina nuclear I* (NMI), la cual forma parte del denominado complejo de transcripción (73), junto a la ARN polimerasa I y a oligómeros de actina. En este proceso, la miosina regula de alguna forma la actividad polimerasa. En principio no habría actividad procesiva a cargo de la NMI, la cual a su vez es difícil de explicar pues esta isoforma es monomérica. La miosina VI colocaliza con ARNm y la ARN polimerasa II en el núcleo y también ha sido implicada en la traducción (74); en el citoplasma, es vista usualmente asociada a organelos derivados del sistema membranoso interno. Finalmente, la propia miosina Va también ha sido descrita en el núcleo de células en cultivo de las líneas PC12, HeLa y melanocitos B16-F19 (75), mas concretamente en sub dominios nucleares asociados al procesamiento post transcripcional del ARNm (*speckles*). La ubicación nuclear parece privativa de la forma fosforilada de la miosina, razón por la cual este evento fue observado solo después del desarrollo de anticuerpos que reconocen específicamente el sitio de fosforilación (serina 1650). Los autores especulan con algún papel de MVa en la movilización de los compontes del spliceosoma, pero hasta tanto no se demuestre fehacientemente la existencia de microfilamentos de actina en el núcleo, estas hipótesis no pasarán de ser una simple especulación. De acuerdo a todo lo expuesto, consideramos que la posibilidad que la MVa incorporada a RNPs, ejerza funciones no “convencionales” además de las clásicas de transporte, debería por lo menos ser tomada en cuenta.

Material y Métodos (no incluidos en el artículo precedente).

Inmunohistoquímica.

a) *YOYO- MVa- HuD*. Los axones obtenidos *in toto*, (ver artículo) fueron post fijados en paraformaldehído al 2 % en buffer fosfato salino (PBS) durante 15 minutos. Luego de sucesivos lavados con PBS, los axones se incubaron con ambos anticuerpos simultáneamente durante al menos dos horas. El anti miosina Va es un anticuerpo producido en cabra, adquirido en Santa Cruz Biotechnology y anti HuD está producido

en conejos y fue cedido por la Dra Perrone-Bizzozero, Departamento de Neurociencias en la Universidad de Nuevo México, NM. El lavado de los anticuerpos fue realizado utilizando PBS- tritón (0,1 %), en varios ciclos. Los anticuerpos secundarios utilizados (Invitrogen-Molecular Probes) fueron producidos en burro para detectar el anti MVa y en cabra para detectar el anti HuD, y marcados con Alexa 546 y Alexa 633, respectivamente. Para la marcación de los ácidos nucleicos axonales se utilizó YOYO-1 diluído en PBS, (50 nM, concentración final). Este último fue realizado luego del último lavado del anticuerpo secundario (hechos con PBS-tritón 0,1 %) y seguido de un lavado simple en PBS sin detergentes. Para su observación microscópica, los preparados se montaron en glicerol 50 %, buffereado.

b) MVa- kinesina- proteínas P. Los axones fueron obtenidos y post fijados análogamente a los anteriores. La incubación con los tres anticuerpos fue simultánea, utilizándose un anti MVa producido en conejo (caracterizado en los dos artículos precedentes), un anti kinesina monoclonal producido en ratón (IBII, Clon 28 adquirido en Sigma-Aldrich) y un anti proteínas P (Anti P, Immunovision Inc.), el cual es obtenido de pacientes humanos con enfermedad autoinmune. Los anticuerpos secundarios fueron (Invitrogen-Molecular Probes) los Alexa conjugados 488 (anti IgG de conejo, para detectar MVa), 546 (anti IgM de ratón para detectar kinesina) y 647 (anti IgG humanas para proteínas P).

Hibridación *in situ* y marcación de PARPs en axones *in toto*. Para la obtención de la preparación de axones enteros, se llevó adelante la metodología ya referida en el artículo, excepto por el uso de soluciones “RNAsa free”, obtenidas a partir del empleo de reactivos libres de ARNsas (incluida el agua) o por el uso de inhibidores tales como el di etil piro-carbonato (DEPC). Los axones fueron fijados durante 2 horas en paraformaldehído al 2 % en buffer fosfato salino. La estrategia de hibridación y el método de detección fueron básicamente los mismos que los relatados en el capítulo I.

En aquellos casos en que las PARPs fueron identificadas en base a inmunohistoquímica (anticuerpos anti P, figura 3, *derecha*), ésta fue realizada posteriormente a la hibridación. La detección secundaria se realizó utilizando anti anticuerpos conjugados a Alexa 488. En los casos en los que se usó YOYO-1 como sonda, ésta se utilizó al comienzo, o sea antes de la hibridación.

Microscopía. La observación de los resultados de la hibridación *in situ* y su correspondencia con las PARPs fue realizada utilizando un microscopio Olympus BX61, equipado con un filtro estándar para fluoresceína y rodamina. Para la adquisición de las imágenes se utilizó una cámara CCD enfriada Olympus DP70.

Las observaciones que requirieron un análisis estructural más fino, así como el estudio de la relación espacial entre sus componentes (co localización), se realizaron utilizando un sistema de microscopía laser confocal (Olympus Fluoview) equipado con 3 láser con emisiones en 488, 543 y 633 nm, respectivamente. Las reconstrucciones definidas en la imagen inserta en la figura 1, y figura 2d se realizaron a partir de secciones ópticas del eje Z de 0,3 μm de espesor tomadas con un lente 100 X de 1,35 de apertura numérica.

Identificación de la MVa, proteínas P y ARNm a partir de ribonucleo partículas y lisados de raíces medulares.

a) Purificación de RNPs a partir de cerebro (total) de rata. Un animal (rata Sprague-Dawley) de 150 gramos de peso es sacrificado por decapitación y su cerebro extraído inmediatamente. Se lo lava para quitar el exceso de sangre, utilizando un buffer Tris 20 mM, pH 7.5, MgCl_2 2mM, KCl 50 mM, sacarosa 250 mM, EGTA 0.1 mM, cicloheximida 1 $\mu\text{g/ml}$ y PMSF 1 mM como inhibidor de proteasas. El cerebro es homogeneizado en un homogeneizador vidrio-vidrio, utilizando 10 ml del mismo buffer por cerebro y posteriormente centrifugado a 4 $^\circ\text{C}$ a 10.000 g por 45 minutos. El sobrenadante resultante es ultracentrifugado a 120.000 g por una hora. El sedimento es resuspendido en 2 ml del mismo buffer (pero conteniendo KCl 150 mM), utilizando un homogeneizador teflón-vidrio. Se mantiene la suspensión en hielo durante 10 minutos para posibilitar una mejor disociación de las RNPs del citoesqueleto co purificado con ellas. Las partículas resuspendidas son finalmente centrifugadas a 10.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante de esta centrifugación (2 ml), representa la fracción de RNPs que se utilizaron para los ulteriores experimentos. Cuando no se la usó inmediatamente, la preparación fue conservada a -80 $^\circ\text{C}$.

b) Ultracentrifugación de RNPs en gradiente de sacarosa. Las RNPs en suspensión (0,5 ml de un total de 2 ml obtenido por cerebro) fueron sometidas a ultracentrifugación (160.000 g, durante 1 hora) en gradientes continuos de 15 % al 45 % en un medio conteniendo además Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 25 mM y MgCl_2 5 mM. Se utilizó un rotor de “ángulo móvil” SW65 y tubos de 5 ml de volumen total. Finalizada la

centrifugación, las muestras fueron colectadas desde el fondo del tubo usando una bomba peristáltica conectada a una celda de detección de UV, lo cual permite monitorear en forma continua las concentraciones de proteínas o ácidos nucleicos en los diferentes estratos del gradiente. Las muestras así recogidas fueron fraccionadas de a 300 μ l.

c) *Lisado de raíces medulares.* Un animal de 150 gramos de peso es sacrificado por decapitación, su columna vertebral es expuesta y utilizando tijeras de punta fina, se van cortando los arcos vertebrales para finalmente descubrir el canal vertebral. Las raíces medulares son cortadas a nivel de su entrada al agujero intervertebral. La médula conteniendo las raíces ventrales como dorsales es removida y sumergida en una placa de petri con suero fisiológico. Bajo lupa, se cortan las raíces a nivel de su punto de emergencia de la medula y se transfieren a un recipiente aparte. Cuando no se las usó inmediatamente, los tejidos fueron conservados a -80 °C. Para lisar las raíces, se les adicionó 1,5 ml de un buffer Hepes 40 mM pH 7.7, KCl 100 mM, EGTA 5 mM, ATP 5 mM y PMSF 1 mM para posteriormente sonicarlas durante 6 segundos en tres ciclos de aplicación-descanso iguales; de esta forma, el tiempo total efectivo de aplicación del ultrasonido fue de solo 3 segundos. Para completar el proceso de disgregación del tejido, la suspensión fue homogeneizada en un homogenizador vidrio-teflón. La muestra se clarifica mediante una centrifugación a 10.000 g por 15 minutos.

d) *Inmunoprecipitación de MVa y proteínas P.* La MVa y los ribosomas fueron inmunoprecipitados a partir de raíces medulares lisadas o RNPs purificadas de cerebro de rata. Debido a que la cantidad de material extraído de las raíces medulares es muy escasa, se requirió un animal entero (200 mg, aproximadamente) por cada inmunoprecipitación. A las muestras a inmunoprecipitar (1 ml de volumen total, aproximadamente) se les adiciona leupeptina 100 μ M (inhibidor de tiol proteasas) y aprotinina 50 unidades (inhibidor de ARNsas). A continuación son sometidas a un pre clarificación mediante una incubación con una cantidad equivalente a un volumen escurrido de 100 μ l de proteína A sefarosa (Amersham Biosciences), durante 1 hora a 4 °C y con agitación rotativa permanente. Una vez clarificada, la muestra es dividida en dos mitades. Una es incubada con 50 μ l de Proteína A sefarosa (volumen escurrido) conteniendo uno de los dos anticuerpos previamente unido a ella, mientras que la otra mitad es incubada con la misma cantidad de Proteína A sefarosa, pero sin anticuerpo. Esta condición es el control negativo de la técnica que evalúa la unión inespecífica de

algún componente de la muestra a la sefarosa. La inmunoprecipitación transcurre toda la noche (cuando se usa anticuerpo anti MVa) o unas 4 horas (con el anticuerpo anti P), con movimiento de rotación permanente y a 4 °C. Finalizado este período el sobrenadante es descartado y la proteína A sefarosa, con los inmunocomplejos unidos es retenida y lavada en 5 ciclos de 15 minutos cada uno, utilizando el mismo buffer en el que esta contenida.

e) Identificación de proteínas P y MVa. Las proteínas presentes en las fracciones obtenidas por centrifugación en gradiente o inmunoprecipitación, fueron separadas por electroforesis (SDS-PAGE) y transferidas a una membrana de PVDF para su posterior identificación por western blot. Los anticuerpos anti MVa y ribosomas fueron los mismos que se utilizaron para las inmunohistoquímica o inmunoprecipitaciones. Los western fueron revelados utilizando fosfatasa alcalina y BCIP/NBT como sustrato o quimioluminiscencia (Amersham Biosciences), según el grado de sensibilidad necesaria.

f) Retrotranscripción y PCR. El ARN contenido en los complejos macromoleculares inmunoprecipitados fue purificado utilizando TRI Reagent (Sigma-Aldrich), el cual es un proceso basado en la extracción de ARN a partir de tiocianato de guanidina y fenol (76). El ARN total purificado fue resuspendido en agua, cuantificado, e incubado con ADNsa I (5 unidades, durante 30 minutos, a 37 °C). Luego, 1 µg (de ARN purificado de RNPs de cerebro) o 0,05 µg (ARN purificado de raíces) fueron retrotranscritos usando oligo dT₁₅ (ARN de RNPs) o “random primers” (ARN de raíces) como cebadores de la enzima Superscript II RT (Invitrogen). Los controles negativos de las inmunoprecipitaciones fueron tratados de la misma forma, excepto en la cantidad de ARN retrotranscrito el cual correspondió a la cantidad que hubiere habido en el mismo volumen en que se tomó 1 µg o 0,05 µg (según el caso) de ARN de las condiciones experimentales. La amplificación de las diferentes secuencias se realizó en condiciones estándar; los detalles particulares para cada una se detallan en la siguiente tabla.

| Secuencia Blanco | Secuencia de los <i>primers</i> | Nº ciclos | Temp. de <i>annealing</i> | Confirmación por secuenciación |
|-------------------------|--|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| β-actina | 5´ CTGACGGGCAGGTCATCACCATTG (F). 3´ GTACATGGGACCGTAACGAACTGGC. (R) | RNPs cerebro: 30 Raíces: 35 | 58 °C. | Sí |
| anquirina G | 5´ AGCTGCGATGGCATCGACTCTC (F) 3´ GACTGTGCCACCTCTTTTCGCGA (R). | RNPs cerebro: 30 Raíces: 35 | 55 °C. | No |
| miosina Va | 5´ TGTCAGCATGGCATGGAACCCAG (F). 3´ ATGGCTTCCGCGTTCATCGTCAG. (R). | RNPs cerebro: 30 Raíces: 35 | 55 °C. | Sí |
| ARNr 18 S | 5´ CCGCAGCTAGGAATAATGGA (F). 3´ GGACGCCGAATTAACACTGAG. (R). | Raíces: 30 | 55 °C. | Sí |

Los fragmentos de amplificación fueron separados por electroforesis en acrilamida al 6 % y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) o con nitrato de plata.

Capítulo III

Movilización de ácidos nucleicos por miosina Va.

Introducción

El papel que pudiera caberle a la miosina Va durante el proceso de polarización funcional y morfológica del axón en la neurona madura, ha sido el punto central de la discusión con que cerró el capítulo anterior. Así, dos preguntas básicas quedaron planteadas sobre el final de la discusión: ¿tráfico de RNPs en torno a las PARPs o regulación de algún tipo sobre la expresión del ARNm que contienen? La primera pregunta, a su vez puede replantearse respecto al objeto último del transporte: ¿transporte de ARNm o de ribosomas?

Existe una herramienta muy útil para abordar ese tipo de cuestiones. Se trata del modelo *dilute letal*, el mismo modelo que se utilizó para evidenciar por primera vez la actividad motora de la MVa. Se trata de un mutante natural que no expresa la proteína. Esta proteína, o más específicamente una variante de *splicing* que no se encuentra presente en el tejido nervioso (77), resulta determinante para la correcta distribución de los organelos que contienen el pigmento característico presente en los melanocitos, los melanosomas (41). En melanocitos normales (los que expresan normalmente el gen *dilute*), los melanosomas son transportados a la periferia celular, donde en primer lugar son retenidos y posteriormente transferidos a los queratinocitos. La ausencia de la proteína genera en el melanocito un fenotipo diametralmente diferente al observado en las células normales: en vez de observarse una distribución periférica de los melanosomas, éstos se encuentran ubicados básicamente en la región peri nuclear. Consecuentemente, estas células resultan incapaces de transferir el pigmento al queratinocito. Basado en estas observaciones se desarrolló un modelo según el cual los organelos conteniendo el pigmento se mueven desde y hacia la periferia por medio de un mecanismo microtúbulo-dependiente, mientras que su secuestro en el citoesqueleto de actina cortical (y tal vez su transferencia al keratinocito) dependería de miosina Va. Al faltar la proteína que oficia de motor/ancla a los microfilamentos, los melanosomas

permanecen sobre la tubulina y particularmente en las regiones más centrales, razón por la cual los queratinocitos nunca reciben el pigmento (41).

El modelo mutante también ha sido útil para dilucidar el mecanismo de transporte dependiente de MVa en otros casos. Por ejemplo, la movilización de vesículas sinápticas y otros componentes membranosos, tanto en cultivos de neuronas provenientes del Ganglio Cervical Superior, como en el propio cerebelo. Sin embargo, en estos casos se observa algo ligeramente diferente a lo que ocurre en melanocitos. Las espinas pre sinápticas de las células de Purkinje poseen normalmente retículo endoplásmico, mientras que en los mutantes las espinas son totalmente carentes de este componente (43, 44). En estos casos, el retículo solo llega hasta el tallo dendrítico, pero no penetra en la espina. En los cultivos neuronales provenientes de ratones *dilute*, diversos organelos de origen membranoso tienden a acumularse en regiones distales y en los puntos de ramificación de los procesos axonales. Esta acumulación preferentemente distal, puede parecer inconsistente con lo observado en melanocitos y con el modelo planteado para estas células. Sin embargo, un estudio más detallado reveló que la acumulación de estos organelos marcados con GFP-MVa o vesículas sinápticas marcadas *in vivo* con anti SV2, coincidía con regiones donde existían microtúbulos altamente tirosinados (51). Teniendo en cuenta que las regiones tirosinadas revelan el extremo dinámico del microtúbulo, estos datos sugieren que la acumulación ocurría una vez que la carga llegaba al final de su viaje por los microtúbulos y antes de incorporarse a la red de actina. Una vez más, la falla radicaría en la incapacidad para transferir estos organelos desde el sistema de microtúbulos al de microfilamentos.

Esta hipótesis podría explicar diversas observaciones realizadas en animales mutantes, como la comentada ausencia de retículo endoplásmico en las espinas dendríticas de las células de Purkinje, el aumento en el volumen promedio de las terminales pre sinápticas de las células granulosas o el aumento de la cantidad y tamaño de las vesículas sinápticas allí presentes (51). Estos últimos datos son interpretados en el sentido que la ausencia de MVa (usualmente enriquecida en terminales sinápticas y espinas dendríticas), participa al menos en las células estudiadas, en la etapa última de movilización de estas vesículas, justo ahí donde dependen de los microfilamentos.

Considerando lo expuesto hasta aquí, así como la evidencia surgida en el anterior capítulo en referencia a la existencia de un complejo motor doble sobre las

RNPs, ¿será posible predecir para las RNPs un comportamiento similar a lo observado con los organelos membranosos? ¿Tendrá la ausencia de MVa consecuencias similares? ¿Existirán diferencias en la estructura de las PARPs en axones de individuos normales y mutantes? La hipótesis resulta interesante porque es directa y conceptualmente simple. Además, para testarla en el modelo de axones desnudos, solo haría falta repetir las inmunomarcaciones y las hibridaciones *in situ* en axones provenientes de animales *dilute* y así buscar las supuestas diferencias. Sin embargo hay dificultades de orden práctico que resultan insalvables. En primer lugar los animales *dilute* mueren un par de semanas luego de nacer, lo que obligaría a trabajar con tejidos sumamente jóvenes, los cuales a su vez, no reproducen exactamente la preparación obtenida en adultos jóvenes o adultos mayores. En segundo lugar, la variabilidad intrínseca de la técnica hace muy difícil extraer conclusiones de la comparación entre normales y *dilute*, máxime si las diferencias entre ambos son de tipo cuantitativo.

Alternativamente, se puede plantear una aproximación menos ambiciosa en un modelo mas reduccionista, como lo es el empleo de cultivos celulares. Allí, la dinámica del transporte de ARNm está bastante bien caracterizada (en neuronas y fibroblastos). Es de especial destaque el caso del ARNm codificante para β -actina el cual ha sido utilizado como paradigma para el estudio de los mecanismos de transporte de ARN mensajero. Como se ha mencionado, este modelo es particularmente útil debido a la tendencia que tiene este mensajero a localizarse compartimentalmente sobre las regiones ricas en microfilamentos (región *P* en conos de crecimiento neuronales (14, 19, 31) o lamelipodia en fibroblastos (26)) en respuesta a estímulos tróficos. En estas regiones, también se han observado ribosomas.

Teniendo en cuenta que tanto los ARNm como los ribosomas llegan a sus destinos finales (lamelipodia o región periférica del cono de crecimiento) en forma de RNP y que algunas subpoblaciones de RNPs contienen MVa, entonces los cultivos celulares de animales *dilute* y normales se presentan como un modelo adecuado para estudiar en forma directa la importancia de la MVa en el proceso. *En base al estudio de la distribución que presentan las RNPs en cultivos de fibroblastos provenientes de individuos mutantes y normales, se testaron independientemente las siguientes hipótesis: a) la participación directa de la MVa en el transporte y localización final de RNPs (identificadas usando un marcador específico para ARN); b) la participación directa de la MVa en el transporte y localización final de ARNm (utilizando el ARNm de*

actina como modelo e identificándolo por hibridación in situ); c) *la participación directa de la MVa en el transporte y localización final de ribosomas, utilizando inmunocitoquímica para la detección de las proteínas ribosomales P*. Análogamente a lo que ocurre con los melanosomas de melanocitos y otros organelos derivados del sistema membranoso interno, se espera verificar una alteración de la distribución de RNPs, ribosomas o ARNm codificante para actina en los referidos tipos celulares cuando la miosina Va está ausente.

Junto a las hipótesis de trabajo que se propone explorar en el desarrollo de este capítulo, se encuentra otra aún no discutida aunque planteada sobre el final de la anterior discusión. *Tal posibilidad es la de la implicancia de la MVa en la expresión génica, alternativamente (o adicionalmente) a la función de motor molecular*. Los elementos que justifican un planteo de este tipo son básicamente circunstanciales: la existencia de otras proteínas motoras involucradas en estos aspectos regulatorios (72-74), la presencia de MVa en el núcleo asociada al sistema de procesamiento de ARNm (75) y finalmente su asociación con ARNm/ribosomas en territorio citoplásmico. Finalmente, un resultado inesperado que apareciera en el transcurso de este trabajo, generará un elemento adicional que justificará explorar la referida hipótesis. Un elemento que dificulta aún un poco más el análisis de este punto es el hecho que la regulación de la expresión génica podría ocurrir a dos niveles: transcripción y traducción. Para testar la hipótesis de una modulación a cargo de la MVa a nivel de la transcripción, la aproximación experimental elegida fue el análisis y comparación, del perfil global de expresión génica en el sistema nervioso (cerebro y cerebelo) de animales controles y mutantes. Para ello se usaron microarreglos de DNA. La razón del uso de tejido nervioso se fundamenta en dos razones, por un lado el interés particular que en la fisiología del sistema nervioso se ha puesto en esta tesis. La segunda razón radica en que el tejido nervioso es el sitio de mayor expresión de la proteína, lo que indica que es particularmente importante allí. La sintomatología *dilute*, que es esencialmente neurológica, da cuenta de ello. A juzgar por esto último, el cerebelo parece particularmente importante. Recuérdese que es en este órgano donde se encontraron las alteraciones morfológicas mas claras. Para testar la hipótesis de una modulación a cargo de la MVa a nivel de la traducción, la aproximación experimental elegida fue el análisis y comparación entre controles y mutantes, del nivel de expresión

de proteínas, también en el sistema nervioso central. Para ello se usaron microarreglos de anticuerpos.

Algunos de los resultados obtenidos, fueron recientemente publicados. Estos datos son incluidos y discutidos en el artículo adjunto.

Participación específica del tesista en el artículo que se presenta a continuación.

El presente artículo, surge como resultado de algunos datos obtenidos al someter a prueba las hipótesis recién planteadas. Además de la iniciativa en ese aspecto, el tesista desarrolló los experimentos cuyos resultados se plasman en la figura 1 y 6 A, B, C y D. Se participó con los otros autores, en el diseño de la figura 7 y en la redacción del manuscrito.

Myosin-Va Mediates RNA Distribution in Primary Fibroblasts From Multiple Organs

Verônica P. Salerno,^{1,2†} Aldo Calliari,^{3,4†} D. William Provance Jr.,¹
José R. Sotelo-Silveira,^{3,5} José R. Sotelo,³ and John A. Mercer^{1*}

¹McLaughlin Research Institute, Great Falls, Montana

²Departamento de Biociências da Atividade Física-EEFD, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

³Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

⁴Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

⁵Laboratory of Molecular Technology, SAIC-Frederick, Inc., NCI-Frederick, Frederick, Maryland

Myosin-Va has been shown to have multiple functions in a variety of cell types, including a role in RNA transport in neurons. Using primary cultures of cells from organs of young *dilute-lethal* (*Myo5a^{d-1}/Myo5a^{d-1}*) null mutant mice and wild-type controls, we show that in some, but not all, tissues, RNA distribution is dramatically different in the homozygous null mutant cells. The dependence of RNA localization on myosin-Va correlates with the relative abundance of the brain-specific splicing pattern of the myosin-Va tail. We also show that myosin-Va is involved in RNA localization soon after synthesis, because the effects of its absence are diminished for RNAs that are more than 30 min old. Finally, we show that localization of β -actin mRNA is significantly changed by the absence of myosin-Va. These results suggest that myosin-Va is involved in a transient transport or tethering function in the perinuclear region. *Cell Motil. Cytoskeleton* 65: 422–433, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: Myosin-Va; mRNA transport; β -actin mRNA

INTRODUCTION

Myosin-Va, encoded by the *Myo5a* (originally *dilute*) locus [Mercer et al., 1991], is a member of one of the more ancient families within the myosin superfamily [Richards and Cavalier-Smith, 2005; Foth et al., 2006]. Multiple functions have been attributed to this molecular motor, including the transport/tethering of melanosomes, smooth endoplasmic reticulum, recycling endosomes, neurotransmitter vesicles, and mRNA [Reck-Peterson et al., 2000; Langford, 2002]). The absence of myosin-Va in homozygous null mutants causes neurological defects and lethality in *dilute-lethal* mice [Searle, 1952] and a subset of Griscelli syndrome cases in humans [Pastural et al., 1997]. Both null and hypomorphic *Myo5a* alleles cause dilutions in pigmentation caused by

[†]Verônica P. Salerno and Aldo Calliari contributed equally to this work.

Contract grant sponsor: NIH; Contract grant number: R01 GM066901; Contract grant sponsors: A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior fellowship; Comisión Sectorial de Investigación Científica-UDELAR and PEDECIBA; Contract grant sponsor: The Pew Latin American Fellows Program in the Biomedical Sciences and ALSA; Contract grant number: 963.

*Correspondence to: John A. Mercer, McLaughlin Research Institute, 1520 23rd Street South, Great Falls, Montana 59405-4900, USA.
E-mail: jam@mri.montana.edu

Received 26 September 2007; Revised 23 December 2007; Accepted 13 February 2008

Published online 20 March 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
DOI: 10.1002/cm.20272

a mislocalization of melanosomes in skin melanocytes [Provance et al., 1996].

While the molecular basis underlying the pigmentation phenotype of *Myo5a* mutants is well-characterized [Matesic et al., 2001; Fukuda et al., 2002; Hume et al., 2002; Provance et al., 2002; Wu et al., 2006]), the basis for the mutant neurological phenotype is less clear. Endoplasmic reticulum is missing in dendritic spines of cerebellar Purkinje cells [Dekker-Ohno et al., 1996; Takagishi et al., 1996] from null mutant rats, long-term synaptic depression (LTD) is abolished in null mutant mice [Miyata et al., 2000], and antibody inhibition of myosin Va causes a delay in neurotransmitter release [Rosé et al., 2003]. While these differences can explain the neurological phenotype, a clear pathway has yet to be demonstrated.

A role for myosin-Va in neuronal RNA transport provides an additional mechanism that may explain the neurological phenotype. Myosin-Va is a member of a complex that includes Pur α , mStaufen, Fragile X protein, a kinesin, and mRNA [Ohashi et al., 2002]. It also is found in motor axons at periaxoplasmic ribosomal plaques (PARPs) together with kinesin-II [Sotelo-Silveira et al., 2004], zipcode-binding protein 1 (ZBP1) and β -actin mRNA [Sotelo-Silveira et al., 2008], and myosin-Va mRNA [Sotelo-Silveira et al., 2006], suggesting a role in long-range mRNA transport in projection neurons. In more functional experiments, involvement of myosin-Va in movement of mRNA encoding Nd1-L (an F-actin-stabilizing protein) into dendritic spines was shown using null mutants, RNAi, and tail-fragment overexpression [Yoshimura et al., 2006].

Despite the severity of the neurological phenotype, it has not yet been shown that it is responsible for lethality in homozygous null mutant mice and humans. For this reason, and to identify more experimentally tractable systems than neurons for the study of myosin-Va's role in RNA transport, we assayed RNA localization in primary cells isolated from multiple tissues of null mutant and wild-type control mice. We observed significant differences in RNA localization in fibroblasts cultured from peripheral nervous system, adipose tissue, and lung, while we observed no difference in fibroblasts from spleen. The deficit in null mutant adipose fibroblasts was rescued by transfection with a full-length myosin-Va construct. Using pulse-chase experiments with bromouridine labeling, we show that the differences were most pronounced within 30 min after RNA synthesis. We show a dramatic difference for a specific message known to be transported (β -actin), as well as evidence for the physical association of β -actin mRNA and myosin-Va. These results suggest a general role for myosin-Va in RNA localization in multiple cell types.

RESULTS

Total RNA Distribution Is Altered in Mutant PNS Fibroblasts

To determine if myosin-Va functions in RNA transport or distribution, we stained primary PNS cultures from homozygous null mutant and wild-type control mice with SYTO[®] RNASelect[™], a cell-permeant nucleic acid stain that binds selectively to RNA over DNA. The results were striking; in the mutant cells, it often was difficult to distinguish nucleus from cytoplasm (Fig. 1A), while in wild-type control cells, perinuclear and nuclear fluorescence levels were very different (Fig. 1B). The difference was sufficiently robust that multiple observers blinded to genotype sorted micrographs from each individual experiment for genotype without error. However, we observed considerable variability between experiments; that is, when experiments were combined, observers incorrectly sorted some micrographs.

To confirm that these were differences in distribution of bulk RNA, and not artifacts caused by different amounts of total RNA, different cell shapes, or different proportions of cell types, we quantified total RNA per cell by flow cytometry of the same cells that were trypsinized, stained with SYTO[®] RNASelect[™] in suspension, and fixed. We observed no difference in RNA content between null mutant and wild-type cells in two independent assays (Fig. 1C), confirming that the micrographs represent differences in total RNA distribution.

The Mutant RNA Distribution Phenotype Is Observed in Primary Fibroblasts From Some, but Not All, Other Tissues

We observed a different pattern of total RNA localization in fibroblasts isolated from adipose tissue and lung than we did in cells from the more heterogeneous PNS cultures described above. In mutant fibroblasts, we observed higher fluorescence in the nucleus than in the cytoplasm (Fig. 2A), while in wild-type control fibroblasts, the difference was less pronounced (Fig. 2B). We also observed concentrated fluorescence just inside the nuclear membrane in mutant fibroblasts (arrows, Fig. 2A). We quantified fluorescence over 20-pixel-long, 5-pixel-wide regions spanning the nuclear/cytoplasmic boundaries, which gave statistically significant differences between wild-type and mutant for PNS, adipose, and lung fibroblasts (Figs. 2D–2F). However, we observed no difference in RNA distribution between wild-type and mutant spleen fibroblasts (Fig. 2G). One difference between tissues is the splicing of the tail domain [Seperack et al., 1995; Huang et al., 1998]; spleen has very little of the brain splicing pattern (Fig. 2C). Together with the results shown in Fig. 1, these results suggest that myosin-Va functions during RNA synthesis or

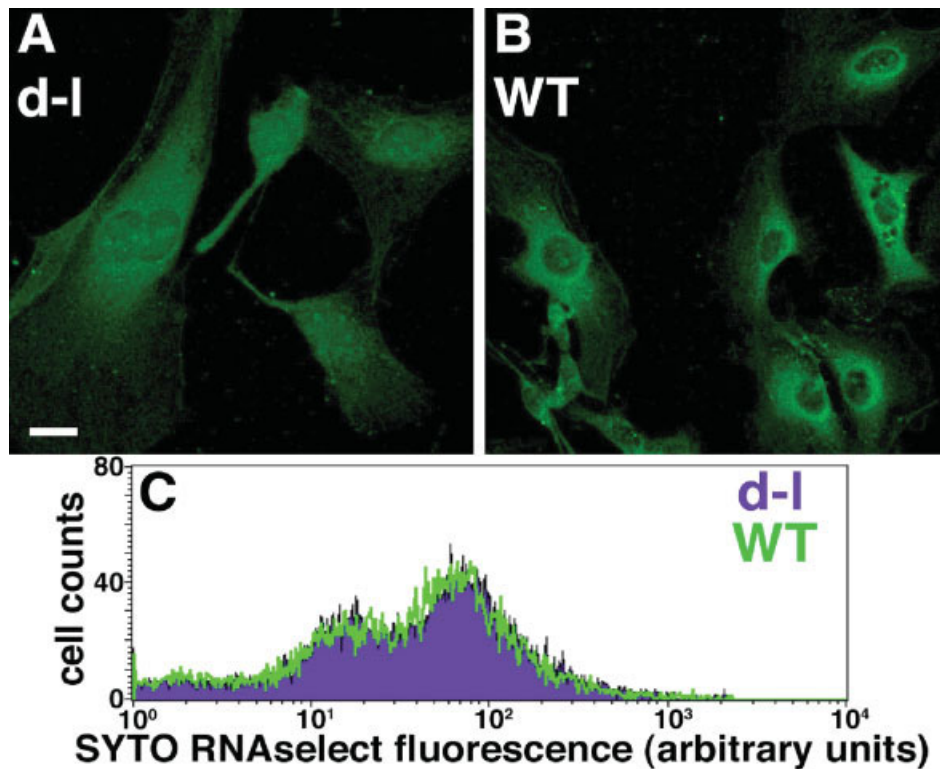


Fig. 1. A and B, SYTO[®] RNaselect[™] fluorescent labeling of nucleic acid in homozygous null (*dilute-lethal*) *Myo5a* mutant (A) and wild-type control (B) PNS cultures. Bar = 15 μ M. (C) flow cytometry analysis of mutant (purple) and wild-type (green) cells labeled with SYTO[®] RNaselect[™].

in RNA transport from or immediately outside the nucleus, and that this involves the myosin-Va isoform with the brain-specific splicing pattern.

Myosin-Va's Role in Transport/Tethering Is Early After Transcription

On the assumption that the difference between mutant and wild-type cells observed around the nuclear/cytoplasmic boundary represented transport or tethering events following soon after transcription, we switched from SYTO[®] RNaselect[™] staining of total, steady-state RNA to bromouridine (BrU) labeling of newly-synthesized RNA.

We tested for myosin-Va function during transport by varying chase times after loading with BrU for 60 min, removing the BrU for 30, 60, or 120 min before fixation. We observed more intense BrU labeling in the nuclei of mutant adipose fibroblasts (relative to cytoplasm) after a 30 min chase (Fig. 3A). By contrast, the ratio of nuclear to cytoplasmic BrU labeling in wild-type control fibroblasts was significantly lower (Fig. 3B).

We quantitated RNA transport by measuring the ratio of BrU labeling in nuclei *versus* cytoplasm for each chase interval (Fig. 3C). We observed statistically-significant differences at all time points, but the differences at

shorter chase intervals were much larger, suggesting that myosin-Va is involved in transport early after synthesis, in conjunction with a slower transport mechanism that does not require myosin-Va. These experiments also were performed on the heterogeneous PNS cultures shown in Fig. 1 with similar results (data not shown).

The Absence of Myosin-Va Has No Effect on RNA Synthesis

Since the results described above suggest that myosin-Va functions during or soon after RNA synthesis, we assayed the distribution of newly synthesized RNA by labeling with bromouridine without a chase interval (Fig. 4). Quantitation revealed no differences between mutant and wild-type cells after 10–60 min of BrU loading (Fig. 4G). These data suggest that the absence of myosin-Va affects neither BrU uptake nor RNA synthesis.

Rescue of the Mutant Phenotype by Expression of Myosin-Va

To determine if the mutant RNA-distribution phenotype could be rescued by expression of myosin-Va, we transfected homozygous null mutant adipose fibroblasts with a full-length myosin-Va expression construct encoding the brain splicing pattern (ABCE; [Seperack

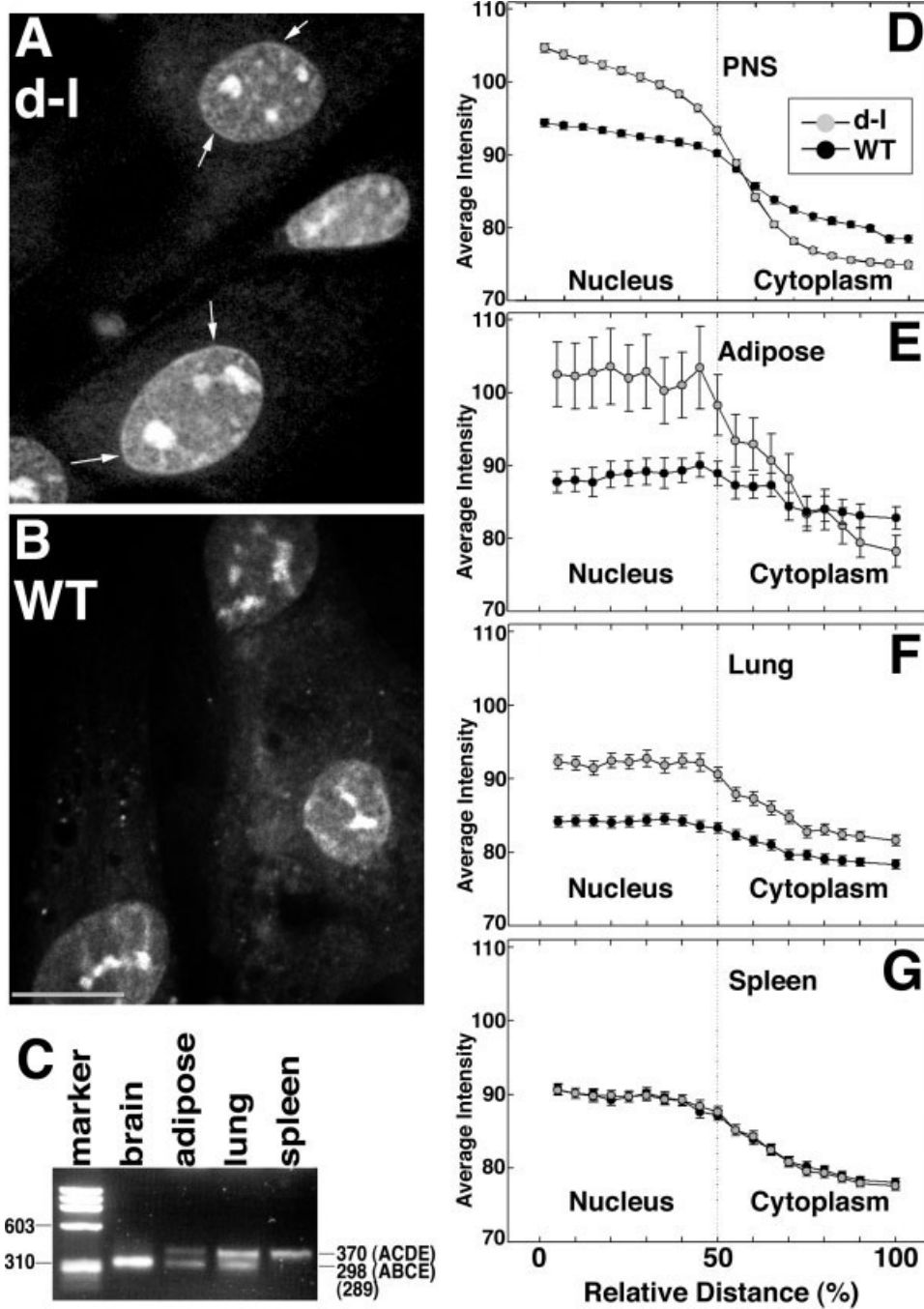


Fig. 2. A and B, SYTO[®] RNASelect[™] labeling of adipose fibroblasts from homozygous null mutant (A) and wild-type control (B) mice. Arrows denote the thin band of higher fluorescence at the edge of the nucleus that was more commonly observed in mutant fibroblasts. Bar = 10 μ m. (C) RT-PCR illustrating myosin-Va tail splicing in RNA from brain (amount loaded was reduced ten-fold to compensate for its high abundance) and from cultures of adipose, lung, and spleen cells. ACDE and ABCE refer to previously-described splicing

patterns [Seperack et al., 1995]. The marker lane is PhiX174 RF DNA cleaved with *Hae*III. D-G, quantitation (error bars represent standard error) of SYTO[®] RNASelect[™] fluorescence over 20-pixel-long, 5-pixel-wide regions with their midpoints set at the nuclear/cytoplasmic boundaries of peripheral nervous system (D), adipose (E), lung (F), and spleen (G) cells. Numbers of cells measured for each genotype/cell type combination ranged from 91 to 122, in three independent experiments.

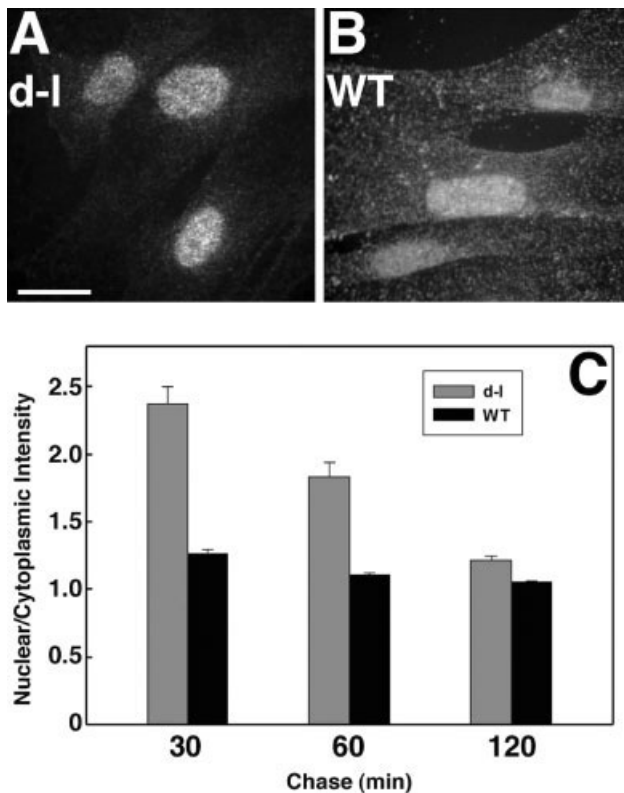


Fig. 3. A and B, bromouridine (BrU) incorporation in homozygous null mutant (A) and wild-type control (B) primary adipose fibroblasts incubated with BrU for 60 min and chased with medium lacking BrU for 30 min. Bar = 15 μ m. (C) ratio (with standard error) of nuclear to cytoplasmic labeling as a function of genotype and chase duration. Each bar represents measurements from 129 to 156 cells in three independent experiments.

et al., 1995)]. On the day after transfection, newly-synthesized RNA was labeled using BrU under the load/chase conditions described above, nuclear/cytoplasmic fluorescence ratios were measured, and transfected cells were identified by immunofluorescent detection of myosin-Va. The BrU quantitation is shown in Fig. 5A, and newly-synthesized RNA and identification of transfected cells by myosin-Va expression are shown in Figs. 5B and 5C respectively. These data show that mutant cells expressing myosin-Va had nuclear/cytoplasmic fluorescence ratios different from neighboring untransfected cells, and similar to ratios observed in wild-type cells (Fig. 3), with significant differences for 30 and 60 min chase times, but not for 120 min. No difference was observed between transfected and untransfected cells at 10–60 min of BrU loading without a chase period (data not shown). We also observed an overall reduction in the ratios due to the transfection protocol (contrast Y-axis scales of Figs. 3C and 5A); we also observed a similar reduction in labeling of mock-transfected mutant cells in the absence of DNA (data not shown). Transfection of

multiple heterologous control DNAs had no effect on the nuclear/cytoplasmic ratio (data not shown).

β -Actin Transcript Distribution Is Altered in Mutant Cells

The data described above suggest that myosin-Va functions in the export of newly-synthesized RNA from the nucleus, or transport immediately outside the nucleus. To test the hypothesis that myosin-Va is required for the transport of specific transcripts, we performed in situ hybridization on homozygous null mutant and wild-type cells using a β -actin antisense probe. Homozygous null mutant cells (Fig. 6A and B) had a dispersed distribution, while wild-type control cells (Figs. 6C and 6D) were labeled primarily at the periphery with less-intense perinuclear labeling. Confocal optical sections (not shown) showed that the labeling is not within the nucleus. A negative control probe with the scrambled sequence gave no significant signal (data not shown).

To test for a physical interaction between myosin-Va and β -actin mRNA, we immunoprecipitated myosin-Va from mutant and wild-type cytoplasmic fractions and assayed for the presence of β -actin mRNA using RT-PCR. As shown in Figs. 6E and 6F, β -actin transcripts were associated with myosin-Va in wild-type samples, but not in the mutant negative control sample.

DISCUSSION

Multiple functions for members of the myosin-V family have been characterized. Given the ancient origin of this family [Richards and Cavalier-Smith, 2005; Foth et al., 2006], this diversity of function is not surprising. These multiple functions make it more difficult to determine the molecular deficiencies responsible for the neurological and lethal phenotypes observed in homozygous *Myo5a* null mutant mice and humans homozygous for null mutant *MYO5A* alleles (Griscelli syndrome) [Pastural et al., 1997].

Directional transport and localization of mRNA has been demonstrated to provide temporal and spatial control of gene expression [Huang and Richter, 2004]. In neurons, the asymmetric distribution of mRNA contributes to synaptic plasticity [Burdwood, 1965; Huang and Richter, 2004; Huang et al., 2006; Schuman et al., 2006]. In yeast, it is well-established that a member of the myosin-V family, *Myo4p*, transports *Ash-1* mRNA [Takizawa et al., 1997; Beach and Bloom, 2001; Muller et al., 2007]. Therefore, an RNA transport/tethering deficit in *Myo5a* null mutant mice may be sufficient to cause the physiological [Takagishi et al., 1996; Miyata et al., 2000] and morphological [Dekker-Ohno et al., 1996; Takagishi et al., 2007] phenotypes observed in

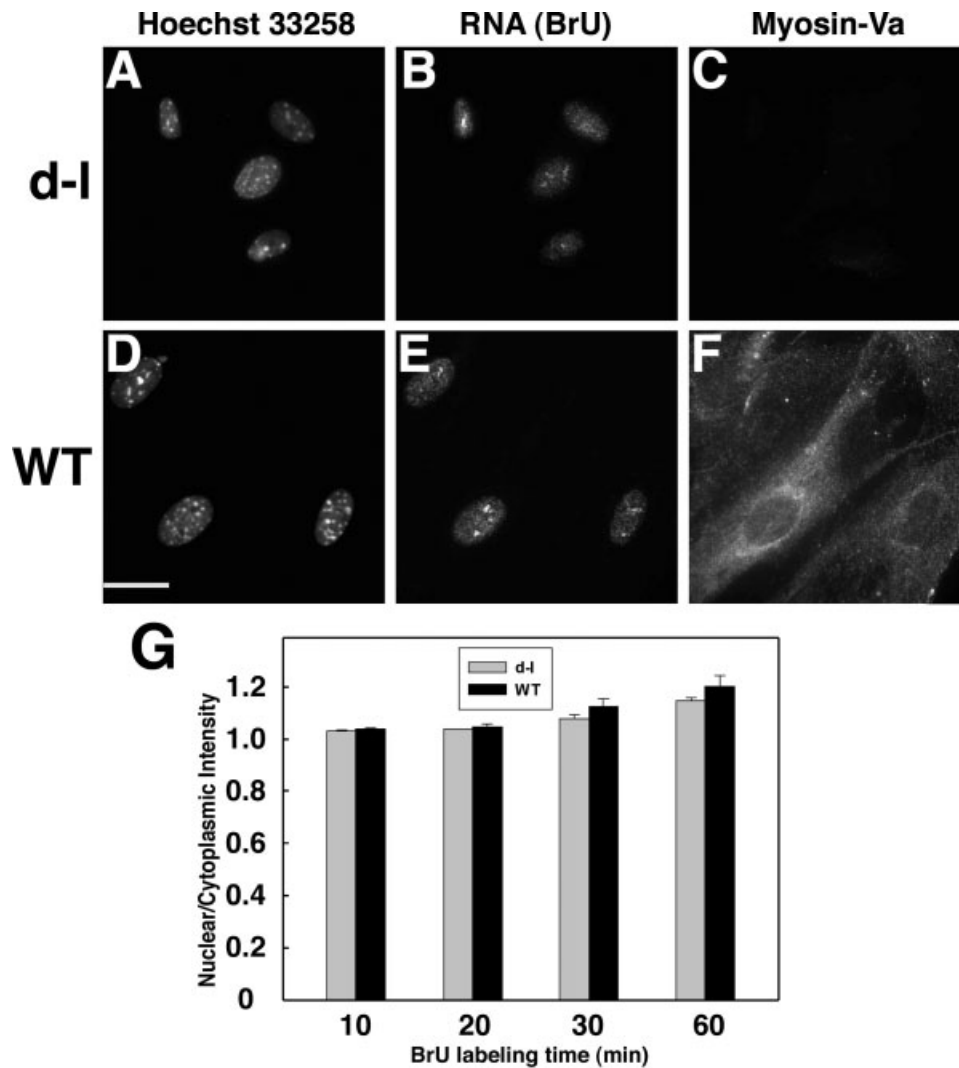


Fig. 4. A-F, fluorescence micrographs of homozygous null (A-C) and wild-type control (D-F) adipose fibroblasts stained for DNA with Hoechst 33258 (A,D), newly-synthesized RNA by BrU incorporation followed by anti-BrU (B,E), and anti-myosin-Va (C,F). Bar = 15 μ m. (G) distribution of newly-synthesized RNA as a function of time of exposure to BrU in homozygous null mutant (gray bars) and wild-type control (black bars) primary adipose fibroblasts. Each bar represents measurements taken from 99 to 150 cells in three independent experiments.

the central nervous system. Circumstantial evidence suggesting a role for myosin-Va in RNA transport in vertebrate neurons was first published in 2002 [Ohashi et al., 2002], but identification of a specific message associated with myosin-Va, Nd1-L, was only recently published [Yoshimura et al., 2006].

We therefore set out to determine if myosin-Va was involved in RNA transport in a wider variety of cell types. Our results from quantitation of newly-synthesized RNA labeled by BrU after variation of pulse and chase intervals (Figs. 3 and 4) suggest that myosin-Va functions as a transporter or tether at a very early stage of RNA transport, within 30 min of RNA synthesis. The

prominence of differences in the vicinity of the nuclear membrane suggests that myosin-Va functions either inside the nucleus or just outside the nuclear membrane. There are preliminary reports of myosin-Va in the nucleus [Pranchevicius et al., 2008] to support the former possibility; our future experiments will analyze isolated nuclei to distinguish between them. Our results suggest that another, albeit slower, mechanism exists for transporting RNA out of the nucleus, since newly-synthesized RNA merely leaves the nuclear region more slowly in the absence of myosin-Va.

Since null mutant pups grow more slowly than wild-type controls as soon as the phenotype is evident at

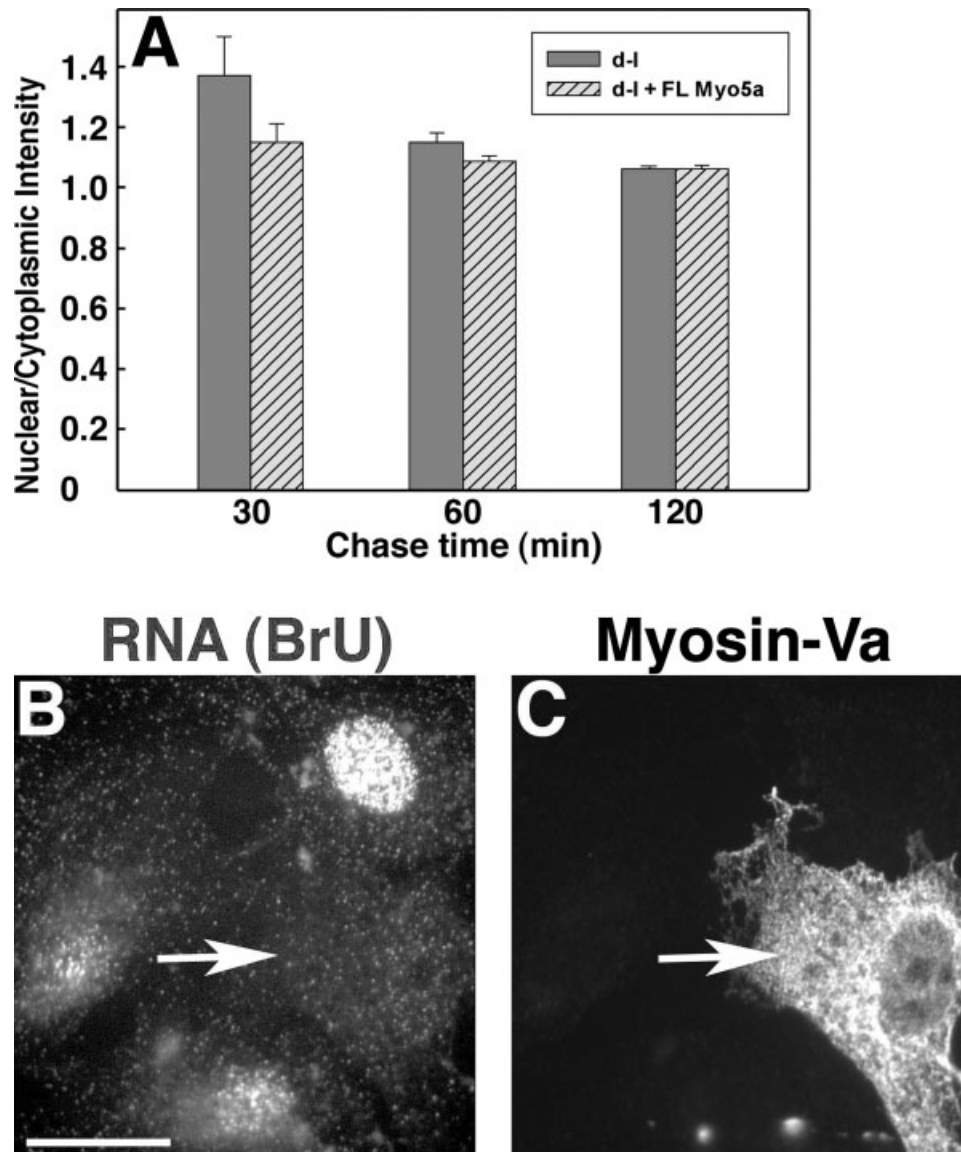


Fig. 5. Expression of myosin-Va in null mutant cells rescues the RNA distribution phenotype. (A) nuclear/cytoplasmic intensities of control *Myo5a* null mutant (d-I, gray bars) and null mutant expressing full-length myosin-Va (d-I + FL Myo5a, hatched bars) adipose fibroblasts. Each bar represents measurements taken from 93 to 130 cells in three independent experiments. (B) representative field after 60' BrU labeling; the nucleus of the transfected cell (arrow) is indistinguishable. (C) immunofluorescent detection of myosin-Va in transfected cell (arrow), same field as panel B. Bar = 15 μ m.

7–8 days of age, a trivial explanation for our observations is that the null mutant cells may not be as healthy as the wild-type cells. However, we observed no differences in total RNA content in PNS fibroblasts (Fig. 1C) or in distribution of RNA in spleen fibroblasts (Fig. 2G) between mutant and wild-type mice. The latter observation correlates with the low levels of *Myo5a* message and/or the low level of the brain-specific splicing pattern in spleen (Fig. 2C). In combination with recent data demonstrating that interaction of dynein light chain

2 (DLC2) with the myosin-Va tail is dependent on the presence of the brain-specific exon B [Hodi et al., 2006], our results contribute significantly to our understanding of the relevance of alternative splicing of the myosin-Va tail.

Mislocalization of β -actin mRNA in fibroblasts has been shown to change their direction of migration [Shestakova et al., 2001], indicating that it plays a role in establishing cell polarity. Since it has been shown that β -actin mRNA distribution is dependent on actin filaments

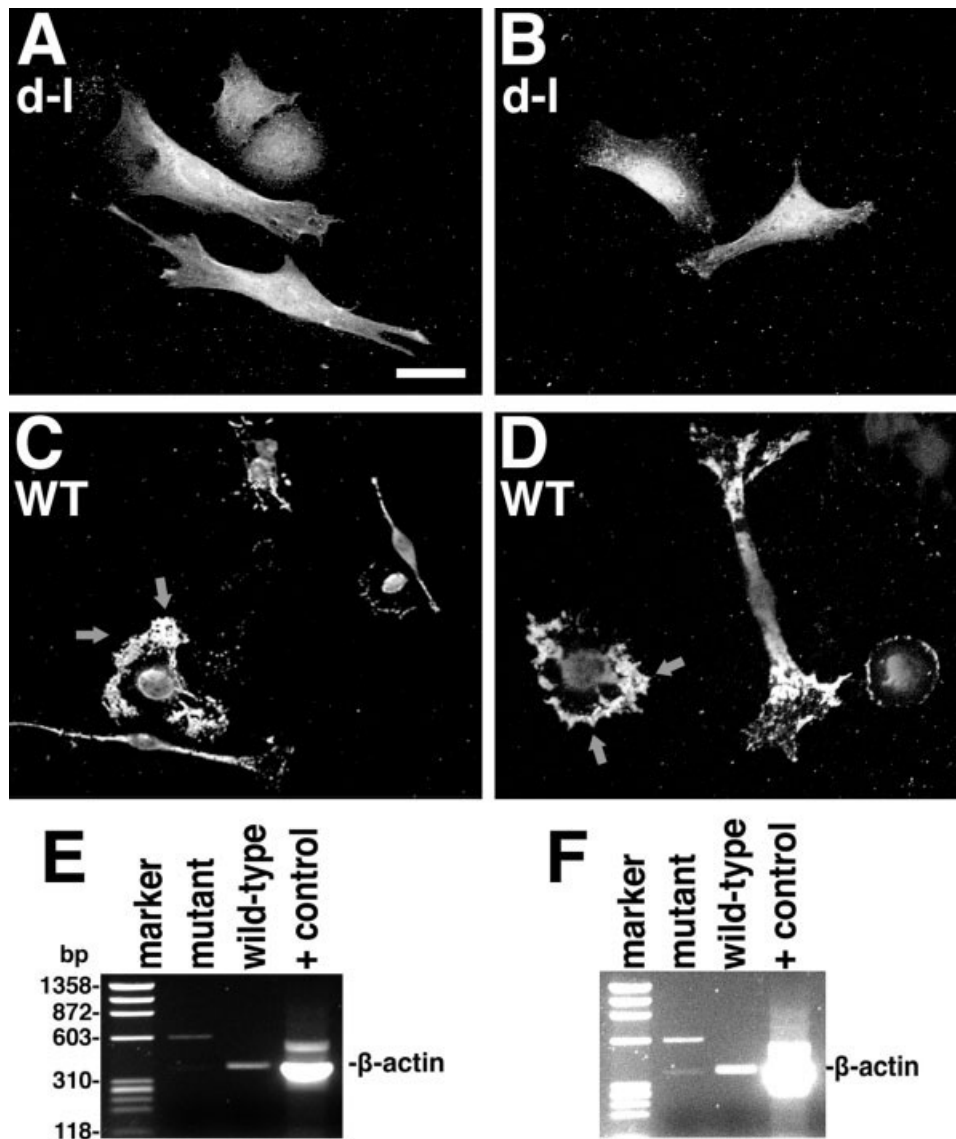


Fig. 6. A-D, in situ hybridization of homozygous null mutant (A, B) and wild-type control (C, D) PNS cells with a fluorescent probe for β -actin mRNA; arrows denote the high concentration of β -actin mRNA at the leading edge. Bar = 20 μ m. (E, F) RT-PCR of anti-myosin-Va immunoprecipitates from homozygous null mutant and wild-type control primary adipose fibroblasts. In F, the levels have been increased

to show the faint, but expected band in the mutant control lane, as well as the absence of background bands in the wild-type experimental lane, demonstrating the absence of contamination during gel loading from the positive control lane (RT-PCR from total HeLa cell RNA). The marker lane is PhiX174 RF DNA cleaved with *Hae*III.

[Sundell and Singer, 1991], we examined the distribution of β -actin message by in situ hybridization in wild-type and null mutant cells (Fig. 6). Wild-type cells had high concentrations of message in the periphery and just outside the nucleus, while the mutant cells had a more diffuse perinuclear distribution, with no increase at the periphery.

To assay for a physical association between β -actin message and myosin-Va, we immunoprecipitated myosin-Va and used RT-PCR to amplify β -actin mRNA from wild-type, but not null mutant, immunoprecipitates

(Figs. 6E and 6F). While this does not demonstrate a direct interaction, it is consistent with the in situ hybridization data. Our data are particularly interesting in the context of the demonstration that myosin-IIB has been shown in fibroblasts to be required for the proper localization of β -actin mRNA in response to growth factors [Latham et al., 1994; Kislauskis et al., 1997; Latham et al., 2001]. From our pulse/chase experiments, myosin-Va appears to be responsible for mRNA transport from the nucleus to the periphery, where myosin-IIB could capture mRNAs.

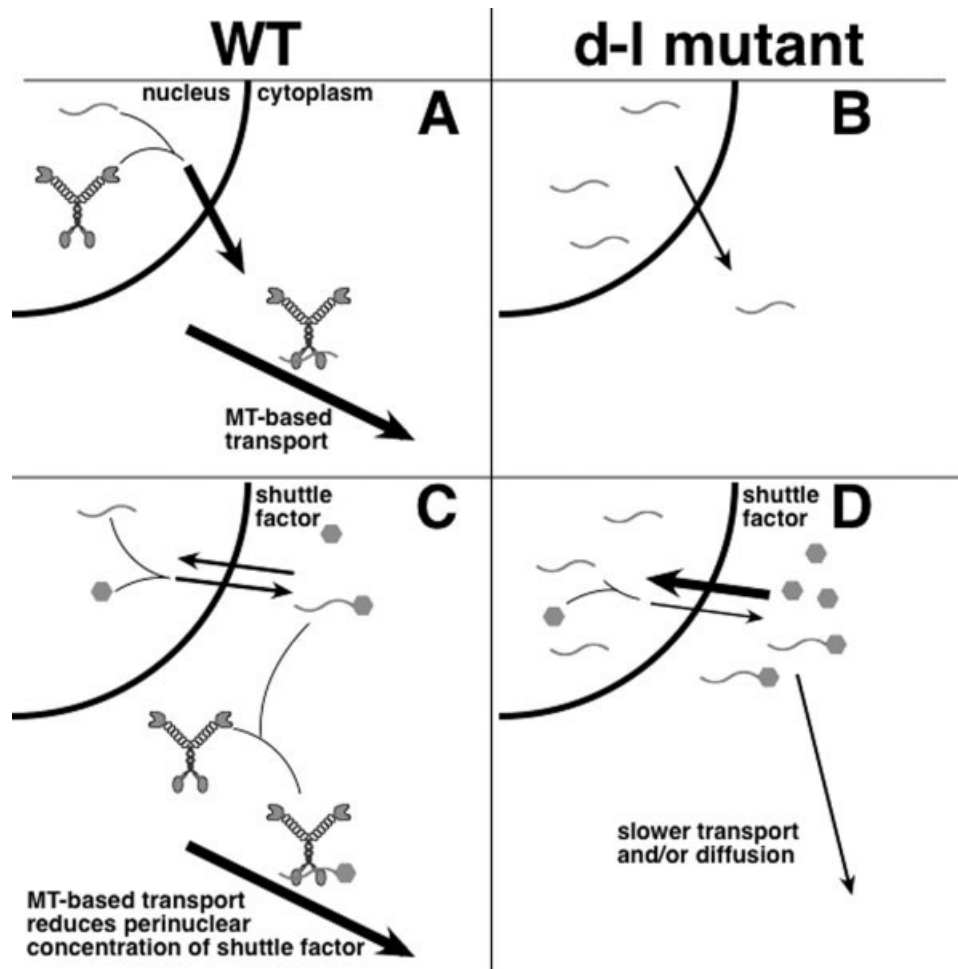


Fig. 7. Models for myosin-Va function in RNA transport in wild-type (A, C) and null *Myo5a* mutant (B, D) cells. (A, B) Nuclear myosin-Va functions in exit of newly-synthesized RNA (wavy lines) from the nucleus to the cytoplasm, also allowing for transport of the complex along microtubules. (B) In the absence of myosin-Va, the ratio of nuclear to cytoplasmic RNA increases. (C, D) Myosin-Va is only pres-

ent in the cytoplasm, and a shuttle factor (hexagons) binds RNA and is at equilibrium across the nuclear membrane. (D) in null mutant cells, the perinuclear concentrations of the shuttle factor and RNA are higher because transport and/or diffusion to the periphery are retarded.

These data are consistent with multiple models (Fig. 7) that differ primarily in their sites of myosin-Va function. In the first model (Figs. 7A and 7B), nuclear myosin-Va activity is required for the exit of some transcripts from the nucleus to areas from which the mRNAs can be transported anterogradely throughout the cell on microtubules. This model incorporates the preliminary observation of myosin-Va in the nucleus [Pranchevicius et al., 2008], and fits well with the common involvement of microtubule-based motors in RNA transport [Kindler et al., 2005], as well as the coincidence of myosin-V and kinesins on the same cargo [Huang et al., 1999; Stafford et al., 2000]. In mutant cells (Fig. 7B), the absence of myosin-Va would slow exit of transcripts from the nucleus. The second model (Figs. 7C and 7D) incorporates a shuttle (or protective) factor that binds mRNA and

reaches equilibrium by moving passively across the nuclear membrane. In mutant cells lacking myosin-Va, transcripts and the shuttle factor would fail to engage microtubule-based transport, and would accumulate in the perinuclear and nuclear regions, decreasing its rate of RNA exit from the nucleus. The granular perinuclear distribution of β -actin message in mutant cells (Fig. 6A) favors the second model (Figs. 7C and 7D). Moreover, treatment of both mutant and wild-type cells with latrunculin A or nocodazole increases the nuclear/cytoplasmic ratio of BrU labeling (data not shown), consistent with both actin and microtubule involvement.

In summary, these observations parallel observations of myosin-Va function in melanocytes [Provance et al., 1996], the loss of myosin-Va leads to a more granular and dispersed distribution of β -actin mRNA, and a

greater nuclear/cytoplasmic ratio for both total and newly-synthesized RNA. Our pulse-chase experiments show that the impact of the absence of myosin-Va is only observed kinetically for newly-synthesized total RNA, but our in situ hybridization data show that myosin-Va has an essential function in β -actin mRNA distribution. We do not know if these functions are mechanistically identical. Any myosin-Va-dependent mechanisms for the proper localization of transcripts in fibroblasts are likely to share components with neuronal mechanisms for mRNA transport, providing a significantly greater potential for experimental manipulation in fibroblasts.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Homozygous *dilute-lethal* mutant mice (C57BL/6J *Myo5a*^{d-126J}/*Myo5a*^{d-126J}, C57BL/6J *Myo5a*^{d-120J}/*Myo5a*^{d-120J}, and DLS/Le *Myo5a*^{d-1}/*Myo5a*^{d-1}) mice were maintained in repulsion with *short ear* (*Bmp5*^{se}), separated by 0.15 centimorgans; wild-type controls were age-matched C57BL/6J mice. Mice were euthanized at 12–18 days of age according to institutional protocols. Mutant mice were identified by ataxia and normal ears. All procedures were approved by the McLaughlin Research Institute (MRI) Institutional Animal Care and Use Committee. MRI is accredited by AAALAC.

Tissue Culture and Transfection

Primary fibroblasts were cultured from peripheral nervous system (PNS; dorsal root ganglia and sciatic nerve), lung, spleen and visceral adipose tissue of homozygous null mutant and age-matched, wild-type control mice.

PNS fibroblasts were isolated from 12 to 18-day-old mice. Approximately 30 dorsal root ganglia (DRG) or 6 sciatic nerves (~1 cm long), were collected and incubated in collagenase solution (Sigma C9407, 0.2 mg/ml final concentration) in HBSS for 60 min at 37°C with gentle agitation. The fragments were transferred to 0.5 mg/ml trypsin in HBSS and incubated for 15 min. Trypsin activity was neutralized by adding soybean trypsin inhibitor at 0.05 mg/ml, followed by trituration of the cells with a fire-polished Pasteur pipette. The cells were pelleted, washed 2 times with DMEM plus fetal bovine serum (FBS, 10%) and plated on glass coverslips.

Lung, spleen, and visceral adipose tissues were minced and incubated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 1 mg/ml collagenase (Type V, Worthington) at 37°C with shaking at 200 rpm. After 1 h, DMEM with 10% FBS was added and cells were centrifuged at 500g for 3 min. Pelleted cells were plated in DMEM with 10% FCS and 100 units/ml each of penicillin and streptomycin. Cells were maintained in this me-

dium in a humidified 37°C, 10% CO₂ incubator for 5–7 passages without allowing the cells to become confluent.

In rescue experiments, the full-length cDNA construct pEF-T7-myosin-Va [Fukuda et al., 2002] with the brain-specific splicing pattern [Seperack et al., 1995] was overexpressed. Primary fibroblasts were transfected with DNA + Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or Lipofectamine 2000 alone (mock) in suspension and plated directly onto glass coverslips. After a 1 h incubation, dishes were flooded with complete medium and incubated 12–18 h before their use in experiments.

RNA Labeling and Detection

Cells were plated at subconfluent densities on glass coverslips a day before experiments. Total RNA was detected with SYTO[®] RNASelect[™] (Molecular Probes) according to manufacturer's instructions. For flow cytometry, 2 × 10⁶ cells were trypsinized, stained (10 μ M, 20 min), washed 3× with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde, pelleted and resuspended in PBS with 3% BSA. Fluorescence and scatter was quantitated using a Becton Dickinson FACScan. For BrU incorporation, modified from published methods [Jackson et al., 1998; Kysela et al., 2005], cells were incubated in 2.5 mM BrU (made fresh in cold, complete medium) for the indicated times at 37°C. To chase, labeling medium was exchanged for cold, complete medium and incubated for indicated times at 37°C. Experiments were ended by fixing cells in fresh 4% paraformaldehyde in PBS. BrU was detected with an Alexa488-conjugated anti-BrdU monoclonal antibody (Molecular Probes), followed by an Alexa488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes). For myosin-Va detection, a rabbit polyclonal anti-myosin-Va (DIL2, gift of V. Gelfand) was used with an Alexa 546-conjugated goat anti-rabbit secondary. Nuclei were stained with Hoechst 33258.

Microscopy and Image Analysis

Coverslips with BrU incorporation were imaged by a 20× PlanApo lens (N.A. 0.75) on a TE2000E microscope (Nikon) with a Quantix-57 camera (Photometrics) controlled by MetaMorph software (Molecular Dynamics). Acquisition parameters were constant within all data sets. SYTO[®] RNASelect[™] staining was imaged with a 40× PlanApo lens (N.A. 0.95) on the same system. In MetaMorph, a 5-pixel-wide, 20-pixel-long line was drawn from the inside of the nucleus to the cytoplasm, avoiding nucleoli, and with the edge of the nucleus approximately centered in each line. Average intensity along the line was exported to Excel. Because diagonal lines had fewer than 20 pixels, each pixel position was converted to a percentage by dividing by the number of pixels in the line. Data were binned for 18 relative positions along the line. In PNS cultures,

Schwann cells were identified by their spindle morphology and excluded from analysis. For the BrU-labeled cells, nuclear regions were identified and selected by MetaMorph using the Hoechst image without access to the BrU image, transferred to the BrU image, and the regions were manually moved to an adjacent cytoplasmic area. Images were obtained with a 60× WI PlanApo (N.A. 1.2) objective.

In situ Hybridization

Cells on coverslips were washed in Krebs-Ringer buffer and fixed in Krebs-Ringer with 2% paraformaldehyde for 2 h at 37°C. After fixation, coverslips were washed in PBS with 5 mM MgCl₂ and 0.1% triton for 5 min, followed by two washes with PBS-MgCl₂, then equilibrated (15 min, 42°C) in hybridization solution (4× SSC, 50% formamide, 0.5 mg/ml sheared single stranded salmon sperm DNA, 0.25 mg/ml yeast tRNA, 1× Denhardt's and 10% Dextran sulfate). After equilibration, the coverslips were incubated in hybridization solution containing the probe (1 ng/μl of each oligonucleotide) at 42°C overnight. Coverslips were washed in 4× SSC with shaking for 20 min, twice in 2× SSC for 15 min, twice in 1× SSC for 15 min, and then incubated with a monoclonal anti-Cy3/Cy5 antibody (Sigma, C0992) followed by an Alexa 546-conjugated goat anti-mouse antibody. The probe for β-actin was a combination of two oligonucleotides complementary to the 5' untranslated region of the mRNA, labeled with Cy3 at both 3' and 5' ends (Laboratory of Molecular Technology, NCI-SAIC, Frederick) oligo 1, GCTGTGCGCCTT CACCGTTCCAGTTTTTAAATCCTGAGTCAAAGC GCCAA; oligo 2, TAGGAGTGGGGTGGCTTTTGG GAGGGTGAGGGACTTCTGTAAACCACTT; oligo3 (control, scrambled), AATCGAGGTACTCCAGTTCCA GTCCACCTGATCGACTGGGACCTTTCCGG.

Immunoprecipitation and RT-PCR

1 × 10⁷ cells were collected, resuspended in hypotonic buffer (10 mM Tris pH 7.8, 10 mM β-mercaptoethanol (Sigma), CompleteTM protease inhibitor (Roche), 0.5 mM PMSF with 1U/μl RNasin (Invitrogen)), incubated in ice for 20 min and passed through a cell cracker (clearance 37 μm) 20 times. Nuclei were pelleted at 1000 g, 15 min, 4°C. The supernatant was diluted with 2× Ripa Buffer (50 mM Tris pH8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 0.5 % DOC (10%)), CompleteTM, and 1:1000 PMSF, DIL2 anti-Va antiserum (1:1000) was added and rocked overnight at 4°C. The next day, 30 μl of Protein A agarose was added for 30 min at 4°C. The agarose was collected by pelleting and washed with Ripa Buffer, Ripa Buffer plus 500 mM NaCl, and 50 mM Tris pH 7.0. The beads were resuspended in water and reverse transcribed using ran-

dom primers (Invitrogen). β-actin was detected by PCR (30 cycles, 60°C annealing) using the primers GGA-GAAGAGCTATGAGCTGC and CCTGCTTGCTGAT-CCACATC (predicted to produce a product of 376 bp, separated on an agarose gel, stained with ethidium bromide, and imaged using a VersDoc gel documentation system (BioRad).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Nancy Jenkins for *Myo5a*^{d-126J} and *Myo5a*^{d-120J} mutant mice, Mitsunori Fukuda for the myosin-Va cDNA construct, David Munroe for supplying the β-actin probes, Rajeev Kumar and George Carlson for assistance with flow cytometry, Ryan Karcher and Deborah Cabin for helpful discussions, and Colleen Silan for technical support.

REFERENCES

- Beach DL, Bloom K. 2001. ASH1 mRNA localization in three acts. *Mol Biol Cell* 12:2567–2577.
- Burdwood W. 1965. Bidirectional particle movement in neurons. *J Cell Biol* 27:115a.
- Dekker-Ohno K, Hayasaka S, Takagishi Y, Oda S, Wakasugi N, Mikoshiba K, Inouye M, Yamamura H. 1996. Endoplasmic reticulum is missing in dendritic spines of Purkinje cells of the ataxic mutant rat. *Brain Res* 714:226–230.
- Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. 2006. New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3681–3686.
- Fukuda M, Kuroda TS, Mikoshiba K. 2002. Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: Implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J Biol Chem* 277:12432–12436.
- Hodi Z, Nemeth AL, Radnai L, Hetenyi C, Schlett K, Bodor A, Perczel A, Nyitray L. 2006. Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein. *Biochemistry* 45:12582–12595.
- Huang JD, Mermall V, Strobel MC, Russell LB, Mooseker MS, Copeland NG, Jenkins NA. 1998. Molecular genetic dissection of mouse unconventional myosin-Va: Tail region mutations. *Genetics* 148:1963–1972.
- Huang JD, Brady ST, Richards BW, Stenolen D, Resau JH, Copeland NG, Jenkins NA. 1999. Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature* 397:267–270.
- Huang YS, Richter JD. 2004. Regulation of local mRNA translation. *Curr Opin Cell Biol* 16:308–313.
- Huang YS, Kan MC, Lin CL, Richter JD. 2006. CPEB3 and CPEB4 in neurons: Analysis of RNA-binding specificity and translational control of AMPA receptor GluR2 mRNA. *EMBO J* 25: 4865–4876.
- Hume AN, Collinson LM, Hopkins CR, Strom M, Barral DC, Bossi G, Griffiths GM, Seabra MC. 2002. The leaden gene product is required with Rab27a to recruit myosin Va to melanosomes in melanocytes. *Traffic* 3:193–202.
- Jackson DA, Iborra FJ, Manders EM, Cook PR. 1998. Numbers and organization of RNA polymerases, nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei. *Mol Biol Cell* 9:1523–1536.
- Kindler S, Wang H, Richter D, Tiedge H. 2005. RNA transport and local control of translation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:223–245.

- Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH. 1997. β -Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *J Cell Biol* 136:1263–1270.
- Kysela K, Philimonenko AA, Philimonenko VV, Janacek J, Kahle M, Hozak P. 2005. Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell. *Histochem Cell Biol* 124:347–358.
- Langford GM. 2002. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic* 3:859–865.
- Latham VM, Jr., Kislauskis EH, Singer RH, Ross AF. 1994. β -actin mRNA localization is regulated by signal transduction mechanisms. *J Cell Biol* 126:1211–1219.
- Latham VM, Yu EH, Tullio AN, Adelstein RS, Singer RH. 2001. A Rho-dependent signaling pathway operating through myosin localizes β -actin mRNA in fibroblasts. *Curr Biol* 11:1010–1016.
- Matesic LE, Yip R, Reuss AE, Swing DA, O'Sullivan TN, Fletcher CF, Copeland NG, Jenkins NA. 2001. Mutations in Mlph, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10238–10243.
- Mercer JA, Seperack PK, Strobel MC, Copeland NG, Jenkins NA. 1991. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature* 349:709–713.
- Miyata M, Finch EA, Khiroug L, Hashimoto K, Hayasaka S, Oda SI, Inouye M, Takagishi Y, Augustine GJ, Kano M. 2000. Local calcium release in dendritic spines required for long-term synaptic depression. *Neuron* 28:233–244.
- Muller M, Heuck A, Niessing D. 2007. Directional mRNA transport in eukaryotes: Lessons from yeast. *Cell Mol Life Sci* 64:171–180.
- 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.
- Pastural E, Barrat FJ, Dufourcq-Lagelouse R, Certain S, Sanal O, Jabado N, Seger R, Griscelli C, Fischer A, de Saint Basile G. 1997. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat Genet* 16:289–292.
- Pranchevicius MCS, Baqui MMA, Ishikawa-Ankerhold HC, Lourenco EV, Leao RM, Banzi SR, Tavares dos Santos C, Barreira MCR, Espreafico EM, Larson RE. 2008. Myosin Va phosphorylated on Ser¹⁶⁵⁰ is found in nuclear speckles and redistributes to nucleoli upon inhibition of transcription. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, in press; doi: 10.1002/cm.20269.
- Provance DW, Wei M, Ipe V, Mercer JA. 1996. Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14554–14558.
- Provance DW, James TL, Mercer JA. 2002. Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes. *Traffic* 3:124–132.
- Reck-Peterson SL, Provance DW, Mooseker MS, Mercer JA. 2000. Class V myosins. *Biochim Biophys Acta* 1496:36–51.
- Richards TA, Cavalier-Smith T. 2005. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* 436:1113–1118.
- Rosé SD, Lejen T, Casaletti L, Larson RE, Pene TD, Trifaro JM. 2003. Myosins II and V in chromaffin cells: Myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *J Neurochem* 85:287–298.
- Schuman EM, Dynes JL, Steward O. 2006. Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. *J Neurosci* 26:7143–7146.
- Searle AG. 1952. A lethal allele of dilute in the house mouse. *Heredity* 6:395–401.
- Seperack PK, Mercer JA, Strobel MC, Copeland NG, Jenkins NA. 1995. Retroviral sequences located within an intron of the dilute gene alter dilute expression in a tissue-specific manner. *EMBO J* 14:2326–2332.
- Shestakova EA, Singer RH, Condeelis J. 2001. The physiological significance of β -actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7045–7050.
- 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 JR, Crispino M, Puppo A, Sotelo JR, Koenig E. 2008. Myelinated axons contain β -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.
- Stafford P, Brown J, Langford GM. 2000. Interaction of actin- and microtubule-based motors in squid axoplasm probed with antibodies to myosin V and kinesin. *Biol Bull* 199:203–205.
- Sundell CL, Singer RH. 1991. Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science* 253:1275–1277.
- Takagishi Y, Oda S, Hayasaka S, Dekkerohno K, Shikata T, Inouye M, Yamamura H. 1996. The dilute-lethal gene attacks a Ca²⁺ store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. *Neurosci Lett* 215:169–172.
- Takagishi Y, Hashimoto K, Kayahara T, Watanabe M, Otsuka H, Mizoguchi A, Kano M, Murata Y. 2007. Diminished climbing fiber innervation of Purkinje cells in the cerebellum of myosin Va mutant mice and rats. *Dev Neurobiol* 67:909–923.
- Takizawa PA, Sil A, Swedlow JR, Herskowitz I, Vale RD. 1997. Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* 389:90–93.
- Wu X, Sakamoto T, Zhang F, Sellers JR, Hammer JA. 2006. In vitro reconstitution of a transport complex containing Rab27a, melanophilin and myosin Va. *FEBS Lett* 580:5863–5868.
- 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.

Experimentos adicionales. Resultados y discusión.

La miosina Va se asocia con ribosomas citoplásmicos, pero su ausencia no afecta la localización ribosomal. La interacción entre ambos componentes puede verificarse por inmunoprecipitación de ribosomas (proteínas *P*) y la concomitante co purificación de MVa. (figura 1). Se confirma de esta manera, que tal interacción no es privativa de las neuronas, como tampoco lo es la interacción MVa-ARNm (para β -actina) según se desprende de la figura 6 del artículo presentado. Esto indicaría, que en la mecánica del transporte y la localización de RNPs, las neuronas y los fibroblastos comparten aspectos en común.

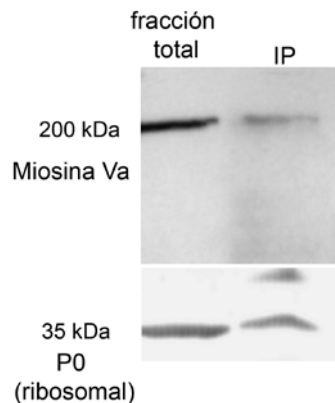


Figura 1. Ribonucleo complejos proteicos en fibroblastos. *Fracción total*; western Blot en los que se ilustran la presencia de MVa (arriba) y ribosomas (abajo), presentes en la suspensión celular a partir de la cual se inmunoprecipitaron los complejos de ribonucleo proteína. *IP*; la inmunoprecipitación de ribosomas con anticuerpos anti proteínas *P*, promueve la recuperación de una fracción del total de los ribosomas presentes en la suspensión mencionada, co purificados con MVa.

Las células mutantes poseen un citoesqueleto de apariencia estándar, si se las compara con las células normales (figura 2). Este control es particularmente importante en relación a los resultados presentados en la figura 6 del artículo referido y la figura 1 de este capítulo, puesto que se podría argumentar que la des localización del ARNm codificante para β -actina sería el resultado de una alteración primaria del citoesqueleto en las células mutantes. Es bien conocido que las proteínas motoras pueden en ocasiones afectar la dinámica del citoesqueleto (53). De acuerdo con la figura 2, este no sería el caso.

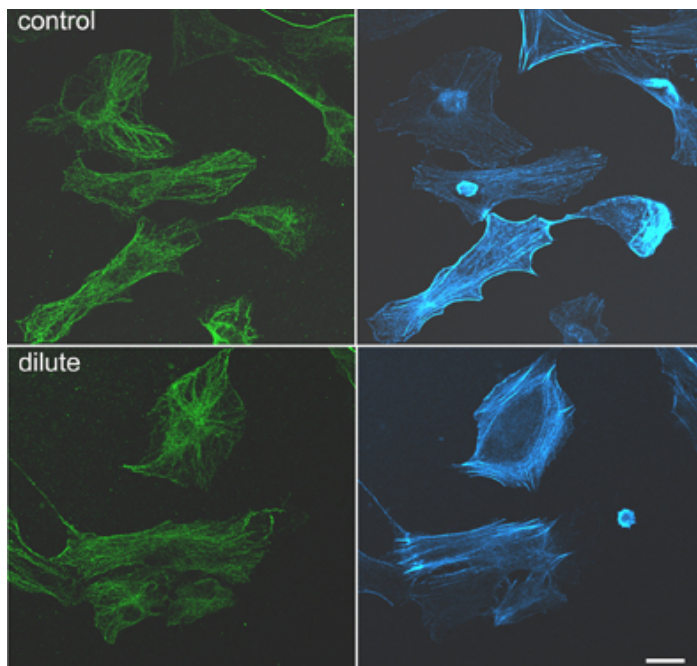


Figura 2. Organización del citoesqueleto en fibroblastos normales y mutantes. *Izquierda*, distribución de los microtúbulos en células de ambos grupos, donde se aprecia la típica organización radial, desde el centro hacia la periferia. No se aprecian diferencias notorias entre controles y *dilute*. *Derecha*, los microfilamentos de actina, evidenciados con falloidina fluorescente revelan su distribución clásica, con abundantes fibras de estrés. Tampoco hay diferencias evidentes entre ambas condiciones. Barra, 10 μm .

Más importante aún es el hecho que, a diferencia de lo que ocurre con el ARN mensajero codificante para β -actina, los ribosomas no ven alterada su distribución en células mutantes cuando se las compara con las controles (figura 3). Esa alteración selectiva de la localización del ARNm es difícil de interpretar, pero indica que tanto el ARNm como los ribosomas parecen tener mecanismos independientes de transporte, al menos hasta la etapa de “gránulo de transporte”. Otra interpretación, tal vez complementaria a la anterior, es que posiblemente la fracción de ribosomas asociada a MVa sea relativamente pequeña respecto al total de los ribosomas presentes en una célula y que por lo tanto aún generándose diferencias en ausencia de MVa, éstas no llegaran a apreciarse. Es importante destacar aquí, que junto a la MVa también fue descrita la miosina II no muscular como componente de RNPs obtenidas de cerebro. Si bien, nada se sabe sobre el significado de esta asociación, sería interesante saber si tiene alguna responsabilidad sobre la dinámica ribosomal.

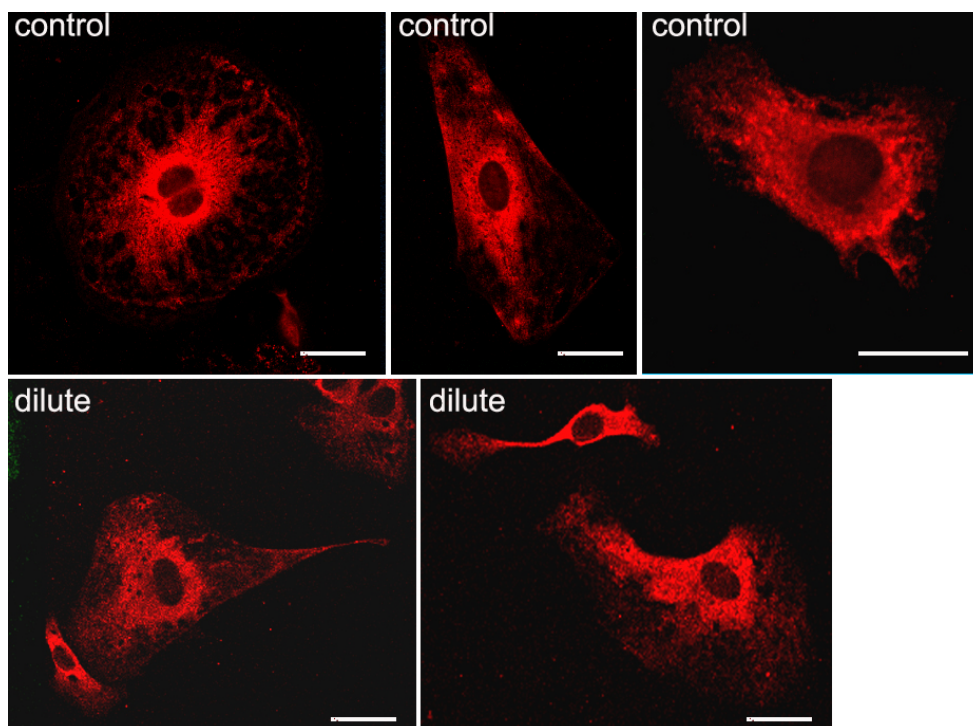


Figura 3. Distribución ribosomal en fibroblastos normales y mutantes. La localización ribosomal en estas células suele estar correlacionada con la distribución del retículo endoplásmico. Esa es la razón por la cual la señal presenta aspecto reticular y es fuertemente positiva más cerca del núcleo. En algunos casos también se proyecta radialmente desde el centro a la periferia, en un patrón asociado al de los microtúbulos (imagen superior izquierda). Ambas características parecen estar conservadas en células *dilute*. Tampoco pudo observarse diferencia notoria en la intensidad de la inmuno marcación. Barra, 10 μm .

Expresión génica global en ausencia de miosina Va. Para explorar la hipótesis anteriormente planteada, se utilizó la plataforma *Affimetrix* de microarreglos de ADN, los cuales fueron hibridados con ARN total extraído de cerebros y cerebelos de ratones controles y *dilute*. Los experimentos fueron realizados por duplicado tanto para cada tejido como para cada condición. Debido a que la calidad del ARN que se requiere para estos experimentos, debe ser de muy buena calidad (en el sentido que debe encontrarse muy bien conservado) y que solo las muestras de ARN purificado de cerebro demostraron inequívocamente reunir esa condición, el análisis de los datos obtenidos, se limitará a ese tejido. De los aproximadamente 30 mil genes presentes en el *array*, se seleccionaron un primer grupo de 12949 por *array*, dejando fuera aquellos datos que:

- a) presentaban señales ausentes o en el límite de detección (confiabilidad) de la técnica.

b) no estuvieran presente simultáneamente en los cuatro *arrays* bajo estudio (*dilute* y control, por duplicado).

c) cuyos valores tuvieran no mostraran repetibilidad en un ensayo respecto a su duplicado.

Como primera aproximación los datos provenientes de cada *array* filtrados con estos criterios, fueron puestos en correlación entre sí (figura 4).

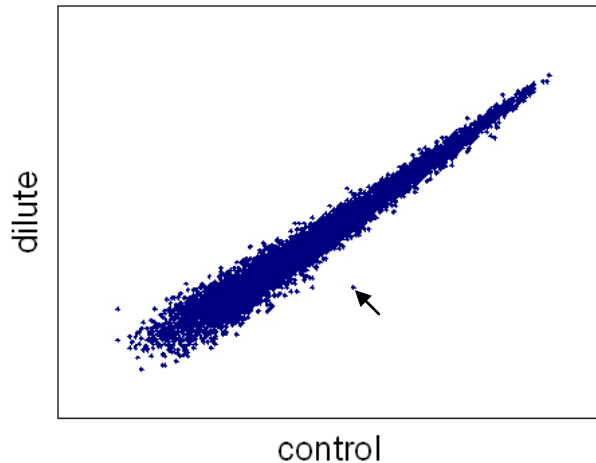


Figura 4. Correlación entre los niveles de expresión de un grupo de 12949 genes, en cerebros de ratones normales y mutantes. Los valores obtenidos por duplicado para cada condición, fueron promediados y correlacionados entre sí. A pesar de existir cierta dispersión en los valores más bajos, se observa una muy buena correlación entre los niveles de expresión en ambas condiciones ($r = 0,985$). Tampoco se aprecian grupos de puntos (genes) que se aparten de la linealidad, tal como sería de esperar en caso que el tratamiento indujera expresión diferencial de genes. El nivel de expresión correspondiente al ARNm codificante para la MVa (*Flecha*), es una de las pocas

El análisis de la referida correlación muestra niveles de expresión muy parejos en ambos grupos lo que no solo surge del valor del coeficiente de correlación de Pearson ($r = 0,985$), sino también por un coeficiente de regresión (pendiente) cercano a 1. Por ejemplo, de existir un nivel de expresión génica generalizadamente deprimida en los mutantes, el coeficiente de Pearson seguiría siendo “bueno”, pero la pendiente de la función tendería a ser menor a 1. Lo contrario pasaría en caso de una sobre expresión generalizada. De todas formas, este tipo de caso no suele ser lo más frecuente. Lo que suele ocurrir, cuando hay alteración de la expresión génica (tanto en más, como en menos) es la aparición de una “nube” de puntos (genes) que se aparta de la distribución general y que representa un conjunto de ARNm emparentados funcionalmente. Nada de eso ocurre aquí, siendo uno de los pocos puntos que claramente se apartan de la distribución lineal, el correspondiente a la propia miosina Va. Dicho resultado no solo es esperable, sino que constituye en buen control interno de la fidelidad del panorama trazado por el *array*.

| | #1 | #2 | #3 | #4 | Array Name | Array Description |
|----|------|-------|-------|-------|------------|-------------------|
| 1. | #1 A | 0.984 | 0.977 | 0.980 | CBWD_6 | RNA |
| 2. | | #2 A | 0.973 | 0.978 | CBWD_7 | RNA |
| 3. | | | #3 B | 0.982 | CBDIL_6 | RNA |
| 4. | | | | #4 B | CBDIL_7 | RNA |

Tabla 1. Correlación presente entre cada uno de las diferentes arrays. La comparación individual de todos contra todos, demuestra que de los 6 coeficientes r , los dos mejores son los que corresponden a comparaciones entre pares del duplicado (A1 vs A2 y B1 vs B2) y los 4 peores corresponden a comparaciones cruzadas control contra dilute. Esto sugiere que si bien no se aprecian diferencias entre controles y dilute cuando se despliegan los datos en un gráfico de correlaciones, podría de todas formas existir una leve diferencia entre ambas condiciones. *CB*, cerebro, *WD*, control, *Dil*, dilute.

La comparación de los *arrays* entre sí, demuestra que podría existir una diferencia entre controles y *dilute*, ya que los coeficientes de correlación entre esas condiciones siempre es ligeramente menor que la de los controles o *dilute* entre sí (tabla 1). Este efecto es mucho mejor visto cuando toda esta información es sometida a un análisis de clústers (Análisis de Componentes Principales o Escalamiento Multi dimensional métrico). El análisis de clusters es una técnica cuya idea básica es agrupar un conjunto de observaciones en un número dado de grupos o clusters. Este agrupamiento se basa en la idea de distancia o similitud entre las observaciones. En las técnicas de Escalamiento Multi Dimensional, un conjunto de similitudes (o distancias) observadas entre un par de objetos integrantes de un grupo mucho mayor, se representan gráficamente en un sistema en pocas dimensiones (típicamente bi o tridimensional), de modo que sus posiciones se ajusten a las similitudes (o distancias) originales. Los cuatro *arrays* bajo análisis aquí, pueden ser representados en un espacio bi o tridimensional ocupando diferentes posiciones unos respecto a los otros. Estas posiciones dependerán a su vez de las distancias (similitudes) que existan entre los mismos genes que se detectan en cada uno de los *arrays* (figura 5).

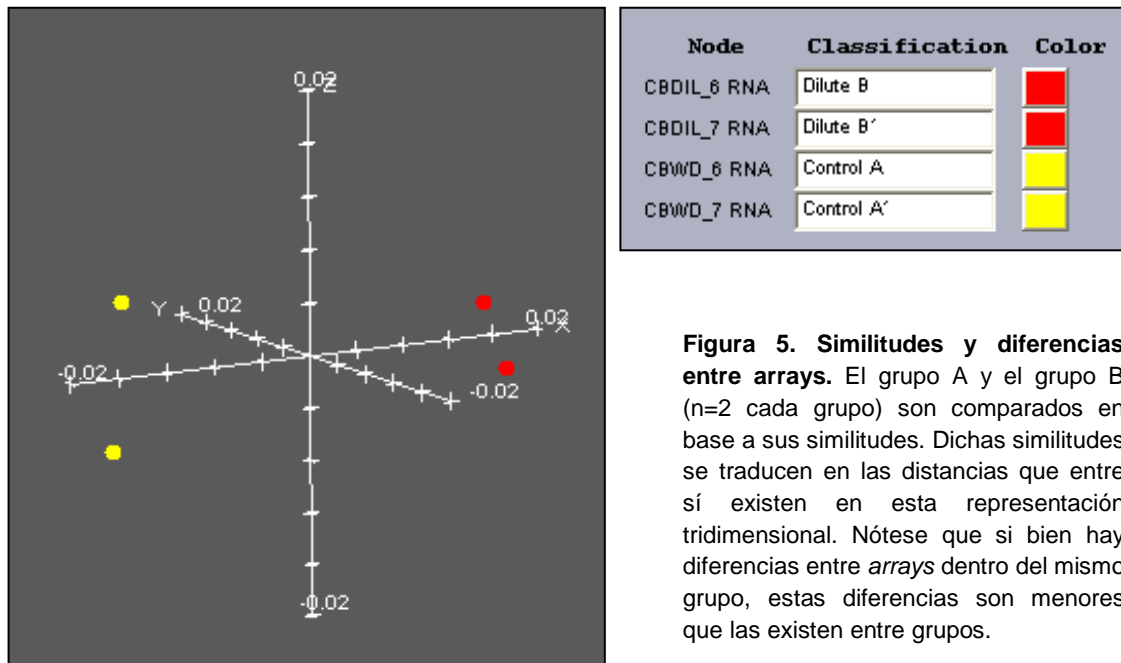


Figura 5. Similitudes y diferencias entre arrays. El grupo A y el grupo B (n=2 cada grupo) son comparados en base a sus similitudes. Dichas similitudes se traducen en las distancias que entre sí existen en esta representación tridimensional. Nótese que si bien hay diferencias entre *arrays* dentro del mismo grupo, estas diferencias son menores que las existen entre grupos.

Es bien conocido el hecho que aún en aquellas condiciones patológicas o experimentales donde utilizando esta aproximación experimental, se detecta una clara alteración en el perfil de expresión, ésta suele comprender un porcentaje menor del total de genes representados en el *array*. Basado en este dato y en el hecho que pareciera existir una muy moderada diferencia entre ambos grupos, se intentó identificar dentro de los 12949 genes seleccionados, aquellos cuyo nivel de expresión más difería entre sí (en más o en menos), para cada condición. Para ello se eliminaron todos aquellos genes que a la comparación entre medias grupales, tuvieran una diferencia menor al 25 %, pero que al mismo tiempo esa diferencia de medias tuviera un valor de $p < 0,1$. Estos valores de diferencia de medias y de probabilidad fueron escogidos arbitrariamente con el objetivo de eliminar todos aquellos valores que mas probablemente estuvieran incambiados en ambas condiciones. Es discutible la aplicación del criterio del uso de estos estadísticos, los cuales surgen de la comparación de dos contra dos. Sin embargo, en un universo de casi 13 mil comparaciones, se genera un nuevo conjunto de datos “filtrados” que tanto por la diferencia en los valores de expresión entre ambos grupos como por su repetibilidad dentro de cada grupo, parece ser minimamente robusto como para proseguir el análisis. Ese grupo dio cuenta de un subconjunto de 919 genes con valores repetibles dentro del grupo, pero claramente diferentes entre grupos. Una ligera mayoría (51,6 %), representa genes sub expresados en la condición *dilute* (tabla 2), mientras el resto son aquellos sobre expresados en estos mismos animales.

| A | A | B | B | | | | | | |
|--------|--------|---------|---------|-----------|------------|---------|------------------------------|--|--|
| CBWD_6 | CBWD_7 | CBDiL_6 | CBDiL_7 | p-Value | Difference | WellID | FeatureID | Description | |
| 8.7364 | 9.1546 | 6.8329 | 6.7536 | 0.0096358 | 2.15 | 1355566 | 1436051 at | myosin Va (Myo5a), mRNA. | |
| 8.0917 | 8.1928 | 6.9966 | 6.5515 | 0.026713 | 1.37 | 1330780 | 1419754 at | myosin Va (Myo5a), mRNA. | |
| 6.7800 | 6.4009 | 5.1938 | 5.6611 | 0.060881 | 1.16 | 1346856 | 1432411 a at | F-box and WD-40 domain protein 2 (Fbxw2), mRNA. | |
| 7.8430 | 7.7892 | 6.4692 | 6.8542 | 0.027201 | 1.15 | 1335254 | 1426218 at | glucocorticoid induced transcript 1 (Glcci1), transcript variant 1, mRNA. | |
| 7.3646 | 7.0811 | 5.9045 | 6.3219 | 0.048008 | 1.11 | 1360357 | 1442757 at | leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 1 (Lrch1), mRNA. | |
| 7.1436 | 7.4578 | 5.9704 | 6.4413 | 0.060795 | 1.09 | 1332750 | 1422590 at | cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5), mRNA. | |
| 8.1624 | 8.1179 | 6.8605 | 7.2517 | 0.031439 | 1.08 | 1331525 | 1420909 at | vascular endothelial growth factor A | |
| 7.2221 | 7.2992 | 6.2724 | 6.1231 | 0.006192 | 1.06 | 1350355 | 1428162 at | RIKEN cDNA 4933421E11 gene (4933421E11Rik), transcript variant 3, mRNA. | |
| 6.0747 | 6.1416 | 5.0090 | 5.0917 | 0.0025195 | 1.06 | 1356415 | 1437552 at | RIKEN cDNA 2410127L17 gene | |
| 7.9218 | 8.2784 | 7.0938 | 7.0367 | 0.029123 | 1.03 | 1337286 | 1433581 at | RIKEN cDNA 1190002N15 gene (1190002N15Rik), mRNA. | |

Tabla 2. Genes sub expresados en animales mutantes. Los 10 genes pertenecientes al conjunto de aquellos sub expresados en mutantes con más clara diferencia entre grupos (A contra B), pero con valores mas repetibles dentro de cada grupo (CBWD6 y CBW7, normales contra CBDiL6 y CBDiL 7). Los genes fueron desplegados en orden de diferencia decreciente entre normales (grupo A) y mutantes (grupo B) y totalizan el 51,6 % de los 919 seleccionados. Nótese que las dos mayores diferencias están representadas por dos “spots” que en el array, detectan el gen de la MVa. Las variables (cuatro primeras columnas) fueron transformadas en base logarítmica 2, siendo los valores de la columna “diferencia”, calculados a partir de la variable transformada. Como ejemplo, en la primera fila una diferencia de 2,15 unidades, representa una expresión 4,5 veces superior en la condición normal que en la mutante.

De existir expresión diferencial entre ambas condiciones, la presencia y abundancia relativa de determinados grupos de genes (agrupados según la ruta metabólica que integran, la función celular o la estructura sub celular de la que participen) debería ser diferente antes y después del “filtrado” que dio origen al sub grupo de 919 genes.

| GOT (Molecular component) | Genes totales | % del total | Genes seleccionados | % selección | Chi ² | Nivel de significancia |
|---------------------------|---------------|-------------|---------------------|-------------|------------------|------------------------|
| envelope | 423 | 3,3 | 23 | 2,5 | 1,37 | p=0,241 |
| synapse | 234 | 1,8 | 9 | 1 | 2,95 | p=0,086 |
| macromolecular complex | 1647 | 12,7 | 79 | 8,6 | 12,97 | p=0,0003 |
| membrane-enclosed lumen | 524 | 4 | 31 | 3,4 | 0,85 | p=0,358 |
| organelle part | 1849 | 14,3 | 115 | 12,5 | 2,10 | p=0,152 |

| | | | | | | |
|---------------------------|-------|------|-----|------|------|----------------|
| organelle | 55784 | 43,1 | 380 | 41,3 | 0,98 | p=0323 |
| cell part | 8669 | 66,9 | 571 | 62 | 8,73 | p=0,003 |
| synapse part | 100 | 0,8 | 4 | 0,44 | 0,90 | p=0,344 |
| extracellular matrix part | 47 | 0,36 | 4 | 0,44 | 0,00 | p=0,946 |
| extracellular region part | 837 | 6,5 | 61 | 6,6 | 0,02 | p=0,891 |
| extracellular region | 959 | 7,7 | 65 | 7,1 | 0,09 | p=0,758 |
| extracellular matrix | 108 | 0,83 | 8 | 0,9 | 0,00 | p=0,944 |

Tabla 3. Clasificación de los genes cuyo nivel de expresión muestra mayor variación en mutantes.

Se compara el porcentaje que cada grupo componente de esta clasificación representa tanto en el total de genes analizados (12949) como en el grupo filtrado en base a una razonable (aunque arbitraria) diferencia en su nivel de expresión génica, (919 genes). De existir un efecto específico de la mutación sobre la expresión génica, esta debería traducirse en un enriquecimiento en (términos porcentuales) de algún grupo de genes respecto a los porcentajes que representan esos mismos grupos en el total de la población. En rojo se resaltan aquellos grupos donde los genes del mutante están sobre representados respecto al total y en negro los sub representados. Nótese que las únicas diferencias significativas encontradas (en negrita), corresponden a grupos que disminuyeron su representación, lo cual es de difícil interpretación.

Cuando los genes totales y filtrados fueron clasificados en base a criterios estándares como por ejemplo el del *Gene Ontology Consortium*, (78) las diferencias sugeridas por las correlaciones o análisis de clusters, no pudieron ser asignadas a ningún grupo de genes específico. En la tabla se ilustra que ninguno de los grupos de genes agrupados de acuerdo a criterios *estructurales* y *funcionales* está selectivamente enriquecido en el grupo de genes filtrados. Dicho de otra manera, el porcentaje que cada uno representa antes y después del filtrado no se traduce en diferencias estadísticas. Hay un par de excepciones en los que sí existe diferencia estadística pero curiosamente esta diferencia obedece a que representan porcentajes menores a los que representaban en el grupo original (919). Este resultado, se produce porque la mayoría de los genes que constituyen estos grupos se perdieron durante el proceso de filtrado. La razón por la que se perdieron fue justamente porque no mostraron variación de expresión en mutantes respecto a normales. Solo una minoría de genes integrantes de estos grupos, efectivamente presentaron un cambio mayor en su expresión, por eso permanecieron dentro del grupo de los 919. Otros análisis similares, utilizando criterios mas rigurosos de filtrado, así como la reclasificación de los genes con otros criterios estandarizados en GO (por ejemplo, según su pertenencia a estructuras moleculares, función o ruta metabólica) no arrojaron resultados diferentes a los ya comentados. Si bien los estudios de diferencia en la expresión génica global realizados en base a microarreglos de ADN,

requiere mas repeticiones para hacer afirmaciones más seguras, el hecho de no poder detectarse diferencias con un n de 2 por grupo, sugiere que dichas diferencias (de existir) responderían a dos causas a) son sutiles y en todo caso involucrarían a un grupo relativamente pequeño de genes; b) ésta variación no sería específica, y podría deberse en todo caso algún efecto secundario inespecífico que sufren los mutantes, como por ejemplo el estrés que implica su enfermedad.

Perfil de expresión de proteínas en ausencia de MVa. Clásicamente, la expresión de los genes está regulada a dos niveles: la transcripción y la traducción. Los resultados anteriores referidos al hipotético efecto de la MVa sobre la transcripción, nada dicen respecto a su posible influencia sobre la traducción de los ARNm, con alguno de los cuales sabemos que se asocia en el citosol. Para eso de utilizaron *chips* con arreglos de 1000 anticuerpos diferentes. El poder de resolución de esta técnica es entonces menor a la de ADN, no solo por la cantidad de variables pasibles de ser analizadas al mismo tiempo, sino porque muchas de ellas no son de utilidad (hay anticuerpos que detectan proteínas que están ausentes en el sistema nervioso). Se utilizaron dos tejidos: cerebro y cerebelo por duplicado cada uno.

En este caso, el diseño del *array* es tal que las proteínas extraídas y solubilizadas de un tejido dado deben ser marcadas químicamente con un fluoróforo diferente (típicamente Cy3 y Cy5), según la condición experimental por ejemplo, control y mutante. Luego, ambas muestras son mezcladas e incubadas con el *array* de forma tal que la señal fluorescente desarrollada sobre cada uno de los *spots* de anticuerpos es el resultado de la unión de la proteína marcada al anticuerpo. El nivel de intensidad de fluorescencia que desarrolle cada *spot* será función de la abundancia de la proteína en la muestra y de la proporción relativa que de proteína-Cy3/proteína-Cy5 exista en la mezcla. Dicha proporción debería reflejar la abundancia relativa que de cada proteína exista en el tejido para cada condición. El diseño también requiere la necesaria realización de un duplicado del experimento, pero invirtiendo el fluoróforo utilizado en una misma condición. El resultado final es expresado como una relación numérica (cociente) entre el resultado obtenido con un par de fluoróforos y el obtenido en su duplicado, con la marcación invertida.

Ejemplo:

Sean A y B dos condiciones experimentales y α una de las 1000 proteínas cuyo nivel de expresión en A y B se quiere comparar. Denominaremos α_1 a la proteína α marcada en la muestra A y α_2 a la misma proteína α marcada en la muestra B.

Experimento 1:

Las proteínas de la condición A se marcan con Cy3 y se obtiene α_1 -Cy3.

Las proteínas de la condición B se marcan con Cy5 y se obtiene α_1 -Cy5.

Resultado: el nivel de expresión de α surge de la relación “R1” = α_1 -Cy5/ α_1 -Cy3.

Experimento 2 (duplicado):

Las proteínas de la condición A se marcan con Cy5 y se obtiene α_1 -Cy5.

Las proteínas de la condición B se marcan con Cy3 y se obtiene α_1 -Cy3.

Resultado: el nivel de expresión de α surge de la relación “R2” = α_2 -Cy5/ α_1 -Cy3.

Resultado final “RF” = $(\alpha_1$ -Cy5/ α_2 -Cy3)/(α_2 -Cy5/ α_1 -Cy3).

Finalmente, RF es transformada en su raíz cuadrada.

De esta forma, se normalizan los valores y se elimina el efecto que potencialmente podría tener el marcador (Cy3 o Cy5), sobre la eficiencia de la marcación.

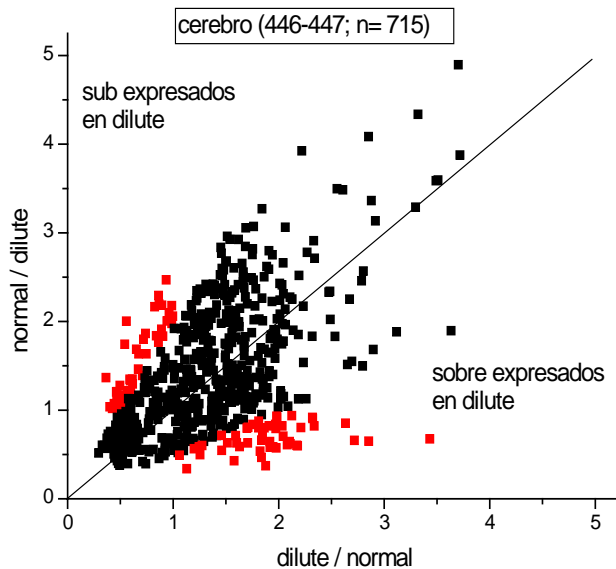


Figura 6: Correlación existente entre el nivel de expresión de cada proteína en muestras de cerebro y en ambas condiciones experimentales. La función de regresión (recta) es desplegada solo con el propósito de ilustrar como los diferentes valores se distribuyen de acuerdo a una correlación ideal ($r=1$). Los valores que quedan por debajo, representan aquellos sobre expresados en mutantes, mientras que lo inverso es lo que ocurre con los valores por encima de la recta. Los puntos marcados en rojo representan valores entre el 30 % el 130% mayores o menores que en los controles.

Dada la mecánica de trabajo, y considerando una proteína hipotética cualquiera, podemos postular que si ésta se encuentra por ejemplo sobre expresada en mutantes (condición A) respecto a los normales (condición B), obtendremos una R1 numéricamente mayor a 1. Si el resultado es repetible, aún cambiando el fluoróforo con la que es marcada, R2 resultaría numéricamente menor a 1. Si la mutación no ejerciera efecto alguno sobre la expresión de esta proteína hipotética, R1 y R2 deberían ser similares, aproximándose a 1. Siguiendo este mismo razonamiento, si pusiéramos en correlación R1 vs R2, obtendríamos una buena correlación para aquellos valores incambiados por el tratamiento, mientras que los que son afectados se apartarían de la función de regresión proporcionalmente a la variación asociada al tratamiento, (figura 6).

Concretamente, en el caso de las proteínas extraídas de cerebro, del total de los anticuerpos representados en el *chip*, se seleccionó un primer grupo de 715. El resto fue descartado por presentar señales consideradas poco confiables, ya sea por ser sumamente bajas y en el límite de detección, como por provenir de *spots* mal impresos y que generan imágenes y señales defectuosas.

| ADD TO PATHWAY | | ADD TO LIST | | CUSTOMIZE TABLE | | Rows: 1 - 50 | |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------------|--|---------------------|------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | Fold Change | ID | Molecules | Description | Location | Type | |
| <input type="checkbox"/> | ↑1,939 | P12318 | FCGR2A | Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32) | Plasma Membrane | transmembrane re... | |
| <input type="checkbox"/> | ↑1,896 | P31689 | DNAJA1 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1 | Nucleus | other | |
| <input type="checkbox"/> | ↑1,793 | O75912 | DGKI | diacylglycerol kinase, iota | Cytoplasm | kinase | |
| <input type="checkbox"/> | ↑1,631 | P38936 | CDKN1A* | cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) | Nucleus | kinase | |
| <input type="checkbox"/> | ↑1,626 | P41241 | CSK | c-src tyrosine kinase | Cytoplasm | kinase | |
| <input type="checkbox"/> | ↑1,621 | P08670 | VIM | vimentin | Cytoplasm | other | |
| <input type="checkbox"/> | ↑1,619 | P00519 | ABL1 | c-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase | Nucleus | kinase | |
| <input type="checkbox"/> | ↑1,615 | P05556 | ITGB1 | integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, | Plasma Membrane | transmembrane re... | |
| <input type="checkbox"/> | ↑1,611 | Q8N0X8 | IL12B | interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cyt | Extracellular Space | cytokine | |
| <input type="checkbox"/> | ↑1,609 | Q9Y5B9 | SUPT16H | suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae) | Nucleus | transcription regul... | |
| <input type="checkbox"/> | ↓-2,258 | P10586 | PTPRF | protein tyrosine phosphatase, receptor type, F | Plasma Membrane | phosphatase | |
| <input type="checkbox"/> | ↓-2,251 | P33151 | CDH5 | cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium) | Plasma Membrane | other | |
| <input type="checkbox"/> | ↓-2,100 | Q52M15 | CPLX2 | complexin 2 | Cytoplasm | other | |
| <input type="checkbox"/> | ↓-2,034 | P43246 | MSH2 | mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. c | Nucleus | enzyme | |
| <input type="checkbox"/> | ↓-1,990 | O75558 | STX11 | syntaxin 11 | Plasma Membrane | transporter | |
| <input type="checkbox"/> | ↓-1,924 | P63167 | DYNLL1 | dynein, light chain, LC8-type 1 | Cytoplasm | other | |
| <input type="checkbox"/> | ↓-1,913 | Q8VCI5 | PEX19 | peroxisomal biogenesis factor 19 | Cytoplasm | other | |
| <input type="checkbox"/> | ↓-1,902 | P18074 | ERCC2 | excision repair cross-complementing rodent repair deficie | Nucleus | enzyme | |
| <input type="checkbox"/> | ↓-1,859 | P21333 | FLNA (incl | filamin A, alpha (actin binding protein 280) | Cytoplasm | other | |
| <input type="checkbox"/> | ↓-1,851 | P54105 | CLNS1A | chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A | Plasma Membrane | ion channel | |
| <input type="checkbox"/> | ↓-1,848 | P25228 | NOX2A | nitric oxide synthase 2A (inducible, hematopoietic) | Cytoplasm | enzyme | |

Figura 7. Efecto de la mutación sobre la expresión diferencial de proteínas. La lista incluye los 20 genes con cambios mayores en el mutante, los 10 primeros sobre expresados y los otros 10, sub expresados.

R1 y R2 fueron puestos en correlación y aquellos valores que mas se apartaron de la regresión, como por ejemplo los que muestran una variación positiva o negativa mayor al 30 % respecto a los controles (puntos rojos en la grafica de la figura 6), fueron identificados, clasificados y analizados utilizando la plataforma Ingenuity Pathways Analysis (figuras 7 y 8). La proteínas con variaciones superiores al 30%, en mas o en menos, totalizaron 146. La categorización que produce este software, no se corresponde exactamente con la utilizada por la plataforma de análisis de microarreglos de ADN, de forma que al menos a este nivel de análisis no es posible hacer comparaciones directas entre ambos grupos de resultados.

| Top Bio Functions | | |
|--|---------------------|----------------|
| Diseases and Disorders | | |
| Name | p-value | # Molecules |
| Hematological Disease | 4.91E-17 - 2.18E-06 | 59 |
| Immunological Disease | 4.91E-17 - 3.25E-06 | 50 |
| Cancer | 1.70E-16 - 2.83E-06 | 101 |
| Connective Tissue Disorders | 2.40E-15 - 8.07E-07 | 52 |
| Inflammatory Disease | 2.40E-15 - 2.57E-06 | 51 |
| Molecular and Cellular Functions | | |
| Name | p-value | # Molecules |
| Cell Death | 4.71E-23 - 2.92E-06 | 87 |
| Cellular Growth and Proliferation | 2.55E-20 - 3.16E-06 | 87 |
| Cell Cycle | 6.62E-19 - 3.25E-06 | 57 |
| Cell-To-Cell Signaling and Interaction | 1.17E-18 - 3.21E-06 | 67 |
| Cellular Movement | 2.26E-18 - 2.77E-06 | 61 |
| Physiological System Development and Function | | |
| Name | p-value | # Molecules |
| Tissue Morphology | 1.97E-17 - 2.04E-06 | 51 |
| Hematological System Development and Function | 5.56E-17 - 3.21E-06 | 59 |
| Immune and Lymphatic System Development and Function | 1.72E-16 - 3.21E-06 | 57 |
| Organismal Survival | 4.74E-15 - 5.68E-09 | 50 |
| Immune Response | 1.35E-13 - 1.88E-06 | 57 |
| Top Canonical Pathways | | |
| Name | p-value | Ratio |
| Leukocyte Extravasation Signaling | 9.98E-09 | 15/196 (0.077) |
| Glucocorticoid Receptor Signaling | 1.15E-08 | 17/279 (0.061) |
| RAR Activation | 1.43E-07 | 13/187 (0.07) |
| Ephrin Receptor Signaling | 1.65E-07 | 13/187 (0.07) |
| Axonal Guidance Signaling | 4.32E-07 | 18/390 (0.046) |

Figura 8. Identificación de las proteínas con los mayores niveles de cambio de expresión en cerebro de ratones *dilute*. Dentro de dos grandes criterios de clasificación (“Bio Funciones” y pertenencia a “Vías Metabólicas Canónicas”), existen diferentes grupos y luego subgrupos que denotan funciones específicas. Por ejemplo, dentro “Funciones Celulares y Moleculares”, existen 87 integrantes del grupo de las 146, que están asociadas a procesos relacionados con la “Muerte Celular”. La probabilidad que estas 87 proteínas hayan sido adjudicadas solo por azar es de $4,7 \times 10^{-23}$ para las relacionadas a “Muerte Celular” y $2,9 \times 10^{-6}$ para las específicamente relacionadas a “Muerte Celular de Células Endócrinas”. Ambas sub categorías representan los extremos entre los que existen muchas otras funciones específicas mas con valores intermedios de probabilidad asociada.

Los datos presentados en la figura 8, parecen sugerir que la mutación produce distorsiones en la expresión de ciertas proteínas. De las 146 proteínas seleccionadas para el estudio, entre 87 y 61 de ellas resultaron compatibles con cinco “funciones” (Muerte Celular, Crecimiento y Proliferación, Ciclo Celular, Señalización e Interacción Intercelular y Motilidad), con una alta probabilidad asociada. Estas cinco funciones son las mas significativas de un grupo mas amplio que llega a las 47. La cantidad de

proteínas de la muestra involucradas en las 42 funciones restantes, ya es muy inferior, lo mismo que su valor de probabilidad. La función mas asociada con los cambios de expresión proteica detectados es la “Muerte Celular”, en particular la muerte por apoptosis. De las 87 proteínas involucradas con “Muerte Celular”, 43 están reguladas en menos y 44 sobre expresadas. Sin embargo, la participación de este grupo de proteínas en el proceso de muerte celular y de apoptosis es seguramente indirecto, pues son muy pocas las que figuran explícitamente en esta vía metabólica. Además algunas vías metabólicas en las que efectivamente participa la MVa (“Actin Cytoskeleton Signaling”, “Synaptic Long Term Depression”) o funciones donde es bien conocida su participación (“Molecular Transport”), no muestran asociación significativa.

La “Vías metabólicas canónicas” que mas proteínas de las que están bajo análisis involucra, son “Extravasación leucocitaria” y “Señalización mediada por Receptor de Glucocorticoide”. Es interesante notar que algunos componentes constitutivos de estas vías aparecieron en los *arrays* de ADN, dentro del grupo de genes con cambio de expresión. Dos de ellos figuran en la tabla 2 (un transcripto inducido por glucocorticoides (Glcci-1) y el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF-A). Esto da a entender que la variación de la expresión de proteínas que se detecta en base a esta aproximación experimental, no solo es producto de regulación post transcripcional.

Si se desglosan las proteínas sobre expresadas de las sub expresadas y se analiza separadamente su importancia en las diferentes funciones o vías metabólicas, nos encontramos que “Muerte Celular” y “Crecimiento y Proliferación” siguen siendo las más importantes en ambos grupos. Evidentemente estas son las funciones mayormente afectadas y poseen un equilibrio entre componentes subexpresados como sobre expresados. Un comportamiento diferente muestran los datos cuando se los agrupa por vias metabólicas involucradas. Los sobre expresados están asociados con alta probabilidad estadística a la vía de “Señalización de las Efrinas” (vinculadas a procesos de migración celular y proyección axonal), desarrollo de procesos de “Hepatitis Fibrótica” y la vía de señalización vinculada al “Receptor de Hidrocarburos de Aro” (factor de transcripción vinculado a respuestas adaptativas relacionadas a la biotransformación y eliminación de sustancias). Por otro lado, el conjunto de las sub expresados no tienen relación alguna con las anteriores vías metabólicas aunque sí con

otras tales como la denominada “Señalización de la Extravasación Leucocitaria” (que incluye muchos integrantes involucrados en procesos tales como la regulación del ciclo celular, o dinámica del citoesqueleto de microfilamentos) y con dos vías más, vinculadas a dos receptores que funcionan como factores de transcripción: el de “Glucocorticoides” y el de “Acido Retinoico”. Estos factores de transcripción regulan genes blancos vinculados a procesos muy variados entre ellos, la diferenciación celular. Curiosamente, las proteínas sobre expresadas no están vinculadas a estas mismas vías metabólicas.

El hecho que las funciones o vías metabólicas que hayan implicado cambios mayores involucren alteraciones del ciclo celular en sus diversas formas (“Muerte Celular”, “Crecimiento y Proliferación”, “Ciclo Celular” “Señalización e Interacción Intercelular” y “Motilidad”) y por otro lado respuesta vascular de tipo inflamatoria (“Enfermedad Hematológica” e “Inmunológica” y “Extravasación Leucocitaria”), sugiere que se podría estar detectando un efecto dual. Por un lado, un efecto más o menos directo de la mutación sobre la viabilidad celular, la diferenciación o el crecimiento. Por otro, un efecto lateral o inespecífico (el vascular-inflamatorio) que tal vez tenga que ver con la pérdida general de estado que sufre el animal a partir del día 8-10 de vida y que culmina con la muerte pasado el día 18-20. Las muestras para los análisis de ARN y proteínas fueron colectadas alrededor del día 12 de vida.

Discusión general del Capítulo.

Los resultados experimentales hasta aquí expuestos indican claramente que los motores actina dependientes son actores importantes en el proceso de localización de ARNm y consecuentemente, de los fenómenos de polarización celular. Esto parece particularmente claro para la miosina Va y tal vez contribuya a entender la patogenia del cuadro clínico neurológico que es típico del mutante nulo para este gen (*dilute letal*). En efecto, si se tiene en cuenta la poca correlación existente entre la alteración morfológica (lo observado en cerebelo) y la funcional, parece necesaria la existencia de alguna disfunción adicional concomitante a la de la movilización de retículo endoplásmico y sus derivados en células de cerebelo, que explique la letalidad de la mutación. La aparente trascendencia de la MVa para la movilización o localización de al menos

algunos ARNm, no debe llevar a plantear un escenario simplista donde se conciba al gen *dilute* como el responsable central en este proceso, aún sobre los territorios ricos en microfilamentos. Seguramente el panorama es mucho más rico y complejo; en primer lugar porque a pesar de ser expresado en una gran variedad de tipos celulares, el gen *dilute* parece ser crítico solo en ciertas condiciones. Esto pone de relieve que existirían múltiples mecanismos alternativos o redundantes de localización o transporte de ARNm en microfilamentos y que el dependiente de MVa es esencial solo en algunos casos, por ejemplo en algunas neuronas. Una prueba de ello es que de acuerdo a los resultados presentados en el artículo precedente, solo la variante de *splicing* típicamente expresada en el sistema nervioso (77) parece ser la responsable de la movilización de ARNm. En segundo lugar, la importancia de MVa varía durante el desarrollo ya que el efecto deletéreo de la mutación se hace evidente solo luego del nacimiento. En mutantes, no se detectan alteraciones morfológicas ni funcionales antes del nacimiento (79). Finalmente, otras miosinas pueden estar también involucradas. Se mencionó a la MII (miosina II, no muscular) como integrante de RNPs (24) y participante en el proceso de localización del mensajero de β -actina, también en fibroblastos (26). Si bien las propiedades biológicas de las miosinas V y II son bastante diferentes, estos resultados podrían explicarse debido a fenómenos de redundancia o complementación entre ambos motores.

Un aspecto que queda sin aclarar es el mecanismo responsable de la movilización y anclaje de los ribosomas al citoesqueleto de actina. La miosina Va no parece ser la responsable aunque esté asociada a ellos. No es sorprendente que los ribosomas posean su propio mecanismo de transporte, independiente de los ARNm. Sin embargo podrían compartir el mismo mecanismo en algún momento. Ese momento sería durante su organización como gránulo de ARN, donde coinciden ARNm, ribosomas y la propia MVa. Lo que sí puede resultar sorprendente es que cuando la MVa falta, el ARNm se deslocaliza mientras los ribosomas no. Hay varias hipótesis que pueden explicar esa observación. Una de ellas es que el mecanismo de movilización de ARNm dependiente de MVa sea sólo válido para el mensajero de actina o a lo sumo unos pocos más. Otra explicación sería que los ribosomas que forman parte de estructuras tales como los gránulos de transporte representen una pequeña fracción del total y que su deslocalización sea enmascarada en las inmunohistoquímicas (figura 3), debido a la correcta localización de la mayoría de los ribosomas. Esta última opción

genera un modelo hipotético según el cual por un lado, ribosomas y mensajeros se mueven independientemente hasta converger en el “gránulo de RNA”. Por otro lado, la interacción ARNm-MVa debería ser anterior a su asociación al ribosoma (figura 9).

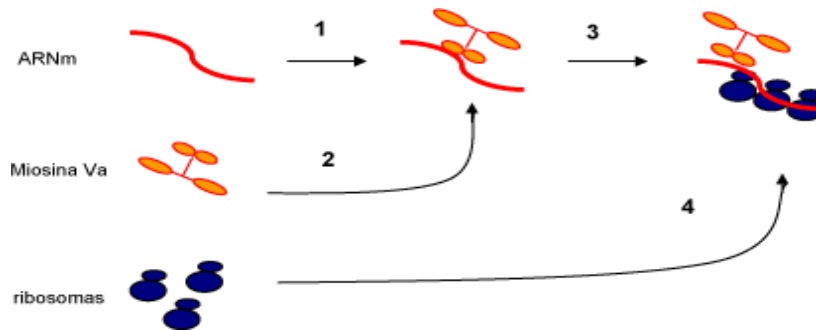


Figura 9: Modelización basada en la interpretación de los resultados sobre la dinámica de transporte del ARNm para β -actina, de ribosomas y su dependencia de miosina Va. El ARNm se une secuencialmente a MVa (paso “2”) y luego a ribosomas para formar el gránulo de ARN (paso “4”). De acuerdo a las observaciones reportadas en el artículo incluido en este capítulo, la unión ARNm-MVa parece ser un fenómeno muy temprano en el proceso, tal vez nuclear. La unión MVa ribosomas, se presume mas tardía, lo que daría cuenta de su escaso o nulo efecto sobre la localización ribosomal. Así, en el mutante estarían distorsionados los pasos “2” y “3”, los cuales afectan exclusivamente la distribución del ARNm.

A modo de conclusión parcial, se podría decir que los datos discutidos hasta aquí, son compatibles con un modelo análogo al planteado a propósito de los melanosomas u organelos derivados del sistema membranoso interno. Su asociación con ARNm y ribosomas ya fue planteado desde el capítulo anterior. También se asociación a kinesina. Ahora resulta claro que la MVa efectivamente influye sobre la localización de ARNm, lo cual a su vez explica definitivamente su abundancia en las PARPs de axones periféricos.

Respecto a las hipótesis referidas al posible efecto de la mutación sobre la expresión génica a nivel transcripcional, los resultados obtenidos no son minimamente contundentes como para confirmar esa posibilidad. Es más, la aparente aleatoriedad de los cambios detectados en mutantes respecto a los controles, parece sugerir lo contrario. Para estar mas seguros en un sentido como en el otro, sería necesario aumentar el número de ensayos tanto de microarreglos de DNA, de anticuerpos y luego cruzar los datos.

Los datos surgidos de los arrays de anticuerpos sugieren algo ligeramente diferente. Por un lado apoyan la idea de un cambio en el perfil de expresión de algunas proteínas. La participación preferente de estas proteínas en funciones relativas a la viabilidad celular, desarrollo y crecimiento, parece compatible con algunos aspectos funcionales de la MVa. Se conoce, por ejemplo la participación que tiene la MVa a nivel de cambios plásticos y sinápticos, no solo en la movilización de retículo endoplásmico (43, 44), sino también de constituyentes funcionales críticos para la pre sinapsis (80, 81) y la post sinapsis (27, 82). Finalmente, la MVa ha sido también involucrada en procesos que llevan a la apoptosis vía Bmf en células MCF-7 (línea celular de adenocarcinoma humano) (83). En efecto, normalmente el complejo Bmf-DLC2 (cadena liviana de dineína) permanece secuestrado y anclado al citoesqueleto de actina cortical a través de MVa. DLC2 es una de las conocidas “cadenas livianas” de la MVa y hace las veces de adaptador entre el motor y su carga. El desensamblaje del citoesqueleto cortical (por pérdida de la adhesividad intercelular, por ejemplo), libera a Bmf y activa su función pro apoptótica.

Si bien no parece reflejarse en los estudios de *arrays* de ADN, podría haber una expresión génica diferencial vía factores de transcripción, como el receptor de glucocorticoides, ácido retinoico o hidrocarburos de anillo. Aún siendo así, no es evidente si la ausencia de la MVa sea causa directa de alguno de estos fenómenos mencionados. Una investigación en este sentido exige buscar si existen interacciones directas de la MVa con alguno de estos factores de transcripción o sus proteínas reguladoras. De ser así se podría comenzar a comprender la cuestión referente al significado de la presencia de la MVa en el nucleoplasma y cuál es la razón por la cual la velocidad del transporte núcleo-citoplasma de ARN, se ve disminuido en su ausencia. Si este no fuera el caso, podría pensarse que mismo en el núcleo su función sería igualmente motor: existe un conjunto importante de evidencias que aunque indirectas, apuntan a la existencia de F-actina dentro del núcleo (84). Paralelamente, está bien establecido que la NMI (miosina nuclear I) se asocia con las tres ARN polimerasas (85). Particularmente, se ha observado que la actividad ARN polimerasa I es afectada negativamente por agentes depolimerizantes del citoesqueleto de actina (citoclasina D, latrunculina B, cofilina), mientras que aquellos que la estabilizan (faloidina, jasplakinolide, profilina), no afectan la actividad polimerasa (86). Estas evidencias

abren la posibilidad para pensar en una función motora a cargo de la MVa también en el núcleo, e incluyendo un papel en el transporte de ARN a través del poro nuclear. Una disfunción de esta actividad tendría repercusiones sobre la traducción y probablemente en forma indirecta y ulterior, sobre la transcripción.

Una interpretación diferente requiere la relación entre la ausencia de MVa y los procesos de tipo reactivo inflamatorio-degenerativo que aparecen concomitantemente: “Enfermedad Hematológica” e “Inmunológica”, “Extravasación Leucocitaria” y señalización vinculada al “Receptor de Hidrocarburos de Arilo”. Estos procesos, si realmente estuvieran ocurriendo, podrían representar alteraciones metabólicas secundarias y de tipo sistémico, producto de la descompensación que conduce días después, a la muerte del individuo.

Los resultados presentados y discutidos en el presente capítulo permiten despejar algunas dudas planteadas como hipótesis al comienzo, al tiempo que dejan la puerta abierta para muchas más interrogantes y posibles líneas en las cuales profundizar. Entre los aspectos en los que se ha podido concluir, está el de la efectiva participación de la MVa durante la polarización celular. Esta participación está no solo relacionada al movimiento de organelos, sino también al de ARNm. No es claro que tan importante es el eslabón de la cadena representado por la MVa, pero la evidencia proveniente de los mutantes indica que al menos en algunos tipos celulares sí lo es. El tema de su importancia en la determinación de la asimetría neuronal y el mantenimiento del axón queda pendiente de una respuesta, pero ahora existen elementos que permiten valorar con mas certeza sobre su significado en las PARPs y su asociación con los ARNm axonales. La asociación de MVa y ARNm comienza probablemente en el núcleo. Si tenemos en cuenta un reciente reporte en el que se prueba inequívocamente su presencia en el núcleo y su asociación a estructuras vinculadas a la maduración del ARNm (75), la formación temprana de un complejo ARNm-MVa a nivel nuclear se torna prácticamente una certeza. Esto obligaría a revisar el modelo de trabajo según el cual los motores moleculares se incorporan a las RNPs a nivel citoplásmico (Introducción, figura 1). Este aspecto también es importante al momento de reconstruir la patogenia de la disfunción causada en los mutantes *dilute*.

Material y Métodos (no incluidos en el artículo precedente).

Detección de proteínas ribosomales y del citoesqueleto en fibroblastos.

Inmunofluorescencia en cultivos. Los fibroblastos fueron cultivados de la forma previamente descrita. Las células fueron sembradas a una baja densidad y fijadas (paraformaldeído al 4 % en buffer fosfato salino, durante 30 minutos), dos días después. Posteriormente fueron permeabilizados usando tritón X-100 en el mismo buffer. Los anticuerpos y las condiciones usadas para la detección de proteínas ribosomales fueron las mismas que para la detección de ribosomas axonales (capítulo II). Los microtúbulos fueron visualizados utilizando un anticuerpo monoclonal anti tubulina (Santa Cruz Biotech) y un anticuerpo secundario anti ratón ligado a Alexa 488 (Invitrogen-Molecular Probes). Los microfilamentos fueron marcados directamente con el uso de faloidina–alexa 633 (Invitrogen-Molecular Probes). Los preparados fueron montados en medio permanente (ProLong Antifade, Invitrogen-Molecular Probes) y observados en un microscopio láser confocal (capítulo II).

Inmunoprecipitación de ribosomas de fibroblastos y detección de proteínas. Cultivos celulares equivalentes a los anteriores fueron utilizados para experimentos de inmunoprecipitación. Una suspensión de aproximadamente 2×10^6 células contenidas en 2 ml de buffer Hepes 40 mM pH 7.7, ATP, 10 mM, EGTA 5 mM, KCl 100mM, PMSF 100 μ M y leupeptina 100 μ M, fue sonicada con 6 ciclos de ultrasonido. Cada ciclo constó de 1 segundo de aplicación de ultrasonido, seguida de otro segundo de reposo. Las células lisadas son centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos. El sobrenadante es lo que se utilizó para inmunoprecipitar los ribosomas. El procedimiento de inmunoprecipitación es en esencia el mismo que el detallado en el capítulo II para la inmunoprecipitación de ribosomas a partir de RNPs. La co purificación de MVa con los ribosomas de fibroblastos, se demostró por western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce la región caudal medial de la proteína, y el sistema de revelado basado en la fosfatasa alcalina.

Micro arrays de DNA.

Preparación de la muestra. Se parte de 1 a 8 µg de RNA total purificado de acuerdo a protocolos convencionales (ver material y métodos, Capítulo II), para luego producir el ADNc o ADN copia a partir del cual se sintetizará la sonda en la hibridación. La transcripción se realiza usando T7-Oligo(dT)₂₄ como primer, 50 µM. Se desnaturaliza la sonda (70 °C, 10 minutos, luego 4 °C 2 minutos), para luego incorporar la mezcla en otra ya preparada conteniendo los desoxinucleótidos (10 mM) y la polimerasa de ADN SuperScript II (Invitrogen, 200 unidades) e incubarla 1 hora a 42 °C. Con el híbrido ARN-ADN se procede posteriormente a la síntesis de la cadena complementaria de ADN, incorporándole a la mezcla conteniendo dicho híbrido, desoxinucleótidos (10 mM), ADN ligasa, ADN polimerasa y ARNasa H (10, 40 y 2 unidades, respectivamente). La nueva mezcla se incuba 2 horas a 16 °C, para posteriormente agregarle 10 unidades de ADN polimerasa T4 y volver a incubarla a la misma temperatura, pero esta vez durante 5 minutos. La reacción finaliza con la adición de EDTA hasta una concentración final de 50 mM.

El cADN sintetizado es repurificado mediante su precipitación alcohólica y filtración en columnas por centrifugación (“cDNA Cleanup Spin Column”). Luego de lavado, el ADN retenido en la columna es eluído, utilizando un buffer adecuado.

La síntesis de la sonda marcada implica la incorporación de ribonucleótidos biotinilados en un proceso de transcripción del ADN y síntesis de ARNc. La reacción es realizada con ARN polimerasa T7, 50 unidades durante 16 horas a 37 °C. El ARNc sintetizado es repurificado mediante su precipitación alcohólica y filtración en columnas, en forma similar a como se purificó el ADN.

Finalmente, en el proceso de preparación de la sonda ésta debe ser fragmentada. Este proceso, que consiste en una fragmentación metálica (35 minutos a 94 °C en el medio adecuado), tiene como objetivo obtener una sonda en fragmentos de 35-200 bases y en una concentración final mayor a 0,5 µg/µl. El proceso de fragmentación es importante para una eficiente hibridación.

Hibridación. Para la hibridación propiamente dicha se utilizaron *chips* de Affymetrix MOE 430-2 que incluyen una parte importante del genoma del ratón (aproximadamente 30 mil genes). La sonda es diluida 1:10 en buffer de hibridación el cual incluye además de agente bloqu coastes (albúmina bovina, ADN de esperma de salmón), sondas que ofician de controles internos, suministradas por el fabricante (de origen procariota, y eucariota). La hibridación procede a 45 °C, durante 16 horas.

El lavado del *chip* se realiza con un buffer no astringente SSPE (3M NaCl, 0.2M NaH₂PO₄, 0.02M EDTA), para luego marcar con avidina-ficoeritrina (1 mg/ml). La señal es subsecuentemente amplificada mediante el uso de anticuerpos anti biotina, anti anticuerpos biotinilados y finalmente avidina-ficoeritrina. Los lavados que se realizan entre cada paso que lleva el proceso de marcación, se realizan con el buffer no astringente detallado.

Lectura y análisis de datos. Para la lectura del chip, se utilizó un *Affymetrix GeneChip Scanner 3000*, operado por el software *Affymetrix Microarray Suite*.

Los datos numéricos derivados de la lectura del array (cuantificación del valor de expresión de cada gen representado, fueron analizados utilizando la plataforma bioinformática “*Mad Bee*” (Center for Information Technology- National Institutes of Health). Los datos en “bruto” sufrieron un doble proceso de filtrado o selección. En primer lugar, un filtrado que podría denominarse “neutro”, pues implicó eliminar solo aquellos datos que no estuvieran representados en los 4 arrays, los que aún estando representados tuvieran valores marginales (en el límite de detección indicado por el propio fabricante) y los valores que en experimento duplicado no mostraron repetibilidad (desvío estándar menor a 0,3). Se redefinió así un primer grupo de datos básicos (12949 genes en cada grupo).

Un segundo filtrado, que tuvo como objetivo identificar todos aquellos genes que manifestaran cambios en su nivel de expresión según el tratamiento (controles y mutantes), se realizó seleccionando todos aquellas medias grupales cuyos valores difirieran en más de un 20% con una probabilidad asociada de 0,1 (*test* de *Student* con varianzas iguales y desconocidas). Los valores de medias grupales así seleccionados generaron un segundo grupo de valores que totalizaron 919 genes por grupo por grupo.

La agrupación de ambos grupos los datos en base a su significado funcional y estructural (Gen Ontology- Clasificación D) reclasificó los genes en 15 nuevos subgrupos. Esto fue realizado para conocer el porcentaje que cada uno de esos 15 subgrupos representa en la población antes y después de la selección del segundo grupo. El significado estadístico de la variación porcentual fue evaluado usando el *test* de *Chi* cuadrado de una cola para dos muestras independientes y con la corrección de continuidad de Grizzle para tablas de 2 x 2.

Arrays de anticuerpos.

Preparación de la muestra: los tejidos (cerebro) son homogeneizados en buffer fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 y centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos. El sobrenadante es ajustado a 1 mg de proteína por mililitro utilizando un buffer bicarbonato 0,2 M a pH 9. Para marcar con Cy3 y Cy5 las proteínas, cada muestra es independientemente incubada en una solución del marcador correspondiente (Amersham Biosciences) en medio bicarbonato 0,2 M a pH 9, durante 90 minutos. Una vez finalizada la incubación, la proteína marcada debe ser separada del exceso de colorante libre. Esto se hace mediante dos filtraciones moleculares sucesivas de la mezcla en columnas de sefadex G-15.

Arrays de anticuerpos. Los *arrays* de anticuerpos utilizados fueron diseñados e impresos en el Laboratorio de Tecnología Molecular (NCI-NIH, Frederick) utilizando una batería de unos 1000 anticuerpos (BD Biosciences, Transductions Laboratories). Dichos no están disponibles comercialmente.

Reconocimiento antígeno-anticuerpo. Las muestras a comparar (marcadas cada una con una molécula diferente), fueron mezcladas y ajustadas utilizando buffer de hibridación (fosfato de sodio 100 mM, pH 7.2, 0.1% Tween-20 y 0.1% poli-vinil pirrolidinona) a una concentración de 30 µg/ml en un volumen final de 5 ml. La incubación fue de 16 horas, a 4 °C y con agitación permanente. Finalizada la incubación, los *arrays* son lavados en varios ciclos con tween-20 0.05% en PBS.

Lectura del array y análisis de datos. El lector de *arrays* (Axon GenePix B-4000 Scanner, MDS Analytical Technologies) es un escáner equipado con dos láseres que

emiten cada uno y simultáneamente a 532nm y 635nm. El equipo es controlado por un software (GenePix Pro, *MDS Analytical Technologies*).

Procesamiento de la Información. Los datos crudos, tal como son obtenidos luego del “escaneo” de la placa son visualizados y procesados con un software adecuado (GenePix Pro). Este procesamiento básico implica eliminar aquellos “spots” que dan lugar a artefactos debidos a problemas en la impresión del *Chip*. Los datos cuantitativos son exportados a una planilla de *Excel (Microsoft)*, para luego desde allí eliminar todos aquellos datos cuyos valores numéricos no hayan sido coherentes con su duplicado (los realizados marcando la proteína con el fluoróforo cambiado). Finalmente se realiza una última selección de acuerdo a un punto de corte (arbitrario) relativo al cambio mínimo de expresión requerido para ser considerado “cambiado en su nivel de expresión”. Ese valor mínimo fue establecido en un 30%. Los cambios máximos llegaron al 130 %.

Para el análisis del contexto biológico de las variaciones detectadas, a lista depurada fue procesada utilizando la plataforma Ingenuity Analysis Pathways (*IPA 6.3-1402, Ingenuity Systems Inc, Redwood, Ca.*). El valor de significación (p) de la asociación de un grupo de datos experimentales a una “Función” o “Vía Metabólica”, fue calculado usando el Test Exacto de Fisher (unicaudal). En este caso, el *valor-p* es función directa del número de moléculas (muestrales) que participan en la Función y el número total de moléculas que, de acuerdo a la base de datos utilizados por la plataforma informática, existen en esa Función.

Capítulo IV

Desensamblaje de Ribonucleopartículas en respuesta al Calcio.

Introducción

Es ampliamente conocido el efecto modulador que el ión calcio tiene sobre la actividad de muy diversas moléculas. Dicho efecto es ejercido tanto en forma directa como indirecta. Un ejemplo clásico de modulación directa es el ejercido sobre la troponina C, durante la contracción muscular esquelética: la interacción calcio-troponina, genera en esta última un cambio conformacional suficientemente importante como para permitir la interacción de la actina con la miosina y la consecuente contracción muscular. Por otro lado, el calcio puede ser el disparador de una cascada enzimática a partir de la cual produce indirectamente, efectos biológicos tan variados como la liberación de neurotransmisores, el cambio en el perfil de la expresión génica o la apoptosis.

Las señales que gobiernan las cinéticas de ensamblaje de diversos tipos de RNPs, o las vías alternativas que una ribonucleopartícula dada puede seguir, recién comienzan a conocerse. Se han descrito varias moléculas con funciones represivas sobre la traducción del ARNm, tanto proteínas como micro ARNs. Entre las primeras, podría citarse por ejemplo a las proteínas de unión al eIF4E, las eIF4E-BPs u otras de funciones similares como maskin (en *Xenopus* y mamíferos), cup (*Drosophila*) o eIF4E-T (mamífero)(21), etc. Parece claro que la regulación de la traducción basada en eIF4E no solo esta ampliamente difundida en diferentes organismos sino que parece ser uno de los mecanismos más frecuentes aún en una misma célula. Las eIF4E-BPs resultan activas o inactivas según su estado fosforilado/desfosforilado. En su estado activo, inhiben la interacción entre eIF4E y una serie de otras proteínas adaptadoras componentes del complejo eIF4 (eIF4E/F/A/G/B) De esta forma y dependiendo de cual de estas proteínas inhibitoras se trate, puede bloquearse la traducción tempranamente (antes que el complejo eIF4 reclute el ARNm), o mas tarde, evitando que la partícula eIF4/ARNm se encuentre con el complejo de pre iniciación 43S (que incluye la subunidad ribosomal 40S)(87). Esta última parece ser una típica modalidad de represión

del ARNm utilizada para su posterior movilización como Partículas de Transporte, las cuales se caracterizan justamente, por no contener ribosomas. El levantamiento de la represión en las etapas tempranas implica la fosforilación de eIF4E-BP; ésta ocurre a través de la vía FRAP/mTOR. La represión a nivel de partícula de transporte (fases más tardías de represión), parece ser revertida a través de la vía PKB/AKT, evento que a su vez debe estar coordinado de alguna forma aún no determinada, con la llegada de la partícula a su destino final. Justamente, son esos estímulos locales los que permanecen pobremente comprendidos y cuya elucidación permitiría contestar preguntas tales como qué es lo que determina que las RNPs axonales se acumulen en forma de PARPs o qué factores son los capaces de levantar la represión sobre los ARNm que allí se encuentran. Otro pregunta interesante es cómo operan estos mecanismos a nivel de la síntesis proteica en las post sinapsis neuronales, o sea en la des represión de la traducción de las partículas de ARN que hasta allí llegan por transporte activo. De alguna forma, el control de los procesos de represión y des represión del material genético allí acumulado, es también el responsable de fenómenos claves como los que subyacen al aprendizaje y a la memoria, por ejemplo.

Una aproximación directa, aunque bastante grosera a estas preguntas proviene de experimentos en los que neuronas corticales en cultivo fueron estimuladas con un pulso único de cloruro de potasio (50 mM, 2 hs). En este caso las células respondían tanto con un cambio estructural de las RNPs presentes en sus axones, (identificadas con un anticuerpo anti proteína ribosomal S6 o anti staufen), las cuales parecían desensamblarse. Dicho cambio estructural era deducido a partir de la observación del cambio en el aspecto microscópico de los gránulos, así como del hecho que staufen y ciertos ARNm, dejaban de cosedimentar en las fracciones pesadas de ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa, para pasar a fracciones menos densas del gradiente. Esto último era interpretado como un desprendimiento de staufen de la partícula o dicho de otra forma, un desensamblaje de la misma. (12). En este caso entonces, parecía existir un vínculo entre la actividad eléctrica de membrana y el levantamiento de la represión existente sobre al menos algunas ARNs.

La participación del ión calcio en la regulación de la síntesis proteica local a nivel sináptico ha sido postulada ya hace varios años atrás (88). La sospecha de la existencia de un vínculo entre calcio y síntesis proteica en sinapsis estuvo basada en dos

fenómenos bien conocidos. Uno de ellos es el efecto modulador que el calcio almacenado en el retículo endoplásmico tiene sobre la síntesis de proteínas (89); el otro es la correlación que existe entre actividad eléctrica en las sinapsis, la aparición local de calcio y la plasticidad sináptica (90). El ejemplo de la plasticidad sináptica vinculada a los fenómenos de potenciación a largo plazo (LTP) es muy ilustrativo (91). El o los mecanismos por los cuales el calcio ingresado al territorio post sináptico, (ya sea desde el exterior o mas probablemente desde reservorios internos en la propia terminal) desencadena la síntesis local, no son conocidos.

La preparación de RNPs purificadas de cerebro de rata que hemos venido utilizando, está muy enriquecida en MVa. Sin embargo, hemos observado que el rendimiento en MVa de dicha preparación parece ser fuertemente dependiente de la presencia del quelante de calcio EGTA, durante el proceso de purificación. De la misma forma, la presencia de la proteína en la partícula ya purificada también seguía siendo dependiente de la presencia de EGTA en los medios de incubación. Considerando que la MVa es sustrato de las calpaínas, tiol proteasas calcio dependientes (36), entonces es factible que un proceso degradativo de ese tipo estuviera ocurriendo a nivel MVa presente en las RNPs que utilizamos como preparación. Se ha postulado a la hidrólisis de esta proteína como un mecanismo fisiológico de regulación de su función a nivel sináptico (92). Concretamente, en preparaciones de sinaptosomas aislados de corteza de cerebro de rata, se ha demostrado que la entrada de calcio subsiguiente a su despolarización induce el clivaje de esta proteína en una región específica de reconocimiento de calpaínas, la región PEST (prolina-glutamato-serina-treonina). A nivel sináptico, existen también otras proteínas que son sustratos de las calpaínas como por ejemplo, las citoesqueléticas (neurofilamentos, fodrina, talina y MAP-2), razón por la cual se ha involucrado a esta enzima en numerosos procesos fisiológicos (regulación de vías metabólicas, LTP) o patológicas (exitotoxicidad por glutamato, Alzheimer), que asientan en esa región (93). Respecto a la MVa presente en las RNPs, una posibilidad muy razonable es que esta proteína sea un motor o un ancla que localice estos complejos sobre los microfilamentos. Existen evidencias experimentales claras que avalan este supuesto. Postulamos entonces que *la hidrólisis por calpaínas de la MVa asociada a RNPs como consecuencia de la actividad sináptica (y el aumento local de*

calcio), podría significar un mecanismo por el cual la partícula se desprende del citoesqueleto y se prepara para la traducción.

Finalmente, teniendo en cuenta, a) los antecedentes comentados, b) la observación respecto a la dependencia entre la presencia de EGTA y la cantidad de MVa detectada en la preparación de RNPs y c) la hipótesis arriba planteada, comenzamos a explorar dicha hipótesis proponiendo como primer objetivo la necesidad de evaluar la actividad calpaínica en la preparación de RNPs.

Resultados experimentales y discusión.

a) Ensayo de hidrólisis Calcio- dependiente de la MVa. La incubación de la preparación de ribo nucleopartículas proteicas obtenidas de cerebelo no mostró indicios de actividad hidrolítica de ningún tipo (figura 1b). La digestión de MVa por calpaínas, genera un par de fragmentos de 130 y 80 kDa, los cuales corresponden a los dominios amino terminal y carboxilo terminal, respectivamente. Este último fragmento es el reconocido por el anticuerpo utilizado en este ensayo. Un resultado positivo de la digestión de la MVa en el sitio PEST, se evidenciaría en este caso concreto por un doble fenómeno: la desaparición paulatina de la banda de 200 kDa correspondiente a la cadena completa y la aparición concomitante de una banda de 80 kDa.

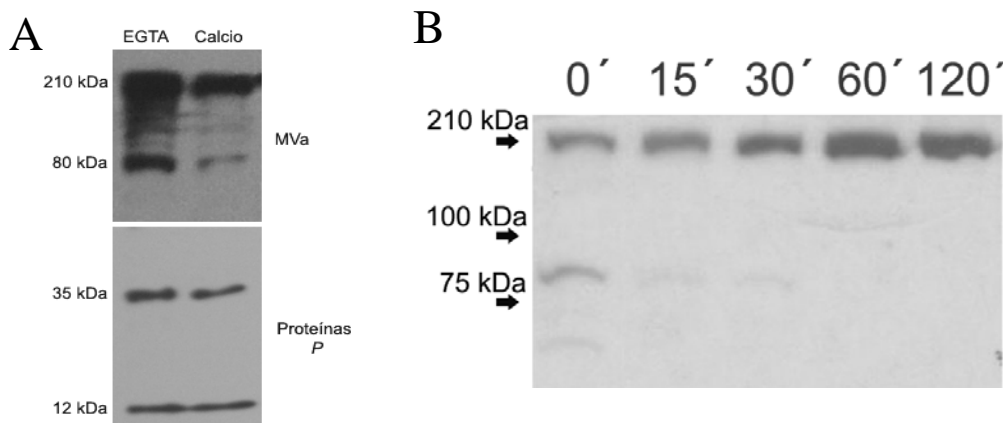


Figura 1. Efecto del calcio sobre la presencia de la MVa asociada a RNPs de cerebro de rata. A, abundancia de MVa y proteínas ribosomales P en la preparación de RNPs en cuestión, dependiendo del uso de EGTA o calcio (5 mM cada uno), durante la purificación. Mientras la miosina tiende a desaparecer, las bandas ribosomales parecen incambiables. Efectos similares pueden constatarse aún en presencia de calcio "contaminante". La detección de una banda de unos 80 kDa es un hallazgo constante. B, Detección de MVa en una misma preparación de RNPs, a diferentes tiempos de incubación a 37 °C, con CaCl₂ 5 mM. Nótese que la banda de 80 kDa desaparece con el tiempo, mientras que la de 210 kDa parece aumentar.

La intensidad de la banda de 200 kDa no disminuyó con el tiempo. Tampoco hubo aparición de nuevos fragmentos (bandas) de menor peso molecular (80 kDa), los cuales en digestiones *in vitro* en sobrenadantes de homogenado de cerebro, incubados a 27 °C, con CaCl₂ 5 mM y con una relación MVa/calpaína estimada en 20:1 (en mg), comienzan a ser evidentes tan temprano como al minuto (36). Un hecho paradójico que se aprecia en la figura 1B y que se constata inclusive cuando el experimento se repite en la presencia de EGTA, es una inmunoreactividad creciente en el tiempo de la banda de MVa, así como la desaparición de fragmentos inmunoreactivos de menor peso molecular (80 kDa, aproximadamente). Estos últimos suelen estar presentes siempre en la preparación (figura 1A). El hecho de no encontrar indicios de actividad proteolítica de ningún tipo, tan tarde como a los 120 minutos de incubación, representa la ausencia significativa de actividad de calpaína o de cualquier otra proteasa. Esta conclusión obligó a ensayar otras causas que expliquen las anteriores observaciones.

b) Efecto del Calcio sobre la interacción MVa-RNP. El hecho que la cantidad de MVa co purificada en las partículas sea menor en presencia de calcio, podría explicarse también por un efecto del calcio sobre la interacción entre la proteína motora y la partícula. Es muy conocido el efecto que el calcio es capaz de producir sobre el plegamiento de la proteína. Este efecto puede ser indirecto, induciendo cambios conformacionales de las cadenas de calmodulina ubicadas en los sitios IQ de la región del “cuello”, lo que a su vez repercute sobre la actividad motora (94), o directo modulando el plegamiento de la proteína y consecuentemente su actividad enzimática (94, 95). A nivel sináptico, se especula que el calcio puede ascender a valores del orden micro molar durante despolarizaciones con apertura de canales de calcio voltaje-dependientes (96, 97). En estas concentraciones de calcio (y en presencia de actina), la actividad ATPasica de la miosina Va es alta. Paradójicamente, en estas mismas condiciones de calcio, la actividad motora está inhibida (36, 37, 95). En este escenario, no está claro como sería la interacción de la miosina con su carga (la RNP). A la luz de las anteriores observaciones, y de la relación que existe entre calcio y motilidad, podríamos postular que la interacción podría verse debilitada y la proteína desprenderse del complejo macromolecular.

De ser esta hipótesis correcta, las partículas originalmente purificadas en presencia de EGTA, incubadas posteriormente en un buffer conteniendo calcio y nuevamente sedimentadas por ultracentrifugación, poseerán menor cantidad de MVa co purificada que al comienzo. Al tiempo, el sobrenadante de esta segunda centrifugación se verá enriquecido en la proteína. La figura 2 muestra claramente que existe una dependencia entre unión de MVa a las partículas y la concentración de calcio a la que son expuestas. Esta relación indica que el calcio las desestabiliza. Si bien el rango de concentración de calcio explorado permite visualizar claramente el fenómeno, este rango excede largamente lo fisiológico.

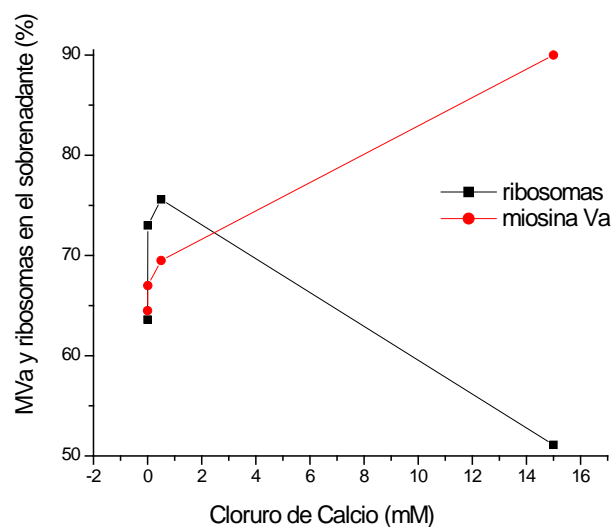


Figura 2. Efecto del incremento del calcio libre sobre la estructura de las RNPs. Ribonucleopartículas purificadas de cerebro de rata en presencia de EGTA 5 mM, incubadas en concentraciones crecientes de cloruro de calcio (que representaron 0, 0.005, 0.008 y 15 mM de calcio libre, respectivamente) y sedimentadas nuevamente por ultracentrifugación en un medio con sacarosa al 15%. Este medio de densidad intermedia retendrá en el sobrenadante no solo la nueva proteína soluble sino también pequeñas partículas que pudieran surgir del desensamblaje de RNP mayores. Nótese como tanto la MVa como las proteínas ribosomales presentan un comportamiento similar en una primera etapa, para luego divergir a concentraciones mayores de calcio. Los experimentos fueron hechos por duplicado, representando cada punto el promedio de ambos ensayos.

Sin perjuicio de la necesidad de explorar con mas detenimiento el fenómeno a concentraciones de calcio libre del orden nano o micro molar, los primeros puntos del gráfico de la figura 2, pueden ser igualmente de interés ya que representan concentraciones de calcio “fisiológicas”. El desplazamiento de las proteínas ribosomales desde el *pellet* al sobrenadante conforme el calcio aumenta, puede en principio parecer contradictorio con lo mostrado en la figura 1A. Allí se muestra que mientras la MVa se pierde durante el proceso de purificación de las RNPs cuando se utiliza calcio, los

ribosomas se mantienen mas o menos constantes. Sin embargo, la ultracentrifugación de partículas en un medio de baja densidad (experimento de la figura 1A) conduce a la sedimentación de todas ellas independientemente de su tamaño y densidad. Si la misma ultracentrifugación se realiza en un medio de densidad intermedia (por ejemplo sacarosa 15%, en el experimento de la figura 2), algunas partículas menores pueden ser retenidas en el sobrenadante. Probablemente eso explique la aparente discrepancia arriba comentada. Los ribosomas obtenidos en la preparación de RNPs de cerebro de rata, son en gran parte ribosomas unidos a membrana (24). Cuando una preparación de este tipo es incorporada a un medio con concentraciones de calcio altas (5 a 8 mM), por fuera del rango fisiológico, las membranas se precipitan, arrastrando los ribosomas con ellas. Este fenómeno ha sido utilizado para purificar retículo endoplásmico rugoso a partir de hígado, con alto rendimiento en ribosomas y de muy alta pureza (98). En nuestra preparación hemos detectado en experimentos pilotos previos, este fenómeno a partir de concentraciones de calcio libre cercanas a 2 mM. Una posibilidad interesante derivada de estas observaciones es que si bien la MVa y los ribosomas parecen seguir una dinámica similar en respuesta a concentraciones de calcio dentro del rango “fisiológico”, esto no implica que esas mismas condiciones sigan compartiendo una misma estructura macromolecular.

c) El calcio promueve el desensamblaje general de la RNP. Una hipótesis que surge de los experimentos anteriores es la posibilidad que en respuesta a calcio la partícula se esté desensamblando en componentes menores. Dicho de otra forma, no estaría ocurriendo una solubilización selectiva de determinados componentes, (la MVa) sino una disgregación de la estructura. Una forma de visualizar más fácilmente el fenómeno es someter a las partículas tratadas con y sin calcio a una ultracentrifugación en gradiente y el posterior análisis de las diferentes fracciones.

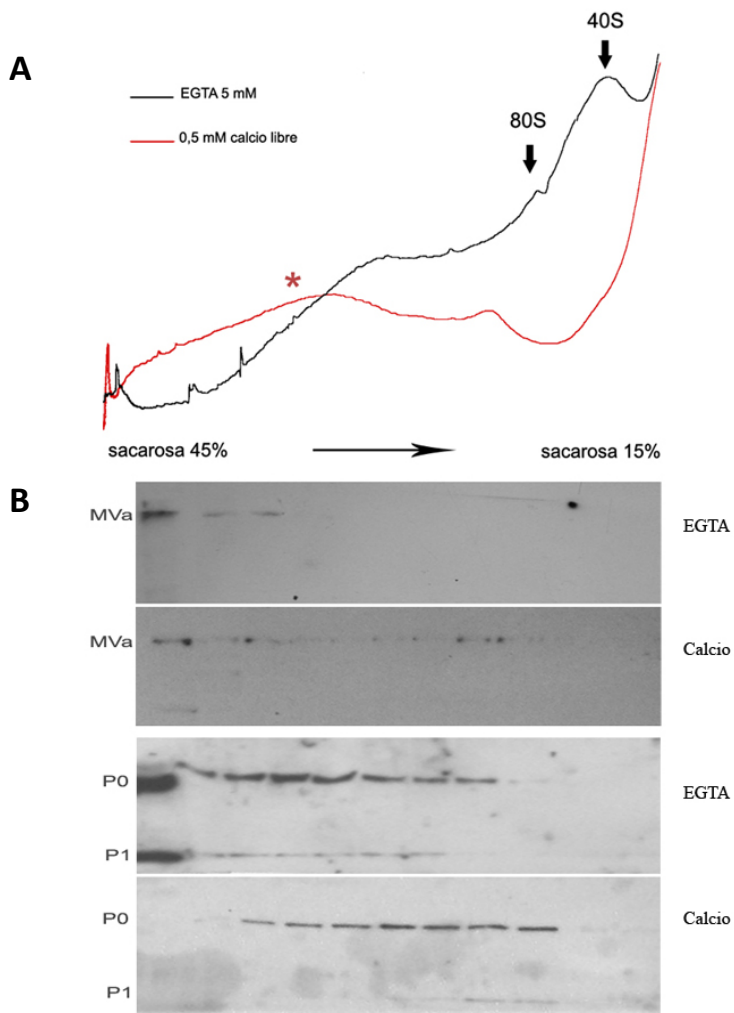


Figura 3. El calcio promueve el desensamblaje de las RNPs. A, Medida continua de la densidad óptica a 280 nm, desde las regiones más densas a las menos densas de un gradiente de sacarosa en el que se sembraron RNPs obtenidas de cerebro de rata. Las líneas oscura y roja representan dos condiciones experimentales diferentes. Los perfiles cromatográficos resultan suficientemente diferentes como para sospechar cambios estructurales en las partículas debidos al tratamiento (calcio). B, Western blot de MVa y ribosomas a lo largo de estos mismos gradiente, en ausencia o presencia de calcio. La proyección de ambos constituyentes hacia las fracciones más livianas, sugiere su incorporación a complejos menos densos.

La figura 3 muestra más claramente el efecto del calcio sobre las partículas. La comparación de los cromatogramas (figura 3A), denota que el efecto del calcio sobre las partículas es bastante más dramático que la simple disociación de alguna proteína. Es clara la desaparición de las fracciones de coeficiente de sedimentación entre 40 y 80S, así como la aparición, difícil de explicar pero constante, de una fracción sumamente pesada que alcanza casi el fondo del tubo (sacarosa 45%).

El estudio particular del movimiento de la MVa en el gradiente (figura 3B), confirma lo ya comentado: esta proteína es uno de los componentes que pierde el complejo, pues se mueve desde las fracciones más pesadas del gradiente a las más livianas. Algo similar ocurre con los ribosomas, los cuales en respuesta al calcio, tienden a desplazarse hacia fracciones más livianas del gradiente. Estas imágenes sugieren una vez más que tanto los ribosomas como la MVa tienen un comportamiento comparable pero no igual, lo cual apoya la idea de un fraccionamiento múltiple de la partícula. A propósito de la MVa, es interesante destacar que su distribución ocupa usualmente varias regiones en el gradiente y que esto se acentúa luego del tratamiento

con calcio. Esto implica que la proteína está simultáneamente formando parte de estructuras de tamaño (y tal vez naturaleza) diversa.

Discusión general del Capítulo.

La expresión local de proteínas en las post sinapsis, sostenida a su vez por el transporte de ARNm y el resto de la maquinaria traduccional, tal vez sea uno de los ejemplos más dramáticos de polarización funcional y estructural. Lo dramático no solo cuenta por lo paradigmático que es el fenómeno sino por las implicancias funcionales que tiene. Detrás de la línea de razonamiento que ata las sucesivas hipótesis que se plantearon aquí, está implícito el interés por entender un aspecto puntual de la regulación *in vivo* de la expresión de la información contenida en las RNPs y cómo podría ocurrir esto a nivel de las sinapsis. El modelo de las sinapsis, además de ser interesante en sí mismo, es oportuno por representar el destino final del tráfico de muchos ARN, por estar puntualmente involucrada la MVa (27) y por existir una correlación bien establecida entre la aparición de una señal (el calcio) y la expresión local de ARNm (90, 91, 99).

En referencia a los resultados expuestos en este capítulo, surgen inmediatamente una serie de preguntas casi obvias tales como qué tanto de lo observado *in vitro* pudiera ocurrir en una sinapsis, o qué relevancia fisiológica pudieran tener. Por ejemplo, el aspecto que muestra el cromatograma correspondiente al experimento de la sedimentación en gradiente de las RNPs expuestas a calcio, sugiere perfiles similares a los que se pueden reproducir cuando se desensamblan ribosomas con EDTA, *in vitro*. Podría especularse que el efecto observado del calcio sobre los ribosomas responde a un mecanismo análogo al del EDTA: al adicionar calcio a las RNPs, éste compite con el magnesio, pudiendo desplazarlo y mimetizar un efecto “tipo EDTA”. Si bien esta posibilidad no puede ser descartada en base a los datos producidos, ésta parece poco probable. En primer lugar, la cantidad de calcio iónico, o sea libre, que es necesario adicionar para lograr el efecto es ínfima (0,5-1 μ M) respecto a los 5 mM de magnesio que existe en el medio de incubación. Por lo tanto podemos considerar que el calcio está ejerciendo su efecto sin necesidad de desplazar al magnesio de sus sitios de unión. Por otro lado, podría pensarse que el EGTA estaría quelando magnesio, sacándolo de sus

sitios naturales de unión y favoreciendo así el efecto competitivo del calcio. Sin embargo, teniendo en cuenta que la afinidad del EGTA por calcio es por lo menos 5 órdenes de magnitud mayor que por magnesio (100), esta interacción no sería cuantitativamente importante.

Existen evidencias reportadas que apoyan la posible relevancia fisiológica del fenómeno observado. El calcio es capaz de alterar la estabilidad del complejo formado por la proteína TLS (de unión al ARNm codificante para la proteína Nd-1) y la MVa, in vitro (27). La adición de cloruro de calcio al medio conteniendo estos complejos, produce la disociación de la MVa por un lado y TLS-ARNm por otro. Las concentraciones de calcio libre no son reportadas, pero sí se sabe que el efecto comienza a ser evidente a partir de cantidades de cloruro de calcio de 10 μ M. Dicho efecto comienza a ser revertido por el cloruro de magnesio a concentraciones 100 veces superiores a las de cloruro de calcio, lo que de alguna forma sugiere que el efecto del calcio es específico. En cultivos de células de hipocampo, estos mismos autores muestran como la translocación hacia la espina dendrítica de gránulos conteniendo GFP-TLS y posteriores cambios morfológicos locales, eran inducidos por la estimulación de receptores metabotrópicos de glutamato que responden a DHPG (Di Hidroxi Fenil Glicina). El estímulo de este tipo de receptores, induce la liberación localizada de calcio desde reservorios internos (retículo endoplásmico). Más aún, el efecto del DHPG podía ser revertido si la MVa era inhibida usando RNA de interferencia o generando dominantes negativos para la miosina. En el mismo sentido, el efecto del DHPG sobre la translocación de los complejos conteniendo GFP-TLS, resultó menor en mutantes nulos para MVa (*dilute letal*) cuando se los comparaba con los silvestres. Los autores concluyen, entre otras cosas, que el calcio movilizado como consecuencia del estímulo con DHPG, promovía el transporte de los gránulos, a cargo de MVa. El calcio intracelular movilizado por estímulo a los receptores metabotrópicos de glutamato, también ejerce efectos similares sobre el transporte dendrítico dependiente de microtúbulos de complejos ribonucleo proteicos que contenían FMRP (Frágil X Mental Retardation Protein) (101). Finalmente, en sinaptodendrosomas de corteza de cerebro de ratón se ha observado que la interacción entre FMRP y el ARNm codificante para APP (Proteína Precursor de Amiloide) se debilita cuando éstos son estimulados con DHPG (102). Este efecto se correlaciona en la misma preparación, con

una activación de la síntesis de APP. Teniendo en cuenta que FMRP es una proteína de unión al ARN de efecto represor sobre su expresión, entonces podría concluirse que el calcio liberado de los reservorios internos presentes en esas terminales sinápticas, es capaz de promover la disociación de esta partícula y la ulterior síntesis proteica local.

En suma, los resultados expuestos en este capítulo resultan en cierta forma compatibles con la evidencia publicada. Estos mismos resultados sugieren que este ión podría tener un efecto directo sobre algunos componentes de las RNPs. Este aspecto particular es novedoso. Esto, de ninguna manera implica que el calcio por sí solo sea capaz de activar mecanismos tan complejos como la des represión de los ARNm, su transporte y la síntesis proteica. Sin embargo, podría ser un primer paso, un *priming* que implicara por ejemplo la distensión de una estructura fuertemente empaquetada y permitir la subsecuente activación de una serie de mecanismos conducentes a la traducción de los ARNm (figura 5).

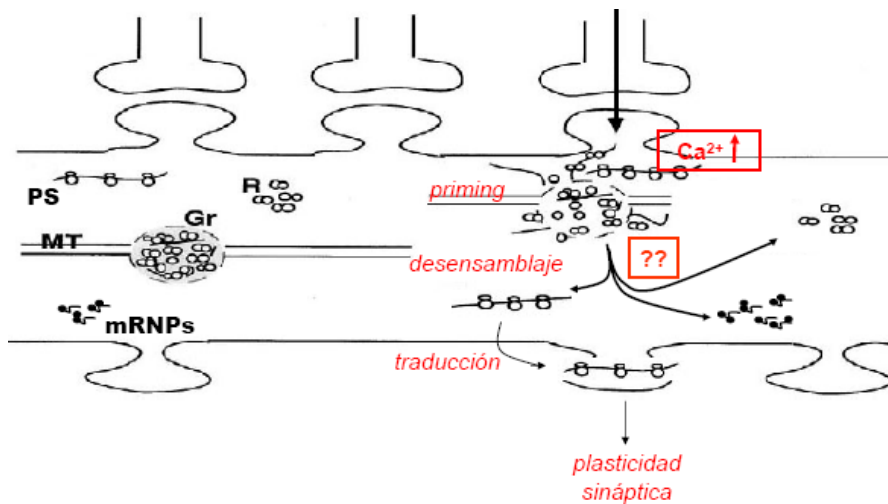


Figura 5. Modelización de la hipotética intervención del calcio en el fenómeno de plasticidad celular dependiente de síntesis proteica local. En una dendrita, a nivel post sináptico pueden encontrarse simultáneamente polisomas (PS), ARNm empaquetados (mRNPs), ribosomas (R) y gránulos de ARN (Gr), asociados a microtúbulos (MT). El aumento local de la concentración de calcio libre asociado a la actividad sináptica, daría lugar a un desensamblaje parcial o relajamiento de algunas RNPs (Gránulos de ARN, por ejemplo). Postulamos que esta sería una etapa preparativa (o "*priming*") previa al desensamblaje de la partícula, la des represión de sus componentes y la activación del proceso traduccional.

Material y Métodos.

Purificación de ribonucleopartículas de cerebro de rata. La preparación de RNPs utilizada en los experimentos relatados en este capítulo es la publicada por Ohashi et al (24), la cual ya fue explicitada en el capítulo II. En aquellos experimentos en que se utilizó EGTA o cloruro de calcio durante la purificación, la concentración fue 5 mM en ambos casos.

Ensayo de digestión de la MVa por calpaína. Se utilizó una preparación de RNPs obtenida sin la adición de EGTA ni calcio a los buffer de purificación, con una concentración final de proteína de 3 mg por mililitro. En este momento se toma una alícuota, la cual será la muestra “tiempo 0”. La suspensión de RNPs fue dividida en dos tubos, a los cuales se le agregó EGTA o cloruro de calcio 5 mM, seguidos por una incubación a 37 °C. A los tiempos 15, 30, 90 y 120 minutos se sacaron alícuotas de volúmenes iguales, mezcladas inmediatamente con buffer de electroforesis e inmediatamente congeladas a -20 °C. Esas alícuotas fueron posteriormente utilizadas para detectar en ellas los fragmentos de 80 kDa, típicos de la actividad calpaínica sobre la MVa, evidentes cuando se utiliza un anticuerpo desarrollado contra la región carboxilo terminal de la proteína.

Desensamblaje de RNPs en respuesta a calcio. Una preparación de RNPs purificada utilizando EGTA 5 mM fue utilizada para estos ensayos. Para ello se sembró sobre la superficie de un buffer con sacarosa al 15% (Tris 25 mM pH 7.5, NaCl 25 mM y MgCl₂ 5 mM) contenido en sendos tubos de ultracentrifugación, 320 µl de RNPs (1 mg de proteína total, aproximadamente) con diferentes concentraciones de calcio. Las cantidades de cloruro de calcio adicionadas a cada preparación fue tal que las cantidades de calcio libre fueron de 0,005 mM, 0,008 mM y 15 mM. Además se incluyó un tubo correspondiente a “0 calcio”, el cual solo contenía EGTA 5 mM. Las concentraciones de calcio libre fueron calculadas basándose en el programa *Mcalc*, de Fabiato (103) usando las constantes de Schwarzenbach para la disociación Ca-EGTA. Las ultracentrifugaciones se realizaron utilizando un rotor SW65, a 160.000g, durante 60 minutos. El pellet de la centrifugación fue resuspendido en 100 µl de buffer de electroforesis, mientras que el sobrenadante representó un volumen seis veces mayor.

Cuantificación densitometría de las proteínas. Las proteínas presentes en las diferentes fracciones fueron separadas por electroforesis (SDS-PAGE) y transferidas a una membrana de PVDF. La detección de la MVa y proteínas ribosomales *P* se realizó utilizando quimioluminiscencia (Amersham Biosciences). Esta forma de inmunodetección es la que guarda mas proporcionalidad entre la cantidad de antígeno y la señal resultante, razón por la cual es la mas apropiada para una subsiguiente cuantificación. La densitometría fue realizada usando el software *Image J 1.4*, de acceso libre a través del *Research Services Branch* del *National Institute of Health*, EEUU. Los valores de proteína de interés, presentes en cada fracción fueron expresados como porcentaje respecto al total de esa proteína presente en la muestra.

Centrifugación de RNPs incubadas con y sin calcio en gradientes de sacarosa. La metodología utilizada fue básicamente la misma que la anteriormente descrita, con la excepción del uso de un gradiente continuo de sacarosa del 45 al 15 % en el mismo buffer detallado anteriormente. Luego de la centrifugación, 20 fracciones de 250 μ l fueron colectadas de cada tubo. Simultáneamente se midió la absorbancia a 280 nm de longitud de onda utilizando una celda espectrofotométrica Shimadzu SPD6A y registrando el cromatograma en un integrador Shimadzu Chromatopac C-R6A. Las fracciones obtenidas fueron reservadas para su posterior procesamiento.

Conclusiones

El objetivo general del trabajo de tesis estuvo orientado hacia el estudio de algunos de los mecanismos que gobiernan la generación de asimetrías celulares, particularmente aquellos involucrados en el mantenimiento de la estructura e identidad de los axones maduros del Sistema Nervioso Periférico. Este objetivo fue abordado desde dos perspectivas, una interesada en conocer mejor el significado biológico de la proteína miosina Va en los largos axones periféricos y el otro la existencia, naturaleza y el significado de los ribonucleo complejos proteicos presentes en el axón. Posteriormente, la dinámica del trabajo nos llevó a interesarnos por la interacción miosina-RNPs, más allá de lo que implica el territorio axonal específicamente.

Los resultados de la tesis aportan en ambos sentidos. En primer lugar, contribuyen a la caracterización de esa interacción RNP-MVa, aportando elementos novedosos que sugieren la importancia de esta interacción para la correcta localización de (al menos algunos) ARNm. Este aspecto funcional de la MVa, se presenta tanto como un mecanismo relativamente novedoso para una proteína ya muy versátil, al tiempo que difundido en diversos tipos celulares. A nivel axonal, queda mejor caracterizada la presencia de ribonucleocomplejos axonales, su asociación con complejos motores dobles (miosina-kinesina) y su relación con las PARPs. Esto sugiere claramente que el territorio axonal, no es una excepción biológica y caben para el los mismos mecanismos básicos que para otros territorios celulares: el transporte de ARNm y la síntesis local de componentes específicos como garantes del proceso de polarización. Pensamos que la incorporación de este último concepto al “acervo cultural neurobiológico”, significa una herramienta importante para comprender mejor al axón tanto en su función como en su patología.

Referencias

- 1- **Palay SL, Palade GE.** The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol.* 1955 Jan;1(1):69-88.
- 2- **Lasek RJ & Hoffman PN.** The neuronal cytoskeleton, axonal transport and axonal growth. En *Cell Motility: microtubules and related proteins*, GoldmanR, Pollard T, Rosebaum J, editors. New York, Cold Spring Harbour. 1976. 3:1021-1049
- 3- **Serani-Merlo, A.** Jaime Alvarez and the case against slow axoplasmic transport: some epistemological reflections. *Biol. Res.*, 2001, vol.34, no.2, p.111-115.
- 4- **Koenig E, Koelle GB.** Acetylcholinesterase regeneration in peripheral nerve after irreversible inactivation. *Science* 132: 12491250, 1960.
- 5- **Sander K.** Pattern specification in the insect embryo. In *Cell Patterning. CIBA Foundation Symp.*1975, 29:241-263.
- 6- **Nüsslein-Volhard C, Frohnhöfer HG, Lehmann R.** Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science.* 1987 Dec 18;238(4834):1675-81.
- 7- **Long RM, Singer RH, Meng X, Gonzalez I, Nasmyth K, Jansen RP.** Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of *ASH1* mRNA. *Science.* 1997 Jul 18;277(5324):383-7.
- 8- **Jansen RP, Dowzer C, Michaelis C, Galova M, Nasmyth K.** Mother cell-specific *HO* expression in budding yeast depends on the unconventional myosin *myo4p* and other cytoplasmic proteins. *Cell.* 1996 Mar 8;84(5):687-97.
- 9- **Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM.** Localization of *ASH1* mRNA particles in living yeast. *Mol Cell.* 1998 Oct;2(4):437-45.
- 10- **Cheney RE, O'Shea MK, Heuser JE, Coelho MV, Wolenski JS, Espreafico EM, Forscher P, Larson RE, Mooseker MS.** Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell.* 1993 Oct 8;75(1):13-23
- 11- **Aronov S, Aranda G, Behar L, Ginzburg I.** Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci.* 2001 Sep 1;21(17):6577-87.
- 12- **Krichevsky AM, Kosik KS.** Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron.* 2001 Nov 20;32(4):683-96.
- 13- **Latham VM Jr, Kislauskis EH, Singer RH, Ross AF.** Beta-actin mRNA localization is regulated by signal transduction mechanisms. *J Cell Biol.* 1994 Sep;126(5):1211-9.
- 14- **Zhang HL, Singer RH, Bassell GJ.** Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones. *J Cell Biol.* 1999 Oct 4;147(1):59-70.

- 15- **Sundell C. L. and Singer R. H.** Actin mRNA Localizes in the Absence of Protein Synthesis. *J Cell Biol.* 1990, 111 (6): 2397-2403.
- 16- **Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH.** Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol.* 1994;127(2):441-51.
- 17- **Ainger K, Avossa D, Diana AS, Barry C, Barbarese E, Carson JH.** Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol.* 1997 8;138(5):1077-87.
- 18- **Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH.** Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol.* 1997 Apr;17(4):2158-65.
- 19- **Zhang H.L., Eom T., Oleynikov Y., Shenoy S.M., Liebelt D.A., Dichtenberg J.B., Singer R.H. and Bassell G.J.** Neurotrophin-Induced Transport of a β -Actin mRNP Complex Increases β -Actin Levels and Stimulates Growth Cone Motility. *Neuron*, 2001, 31:261–275.
- 20- **Rossoll W., Jablonka S., Andreassi C., Kröning A. K., Karle K., Monani U. R. and Sendtner M.** Smn, the spinal muscular atrophy–determining gene product, modulates axon growth and localization of β -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *The Journal of Cell Biology*, 2003, 163: 801–812.
- 21- **Sossin WS and DesGroseillers L.** Intracellular Trafficking of RNA in neurons *Traffic* 2006; 7:1581-1589.
- 22- **Costa-Mattioli M., Gobert D., Harding H., Herdy B., Azzi M., Bruno M., Bidinosti M., Mamou C. B., Marcinkiewicz E., Yoshida M., Imataka H., Cuello A. C., Seidah N., Sossin W., Lacaille J. C., Ron D., Nader K., and Sonenberg N.** Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2 α kinase, GCN2. *Nature*, 2005. 436:1166-1173.
- 23- **Knowles RB, Sabry JH, Martone ME, Deerinck TJ, Ellisman MH, Bassell GJ, Kosik KS.** Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci.* 1996 Dec 15;16(24):7812-20
- 24- **Ohashi S, Koike K, Omori A, Ichinose S, Ohara S, Kobayashi S, Sato TA, Anzai K.** 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.* 2002 Oct 4;277(40):37804-10. Epub 2002 Jul 29
- 25- **Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N.** Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron.* 2004 Aug 19;43(4):513-25.
- 26- **Latham VM, Yu EH, Tullio AN, Adelstein RS, Singer RH.** A Rho-dependent signaling pathway operating through myosin localizes beta-actin mRNA in fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 2002 Feb;13(2):579-92.

- 27- **Yoshimura A, Fujii R, Watanabe Y, Okabe S, Fukui K, Takumi T** Myosin-Va facilitates the accumulation of mRNA/protein complex in dendritic spines. *Curr Biol*. 2006 Dec 5;16(23):2345-51.
- 28- **Petritsch C, Tavosanis G, Turck CW, Jan LY, Jan YN**. The *Drosophila* myosin VI Jaguar is required for basal protein targeting and correct spindle orientation in mitotic neuroblasts. *Dev Cell*. 2003 Feb;4(2):273-81.
- 29- **Hamada S., Ishiyama K., Sakulsingharoj C., Choi S. B., Wu Y., Wang C., Singh S., Kawai N., Messing J., and Okita T. W.** Dual Regulated RNA Transport Pathways to the Cortical Region in Developing Rice Endosperm. *The Plant Cell*. (2003) 15, 2253-2264.
- 30- **Yisraeli JK, Sokol S, Melton DA**. A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development*. 1990 Feb;108(2):289-98.
- 31- **Gu W, Pan F, Zhang H, Bassell GJ, Singer RH**. A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of beta-actin mRNA in fibroblasts and neurons. *J Cell Biol*. 2002 Jan 7;156(1):41-51. Epub 2002 Jan 7.
- 32- **Richards TA, Cavalier-Smith T**. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature*. 2005 Aug 25;436(7054):1113-8.
- 33- **Hodge T, Cope MJ**. A myosin family tree. *J Cell Sci*. 2000 Oct;113 Pt 19:3353-4.
- 34- **Mercer JA, Seperack PK, Strobel MC, Copeland NG, Jenkins NA**. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature*. 1991 Feb 21;349(6311):709-13.
- 35- **Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AA, De Camilli PV, Larson RE, Mooseker MS**. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol*. 1992 Dec;119(6):1541-57.
- 36- **Espindola FS, Espreafico EM, Coelho MV, Martins AR, Costa FR, Mooseker MS, Larson RE**. Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin. *J Cell Biol*. 1992 Jul;118(2):359-68.
- 37- **Nascimento AA, Cheney RE, Tauhata SB, Larson RE, Mooseker MS**. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J Biol Chem*. 1996 Jul 19;271(29):17561-9.
- 38- **Mehta AD, Rock RS, Rief M, Spudich JA, Mooseker MS, Cheney RE**. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature*. 1999 Aug 5;400(6744):590-3.

- 39- **Tabb JS, Molyneaux BJ, Cohen DL, Kuznetsov SA, Langford GM.** Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *J Cell Sci.* 1998 Nov;111 (Pt 21):3221-34.
- 40- **Brown JR, Stafford P, Langford GM.** Short-range axonal/dendritic transport by myosin-V: A model for vesicle delivery to the synapse. *J Neurobiol.* 2004 Feb 5;58(2):175-88.
- 41- **Provance DW Jr, Wei M, Ipe V, Mercer JA.** Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10;93(25):14554-8.
- 42- **Gross SP, Tuma MC, Deacon SW, Serpinskaya AS, Reilein AR, Gelfand VI.** Interactions and regulation of molecular motors in *Xenopus* melanophores. *J Cell Biol.* 2002 Mar 4;156(5):855-65. Epub 2002 Feb 25.
- 43- **Dekker-Ohno K, Hayasaka S, Takagishi Y, Oda S, Wakasugi N, Mikoshiba K, Inouye M, Yamamura H.** Endoplasmic reticulum is missing in dendritic spines of Purkinje cells of the ataxic mutant rat. *Brain Res.* 1996 Apr 1;714(1-2):226-30
- 44- **Takagishi Y, Oda S, Hayasaka S, Dekker-Ohno K, Shikata T, Inouye M, Yamamura H.** The dilute-lethal (dl) gene attacks a Ca²⁺ store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. *Neurosci Lett.* 1996 Sep 13;215(3):169-72.
- 45- **Miyata M, Finch EA, Khiroug L, Hashimoto K, Hayasaka S, Oda SI, Inouye M, Takagishi Y, Augustine GJ, Kano M.** Local calcium release in dendritic spines required for long-term synaptic depression. *Neuron.* 2000, 28(1):233-44.
- 46- **Hirokawa N.** The mechanisms of fast and slow transport in neurons: identification and characterization of the new kinesin superfamily motors. *Curr Opin Neurobiol.* 1997 Oct;7(5):605-14.
- 47- **Larson RE, Pitta DE, Ferro JA.** A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. *Braz J Med Biol Res.* 1988;21(2):213-7.
- 48- **Miller KE, Sheetz MP.** Characterization of myosin V binding to brain vesicles. *J Biol Chem.* 2000 Jan 28;275(4):2598-606.
- 49- **Costa MC, Mani F, Santoro W Jr, Espreafico EM, Larson RE.** Brain myosin-V, a calmodulin-carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase II and activates its kinase activity. *J Biol Chem.* 1999 May 28;274(22):15811-9.
- 50- **Huang JD, Brady ST, Richards BW, Stenolen D, Resau JH, Copeland NG, Jenkins NA.** Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature.* 1999 Jan 21;397(6716):267-70.
- 51- **Bridgman PC.** Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex. *J Cell Biol.* 1999 Sep 6;146(5):1045-60.

- 52- **Langford GM.** Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr Opin Cell Biol.* 1995 Feb;7(1):82-8.
- 53- **Hunter AW, Wordeman L.** How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *J Cell Sci.* 2000 Dec;113 Pt 24:4379-89.
- 54- **St Johnston D.** Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 May;6(5):363-75.
- 55- **Edstrom JE, Eichner D, Edstrom A.** The ribonucleic acid of axons and myelin sheaths from Mauthner neurons. *Biochim Biophys Acta.* 1962 Aug 20;61:178-84.
- 56- **Olink-Coux M and Hollenbeck PJ.** Localization and active transport of mRNA in axons of sympathetic neurons in culture. *J Neurosci.* 1996 Feb 15;16(4):1346-58
- 57- **Aronov S, Aranda G, Behar L, Ginzburg I.** Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J Cell Sci* 2002 Oct 1;115(Pt 19):3817-27.
- 58- **Muslimov I, Titmus M, Koenig E and Tiedge H.** Transport of Neuronal BC1 RNA in Mauthner Axons. *J Neurosci.* 2002 Jun 1;22(11):4293-301.
- 59- **Tiedge H, Zhou A, Thorn NA, Brosius J.** Transport of BC1 RNA in hypothalamo-neurohypophyseal axons. *J Neurosci.* 1993 Oct;13(10):4214-9.
- 60- **Langford GM.** Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic.* 2002 Dec;3(12):859-65.
- 61- **Koenig E, Martin R.** Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. *J Neurosci.* 1996 Feb 15;16(4):1400-11.
- 62- **Koenig E, Martin R, Titmus M, Sotelo-Silveira JR.** Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J Neurosci.* 2000 Nov 15;20(22):8390-400.
- 63- **Park-Lee S, Kim S, Laird-Offringa IA.** Characterization of the interaction between neuronal RNA-binding protein HuD and AU-rich RNA. *J Biol Chem.* 2003 Oct 10;278(41):39801-8. Epub 2003 Aug 4.
- 64- **Zelená J.** Ribosomes in myelinated axons of dorsal root ganglia. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1972;124(2):217-29.
- 65- **Sotelo JR, Kun A, Benech JC, Giuditta A, Morillas J, Benech CR.** Ribosomes and polyribosomes are present in the squid giant axon: an immunocytochemical study. *Neuroscience.* 1999 May;90(2):705-15.
- 66- **Kun A, Otero L, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR.** Ribosomal distributions in axons of mammalian myelinated fibers. *J Neurosci Res.* 2007 Aug 1;85(10):2087-98.

- 67- **Li YC, Li YN, Cheng CX, Sakamoto H, Kawate T, Shimada O, Atsumi S.** Subsurface cisterna-lined axonal invaginations and double-walled vesicles at the axonal-myelin sheath interface. *Neurosci Res.* 2005 Nov;53(3):298-303. Epub 2005 Aug 29.
- 68- **Li YC, Cheng CX, Li YN, Shimada O, Atsumi S.** Beyond the initial axon segment of the spinal motor axon: fasciculated microtubules and polyribosomal clusters. *J Anat.* 2005 Jun;206(6):535-42.
- 69- **Brittis PA, Lu Q, Flanagan JG.** Axonal protein synthesis provides a mechanism for localized regulation at an intermediate target. *Cell.* 2002 Jul 26;110(2):223-35.
- 70- **Sotelo-Silveira J, Crispino M, Puppo A, Sotelo JR, Koenig E.** 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.* 2008 Jan;104(2):545-57. Epub 2007 Oct 24.
- 71- **Hüttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH.** Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature.* 2005 Nov 24;438(7067):512-5.
- 72- **Midorikawa R, Takei Y, Hirokawa N.** KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):371-83.
- 73- **Pestic-Dragovich L, Stojiljkovic L, Philimonenko AA, Nowak G, Ke Y, Settlege RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Hozak P, de Lanerolle P.** A myosin I isoform in the nucleus. *Science.* 2000 Oct 13;290(5490):337-41.
- 74- **Vreugde S, Ferrai C, Miluzio A, Hauben E, Marchisio PC, Crippa MP, Bussi M, Biffo S.** Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell.* 2006 Sep 1;23(5):749-55.
- 75- **Pranchevicius MC, Baqui MM, Ishikawa-Ankerhold HC, Lourenço EV, Leão RM, Banzi SR, dos Santos CT, Barreira MC, Espreafico EM, Larson RE.** Myosin Va phosphorylated on Ser1650 is found in nuclear speckles and redistributes to nucleoli upon inhibition of transcription. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2008 Jun;65(6):441-56.
- 76- **Chomczynski P. and Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987. 162, 156-159.
- 77- **Seperack PK, Mercer JA, Strobel MC, Copeland NG, Jenkins NA.** Retroviral sequences located within an intron of the dilute gene alter dilute expression in a tissue-specific manner. *EMBO J.* 1995 May 15;14(10):2326-32.
- 78- **The Gene Ontology Consortium** Gene Ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics.* 2000. 25, 25-29.

- 79- **Silvers, W.K.** Dilute and Laden, the p-locus, Ruby-eye and Ruby-eye-2. En *The Coat Colors of Mice*. Springer-Verlag, 1979.
- 80- **Watanabe M, Nomura K, Ohyama A, Ishikawa R, Komiya Y, Hosaka K, Yamauchi E, Taniguchi H, Sasakawa N, Kumakura K, Ushiki T, Sato O, Ikebe M, Igarashi M.** Myosin-Va regulates exocytosis through the submicromolar Ca²⁺-dependent binding of syntaxin-1A. *Mol Biol Cell*. 2005 Oct;16(10):4519-30.
- 81- **Prekeris R, Terrian DM.** Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca²⁺-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J Cell Biol*. 1997 Jun 30;137(7):1589-601.
- 82- **Correia SS, Bassani S, Brown TC, Lisé MF, Backos DS, El-Husseini A, Passafaro M, Esteban JA.** Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation. *Nat Neurosci*. 2008 Apr;11(4):457-66.
- 83- **Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A.** Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*. 2001 Sep 7;293(5536):1829-32.
- 84- **Pederson T.** As functional nuclear actin comes into view, is it globular, filamentous, or both? *J Cell Biol*. 2008 Mar 24;180(6):1061-4. Epub 2008 Mar 17.
- 85- **Obrdlik A, Kukalev A, Percipalle P.** The function of actin in gene transcription. *Histol Histopathol*. 2007 Sep;22(9):1051-5.
- 86- **Ye J, Zhao J, Hoffmann-Rohrer U, Grummt I.** Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes Dev*. 2008 Feb 1;22(3):322-30. Epub 2008 Jan 29.
- 87- **Sonenberg N, Hinnebusch AG.** New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol Cell*. 2007 Dec 14;28(5):721-9.
- 88- **Benech JC, Crispino M, Kaplan BB, Giuditta A.** Protein synthesis in presynaptic endings from squid brain: modulation by calcium ions. *J Neurosci Res* 55: 776-781, 1999.
- 89- **Brostrom MA, Brostrom CO.** Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability. *Cell Calcium*. 2003 Oct-Nov;34(4-5):345-63.
- 90- **Vanderklish PW, Edelman GM.** Dendritic spines elongate after stimulation of group 1 metabotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5;99(3):1639-44. Epub 2002 Jan 29.
- 91- **Raymond CR, Thompson VL, Tate WP, Abraham WC.** Metabotropic glutamate receptors trigger homosynaptic protein synthesis to prolong long-term potentiation. *J Neurosci*. 2000 Feb 1;20(3):969-76.

- 92- **Casaletti L, Tauhata SB, Moreira JE, Larson RE.** Myosin-Va proteolysis by Ca²⁺/calpain in depolarized nerve endings from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Aug 15;308(1):159-64.
- 93- **Huang Y and Wang K K.W.** The calpain family and human disease. *Trends Mol Med.* 2001 Aug 8; 7:355-362.
- 94- **Wang F, Thirumurugan K, Stafford WF, Hammer JA 3rd, Knight PJ, Sellers JR.** Regulated conformation of myosin V. *J Biol Chem.* 2004 Jan 23;279(4):2333-6. Epub 2003 Nov 22.
- 95- **Krementsov DN, Krementsova EB, Trybus KM.** Myosin V: regulation by calcium, calmodulin, and the tail domain. *J Cell Biol.* 2004 Mar 15;164(6):877-86.
- 96- **Llinás R, Sugimori M, Silver RB.** Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science.* 1992 May 1;256(5057):677-9.
- 97- **Benech JC, Lima P, Sotelo JR, Brown E.** Ca⁺ dynamics in synaptosomes isolated from the squid optic lobe. *J Neurosc. Res.* 62:65-74.
- 98- **Hamilton RL, Moorehouse A, Lear SR, Wong JS, Erickson SK.** A rapid calcium precipitation method of recovering large amounts of highly pure hepatocyte rough endoplasmic reticulum. *J Lipid Res.* 1999 Jun;40(6):1140-7.
- 99- **Lynch MA.** Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):87-136.
- 100- **Thomas A. P., and Delaville F.,** The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. *En Cellular Calcium, A Practical Approach.* McCormack, J G and Cobbold, P H, editors Oxford University, Press 1991. pp 1-54.
- 101- **Wang H, Dichtenberg JB, Ku L, Li W, Bassell GJ, Feng Y.** Dynamic Association of the Fragile X Mental Retardation Protein as a Messenger Ribonucleoprotein between Microtubules and Polyribosomes. *Mol Biol Cell.* 2008 Jan;19(1):105-14. Epub 2007 Oct 31.
- 102- **Westmark C. J., Malter J. S.** FMRP Mediates mGluR5-Dependent Translation of Amyloid Precursor Protein. *Plos Biology.* 2008, 5(3):629-639.
- 103- **Fabiato A.** Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol.* 1988;157:378-417.

Agradecimientos

La presentación de este trabajo de Tesis representa la culminación de una etapa que comenzó hace muchos años, cuando entré por primera vez a un laboratorio de bioquímica. Han sido decenas de personas las que he encontrado a lo largo de ese camino y a las cuales estoy agradecido. Desde compañeros de trabajo, algunos de los cuales ya no están, hasta los seres queridos mas cercanos de mi familia. No los voy mencionar uno por uno. No es necesario, pues cada uno de ellos sabe bien cual es mi deuda con cada uno de ellos.

Ese mismo camino tal vez no hubiese podido siquiera ser comenzado si no fuera por las características tan particulares de la Institución que me acogió: la Universidad de la República. Una Institución que le permite al estudiante ser protagonista de su propia formación; que lo admite junto al investigador o al docente, compartiendo el mismo espacio de trabajo y también sus experiencias. Que sólo requiere como contrapartida, el compromiso y la dedicación. Esto último, también es un signo de identidad que comparte con la otra Institución que siempre me abrió sus puertas, el Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable”. A ambas también les estoy muy agradecido.