



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Evaluación de la participación de la miosina 1c en las
funciones efectoras de los linfocitos B”**

TESIS

Que presenta

LAURA DENISE MANZANARES MEZA

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

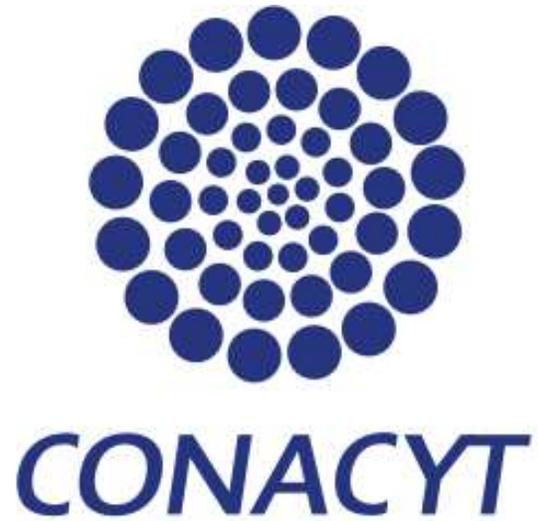
Directores de la Tesis:

Dr. En C. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO

Dr. En C. OSCAR MEDINA CONTRERAS

Ciudad de México

Agosto, 2017



Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las facilidades otorgadas para la realización de mis estudios de maestría.

Becario número: 589088, apoyo número: 421930

AGRADECIMIENTO POR EL APOYO AL PROYECTO

- Agradezco al CONACYT por el apoyo al proyecto número: 255053

- Y a la secretaría de salud por el apoyo al proyecto número:
HIM/2016/056/SSA/1280

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CINVESTAV por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en el departamento de biomedicina molecular.

Agradezco al Dr. Leopoldo Santos Argumedo por aceptarme en su laboratorio y permitirme iniciar mi camino como investigadora. Aprecio las exigencias con las que me ayudó a desarrollar mi proyecto, el tiempo que dedicó a explicarme y cuestionarme. Su orientación me permitió desarrollar independencia y ganar confianza en mí misma para resolver los problemas que se fueron presentando a lo largo de mi proyecto. Agradezco su ayuda en el desarrollado de mi pensamiento crítico no solo para evaluar otros trabajos si no para evaluar mi propio trabajo.

Agradezco al Dr. Oscar Medina Contreras por aceptar la colaboración en el proyecto. Agradezco su apoyo tanto académico como personal a lo largo del desarrollo de mi trabajo. Y sobre todo agradezco el tiempo y paciencia que dedicó a enseñarme, cuestionarme y orientarme lo cual permitió culminar mi trabajo, así como el desarrollo de mis habilidades tanto técnicas como de pensamiento.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio al M. en C. Daniel Girón, a la M.en C. Carolina Moreno, a la M. en C. Zayda Piedra, al Dr. en C. Orestes López y al QFB. Erick Sánchez por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio, por orientarme y ayudarme en cuestiones académicas, así como su apoyo a nivel personal.

Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera académica, por su comprensión y cariño me ha sido posible llegar hasta este punto de mis estudios.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia quienes son los motores de mi vida, mi inspiración para superarme cada día y para tomar decisiones que los llenen de orgullo con cada paso que doy.

Este trabajo también está dedicado a Edgard Varela Petrissans, a mis amigos y compañeros de generación especialmente a Eliana Silva, a Lourdes Mejía y a Paola Briseño quienes me apoyaron durante el desarrollo de este proyecto y me ayudaron a liberar la frustración y el bloqueo mental que muchas veces surgen durante el desarrollo de una investigación.

Por último, dedico este trabajo a todas aquellas personas que persiguen sus sueños y que les interesa desarrollarse en el campo de la investigación. Cualquier cosa que se desee de verdad puede hacerse realidad con mucho esfuerzo y trabajo, un ejemplo de ello es este trabajo.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Regulación de las miosinas de clase I	3
1.2 Función de las miosinas de clase I	4
1.2.1 Miosina 1a	5
1.2.2 Miosina 1b	5
1.2.3 Miosina 1d	5
1.2.4 Miosina 1e	6
1.2.5 Miosina 1f	6
1.2.6 Miosina 1g	7
1.2.7 Miosina 1h	7
1.3 Miosina 1c.	7
1.3. 1 Estructura de la miosina 1c	9
1.3.1.1 Región motora	9
1.3.1.2 Región de cuello	9
1.3.1.3 Región de cola	10
1.3.2 Función de la miosina 1c	11
1.3.3 Efecto compensatorio entre miosinas de clase I.	13
2. Justificación.	15
3. Hipótesis.	16
4. Objetivos.	17
4.1 Objetivos particulares.	17
5. Materiales y métodos.	18
5.1 Plásmido lentiviral pLVX-shRNA2.	19
5.2 Producción y recolección de partículas virales.	19
5.2.1 Transfección.	19

5.2.2 Recolección y titulación de partículas virales.	20
5.3 Transducción de linfocitos B.	20
5.4 Determinación de la disminución en la expresión de la miosina 1c.	21
5.5 Determinación de la capacidad de migración.	21
5.6 Determinación de la capacidad de endocitosis.	22
6. Resultados.	23
6.1 Generación de los shRNAs.	23
6.2 Eficiencia de transducción de los linfocitos B.	24
6.3 Disminución en la expresión de la miosina 1c en linfocitos B.	25
6.4 Capacidad de migración de los linfocitos B que presentan disminución en la expresión de la miosina 1c.	26
6.5 Capacidad de endocitosis de los linfocitos B que presentan disminución en la expresión de la miosina 1c.	27
7. Discusión.	28
8. Conclusión.	31
9. Perspectivas.	32
10. Bibliografía.	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las secuencias de los shRNAs.	18
Tabla 2. Secuenciación de las construcciones PLVX-shRNAs.	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Introducción a las miosinas de clase I no convencionales	2
Figura 2. Representación esquemática de las tres isoformas de la miosina 1c, de sus dominios y regiones de interés.	9
Figura 3. Generación de los shRNAs.	23
Figura 4. Eficiencia de transducción de los linfocitos B.	24
Figura 5. El tratamiento con los shRNAs disminuye la expresión de la miosina 1c en los linfocitos B.	25
Figura 6. La disminución en la expresión de la miosina 1c afecta la capacidad de migración de los linfocitos B.	26
Figura 7. La capacidad de endocitosis se ve aumentada en los linfocitos B que presentan disminución en la expresión de la miosina 1c.	27

RESUMEN

Una de las miosinas de clase I más estudiadas es la miosina 1c, sin embargo, existe poca información sobre su función en células del sistema inmunológico particularmente en linfocitos B donde su expresión es abundante. El presente trabajo aborda la participación de la miosina 1c en la migración y la endocitosis de los linfocitos B. Para conocer su participación en dichos fenómenos, se disminuyó su expresión a través de shRNAs mediante un sistema de transducción lentiviral y posteriormente se evaluó la capacidad de migración y de endocitosis de las células que presentaban disminución en la expresión de la miosina 1c.

Los datos indican que los linfocitos B que presentan disminución en la expresión de la miosina 1c muestran defectos en la migración, con trayectorias más cortas, así como una reducción significativa de la velocidad y la distancia recorrida por estas, en comparación con las células control. Así mismo, se observa que en los linfocitos B con reducción en la expresión de la miosina 1c aumenta significativamente la capacidad de endocitar bacterias en comparación con las células control. Lo anterior indica que la miosina 1c participa tanto en la migración como en la endocitosis de los linfocitos B.

SUMMARY

One of the most studied class I myosin is myosin 1c, nevertheless there is little information regarding its function in hematopoietic cells particularly in B cells where its expression is abundant. The present work approaches myosin 1c participation in migration and endocytosis in B cells. For that purpose, myosin 1c expression was reduced using shRNAs through a lentiviral transduction system. Afterwards, migration and endocytic capacity was measured in B cells that presented a reduction in myosin 1c expression.

The data indicate that B cells, with diminished expression of myosin 1c, demonstrate defects in migration, such as, shorter trajectories, a significant reduction in the velocity and distance traveled by these cells when compared with control cells. Likewise, it was observed that in B cells with reduction in myosin 1c expression there is a significant increase in the capacity to endocytose bacteria when compared with control cells. This denotes a role for myosin 1c as an active player in migration and endocytosis in B cells.

1. INTRODUCCIÓN

Las miosinas pertenecen a la superfamilia de motores proteicos, los cuales, se caracterizan por presentar un dominio motor capaz de interactuar con actina, hidrolizar ATP y generar movimiento (Sellers, 2000). Las miosinas se dividen en dos grandes grupos: las miosinas convencionales y las miosinas no convencionales. Las miosinas convencionales, son mejor conocidas por su función en la contracción muscular, además, presentan la característica de estar formadas por dímeros de cadenas pesadas. Por otro lado, las miosinas no convencionales, son monómeros de cadenas pesadas que desempeñan diversas funciones en células no musculares. Uno de los miembros de las miosinas no convencionales son las miosinas de clase I, las cuales, tanto en humano como en ratón están conformadas por 8 miembros; miosina 1a - miosina 1h (Santos-Argumedo, *et al* 2013). Las miosinas de clase I no convencionales, así como la mayoría de las miosinas, están conformadas por tres subdominios funcionales: Un dominio motor o cabeza, un dominio de cuello y un dominio de cola. (**Figura 1**) El dominio motor o de cabeza, interactúa con actina y se une a ATP. El dominio de cuello tiene la capacidad de unir cadenas ligeras o calmodulina las cuales se unen a una secuencia alfa-helicoidal de alrededor de 23 aminoácidos llamada motivo IQ, que presenta una secuencia consenso de IQXXXRGXXXR, se ha descrito que la unión de cadenas ligeras o calmodulina le confiere rigidez a la estructura. Además, se ha observado que la región de cuello también funciona como sitio de *splicing*. En vertebrados, la miosina 1b sufre *splicing* alternativo lo cual resulta en isoformas con 4,5 o 6 motivos IQ, mientras que miosina 1a, 1c y 1g presentan 3 motivos, miosina 1d y 1h presentan 2 y miosina 1e y 1f presentan 1, lo cual les confiere diversidad en función, así como en regulación (Mazerik, 2013). Finalmente, las miosinas de clase I presentan un dominio de cola, en el cual, se encuentran motivos funcionales que les permiten interactuar con otras proteínas e incluso con lípidos. El dominio de cola es el más diverso y varía ampliamente en secuencia y longitud. En función a éste se clasifican a las

miosinas de clase I en miosinas de cola corta y de cola larga. Las miosinas de cola corta presentan un dominio TH1, el cual, contiene un motivo de homología a pleckstrina (PH) que les permite interactuar con lípidos y está involucrado en la unión de las miosinas con la membrana plasmática (Maravillas-Montero, *et al* 2011). Las miosinas de cola larga presentan motivos funcionales adicionales. El motivo TH2, es una región que contiene una región de repetidos dipeptídicos conformados por prolinas y lisinas o glutaminas, los cuales han mostrado ser importantes para el reclutamiento de miosinas de clase 1 a estructuras endocíticas. El dominio TH3 es un dominio de homología a Src que reside en el C-terminal de la proteína y le permite interactuar con otras proteínas. Xu *et al*, descubrió la primera proteína que se une a esta región llamada CARMIL, por su habilidad de funcionar como proteína de “capping” y de hacer un enlace entre miosina 1 y el complejo Arp 2/3. Otras moléculas que se unen a este dominio son dinamina, verprolina, sinaptojanina, N-WASP, WIP y WIRE entre otras (Greenberg y Ostap, 2013).

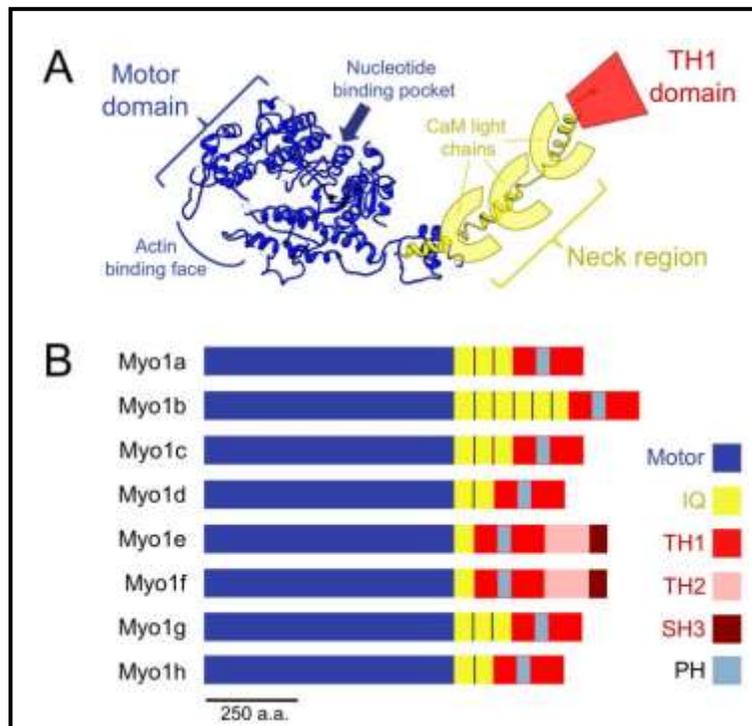


Figura 1. Introducción a las miosinas de clase I no convencionales. A) Predicción de la estructura de una miosina de clase I, basándose en la búsqueda por homología en el servidor Phyre, usando como molde la estructura resuelta de otras miosinas. B) Dominios estructurales de las 8 miosinas de clase I (McConell y Tyska, 2010).

El descubrimiento y estudio de las miosinas no convencionales muestra la importancia de estos motores en diversos procesos celulares. Algunas actividades en las que participan estas miosinas son en el transporte de organelos, el transporte de complejos proteína-RNA, la citocinesis, el control en la dinámica de la membrana e incluso en la regulación de la transcripción génica (Hoffman, *et al* 2006). Además, hay evidencia genética en los ratones y en los humanos que asocian mutaciones de la miosina con defectos en la audición y en la visión, con problemas neurológicos, con cardiomiopatías, con desórdenes del sistema inmunológico, con defectos en la pigmentación y con cáncer (Krendel *et al*, 2007). A pesar de que estas moléculas han sido caracterizadas en algunos tipos celulares, existe poca información sobre las miosinas en células hematopoyéticas. Las miosinas de clase I son de particular interés en células del sistema inmunológico ya que su expresión es abundante en linfocitos (Santos-Argumedo, *et al* 2013).

1.1 Regulación de las miosinas de clase I

Se ha descrito un sitio regulador muy conservado en motores proteicos, el cual, presenta treonina, glutamato, aspartato o serina, y es conocido como TEDS. La carga negativa del sitio TEDS es necesaria para la activación. Los motores moleculares que presentan residuos de glutamato o aspartato están constitutivamente activos, mientras que las miosinas que presentan serina o treonina, requieren fosforilación. Los miembros de la familia de las PAK cinasas confieren esta fosforilación (Mazerik, 2013). En adipocitos, se ha observado que la fosforilación de miosina 1c es necesaria para que participe en el tránsito vesicular. La miosina 1c es fosforilada por la proteína cinasa II dependiente de calcio (CaMKII) en la S701; esto provoca la pérdida de por lo menos una calmodulina de la región de cuello y estimula la interacción con 14-3-3. Así mismo, se sugiere que la fosforilación mediada por CaMKII estimula la actividad de ATPasa de la miosina 1c (Yip *et al*, 2008).

Las interacciones con calmodulina u otras cadenas ligeras, modula las propiedades bioquímicas y físicas de las miosinas de clase I. La región de cuello de estas miosinas, es una alfa hélice que actúa como palanca y además funciona como interruptor de regulación. La rigidez del cuello, la cual es requerida para la transducción de la fuerza, se logra a través de la interacción con la proteína de unión a calcio, la calmodulina. Ya que la calmodulina sufre cambios conformacionales al unirse al calcio, la región de cuello es muy susceptible a la regulación mediada por interacciones de calcio/calmodulina (Mazerik, 2013).

1.2 Función de las miosinas de clase I

Las miosinas son mejor conocidas por su papel en la contracción muscular y en diversos procesos de motilidad en células eucariontes. Sin embargo, estudios recientes sugieren que las miosinas de clase I, son moléculas sensibles a la tensión que enlazan al citoesqueleto de actina con la membrana plasmática (Greenberg, *et al* 2012).

El mantenimiento de la tensión de la membrana, así como la habilidad de resistir la deformación, son características necesarias para que se lleven a cabo procesos celulares tales como la endocitosis, la exocitosis, la división celular y la migración. Existe un balance entre el aumento y el decremento en la tensión de la membrana para permitir dichos eventos celulares. Ya que las miosinas interactúan directamente con el citoesqueleto de actina, están posicionadas para poder regular la tensión de membrana en las células (Mazerik, 2013). Experimentos *In vitro* sugieren que algunas miosinas de clase I funcionan como proteínas rígidas de anclaje, mientras que otras, están adaptadas para participar en funciones más dinámicas como procesos involucrados en el transporte vesicular (McConnell y Tyska, 2010).

Los ocho miembros de las miosinas de clase I no convencionales, llevan a cabo una gran variedad de funciones en diversas células, algunas de sus funciones son similares, por lo que se ha llegado a creer que, en ausencia de una, las demás podrían ejercer un efecto compensatorio.

1.2.1 Miosina 1a

La miosina 1a se expresa principalmente en el tracto gastrointestinal, donde se localiza casi exclusivamente al borde en cepillo del intestino delgado. Dentro de las microvellosidades forma puentes laterales, los cuales, aparentemente unen a la membrana plasmática con actina. Interesantemente, las mutaciones en el C-terminal de la miosina 1a se asocian con la pérdida de polaridad de las células epiteliales y el desarrollo de cáncer de colon. Ratones que carecen de miosina 1a exhiben alteraciones en la morfología del borde en cepillo, herniaciones y microvellosidades fusionadas (Crawley *et al*, 2014).

1.2.2 Miosina 1b

Observaciones previas en hepatocitos de ratón, sugieren que la miosina 1b participa en procesos endocíticos controlando la entrega de moléculas internalizadas de endosomas a lisosomas. Se ha observado su localización en regiones perinucleares donde se dan eventos de fusión entre endosomas tardíos y lisosomas, así como, en la periferia nuclear, donde puede estar participando en la fusión de lisosomas con la membrana plasmática, como fue sugerido por Temesvari *et al*, en 1996. Además, se ha observado que junto con la red de F-actina, forma parte de una maquinaria regulatoria que retiene transitoriamente a los lisosomas durante su trayectoria sobre los microtúbulos (Cordonnier *et al*, 2001). La miosina 1b y la miosina 1c están presentes en axones, pero sólo miosina 1b se ha visto asociada a eventos relacionados con el transporte y posicionamiento de organelos y moléculas de membrana en neuronas (Bridgman 2013). También fue reportada la participación de la miosina 1b y la miosina 1c en diversas etapas de la exocitosis de surfactante en células ATI en alveolos de rata (Kittelberger *et al*, 2016).

1.2.3 Miosina 1d

Se ha reportado la expresión de la miosina 1d en varios tejidos, sin embargo, donde se expresa abundantemente es en el sistema nervioso central. También fue identificada como componente en fracciones sub-celulares de mielina. Las

mutaciones en MYO1D han sido relacionadas con autismo (Benesh *et al*, 2012). La miosina 1d también se encuentra en intestino delgado, específicamente en la punta de las microvellosidades. Se ha observado que en ausencia de la miosina 1a, la miosina 1d duplica su expresión y se redistribuye a lo largo de las microvellosidades, hacia sitios ocupados normalmente por la miosina 1a. Por lo que se sugiere que la miosina 1d ejerce un efecto compensatorio ante la ausencia de la miosina 1a (Benesh *et al*, 2010).

1.2.4 Miosina 1e

La miosina 1e es una de las dos miosinas de clase I no convencionales de cola larga y a diferencia de la miosina 1f, esta se expresa de forma ubicua en células de mamíferos. Se ha demostrado que esta miosina se localiza en podocitos en los riñones. Los ratones deficientes de la miosina 1e exhiben proteinuria, daño renal crónico e inflamación de los riñones. A nivel estructural, estos ratones muestran una membrana basal glomerular engrosada y desorganizada e irregularidades en la morfología de los podocitos. Por lo tanto, la miosina 1e juega un papel importante en la función de los podocitos, así como en la filtración glomerular (Krendel *et al*, 2009). Además, se ha observado que la miosina 1e es reclutada a los sitios de endocitosis mediada por clatrina donde se desencadena el ensamblaje de filamentos de actina (Cheng *et al*, 2012).

1.2.5 Miosina 1f

Kim *et al* en 2006, demostraron que la miosina 1f se expresa predominantemente en células del sistema inmunológico en los mamíferos. Las células del ratón deficiente de la miosina 1f muestran un aumento anormal en su capacidad de adhesión y una reducción en su motilidad, lo cual, resulta en el aumento en la exocitosis de gránulos que contienen $\beta 2$ integrinas, en neutrófilos. Además, la actina cortical que co-localiza con la miosina 1f, se encuentra reducida en células deficientes de dicha miosina. *In vivo*, los ratones deficientes de la miosina 1f muestran un aumento en la susceptibilidad a infecciones por *Listeria monocytogenes* y una respuesta ineficiente por parte de los neutrófilos. Por lo

que se sugiere que la miosina 1f dirige la motilidad de las células del sistema inmunológico y la defensa innata del huésped contra infecciones.

1.2.6 Miosina 1g

La miosina 1g se expresa de manera exclusiva en tejidos y células hematopoyéticas, y se asocia con la membrana plasmática, dicha asociación es dependiente del motivo de homología a pleckstrina (PH) localizado en el motivo TH1 en el dominio de cola de la miosina. (Olety et al, 2010) En los linfocitos B, se localiza en compartimientos de la membrana como son las balsas de lípidos, las microvellosidades y las extensiones de la membrana. Se han reportado anomalías en la capacidad de adherencia, en la rigidez de la membrana plasmática y en la migración inducida por quimiocinas, así como irregularidades en procesos como la fagocitosis y la exocitosis de los linfocitos B de ratones deficientes de la miosina 1g (Maravillas-Montero *et al*, 2014; López-Ortega *et al*, 2016).

1.2.7 Miosina 1h

De todas las miosinas de clase I, la miosina 1h es el miembro menos estudiado y por consecuencia del que menos información existe. En bases de datos de expresión, tanto en humano como en ratón, se observa que su expresión se limita al sistema nervioso central y a órganos reproductores masculinos. Arun R. *et al* en 2016 reportaron que polimorfismos del gen de la miosina 1h están asociados con el desarrollo de retrognatismo mandibular.

1.3 Miosina 1c

La miosina 1c, antes conocida como myr2 o miosina 1 β , es un motor monomérico que forma parte de la familia de las miosinas de clase I no convencionales. Se expresa ampliamente en vertebrados y se localiza principalmente en el citoplasma, el núcleo y el nucléolo (Tang et al, 2002). En el citoplasma, se asocia a la membrana plasmática y está involucrada en el tránsito vesicular. La miosina 1c también es capaz de interactuar con la RNA polimerasa I y II, por lo que está involucrada en procesos transcripcionales. Se asocia con transcritos de RNA, así

como a subunidades ribosomales y pre-ribosomales y tiene un papel en su transporte nuclear. También actúa como motor molecular en movimientos cromosomales intranucleares (Schwab *et al*, 2013).

El gen humano *MYO1C*, codifica para tres isoformas (**Figura 2**); La isoforma C de la miosina 1c, es la forma clásica citoplasmática de 1028 aminoácidos, se expresa en todos los tejidos, sin embargo, su mayor expresión es en órganos del sistema inmunológico, en los pulmones, el hígado, la vejiga, el tracto gastrointestinal y en los órganos reproductores. La isoforma B de la miosina 1c, también llamada miosina nuclear (NM1), incluye 16 aminoácidos extras en su extremo N-terminal provenientes del exón -1. Al investigar su expresión, se encontró que se expresa en la mayoría de los tejidos, mostrando moderadas variaciones, sus niveles más bajos de expresión corresponden al músculo esquelético y al corazón, mientras que los niveles más altos de expresión se encuentran en el timo, el hígado y en el tejido adiposo (Sielski *et al*, 2014). La isoforma descrita recientemente es la isoforma A, la cual, incluye 35 aminoácidos extras en su extremo N-terminal, provenientes del exón -2 y se ha descrito su participación en el núcleo. Se ha observado su expresión principalmente en el riñón, las glándulas adrenales, el páncreas y en el tejido adiposo (Venit *et al*, 2013).

La Isoforma C de miosina 1c, muestra una localización predominante en el citoplasma. Las isoformas A y B se localizan en el núcleo, sin embargo, muestran diferencias en su localización intranuclear y en la interacción con proteínas nucleares. La isoforma B se localiza en nucleoplasma y nucléolo, interactúa con la RNA polimerasa I y II y está involucrada en la transcripción por ambas RNA polimerasas. En contraste, la isoforma A está ausente en el nucléolo y no interactúa con la RNA polimerasa I, y es la única que se asocia con “speckles” intranucleares (Ihnatovych *et al*, 2012).

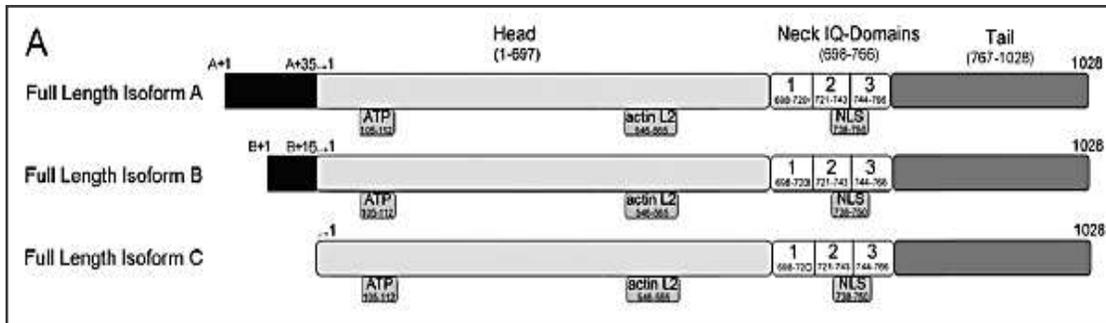


Figura 2. Representación esquemática de las tres isoformas de la miosina 1c, de sus dominios y regiones de interés (Schwab *et al*, 2013).

1.3.1 Estructura de la miosina 1c

La miosina 1c, al igual que todas las miosinas, presenta tres dominios funcionales; una región motora, una región de cuello y una región de cola. Cada una de los dominios le confiere tanto características comunes con otras miosinas como características individuales que se ven reflejadas en la diversidad de sus funciones. Además, algunos de estos dominios son importantes para la regulación de su actividad.

1.3.1.1 Región motora

El dominio motor o de cabeza, es un motor catalítico de 80kDa que se une a actina e hidroliza ATP para producir fuerza motriz. Este dominio le permite llevar a cabo el ciclo de ATPasa, en el cual, al estar la miosina disociada de ATP, se encuentra fuertemente unida a actina. A esta etapa se le conoce como estado de rigor. Al unirse ATP a la miosina 1c se debilita su unión con actina y finalmente se disocia del filamento. Entonces se hidroliza el ATP y la miosina adopta una conformación preproducción de fuerza motriz. Al unirse a actina débilmente, se libera el fosfato (Pi) y el cuello de la miosina que funciona como palanca, avanza para posicionarla nuevamente sobre la actina y permitirle entrar de nuevo al estado de rigor (Hokanson y Ostap, 2006). En 2013, Schwab *et al*, reportó una señal de localización nuclear localizada dentro de los 16 aminoácidos extras del N-terminal de la isoforma B de la miosina 1c. Considerando que las isoformas A

y C no se localizan en nucléolo, se asume que la señal localizada en el N-terminal de la isoforma B es la señal principal que la dirige hacia este organelo.

1.3.1.2 Región de cuello

La miosina 1c presenta tres motivos IQ en su región de cuello, los cuales, le permiten interactuar con cadenas ligeras o calmodulina. Dzijak *et al*, en 2015 reportaron que la secuencia de localización nuclear de la miosina 1c isoforma B (NM1), se encuentra en el segundo motivo IQ dentro de la región de cuello y no en los 16 aminoácidos al inicio del N-terminal como se sugirió anteriormente. La secuencia contiene una serie de aminoácidos básicos intercalados con aminoácidos no polares, y demostraron que al mutar los aminoácidos básicos por alaninas se bloquea la importación nuclear de la NM1. Esta secuencia de localización nuclear no es similar a otras descritas en la literatura, sin embargo, existe otra miosina no convencional (miosina Vb), la cual, al igual que NM1 presenta su secuencia de localización nuclear en los motivos IQ de su región de cuello. Además de la isoforma B, la isoforma C y la isoforma A de miosina 1c presentan la secuencia de localización nuclear en sus motivos IQ2, por lo tanto, las tres isoformas son capaces de translocarse al núcleo (Dzijak *et al*, 2015). Por otro lado, Hokanson en 2007, describió un segundo sitio de unión de la miosina 1c a la membrana plasmática, dicho sitio, está localizado dentro del dominio regulador de la región del cuello en los motivos IQ, no es específico de fosfatidilinositoles, si no que se une a fosfolípidos aniónicos de una forma dependiente de calcio. Por lo que la región de cuello de estas miosinas no solo le confiere características de rigidez y de regulación, sino que también aporta propiedades que se ven reflejadas en la diversidad de sus funciones.

1.3.1.3 Región de cola

La región de cola de la miosina 1c contiene un dominio de homología a pleckstrina (PH), el cual, es un dominio de aproximadamente 120 aminoácidos que está presente en proteínas involucradas en eventos de señalización o en constituyentes del citoesqueleto. Este dominio es rico en residuos básicos, lo que le permite interactuar con fosfatidilinositoles localizados en membranas

biológicas. También está reportada la capacidad de este dominio para interactuar con otras proteínas como la proteína cinasa C (PKC) o bien con la subunidad β de las proteínas G heterotriméricas. A través de estas interacciones, el dominio PH juega un papel en el reclutamiento de proteínas a la membrana (Haslam *et al*, 1993). Se ha observado, mediante experimentos de sub-localización celular y de fraccionamiento, que un gran porcentaje de la miosina 1c se encuentra asociada con membranas lipídicas y que esta asociación es principalmente electrostática. Estudios recientes *in vivo* sugieren que la miosina 1c se asocia con fosfoinosítidos aniónicos y que esta interacción está regulada por calcio y calmodulina (Hokanson y Ostap, 2006).

Se sabe que el dominio motor de la miosina 1c es el encargado de llevar a cabo la hidrólisis de ATP, así como la interacción con F-actina. Sin embargo, Fan *et al* en 2012, reportaron que la región de la cola de la miosina 1c es capaz de interactuar con G-actina. Sus observaciones proponen a la miosina 1c como mediadora del tránsito de corto alcance de G-actina en los lamelipodios. Al reducir la expresión de miosina 1c en células endoteliales, observan que se ve severamente afectado el transporte de G-actina hacia el borde líder del lamelipodio, así como su migración evaluada por ensayos de cierre de herida.

1.3.2 Función de la miosina 1c

Miosina 1c isoforma C, pertenece a un grupo de motores moleculares que unen membranas celulares con el citoesqueleto de actina, además está involucrada en la generación de la tensión de membrana plasmática. Se ha observado que la miosina 1c puede asociarse con diferentes moléculas y es importante para la correcta localización y llegada de éstas a la membrana plasmática. Un ejemplo de estas funciones fue descrita en podocitos, donde se asocia con neph1 y nefrina, las cuales, son moléculas con funciones importantes en la membrana plasmática de los podocitos que permiten una adecuada filtración de la sangre y un correcto funcionamiento del riñón. Al reducir la expresión de la miosina 1c mediante siRNAs, se observan defectos en la llegada tanto de neph1 como de

nefrina a la membrana plasmática, así como defectos en la capacidad de migración de los podocitos (Arif *et al*, 2011).

Además, se ha observado su asociación con el transportador de glucosa GLUT4 en adipocitos. Las vesículas cargadas con GLUT4 son dirigidas hacia la membrana plasmática por la miosina 1c bajo el estímulo generado por la insulina. Al disminuir la expresión de la miosina 1c mediante siRNA, se observa una disminución significativa en la capacidad de los adipocitos de tomar glucosa (Bose, *et al* 2002).

Este motor proteico está concentrado en regiones dinámicas de la membrana plasmática, caracterizadas por la presencia de filopodios, lamelipodios y volantes de la membrana. Además, la miosina 1c es reclutada a balsas lipídicas altamente dinámicas en la vía de reciclamiento endocítico, donde es requerida para la entrega y exocitosis de membranas enriquecidas en balsas lipídicas hacia la membrana plasmática. Se ha observado que en las células con disminución en la expresión de la miosina 1c hay un incremento significativo en el contenido intracelular de colesterol, además, se detectan defectos en la fusión del autofagosoma con el lisosoma y defectos en la capacidad de migración en las células HeLa (Brandstaetter *et al*, 2014).

Por otro lado, Diakanova *et al*, en 2002 reportó que la miosina 1c participa en las etapas finales de la fagocitosis, principalmente en el cierre de la copa fagocítica en macrófagos.

La presencia de las miosinas no convencionales en las células hematopoyéticas se asocia con la motilidad celular, sin embargo, en los linfocitos B se relaciona con la habilidad de toma de antígeno. Se ha descrito que las miosinas no convencionales de clase II, especialmente miosina IIA (MyH9 o NMMH-IIA), es uno de los principales reguladores de la toma de antígeno, ya que ejerce la fuerza necesaria para que el linfocito B tome un trozo de antígeno de las membranas que se le presentan. Estudios recientes sugieren que la miosina 1c es uno de los elementos que controlan la interacción membrana-citoesqueleto y la tensión cortical en los linfocitos B. Además, esta proteína participa en la migración celular

generando y estabilizando los filopodios y los lamelipodios observados durante la extensión de los linfocitos B. Se ha observado que la miosina 1c se encuentra enriquecida en las microvellosidades de los linfocitos B, lo que lleva a especular que esta molécula motora puede estar participando en el reclutamiento de receptores, moléculas de adhesión o proteínas de señalización hacia las microvellosidades. Al disminuir la expresión de la miosina 1c en las células A20 usando siRNA, y someterlas a ensayos de presentación de antígeno, se observa una disminución en la proporción de linfocitos T CD4+CD69+ así como una baja secreción de IL-2, sugiriendo que la disminución en la expresión de la miosina 1c reduce la habilidad de los linfocitos B como células presentadoras de antígeno (Maravillas-Montero *et al*, 2011).

1.3.3 Efecto compensatorio entre miosinas de clase 1

Las miosinas de clase 1, son una de las tres subfamilias más antiguas de motores proteicos. El dominio de unión a la membrana plasmática (dominio TH1) es la característica que define a esta ancestral clase de motores. Las miosinas de clase 1 se perdieron en plantas, pero se encuentran en eucariontes superiores e inferiores como levaduras, amebas, hongos, gusanos y moscas. Las variaciones en aminoácidos en las secuencias de las diferentes miosinas tienen consecuencias funcionales y regulatorias, sin embargo, sus secuencias son compartidas casi en su totalidad por lo que se pudiera esperar que al faltar una, las demás pudieran tratar de generar un efecto compensatorio, que, si bien no hace la función completa, la rescata de cierta manera.

Está descrito que en el ratón deficiente de miosina 1a, no se observa un fenotipo severo, esto se atribuye a la redistribución y función redundante de las otras miosinas principalmente la miosina 1c, la miosina 1d y la miosina 1e en el modelo estudiado. A pesar de que estos otros miembros de miosinas de clase 1 no reemplazan a la miosina 1a, su redundancia sugiere, que por lo menos la función de regular la tensión de la membrana plasmática es una función compartida con la mayoría, si no es que con todos los miembros de la familia (Mazerik, 2013).

Así mismo, cuando se disminuye la expresión de la miosina 1c en los linfocitos B, no observa un fenotipo severo, por lo que también se sugiere un efecto compensatorio por parte de la miosina 1g y la miosina 1e, que son las otras miosinas de clase I que se expresan en estas células (Maravillas-Montero *et al*, 2011).

2. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado en diversos modelos celulares que la miosina 1c participa en funciones como la migración y la endocitosis, eventos que son fundamentales en el contexto de una respuesta inmunológica. Ya que no existe el ratón deficiente de la miosina 1c y debido a que esta se expresa abundantemente en los linfocitos B, los cuales, dependen de las funciones antes mencionadas para responder a antígenos de manera eficiente, es importante identificar el papel de la miosina 1c en la migración y la endocitosis en los linfocitos B.

3. HIPÓTESIS

La miosina 1c participa en las funciones de migración y de endocitosis en los linfocitos B.

4. OBJETIVO

Evaluar la participación de la miosina 1c en las funciones efectoras de los linfocitos B.

4.1 Objetivos particulares

1. Disminuir la expresión de miosina 1c en linfocitos B
2. Determinar la capacidad de migración que presentan los linfocitos B con disminución en la expresión de la miosina 1c.
3. Evaluar la capacidad de endocitosis de los linfocitos B con disminución en la expresión de la miosina 1c.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñaron las secuencias de los shRNA siguiendo los parámetros recomendados por el Instituto Broad (www.broadinstitute.org). A partir de la secuencia nucleotídica de la isoforma C de miosina 1c, se generaron 6 secuencias para shRNA, resultando en 3 pares de oligos cada uno con su sentido y antisentido.

ShRNA	
mMyo1csh04F	gatcc GCCACCAAGAGACTGCTCCAGTTCTATGCTT CAAGAGAG CATAGA ACTGGAGCAGTCTCTTGGTGGCTTTTT ACGCGT g
mMyo1csh04R	aattc ACGCGT TAAAAAAGCCACCAGAGACTGCTCCAGTTCTATGCTCTCTT GAAGCATAGAACTGGAGCAGTCTCTTGGTGGC g
mMyo1cshL1F	gatcc GTACATGGATGTGCAGTTTGATT CAAGAGATCAA ACTGCACATCCA TGATTTTT ACGCGT g
mMyo1cshL1R	aattc ACGGT TAAAAATACATGGATGAGTTTGATCTCTCTT GAA TCAA ACTG CACATCCATGTACg
mMyo1cshB1F	gatcc GCCGCGTGAACAATATCAACATTT CAAGAGA ATGTTGATATTGTT ACGCGTTTTTT ACGCGT g
mMyo1cshB1R	aattc ACGCGT TAAAAACCGCGTGAACAATATCAACATT CTCTTGAA ATGTT GATATTGTT CACGCGGC g

Tabla 1. Descripción de las secuencias de los shRNAs. Resaltados en rojo se muestran los sitios de reconocimiento por las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, en itálicas se encuentra la secuencia complementaria a la isoforma C de la miosina 1c y su secuencia antisentido, resaltado en negritas se encuentra la secuencia generadora de la horquilla y resaltado en azul se encuentra el sitio de reconocimiento por la enzima de restricción MluI.

Las secuencias de los shRNAs se muestran en la tabla1. Contienen sitios de reconocimiento por las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, presentan sus secuencias sentido y antisentido, así como la secuencia encargada de generar la horquilla característica de los shRNAs. Finalmente cuentan con un sitio de reconocimiento por la enzima de restricción MluI.

5.1 Plásmido lentiviral p LVX-shRNA2

Se usó el plásmido pLVX-shRNA2 (Clontech California cat:632179), el cual, es un vector lentiviral de expresión diseñado para expresar pequeños RNA en horquilla (shRNA). Expresa la proteína fluorescente ZsGreen1 usada como indicador de la eficiencia de transfección y transducción. El vector pLVX-shRNA2 contiene todos los elementos necesarios del procesamiento viral para la producción de lentivirus con replicación incompetente, así como, elementos que mejoran los títulos virales y la funcionalidad del vector. Este vector fue usado como control en los experimentos descritos a continuación y será referido como plásmido control.

5.2 Producción y recolección de partículas virales

5.2.1 Transfección

Se realizó la transfección utilizando 5×10^6 células HEK293T, las cuales, fueron cultivadas en medio DMEM (Thermo scientific Utah cat:SH30003.02) suplementado con 10%SFB, antibiótico/antimicótico, pen/strep, L-glutamina y piruvato de sodio. Se preparó la reacción de transfección empleando 10µg de ADN plasmídico, 375µl de medio DMEM no suplementado adicionado con 375µl de HBSS, se agregaron 30µl de la mezcla de plásmidos de empaquetamiento pak(VSV-G) Dharmacon Trans-Lentiviral Packaging kit (Dharmacon EUA cat: TLP5912) y 41 ul de CaCl₂. Se dejó incubando la reacción a temperatura ambiente por 30 minutos, posteriormente se agregó la mezcla gota a gota al cultivo de células HEK293T. El cultivo se dejó en incubación a 37°C, 5% CO₂ por 16h. Posterior a las 16h, se retiró el medio del cultivo y se cambió por Opti-MEM (Gibco EUA cat: 3185-070) suplementado con 10%SFB, antibiótico/antimicótico, pen/strep, L-glutamina y piruvato de sodio, el cual, se quedó en incubación a 37°C, 5% CO₂ por 24h.

5.2.2 Recolección y titulación de partículas virales

Se recuperó el medio de cultivo de las células HEK293T, se tomó una alícuota de 20µl para titular las partículas virales y el resto del medio de cultivo se empleó para la transducción de los linfocitos B.

En una placa de 96 pozos se colocaron 80µl de medio DMEM no suplementado en 6 pozos, posteriormente se hizo una dilución usando los 20µl de partículas virales que se habían separado previamente, se colocaron los 20µl en el primer pozo de la placa de 96, se mezclaron las partículas virales con el medio no suplementado, se tomaron 25µl de este pozo y se colocaron en el segundo, se mezclaron y se repitió el procedimiento hasta terminar los 6 pozos que contenían medio DMEM no suplementado.

En otra placa de 96 pozos se sembraron 50,000 células HEK293T en seis pozos 24h previas a la titulación viral, se hizo la transducción de las células HEK293T con las diluciones de las partículas virales previamente mencionadas. Se cultivaron a 37°C, 5% CO₂ por 24h y se observaron al microscopio. Se contaron las células transducidas que expresan la proteína verde fluorescente y se calcularon las unidades transducidas / ml de acuerdo con la siguiente fórmula:
$$UT/ml = (\# \text{ Colonias que expresan la proteína verde fluorescente}) * (\text{Factor de dilución}) * (40)$$

5.3 Transducción de linfocitos B

Se extrajeron los linfocitos B del bazo de ratones C57/B6, los cuales, fueron purificados por selección negativa utilizando perlas magnéticas del kit Mojo Sort Pan B cell selection (Biolegend EUA cat: B214886). Una vez purificados, se colocaron 100,000 linfocitos B por pozo en una placa de 96 pozos en medio RPMI 1640 (Gibco EUA, cat: 31800-089) suplementado con 10% SFB, antibiótico/antimicótico, pen/strep, piruvato de sodio, L-glutamina, aminoácidos esenciales y β-mercaptoetanol, los linfocitos B fueron transducidos con 100µl de partículas virales por pozo, el cultivo se dejó incubando a 37°C 5%CO₂ por 24h.

Posteriormente se observaron al microscopio para comprobar la transducción por la expresión de la proteína verde fluorescente.

5.4 Determinación de la disminución en la expresión de la miosina 1c

Se realizó una tinción intracelular para la determinación de la expresión de la miosina 1c. Se tomaron 500,000 linfocitos B no tratados, tratados con los shRNAs y tratados con el plásmido control. Se lavaron con PBS 1X, se incubaron 30 min a 4°C con 100 µl de buffer de fijación (Paraformaldehído 1% en PBS 1X), posteriormente se lavaron las células 3 veces con PBS 1X y se re-suspendieron en 100µl de buffer de permeabilización (Saponina 1% en PBS 1X) y se incubaron 20 min a 4°C. Nuevamente se lavaron con PBS 1X, se les agregó 1ml de buffer de bloqueo (0.5% BSA, 2%SFB en PBS 1X) se incubaron por 30 min a 4°C. Se re-suspendieron las células en 125µl de buffer de FACS (0.5% BSA, 0.05% Azida de sodio en PBS 1X) posteriormente se agregaron 20µl de anticuerpo primario dirigido contra miosina 1c (GeneTex EUA cat: GTX55719) diluido 1:400. Se incubaron las células con el anticuerpo primario por 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente se lavó con buffer de FACS, se re-suspendieron las células con 125 µl de buffer de FACS, se agregaron 20µl del anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a ficoeritrina (PE) diluido 1:400, se dejaron en incubación por 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente se lavaron las células con buffer de FACS y se re suspendieron con 300µl de PBS1X. La tinción se observó por citometría de flujo.

5.5 Determinación de la capacidad de migración

Se tomaron 400,000 linfocitos B no tratados, tratados con los shRNAs y tratados con el plásmido control, se colocaron sobre un cubreobjetos previamente recubierto con fibronectina, se incubaron a 37°C 5%CO₂ por 30 min. Posteriormente se lavaron las células no adheridas con PBS1X, se montó el cubreobjetos sobre la cámara de Zigmond, la cual, en uno de los carriles contenía

100µl de medio RPMI no suplementado y en el otro contenía 100µl de medio RPMI 1640 no suplementado adicionado con la quimiocina CXCL13. Se dejaron incubando las células con la quimiocina a 37°C 5%CO₂ por 15 min. Se adquirieron fotografías cada 30s durante 1h en el microscopio confocal Olympus fv300. Los videos construidos por las fotografías fueron analizados en los programas Fiji ImageJ y Migration and Chemotaxis Tool.

5.8 Determinación de la capacidad de endocitosis

Se utilizaron 500,000 linfocitos B no tratados, tratados con los shRNAs y tratados con el plásmido control. Se colocaron en co-cultivo con *E.coli-RFP*, se dejaron incubando a 37°C 5%CO₂ por 1h. Posteriormente se lavaron las células con PBS1X para eliminar la bacteria no endocitada y se fijaron con formaldehído al 1.5%. Se determinó la endocitosis de bacteria por citometría.

6. RESULTADOS

6.1 Generación de los shRNAs

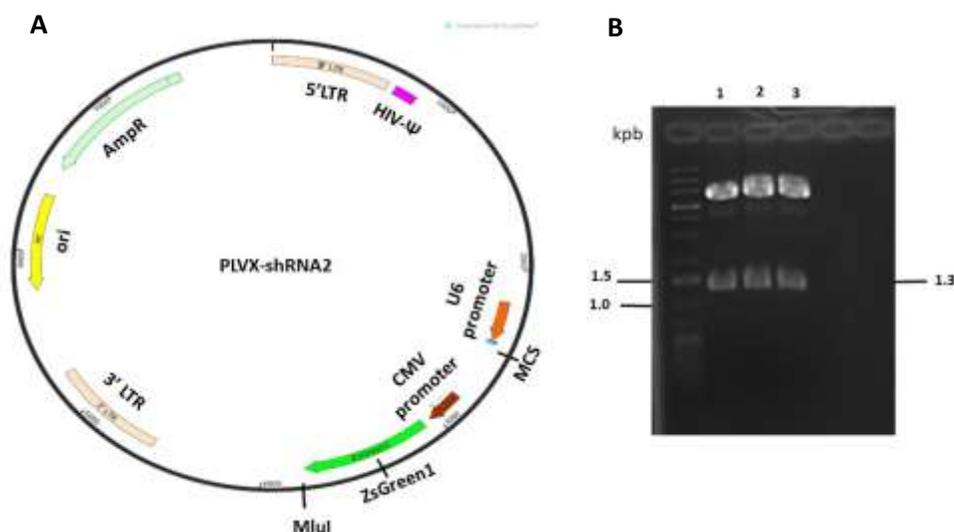


Figura 3 Generación de los shRNAs. A: plásmido lentiviral plvx-shRNA2. **B:** gel de la digestión de las tres construcciones con la enzima de restricción MluI.

Construcción	Secuencia
Plvx-L1	gatccGTACATGGATGTGCAGTTTGATTATCTTCAAGAGAGCATAGAAGCTGGAGCAGTCTCTTGGTGGCTTTTTACGCGTg
Plvx-L1 Secuenciado	gatccGTACATGGATGTGCAGTTTGATTATCTTCAAGAGAGCATAGAAGCTGGAGCAGTCTCTTGGTGGCTTTTTACGCGTg
Plvx-B1	gatccGCCGCGTGAACAATATCAACATTTCAAGAGAATGTTGATATTGTTACGCGGTTTTTACGCGTg
Plvx-B1 Secuenciado	gatccGCCGCGTGAACAATATCAACATTTCAAGAGAATGTTGATATTGTTACGCGGTTTTTACGCGTg
Plvx-Ori4	gatccGCCACCAAGAGACTGCTCCAGTTCTATGCTTCAAGAGCATAGAAGCTGGAGCAGTCTCTTGGTGGCTTTTTACGCGTg
Plvx-Ori4 Secuenciado	gatccGCCACCAAGAGACTGCTCCAGTTCTATGCTTCAAGAGCATAGAAGCTGGAGCAGTCTCTTGGCGGCTTTTTACGCGTg

Tabla 2. Secuenciación de las construcciones pLVX- shRNAs. Comparación de la secuencia insertada al plvx-shrna2 que codifica para los shRNAs, con la secuencia obtenida de la secuenciación de las construcciones. Resaltado en amarillo se encuentra la mutación de una T por una C en la secuencia del shRNA Ori4.

Las tres secuencias que codifican para los tres shRNAs fueron insertadas en el plásmido lentiviral plvx-shRNA2, ambos descritos en los materiales y métodos. El plvx-shRNA2 así como las secuencias de los shRNAs, contienen un sitio de

corte por la enzima de restricción MluI, por lo tanto, para comprobar que se clonaron en el vector se realizó una digestión con dicha enzima, con lo cual se obtiene la liberación de un fragmento de 1.3kpb indicando que las secuencias fueron insertadas en el vector lentiviral. Posteriormente, se secuenciaron las tres construcciones y se encontró que la secuencia de la construcción plvx-Ori4 contiene una mutación donde se cambió una T por una C antes de la secuencia terminadora. Sin embargo, al hacer análisis de BLASTnt el único blanco reconocido es la secuencia de la miosina 1c. Indicando que teóricamente no se encuentra afectada su especificidad por la miosina 1c.

6.2 Eficiencia de transducción de los linfocitos B

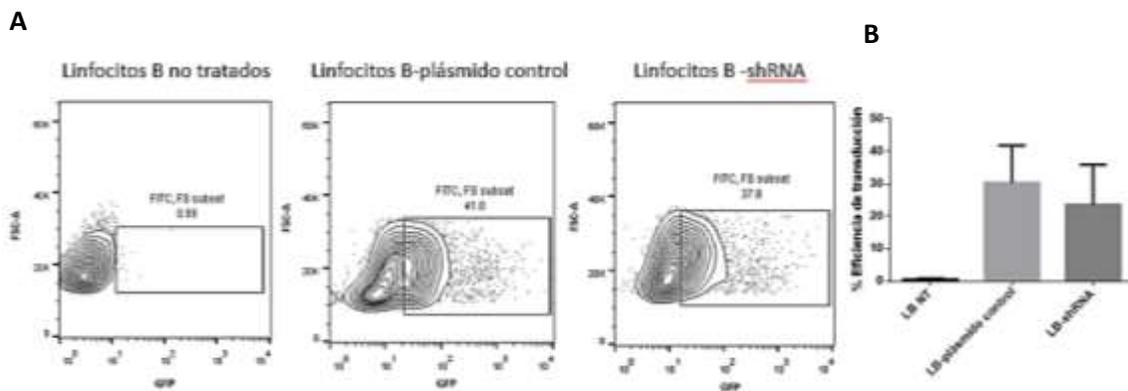


Figura 4. Eficiencia de transducción de los linfocitos B. **A:** Gráficas de puntos de linfocitos B no tratados a la izquierda, tratados con el plásmido control sin shRNA en el centro y tratados con los shRNAs a la derecha. **B:** Cuantificación del porcentaje de eficiencia de transducción. Representación de tres experimentos independientes.

Una vez que fue hecha la transfección y que fueron recuperadas las partículas virales, se hizo la transducción de los linfocitos B como se describe en materiales y métodos. Se observó la eficiencia de dicha transducción mediante citometría de flujo, evaluando el porcentaje de células GFP+. Se observa que aproximadamente el 40% de las células analizadas son GFP+ indicando que fueron transducidas, por lo tanto, estas células fueron seleccionadas para realizar los siguientes experimentos.

6.3 Disminución en la expresión de la miosina 1c en linfocitos B

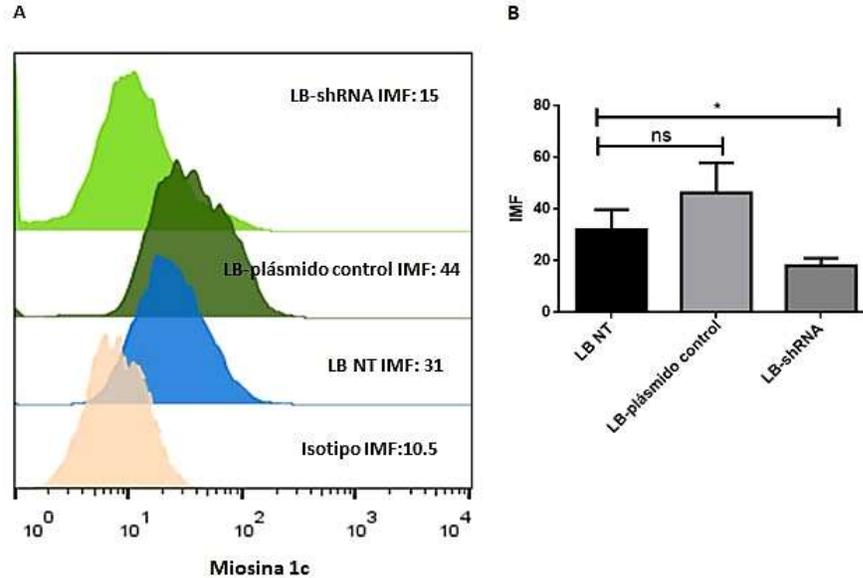


Figura 5. El tratamiento con los shRNAs disminuye la expresión de la miosina 1c en los linfocitos B. Histograma de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la miosina 1c. **A:** Verde claro: linfocitos B tratados con los shRNAs, verde oscuro: linfocitos B tratados con el plásmido control sin shRNA, azul: linfocitos B no tratados, rosa: control de isotipo. **B:** Gráfica de la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF). * $P=0.01$. Representación de tres experimentos independientes.

Se determinó la expresión de la miosina 1c a través de una tinción intracelular evaluada por citometría de flujo en los linfocitos B no tratados y en los linfocitos B transducidos tanto con los shRNAs como con el plásmido control sin shRNA. Se observa que los linfocitos B que fueron tratados con los shRNAs presentan una disminución significativa en la expresión de la miosina 1c en comparación con los linfocitos B que fueron tratados con el plásmido control sin shRNA o con los linfocitos B que no fueron tratados. Por lo tanto, a pesar de no tener una eficiencia de transducción del 100%, las células que son transducidas presentan disminución en la expresión de la miosina 1c.

6.4 Capacidad de migración de los linfocitos B que presentan disminución en la expresión de la miosina 1c

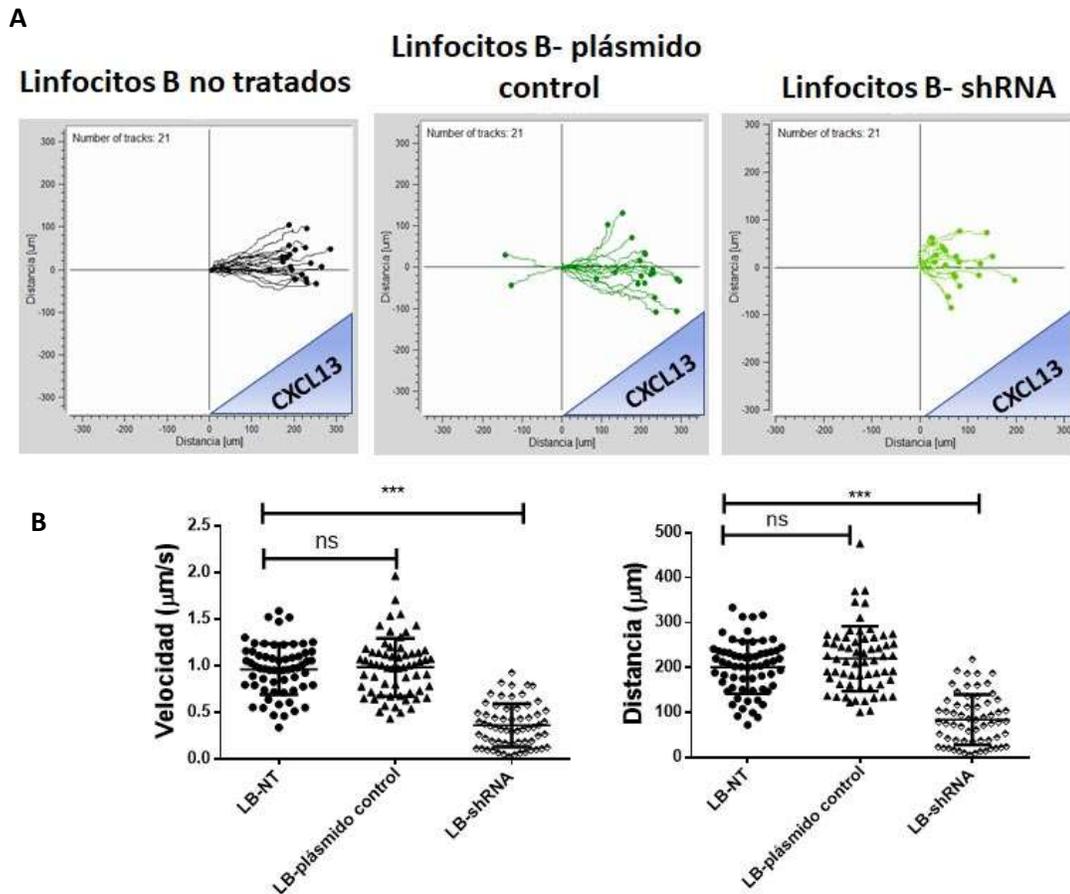


Figura 6. La disminución en la expresión de la miosina 1c afecta la capacidad de migración de los linfocitos B. A: A la derecha linfocitos B no tratados, en el centro linfocitos B tratados con el plásmido control sin shRNA y a la izquierda linfocitos B tratados con los shRNAs. **B:** Gráficas de la cuantificación de la velocidad y la distancia recorrida de los linfocitos B. *** $P=0.001$. Representación de tres experimentos independientes.

Al evaluar la capacidad de migración de los linfocitos B tratados con los shRNAs, los tratados con el plásmido control sin shRNA y los no tratados, se observa que los linfocitos B tratados con los shRNAs, es decir, los que presentan disminución en la expresión de la miosina 1c muestran defectos en su capacidad de migración, se observan trayectorias más cortas así como una disminución significativa en la velocidad y en la distancia recorrida por estas células en

comparación con los linfocitos B tratados con el plásmido control o con los linfocitos B no tratados. Por lo tanto, la miosina 1c participa en el proceso de migración de los linfocitos B.

6.5 Capacidad de endocitosis de los linfocitos B que presentan disminución en la expresión de la miosina 1c

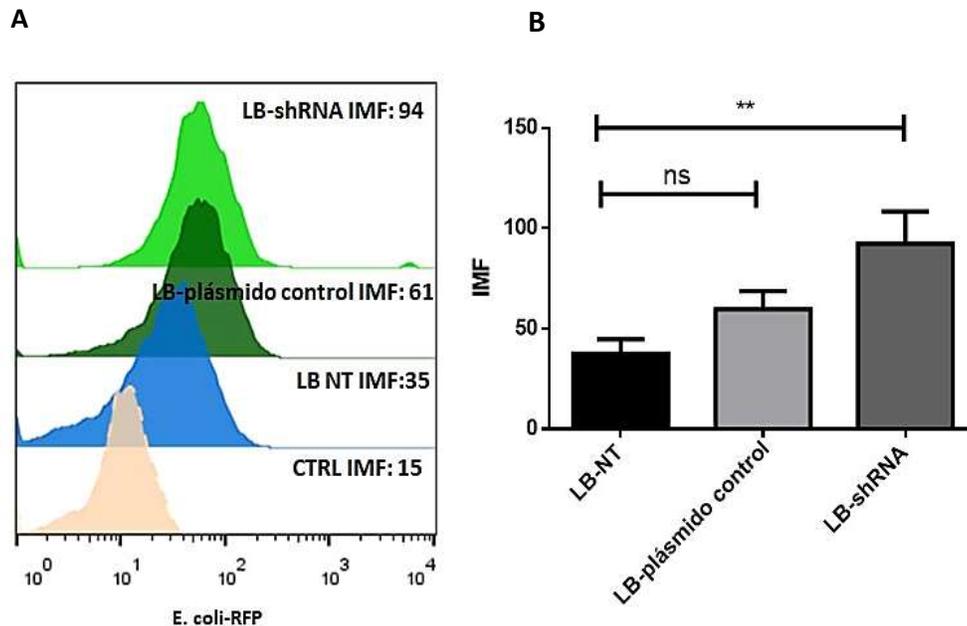


Figura 7. La capacidad de endocitosis se ve aumentada en los linfocitos B que presentan disminución en la expresión de la miosina 1c. A: Histogramas de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de *E.coli*-RFP. Verde claro: linfocitos B tratados con los shRNA, Verde oscuro: linfocitos B tratados con el plásmido control sin shRNA, azul: linfocitos B no tratados, rosa: control de auto fluorescencia. **B:** gráfica de la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia IMF. ** $P=0.003$. Representación de tres experimentos independientes.

Se determinó la capacidad de endocitosis de la bacteria *E.coli* que expresa a la proteína rojo fluorescente. por parte de los linfocitos B que fueron tratados con los shRNAs, con el plásmido control sin shRNA y los linfocitos B no tratados. Se observa un aumento significativo en la capacidad de endocitosis por parte de los linfocitos B tratados con los shRNAs en comparación con los linfocitos B tratados con el plásmido control o con los linfocitos B no tratados. Por lo tanto, la disminución en la expresión de la miosina 1c le confiere mayor permisividad

a la membrana plasmática para endocitar a la bacteria. Indicando que la miosina 1c participa en el proceso de endocitosis.

7. Discusión

La miosina 1c ha sido estudiada en diversos tipos celulares, sin embargo, existe muy poca información sobre sus funciones en células del sistema hematopoyético en especial en los linfocitos B donde se expresa con mayor abundancia en comparación con otros linajes celulares del sistema hematopoyético. Maravillas-Montero *et al* en 2011 reportó que la miosina 1c está presente en la sinápsis inmunológica, así como su participación en la presentación antigénica, eventos clave durante una respuesta inmunológica. Estos hallazgos abren la puerta para la investigación del papel de las miosinas no convencionales en células hematopoyéticas y en funciones que permiten el correcto funcionamiento del sistema inmunológico. Ya que la miosina 1c está implicada en los procesos de migración y endocitosis en otras células, fue importante determinar su participación en estas funciones en los linfocitos B. Lo anterior debido a que los linfocitos B requieren de ambas funciones para desempeñarse de manera eficiente; requieren de la migración para arribar a órganos linfoides secundarios, y de la capacidad de endocitosis para probar el medio que los rodea en busca de antígeno.

Los datos reportados en este trabajo muestran que la miosina 1c participa tanto en la migración como en la endocitosis en los linfocitos B. Al disminuir su expresión y evaluar la capacidad de migración en dichas células, se observaron defectos similares a los reportados para otros tipos celulares.

Las alteraciones observadas en la migración pueden deberse a las funciones previamente reportadas para la miosina 1c, donde está involucrada en el reciclamiento y posicionamiento de moléculas de superficie (Bose *et al*, 2004). La miosina 1c puede estar involucrada en el reciclamiento o en el posicionamiento

del receptor de quimiocina CXCR5, empleado en los ensayos descritos anteriormente o bien en el reciclamiento o posicionamiento de las integrinas VLA-4 y LFA-1 que se expresan en los linfocitos B y reconocen a fibronectina, sustrato sobre el cual se llevaron a cabo los ensayos de migración. Otro fenómeno posible que podría explicar los defectos observados puede deberse a las alteraciones en la distribución de balsas de lípidos en la membrana plasmática al disminuir la expresión de la miosina 1c (Brandstaetter *et al*, 2014).

Debido a que tanto el receptor de quimiocinas como las integrinas requieren estar posicionadas en estos microdominios de membrana (Matkó y Szöllosi, 2002), dichas alteraciones impedirían la difusión lateral de dichas moléculas alterando su señalización, lo cual, resultaría en defectos sobre sus funciones.

Por otro lado, se ha asociado a las miosinas de clase I, en especial las de cola corta como lo es la miosina 1c, en el mantenimiento de la tensión de membrana. Esta característica es necesaria para que se lleven a cabo procesos celulares tales como la endocitosis, exocitosis, división celular y migración. Lopez-Ortega *et al* en 2016 reportó que en el ratón deficiente de miosina 1g existe una reducción en la tensión de membrana, lo anterior fue medido sometiendo a las células deficientes de miosina 1g a una fuerza y observando su resistencia a la deformación. Al analizar la capacidad de endocitosis de las células deficientes de miosina 1g se observó un aumento la capacidad de endocitosis de bacteria. Esto se le atribuye al defecto observado en la tensión de membrana en ausencia de miosina 1g, ya que al disminuir la tensión de membrana esta pierde rigidez lo cual le confiere mayor permisividad a la membrana plasmática para endocitar a la bacteria.

Los datos reportados en este trabajo sobre la endocitosis de bacteria en linfocitos B que presentan reducción en la expresión de miosina 1c, son similares a los mencionados anteriormente. En el sistema empleado en este trabajo también se observa un aumento significativo en la capacidad de endocitar bacterias en las células que presentan reducción en la expresión de la miosina 1c. A pesar de que no fue medida la tensión de membrana, debido a los antecedentes donde se

involucra a las miosinas de clase I en esta función y debido al reporte de López-Ortega *et al* en 2016, se puede sospechar que la miosina 1c también está participando en el mantenimiento de la tensión de membrana, lo cual, impacta directamente en las funciones evaluadas.

Así mismo, esto reafirma que el mantenimiento de la tensión de membrana es una de las funciones compartidas por varios miembros de las miosinas de clase I no convencionales.

Este trabajo permite esclarecer un poco más las funciones de la miosina 1c en los linfocitos B. A pesar de ser una de las miosinas no convencionales más estudiadas, existe poca información sobre sus funciones en células hematopoyéticas, especialmente en linfocitos B. Análisis sobre su expresión en células hematopoyéticas realizada en bases de datos, muestran que la miosina 1c en linfocitos B se expresa desde etapas tempranas de su desarrollo, detectándose su abundante expresión desde el estadio pro-B y manteniéndose hasta la madurez del linfocito B (www.immgen.org).

Por lo tanto, es importante esclarecer y establecer la importancia y la función que tiene la miosina 1c en los linfocitos B no solo en las funciones que desempeñan si no también en su desarrollo.

8. Conclusión

La miosina 1c participa en el proceso de migración, ya que al disminuir su expresión se generan trayectorias más cortas, así como una reducción significativa de la velocidad y la distancia que recorren los linfocitos B. Así mismo, participa en la endocitosis, ya que, al disminuir su expresión aumenta significativamente la capacidad de endocitar bacteria por parte de los linfocitos B.

9. Perspectivas

Es necesario abordar los defectos observados en la migración y en la endocitosis con más detalle. Para determinar exactamente dónde se encuentra el defecto en la migración primero es necesario medir la expresión en la membrana plasmática tanto del receptor de quimiocina CXCR5 como de las integrinas VLA-4 y LFA-1. Así mismo, es importante determinar la localización de dichas moléculas, lo cual, nos hablaría de si están siendo transportadas de manera eficiente hacia la membrana plasmática.

Por otro lado, en relación a la endocitosis para confirmar de manera irrefutable que la miosina 1c participa en el mantenimiento de la tensión de membrana, habrá que hacer la medición de la misma en células con disminución en la expresión de la miosina 1c. Así mismo, es importante dilucidar su participación en la endocitosis mediada por receptor, principalmente la endocitosis del BCR, también sería interesante evaluar la endocitosis mediada por el receptor Fc o bien por el receptor de complemento y de esta manera redondear el estudio de la participación de la miosina 1c en la endocitosis.

10. Bibliografía

Arif E. Sharma P., Solanki A., Mallik L., Rathore Y., Twal K., Nath S., Gandhi D., Holzman L., Ostap M., Ashish., Nihilani D. Structural analysis of the myo1c and neph1 complex provides insights into the intracellular movement of Neph1. *Molecular Cell Biology*. 36 (11): 1639-1654 (2016)

Arun R., Lakkakula B. Chitharanjan A. Role of myosin 1H gene polymorphisms in mandibular retrognathism. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopaedics*. 149(5):699-704 (2016)

Barylko B., Jung G., Albanesi J. Structure, function and regulation of myosin 1C. *Acta Bioquímica Polónica*. 52(2):373-380 (2005)

Benesh A., Nambiar R., McConell R, Mao S., Tabb D., Tyska M. Differential localization and dynamics of class I myosins in the enterocyte microvillus. *Molecular Biology of the Cell*. 21: 970-980 (2010)

Benesh A., Fleming J., Chiang C., Carter B., Tyska M. Expression and localization of myo1d in the developing nervous system. *Brain Research*. 1440:9-22 (2012)

Brandstaetter H., Kishi-Itakura C., Tumbarello D., Manstein D., Buss F. Loss of functional MYO1C/myosin 1c, a motor protein involved in lipid raft trafficking, disrupts autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 10(12): 2310-2323 (2014)

Bridgman P. Myosin-dependent transport in neurons. *Wiley Periodicals*. 164-174 (2013)

Brownstein A., Rayyan A., Doron D., Sirigu S., Davidov B., Shohat M., Frydman M., Houdusse A., Kanaan M., Avraham K. Novel myosin mutations for hereditary hearing loss revealed by targeted genomic capture and massively parallel sequencing. *European Journal of Human Genetics*. 22(6): 768-775 (2014)

Buchsacher G., Wong S. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*. 95(8): 2499-2504 (2000)

Cordonnier M., Dauzonne D., Louvard D., Coudrier E. Actin filaments and Myosin I alpha cooperate with microtubules for the movement of lysosomes. *Molecular Biology of the Cell*. 12:4013-4029 (2001)

Charpentier E. and Duodna J. Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature*. 495: 50-53 (2013)

Chase S., Encina C., Stolzenburg L., Tatum A., Holzman L., Krendel M. Podocyte-specific knockout of myosin 1e disrupts glomerular filtration. *AJP-Renal Physiology*. 303:1099-1106 (2012)

Cheng J., Grassart A., Drubin D. Myosin 1e coordinates actin assembly and cargo trafficking during clathrin-mediated endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*. 23(15):2891-2904 (2012)

Crawley S., Mooseker M., Tyska M. Shaping the intestinal brush border. *Journal of Cell Biology*. 207(4):441-451 (2014)

Diakanova M., Bokoch G, Swanson J. Dynamics of cytoskeletal proteins during Fcy receptor mediated phagocytosis in macrophages. *Molecular Biology of the Cell*. 13: 402-411 (2002)

Escors D., Breckpot K., Arce F., Kochan G., Stephenson H. Lentiviral vectors and gene therapy. Springer; Chapter 2, Development of Retroviral and Lentiviral Vectors.11-28 (2012)

Glaser S, Anastassiadis K, Stewart AF. Current issues in mouse genome engineering. *Nature Genetics*. 37(11):1187-93 (2005)

Greenberg M. and Ostap M. Regulation and control of Myosin-1 by the motor and light chain binding domains. *Trends Cell Biology* 23(2):81-89 (2013)

Haslam, R. J.; Koide, H. B.; Hemmings, B. A. Pleckstrin domain homology. *Nature*. 363 (6427): 309–10 (1993)

Hassen S., Woldemichaele B., White M. Lentiviral transduction of neuronal cells. *Methods Molecular Biology*. 1078:141-146 (2013)

Heng T. Immunological Genome Project Consortium. *Nature Immunology*. 10:1091-1093 (2008)

Hoffman WA.,Johnson T.,Klapczynski M.,Fan JL., de Lanerolle P. From transcription to transport: emerging roles for nuclear myosin I. *Biochemistry and Cell Biology*. 84: 418-426 (2006)

Hokanson D. and Ostap M. Myo1c binds tightly and specifically to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate. *PNAS*. 103(9):3118-3123 (2006)

Hokanson D. MYO1C binds to PIP2 with high affinity through a putative PH domain. Publicly accessible Penn dissertations. (2007)

Houdebine L. Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Molecular Biology* 360:163-202 (2007)

Kalpana V. Retroviral Vectors for Liver-directed Gene Therapy. *Seminar in Liver Disease*. 19 (1): 27-37 (1999)

Kim S., Mehal W., Dong X., Heinrich V., Pypaert M., Mellman I., Dembo M., Mooseker M., Wu D., Flavell R. Modulation of cell adhesion and motility in the immune system by myo1f. *Science*. 314(5796) 136-139 (2006)

- Kittelberger N., Breuning M., Martin R., Knölker H., Miklavc P. The role of myosin 1c and myosin 1b in surfactant exocytosis. *Journal of Cell Science*. 129(8): 1685-1696 (2016)
- Krendel M., Kim S., Willinger T., Wang T., Kashgarian M., Flavell R., Mooseker M. Disruption of Myosin 1e promotes podocyte injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 20(1):86-94 (2009)
- Krendel M., Osterweil E., Mooseker M. Myosin 1e interacts with synaptojanin-1 and dynamin and is involved in endocytosis. *FEBS Letters*. 581: 644-650 (2007)
- López Ortega O., Ovalle-García E., Ortega-Blake I., Antillón A., Chávez-Munguía B. Patiño-López G., Fregoso-Soriano R., Santos-Argumedo L. Myo1g is an active player in maintaining cell stiffness in B-Lymphocytes. *Cytoskeleton*. 73: 258-268 (2016)
- Maravillas-Montero J.L., and Santos-Argumedo L. The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 91:35-43 (2012)
- Maravillas-Montero J.L., Gillespie P., Patiño López G., Shaw S., Santos-Argumedo L. Myosin 1c participates in B cell cytoskeleton rearrangements, is recruited to the immunological synapse, and contributes to antigen presentation. *Journal of Immunology*. 187: 3053-3063 (2011)
- Maravillas-Montero J.L., López-Ortega O., Patiño-López G., Santos-Argumedo L. Myosin 1g regulates cytoskeleton plasticity, cell migration, exocytosis and endocytosis in B lymphocytes. *Molecular Immunology*. 44:877-886 (2014)
- Mazerik J. Uncovering mechanisms that control myosin1a membrane binding and targeting dynamics. Dissertation Vanderbilt University. 1-160 (2013)
- Mazzolini R., Dopeso H., Mateo-Lozano S., Chang W., Rodrigues P., Bazzocco S., Alazzouzi H., Landorfis., Hernández Losa J., Andretta E., Alhopuro P., Espín E., Armengol M., Taberrero J., Ramón y Cajal S., Kloor M., Gebert J., Mariadason J., Schwartz S., Aaltonen L., Mooseker M., Arango D. Brush border myosin 1a has a tumor suppressor activity in the intestine. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States*. 109(5): 1530-1535. (2012)
- Moore C., Guthrie E., Tze- Han Huang M., Taxman D. Short hairpin RNA (shRNA): Design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods of Molecular Biology*. 629: 141-158 (2010)
- Olety B., Wälte M., Honnert U., Schillers H., Bähler M. Myosin 1G is an hematopoietic specific myosin that localises to the plasma membrane and regulates elasticity. *FEBS Letters*. 584:493-499 (2010)

- Santos-Argumedo L., Maravillas-Montero J.L., López-Ortega O. Class I myosins in B-cell physiology: functions in spreading, immune synapses, motility and vesicular traffic. *Immunological Reviews*. 256:190-202 (2013)
- Sellers J. Myosins: a diverse superfamily. *Biochimica et Biophysica*. 1496:3-22 (2000)
- Sielski N., Ihnatovych I., Hagen J., Hofmann W. Tissue specific expression of Myosin 1C isoforms. *BMC Cell Biology*. 15(8):320-327 (2014)
- Tang N., Lin T., Ostap E.M. Dynamics of myo1c lipid binding and dissociation. *Journal of Biological Chemistry* 277(45):42763-42768 (2002)
- Tassopoulou F., Deeley K., Harvey E., Sciote J., Veria A. Genetic variation in myosin 1h contributes to mandibular prognathism. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 141(1): 51-59 (2012)
- Venit T., Dzijak R., Kalendova A., Kahle M., Rohozková J., Schmidt V., Rüllicke T., Rathkolb B., Hans W., Bohla A., Eickelberg O., Stoeger T., Wolf E., Yildirim A., Gailus-Durner V., Fucsh H., Angelis M., Hozák P. Mouse nuclear Myosin I knockout shows interchangeability and redundancy of myosin isoforms in the cell nucleus. *PLOS ONE* 8(4): 1-11 (2013)
- Warnock J., Daigre C., Al-Rubeai M. Introduction to viral vectors. *Methods of Molecular Biology*. 737:1-25 (2011)
- Yip M., Ramm G., Larance M., Hoehn K., Wagner M., Guilhaus M., James D. CaMKII-Mediated phosphorylation of the myosin motor 1c is required for insulin stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Cell Metabolism*. 8:384-398 (2008)