



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUCIANO GRACIANI DOLCE

**Estudo do Interactoma
das Miosinas V Humanas**

Campinas

2018

LUCIANO GRACIANI DOLCE

Estudo do Interactoma das Miosinas V Humanas

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na Área de Bioquímica

ESTE ARQUIVO DIGITAL
CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
LUCIANO GRACIANI DOLCE E
ORIENTADA PELO DR. MÁRIO TYAGO
MURAKAMI.

Orientador: Dr. Mário Tyago Murakami

Co-orientadora: Dr. Priscila Oliveira de Giuseppe

Campinas

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/00584-5

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D687e Dolce, Luciano Graciani, 1991-
Estudo do interactoma das miosinas V humanas / Luciano Graciani Dolce. –
Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Mário Tyago Murakami.
Coorientador: Priscila Oliveira de Giuseppe.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Miosinas. 2. Técnicas do sistema de duplo-híbrido. 3. Proteínas adaptadoras de transporte vesicular. I. Murakami, Mário Tyago. II. Giuseppe, Priscila Oliveira de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Studies on human myosin V interactome

Palavras-chave em inglês:

Myosins

Two-hybrid system techniques

Adaptor proteins, Vesicular transport

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Mário Tyago Murakami [Orientador]

Juliana Ferreira de Oliveira

Aline Mara dos Santos

Luiz Claudio Cameron

Ana Paula Ulian de Araujo

Data de defesa: 02-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 02 de fevereiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Mário Tyago Murakami

Dr. Juliana Ferreira de Oliveira

Prof. Dr. Aline Mara dos Santos

Prof. Dr. Luiz Claudio Cameron

Prof. Dr. Ana Paula Ulian de Araujo

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

**Esta Tese de Doutorado foi financiada pela
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**

Projeto 2014/00584-5

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que, por meio do Projeto 2014/00584-5, financiou esse projeto de pesquisa. Agradeço também aos outros órgãos de fomento à pesquisa brasileiros, CAPES e CNPq, que de certo modo também contribuíram para a construção geral da minha formação acadêmica.

Agradeço também a todos os professores que eu tive ao longo do meu desenvolvimento, desde meus primeiros anos de estudo, da escola, do colégio, da faculdade. Muito do que sei, e muito do que sou hoje é devido ao tempo e dedicação de diversos professores, e levo comigo um pouco de cada um. Junto com os professores, agradeço minha mãe Silvana e meu pai Celso, que foram fundamentais para minha formação como pessoa, me ensinando ética, dedicação, perseverança, humildade e honestidade; mas exigentes, sempre me forçando a buscar o meu melhor.

Agradeço à toda minha família, que sempre me apoiou e incentivou nas minhas escolhas, e que sempre se esforçaram e dedicaram para conseguir me dar condições de saber que eu poderia me arriscar, pois sempre teria o apoio deles por trás. Falando em família, agradeço à todos aqueles amigos, que hoje considero fazer parte da minha família.

Aos amigos mais antigos, como o Alexandre ou a Miyuki, que mesmo passando anos sem se ver, a amizade continua sempre forte; aos amigos da federal, Arthur, Caio, Cinthia, Isa, Lucas, Lais, Maria Helena, Marx, Robson e Thulio, com quem eu aprendi muito durante os anos do colegial e continuo aprendendo muito até hoje me dia; e à Danielle, que me apoiou na complicada transição entre final do colegial e o início da faculdade. Agradeço aos amigos que fiz durante a faculdade, principalmente ao AdS, com quem passei tardes estudando, tardes descansando, noites fazendo trabalhos, em geral, que me acompanharam ao longo da faculdade, e me ajudaram a decidir seguir essa carreira! Agradeço também ao Atilio, por todo conhecimento que me passou ao longo de três anos de iniciação científica, e que foram fundamentais para a continuação do meu percurso acadêmico. Em especial, agradeço ao Rodrigo e à Iza, por tantas coisas que não daria para escrever aqui.

Agradeço a todas as pessoas que ajudaram, direta ou indiretamente nos anos de pós graduação. Ao CNPEM, por ter me fornecido a infraestrutura invejável que tive para fazer meus experimentos, e ao corpo técnico do LNBio, em especial à Celisa, Givanil e Jackeline, e à Juliana e à Fernanda. Agradeço também ao Prof Dr. Jorg e a seu grupo, pelo auxílio com os experimentos de duplo híbrido em levedura. Agradeço a todos do MiSB, em especial ao

Leandro e ao Andrey, e depois à Ana Maria e ao Daniel, que colaboraram diretamente com minha pesquisa, e ao Plínio, que aguentou dividir apartamento comigo por quase 4 anos! Agradeço também à Isa, ao Pedro, e à Rosa, pelos momentos de descontração; às meninas do LEC, e ao pessoal de Ribeirão, em especial ao Rui, que me recebeu, me hospedou e me ensinou muita coisa.

Agradeço a todos os colaboradores deste trabalho (e foram muitos! Rui, Leandro, Andrey, Daniel, Ana, Renan, Lucelia, Leticia, Mariana, Norihiko, e os Profs, Carlos, Fabio, Mitsunori e Enilza). Sem eles não teria sido possível realizar grande parte do que foi feito, e eu não teria aprendido grande parte do que aprendi. Agradeço também à Unicamp, ao IB e ao Programa de Pós Graduação da Biologia Funcional e Molecular, pela oportunidade, e à FMRP e à Prof. Enilza, pelo momento que fui recebido lá.

Agradeço também ao membros da minha banca de qualificação, que, com críticas construtivas, me ajudaram a melhorar a apresentação desse trabalho.

Agradeço especialmente à minha co-orientadora, Priscila, que durante esses 4 anos me ajudou e me apoiou. Me deixou livre para tomar decisões quando era o momento de eu ser livre e tomar decisões, e retomou as rédeas quando era o momento de fazer isso, permitindo que esse projeto tenha obtido resultados muito além do que eu teria conseguido sozinho. Por fim, a agradeço por ser peça fundamental no meu processo de aprendizado e crescimento, tanto acadêmico quanto pessoal, dos últimos 4 anos.

Agradeço ao meu orientador, Mário, por ter me confiado um projeto desafiador, me incentivado a estudar mais, pesquisar mais, e aprender mais, e principalmente por ter me acompanhado nesse projeto, tomando decisões certas em momentos estratégicos.

Por fim, agradeço à Angélica, minha namorada, que me acompanhou, ajudou, ouviu, e tantas outras coisas nos últimos anos!

RESUMO

Miosinas são proteínas motoras com atividade ATPásica e apresentam processividade em filamentos de actina. A classe V das miosinas apresenta três genes parálogos em humanos, *MYO5A*, *MYO5B* e *MYO5C*, que codificam para as proteínas diméricas MyoVa, MyoVb e MyoVc. Essas proteínas motoras são responsáveis pelo transporte vetorial de vesículas, organelas, ácidos nucléicos e proteínas, fundamentais para exocitose, reciclagem de membranas e polarização celular, processos que estão intimamente relacionados com a pigmentação da pele, plasticidade sináptica e diferenciação celular. A maioria dos carregamentos transportados por MyoVs se ligam ao seu domínio cauda globular, localizado na região C-terminal da proteína, por meio de uma ou mais proteínas adaptadoras. Além disso, o domínio cauda globular contém um sítio de fosforilação cuja função ainda não é bem descrita. Evidências indicam que este evento possa atuar tanto como mais um nível de regulação da MyoVa para a escolha de carregamentos, ou também para indicar o momento em que a liberação desses carregamentos deve ser realizada. Neste sentido, por meio da técnica de duplo híbrido em levedura, buscamos expandir no conhecimento do interactoma da MyoVa principalmente relacionado ao evento de fosforilação. A partir do uso de um duplo mutante fosfo-mimético foi identificado quatro novos possíveis parceiros moleculares: Spermine Synthase; Tandem C2 Nuclear Protein; WD Repeat-Containing Protein 48; e Cold Shock Domain-Containing Protein E1. Duas das interações – Spermine Synthase (que teve sua interação confirmada *in vitro*) e Tandem C2 Nuclear Protein – foram estudadas por imunocitoquímica; e essas proteínas apresentaram um padrão pontual e discreto de colocalização com a MyoVa no citoplasma, e alterações fenotípicas quando o gene *MYO5A* foi silenciado por siRNA. Inesperadamente nenhuma das proteínas identificadas, validadas e curadas pelo método de duplo híbrido em levedura mostrou uma preferência de interação pela forma fosfo-mimética *in vitro*, o que não permitiu avançar no melhor entendimento da função dessa fosforilação. Paralelamente, outra interação inédita entre a MyoVc e a Rab3A foi alvo de estudos biofísicos e celulares, que se originou da parceria do nosso grupo de pesquisa com o Prof. Fukuda da Universidade Tohoku, sugerindo um potencial novo papel biológico para a MyoVc que é ainda pouco estudada em comparação com à MyoVa.

ABSTRACT

Myosins are motor proteins with ATPase activity and processivity in actin filaments. The Myosin Class V presents, in humans, three paralogous genes, MYO5A, MYO5B and MYO5C, which encode the dimeric proteins MyoVa, MyoVb and MyoVc, respectively. These motor proteins are responsible for the transport of vesicles, organelles, nucleic acids and proteins, which is fundamental for exocytosis, membrane recycling and cell polarization; processes that are closely related to skin pigmentation, synaptic plasticity and cellular differentiation. Most of the cargoes transported by MyoVs bind to their globular tail domain, located at the C-terminal region of the protein, usually in the presence of one or more adaptor proteins. Moreover, the globular tail domain contains a phosphorylation site whose function is not yet well described. Evidence indicates that it may act as a further level of MyoVa regulation for the choice of cargoes, or also to indicate when MyoVa should release these cargoes. In this context, through the yeast two-hybrid technique, we sought to expand on the knowledge of the MyoVa interactome mainly related to the phosphorylation event. From the use of a double mutant phospho-mimetic was identified four new putative molecular partners: Spermine Synthase; Tandem C2 Nuclear Protein; WD Repeat-Containing Protein 48; and Cold Shock Domain-Containing Protein E1. Two of these interactions - Spermine Synthase (which had its interaction confirmed *in vitro*) and Tandem C2 Nuclear Protein - were studied by immunocytochemistry; and these proteins showed a punctual and discrete pattern of colocalization with MyoVa in the cytoplasm, and phenotypic changes were observed when the MYO5A gene was silenced by siRNA. Unexpectedly none of the proteins identified, validated and cured by the yeast two-hybrid method showed a preference for interaction by the phospho-mimetic form *in vitro*, which did not allow to advance in the better understanding of the role of phosphorylation. In parallel, another novel interaction between MyoVc and Rab3A was the subject of biophysical and cellular studies, which originated from the cooperation of our research group with Prof. Fukuda from Tohoku University, suggesting a potential new biological role for MyoVc that is still poorly studied compared to MyoVa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação da MyoV	18
Figura 2: Eletroforese em gel de agarose	54
Figura 3: Testes de autoativação das construções	55
Figura 4: Resultado final do <i>screening</i> em placa QDO/X/A	56
Figura 5: Parte do sequenciamento do plasmídeo da colônia 123	57
Figura 6: Primeiro resultado da validação “1x1”	58
Figura 7: Segunda rodada de experimentos de validação “1x1”	59
Figura 8: Duplicação de parte dos resultados	59
Figura 9: Resultado da terceira rodada de experimentos de validação	60
Figura 10: Resultado da predição de domínio	63
Figura 11: Amplificação das construções SMS, C2.1 e C2.2 por PCR	65
Figura 12: Teste de expressão das cinco construções de SMS e TC2N	65
Figura 13: Gel com as frações insolúveis do lisado celular	66
Figura 14: Teste de expressão das duas construções da proteína spermine synthase	67
Figura 15: Resultado do <i>western blot</i>	68
Figura 16: Purificação da SMS por cromatografia de afinidade	69
Figura 17: Purificação da SMS por cromatografia de exclusão molecular	70
Figura 18: Experimento de MST	71
Figura 19: Imunocitoquímica	72
Figura 20: Imunocitoquímica	73
Figura 21: O Silenciamento do gene <i>MYO5A</i>	74
Figura 22: Potenciais proteínas parceiras da MyoVa	75
Figura 23: Cromatograma da purificação por afinidade	81
Figura 24: Cromatograma da purificação por exclusão molecular	82
Figura 25: Melhor condição obtida nos primeiros ensaios de cristalização	83
Figura 26: Refinamento das condições de cristalização	84
Figura 27: Cromatograma da troca-iônica	86
Figura 28: SDS-PAGE de frações da troca-iônica	86
Figura 29: Cromatograma da exclusão molecular	87
Figura 30: SDS-PAGE de frações da cromatografia de exclusão molecular	88
Figura 31: A: Condição F6 do <i>Wizard Screens I e II</i> (Emerald)	89

Figura 32: Melhores resultados dos refinamentos	90
Figura 33: Resultados da difração	91
Figura 34: SDS-PAGE da reação de <i>crosslinking</i>	92
Figura 35: Distância entre as Lisinas do terceiro <i>cross-link</i>	93
Figura 36: Perfil de desnaturação térmica dos MyoVa-GTDs.....	94
Figura 37: Ensaios de CD	95
Figura 38: MST da interação entre MyoVa-GTD-AA e Mlph-GTBDP	97
Figura 39: Representação do sitio de ligação do Mlph-GTBDP no MyoVa-GTD	97
Figura 40: MST da interação entre MyoVa-GTD-AA e Mlph-GTBDP	98
Figura 41: Ensaios de ITC	99
Figura 42: GST <i>pull-down</i>.....	104
Figura 43: Purificação da Rab3A	105
Figura 44: Cromatografia de exclusão molecular do complexo.....	105
Figura 45: SEC-MALS do complexo Rab3A•MyoVc-GTD	106
Figura 46: Termoforese em microescala da Rab3A	107
Figura 47: Resultado do HDX	108
Figura 48: Microscopia confocal de fluorescência	109
Figura 49: O Silenciamento dos genes <i>MYO5C</i> e <i>RAB3A</i>	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Construções das proteínas SMS e TC2N.....	27
Tabela 2: Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR	27
Tabela 3: Sequência dos siRNA utilizados para os silenciamentos.....	36
Tabela 4: Sequência de <i>primers</i> utilizados na reação de qRT-PCR.....	37
Tabela 5: Representação dos três blocos utilizados para o teste de expressão	50
Tabela 6: Análise dos intervalos identificados pelo sequenciamento	62
Tabela 7: Análise da composição de domínios proteicos.	63
Tabela 8. Informações sobre os quatro clones	64
Tabela 9: Raio hidrodinâmico e polidispersão	85
Tabela 10: Raio hidrodinâmico, volume de eluição e polidispersão	86
Tabela 11: Raio, volume de eluição e polidispersão	88
Tabela 12. <i>Crosslinks</i> identificados pela análise em espectrometria de massas.....	93

SUMÁRIO

1 Introdução.....	17
1.1 Superfamília das Miosinas	17
1.1.1 Miosinas V.....	17
2 Objetivos.....	25
3 Materiais e Métodos	26
3.1 Biologia molecular	26
3.1.1 Subclonagem das construções do MyoVa-GTD no vetor de duplo-híbrido.....	26
3.1.2 Clonagem das construções de SMS e TC2N	27
3.2 Duplo Híbrido em Levedura (Y2H)	28
3.2.1 Transformação em Levedura	28
3.2.2 Teste de autoativação.....	30
3.2.3 <i>Screening</i> contra a biblioteca humana universal normalizada.....	30
3.2.4 Identificação das proteínas pescadas	31
3.2.5 Validação do <i>screening</i> em experimentos “1x1”	32
3.2.6 Análises de bioinformática das proteínas confirmadas	32
3.2.7 Validações <i>in-vitro</i>	33
3.3 Biologia Celular.....	35
3.3.1 Cultura de células de mamíferos	36
3.3.2 Silenciamento gênico.....	36
3.3.3 Imunocitoquímica.....	37
3.3.4 GST <i>pull-down</i> contra biblioteca de Rabs.....	38
3.4 Expressão e Purificação de Proteínas	39
3.4.1 MyoVa-GTD-EE	39
3.4.2 MyoVa-GTD-AA	41

3.4.3 MyoVa-GTD- <i>wt</i>	41
3.4.4 MyoVb-GTD	41
3.4.5 SMS	41
3.4.6 MyoVc-GTD	41
3.4.7 Rab3A.....	42
3.5 Ensaio de Cristalização	43
3.5.1 Kits Iniciais.....	43
3.5.2 Refinamento	43
3.5.3 <i>Microseeding</i>	44
3.5.4 Teste de difração de raios X	44
3.6 Caracterizações Biofísicas.....	45
3.6.1 Espectrometria de massas.....	45
3.6.2 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)	47
3.6.3 Dicroísmo circular (CD).....	47
3.6.4 Termoforese em microescala (MST).....	47
3.6.5 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	49
3.6.6 Teste de Expressão de proteínas em sistema de báculo vírus.....	50
3.6.7 Cromatografia de exclusão molecular do complexo Rab3A•MyoVc-GTD.....	51
3.6.8 Cromatografia de exclusão molecular analítica acoplada a espalhamento de luz em multiângulos (SEC-MALS).....	51
PARTE 1	53
4 Resultados.....	54
4.1 Duplo Híbrido em Levedura.....	54
4.1.1 Subclonagem das construções de MyoVa-GTD no vetor de duplo-híbrido.....	54
4.1.2 Teste de autoativação.....	55
4.1.3 <i>Screening</i> Contra a Biblioteca Humana Universal Normalizada	55
4.1.4 Identificação das Proteínas Pescadas.....	56

4.1.5 Validação do <i>screening</i> em experimentos “1x1”	57
4.1.6 Análises de bioinformática dos clones confirmados	61
4.1.7 Validações <i>in-vitro</i>	64
4.2 Biologia Celular.....	71
4.2.1 Imunocitoquímica.....	71
5 Discussão e Conclusões.....	75
5.1 A descoberta de novos possíveis parceiros de interação para a MyoVa	75
5.1.1 WDR48.....	76
5.1.2 CSDE1	76
5.1.3 TC2N	77
5.1.4 SMS	77
6 Perspectivas Futuras	79
PARTE 2	80
7 Resultados.....	81
7.1 Purificação e Ensaio de Cristalização do MyoVa-GTD-EE	81
7.1.1 Primeiro Protocolo de Purificação.....	81
7.1.2 Ensaio de Cristalização	82
7.1.3 Segundo protocolo de purificação.....	85
7.1.4 Novos Ensaio de Cristalização.....	89
7.1.5 Difração de raios X.....	91
7.2 Caracterizações Biofísicas.....	92
7.2.1 <i>Crosslinking</i> químico.....	92
7.2.2 Calorimetria diferencial de varredura.....	94
7.2.3 Dicroísmo circular	94
7.2.4 Termoforese em microescala com Mlph-GTBDP.....	96
7.2.5 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	98
7.2.6 Teste de expressão de proteínas em sistema de baculovírus	99

8 Discussão e Conclusões.....	100
8.1 O papel da fosforilação no GTD da MyoVa é elusivo, e permanece obscuro	100
9 Perspectivas Futuras	102
PARTE 3	103
10 Resultados.....	104
10.1 GST <i>pull-down</i> contra biblioteca de Rabs.....	104
10.2 Purificação da Proteína e Rab3A.....	104
10.3 Cromatografias de exclusão molecular.....	105
10.4 Termoforese em microescala.....	107
10.5 Troca de Hidrogênio por Deutério.....	108
10.6 Localização celular da Rab3A com a MyoVc.....	109
10.7 Silenciamento dos genes <i>MYO5C</i> e <i>RAB3A</i>	109
11 Discussão, Conclusões e Perspectivas Futuras.....	111
11.1 Rab3A interage com as caudas globulares da MyoVa e da MyoVc, mas não com a da MyoVb.....	111
11.2 MyoVc se localiza com Rab3A em pontos discretos do citoplasma, e seus silenciamentos afetam o tráfego de membranas	112
12 Referências	113
ANEXOS	127

1 Introdução

1.1 Superfamília das Miosinas

Miosinas são mecanoenzimas^{1,2} – enzimas que convertem a energia liberada pelo processo de transformação de seu substrato em produto em energia cinética – com atividade processiva sobre filamentos de actina acoplada a sua atividade ATPásica^{1,3,4}. A primeira miosina foi descoberta em 1864 por Willy Kühne, em extratos musculares⁵, que posteriormente ficou conhecida como miosina de classe II (MyoII), ou de miosina convencional (por ser a primeira a ser descoberta). Na década de 70, foi identificada uma nova proteína, semelhante à miosina II, mas que, por não formar dímeros, foi denominada Miosina I ou não convencional⁶. A partir daí, e com o advento do sequenciamento completo de genomas, análises baseadas na identidade de sequência do domínio motor das miosinas revelaram a existência de 35 classes de miosinas, além de outras miosinas “órfãs” que não se enquadram nessas classificações⁷. Estrutural e funcionalmente, as classes dentro da superfamília das miosinas são muito divergentes, visto que existem miosinas que são encontradas como homodímeros^{8,9} ou monômeros¹⁰, e com diversos tipos de cadeias leves associadas^{8,11-14} apresentando função tanto na contração muscular, como no transporte de organelas, proteínas, vesículas e RNAs^{12,15-19}, em diversos organismos. Dentre essas classes, 12 são encontradas em humanos e compreendem miosinas codificadas por cerca de 40 genes⁷.

1.1.1 Miosinas V

Dentre os membros da superfamília das miosinas, as miosinas não convencionais de classe V (MyoV), descobertas no início dos anos 90^{8,20,21}, foram as miosinas não convencionais mais estudadas nas últimas décadas⁹ e o seu papel biológico está associado ao transporte de organelas, mRNA e vesículas secretoras²²⁻²⁶. Em humanos existem 3 genes parálogos para miosinas de classe V, o *MYO5A*, o *MYO5B* e o *MYO5C*, que codificam para as proteínas miosina Va (MyoVa), miosina Vb (MyoVb) e miosina Vc (MyoVc), respectivamente. *MYO5A* é expresso principalmente em melanócitos e no sistema nervoso²⁷, e se encontra no cromossomo 15²⁸. O gene *MYO5B*, que está relacionado com a doença de inclusão das microvilosidades²⁹, se encontra no cromossomo 18, e apresenta um padrão de expressão ubíquo. Por fim, o gene *MYO5C*, que também se localiza no cromossomo 15, é expresso principalmente em células exócrinas³⁰, mas também de forma ubíqua.

1.1.1.1 Estrutura das miosinas V

Estruturalmente as miosinas membros da classe V são separadas em três macrorregiões principais (figura 1): a cabeça, o pescoço e a cauda^{9,22}.

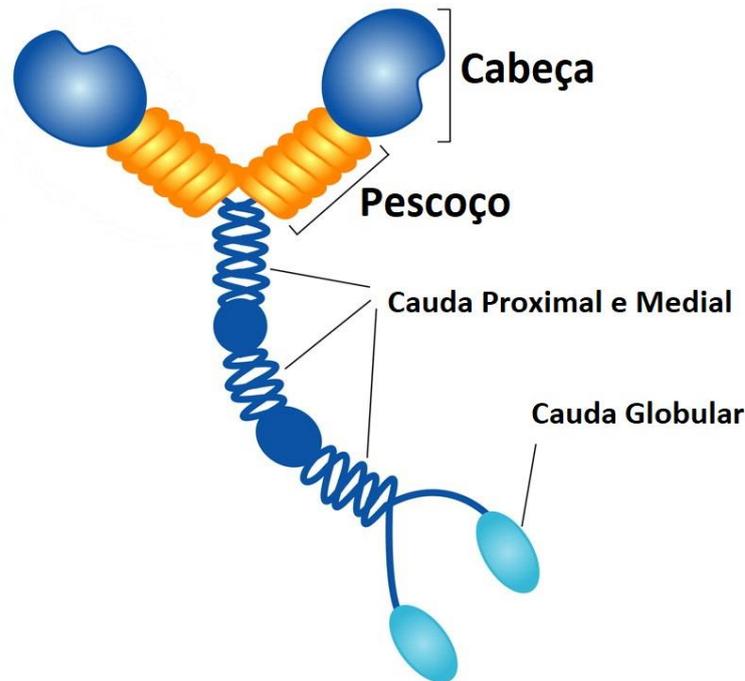


Figura 1: Representação da MyoV, com as macrorregiões da cabeça, onde se encontra o domínio motor, do pescoço, onde se encontram os seis domínios IQ, da cauda, que pode ser subdividida em caudas proximal, medial e globular, e contém as regiões de dimerização, as regiões de exons, e o domínio cauda globular, respectivamente. (adaptado de Toth, J³¹)

1.1.1.1.1 Cabeça

A cabeça é a região mais conservada entre as miosinas. Ela contém um sítio de ligação à actina e um sítio de ligação de adenosina trifosfato (ATP). A cabeça (também conhecida como domínio motor) cliva o ATP em adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (P_i) fornecendo a energia necessária para as mudanças conformacionais que resultam nos passos dados pela proteína³²⁻³⁵ ao longo da actina³⁶.

1.1.1.1.2 Pesçoço

O pesçoço (também conhecido como domínio alavanca) emerge logo após a cabeça, e amplifica as mudanças conformacionais geradas pela cabeça, fazendo com que ela volte a se ligar ao filamento de actina, 72 nm à frente³⁷, garantindo uma processividade alternada com passos de 36 nm^{38,39}. O pesçoço apresenta uma repetição de seis domínios IQ, domínios compostos por α -hélices, com sequência polipeptídica bem definida ((FILV)Qxxx(RK)Gxxx(RK)xx(FILVWY), sendo “x” qualquer resíduo de aminoácido). Cada

um desses domínios IQ é capaz de ligar uma proteína calmodulina (CaM), ou uma cadeia leve relacionada^{9,11,12,16,40-42}. A ligação de CaM ou cadeias leves está relacionada com a rigidez do pescoço, e conseqüentemente à regulação da atividade processiva das MyoV^{12,43,44}, e à atividade ATPásica da cabeça^{45,46}. Além da regulação pelas cadeias leves ou CaMs, os domínios IQ ainda sofrem regulação relacionada com a concentração de cálcio, que pode se ligar à CaMs, diminuindo a afinidade delas pela MyoV^{43-45,47}.

1.1.1.1.3 Cauda

A cauda das MyoV inicia logo após o último domínio IQ do pescoço, e se estende até o final da proteína, sendo subdividida em 3 regiões: cauda proximal, cauda medial e cauda distal⁹.

1.1.1.1.3.1 Cauda proximal

A região proximal da cauda das MyoV é formada principalmente por uma α -hélice em *coiled-coil*, responsável pela dimerização da MyoV. Isso ocorre devido à presença de um motivo estrutural repetitivo de 7 peptídeos, sempre com a presença de resíduos hidrofóbicos nas primeiras e quartas posições, que ficam voltados para o interior do *coiled-coil*⁹. No final da região proximal da cauda dos parálogos Va e Vb existe uma sequência peptídica PEST, formada por prolina (P), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T), que pode ser clivada por calpaína⁴⁸, e é um marcador para degradação da MyoV⁴⁹.

1.1.1.1.3.2 Cauda medial

A região seguinte ao motivo PEST é chamada de cauda medial. Nos genes MYO5, essa região apresenta seis exons que sofrem *splicing* alternativo tecido dependente, e são nomeados de A a F. Dentre os seis, os exons A, B, D e F (com 228, 9, 81 e 75 pares de bases, respectivamente) podem ser removidos sem que a *open read frame* (ORF) seja alterada⁵⁰, sendo que a presença do exon B (que insere apenas 3 aminoácidos na proteína), é obrigatória para a interação da MyoVa com DYNLL2, estabilizando o *coiled-coil*^{51,52}, e a presença do exon F é fundamental para a ligação de melanossomos⁵³, evidenciando que o *splicing* alternativo da MyoV é um de seus mecanismos de regulação.

1.1.1.1.3.3 Cauda Globular

Por fim, a porção distal da cauda contém o domínio cauda globular (do inglês *Globular Tail Domain*, GTD), também conhecido como domínio de ligação de cargas, por ser

a região da MyoV que apresenta o maior número de proteínas parceiras diferentes, como as Rabs 3A⁵⁴ e 11^{55,56}, a Spir⁵⁶, a Melanofilina^{53,55,57-60}, a RILPL2^{60,61}, a PTEN^{19,62}, e a recentemente descoberta RPGRIP1L⁶³. Estruturalmente, o GTD é composto por dois feixes de α -hélices separados entre si por uma hélice longa, um motivo de três hélices e um grande loop que estabiliza todo o domínio, e termina em um zíper molecular formado por duas folhas β ^{55,60,64,65}. Além dos sítios de interação proteína-proteína, o GTD tem um sítio de interação com o domínio motor da própria MyoV, dobrando a proteína em uma conformação fechada, que inibe a atividade ATPásica do domínio motor^{26,40,45,46,64-68}. A formação dessa conformação fechada, também chamada de estado auto-inibido, garante que a MyoV não consuma ATP quando não tiver cargas para levar⁶⁸. Evidências recentes indicam que a presença de proteínas que tem afinidade ao GTD pode atrapalhar a formação ou estabilidade do estado auto-inibido, liberando assim os sítios de ligação de cargas do GTD^{58,69,70}.

1.1.1.2 Paráloga Miosina Va

Dentre as três proteínas parálogas (MyoVa, MyoVb e MyoVc) pertencentes à família MyoV em humanos, a MyoVa é a mais estudada, com o maior número de proteínas parceiras e papéis biológicos já conhecidos. Em camundongos, as mutações do gene *MYO5A* que atrapalhem a atividade da MyoVa causam um fenótipo conhecido como *dilute*, pois o camundongo apresenta uma descoloração dos pelos, como se sua cor ficasse diluída. Além dos problemas de coloração, esses camundongos morrem após algumas semanas, de crises epiléticas^{21,28,71}. Em humanos, mutações no gene *MYO5A* causam a síndrome de Griscelli tipo 1 (também chamada de síndrome de Elejalde)^{40,72-74}, uma doença autossômica recessiva caracterizada por albinismo parcial, problemas neurológicos graves, hipotonia muscular e convulsões^{72,75-77}. A relação da MyoVa com o albinismo parcial já foi profundamente estudada, e se caracteriza por problemas na via de transporte de melanossomos^{53,57,59,78}. Entretanto, a relação da MyoVa com os problemas neuronais, provavelmente pleiotrópica, ainda não foi completamente determinada⁷³.

A função mais bem estudada da MyoVa é o transporte de melanossomos da região perinuclear para a periferia celular⁷⁹. Esse transporte envolve um complexo de três proteínas, MyoVa, Rab27a e Melanofilina (MLPH), além dos filamentos de actina. A proteína Rab27a é uma pequena GTPase pertencente à família Ras, que se ancora na membrana externa do melanossomo. Essa proteína tem a capacidade de interagir com a MLPH, uma proteína com domínios intrinsecamente desordenados, que recruta a MyoVa⁵⁹, interagindo tanto com o seu GTD^{55,57} quanto com o exon F⁸⁰. Juntas, Rab27a e MLPH formam um complexo adaptador,

que acopla a MyoVa ao melanossomo, possibilitando o seu transporte em actina. Apesar de ser a via mais estudada, ainda existem questões em aberto nela, como por exemplo, a importância da fosforilação na serina 1652 na regulação dessa via, visto que existem evidências de que essa fosforilação inibe a ligação da MyoVa ao melanossomo⁸¹. Porém não se sabe se essa fosforilação estaria atuando como uma sinalização para a liberação da carga, ou se ela estaria direcionando a MyoVa para o transporte de outro carregamento, não participando dessa via.

Além da MLPH, já foram descobertas diversas outras proteínas adaptadoras da MyoVa. As proteínas MyRIP (do inglês *Myosin- and Rab-interacting protein*)⁸², Gran-a/b (Granofilina-a/b)⁸³ e Rph-3A (Rabfilina-3A)⁸³, e suas interações com a isoforma cerebral da MyoVa apresentam função no transporte de grânulos secretórios de núcleo denso para a membrana plasmática de células secretoras de hormônios e neuropeptídeos. Em células pancreáticas, o aumento das taxas de secreção de insulina eleva os níveis de cAMP (adenosina monofosfato cíclica), o que causa a fosforilação da MyRIP (membro da família ancoradora de proteínas quinase A) que é capaz de interagir com a MyoVa somente em sua forma fosforilada. Essa interação leva a fosforilação da outra proteína interactora de miosina desse sistema, a Rph-3A, e também à interação com a Gran-a/b, e juntos, esses múltiplos parceiros de interação da MyoVa formam o complexo de transporte e ancoragem de grânulos secretórios de núcleo denso em actina, e também explicam a sua regulação baseada na via cAMP-PKA⁸²⁻⁸⁴.

A DYNLL1/LC8 (do inglês: *dynein light chain LC8-type 1*) possivelmente atua como uma proteína adaptadora da MyoV para a interação com nNOS α , que é transportada para membrana da junção neuromuscular, aonde sua presença é fundamental para a neurotransmissão nitrérgica^{85,86}. A proteína DLC2 (do inglês: *dynein light chain 2*) – que é uma proteína adaptadora da MyoVa – é capaz de interagir com a Bmf (*bcl-2-modifying factor*), uma proteína sinalizadora para apoptose que seria sequestrada pelo complexo MyoVa DLC2, e então liberada como resposta à ausência de interação com a matriz extracelular, iniciando o processo de anoikose (processo de apoptose dependente da ausência de ancoragem com a matriz extracelular)⁸⁷, porém estudos mais recentes colocam em dúvida esses resultados, indicando que a função da MyoVa é promover o sequestro da DLC2, rompendo sua interação com Bmf, e assim sinalizando para anoikose⁸⁸. Evidências também indicam a importância da MyoVa em transporte de ribonucleoproteínas, visto que ela coimunoprecipita com a proteína TLS, e com complexos de mRNA TLS-positivos ou Pura positivos^{89,90}.

Existem também parceiros de interação de MyoVa cuja função celular do complexo é desconhecida. Um exemplo disso são as diversas Rabs descobertas em um experimento de duplo híbrido em levedura contra uma biblioteca com todas as Rabs humanas. Esse experimento indicou que ao menos 15 Rabs são capazes de interagir com a MyoVa, e sugere que essas interações estão todas relacionadas com a manutenção da distribuição intracelular de organelas, e com vias secretórias, porém os mecanismos dessas interações, e as suas vias exatas permanecem desconhecidos⁵⁴.

Por fim, existem funções conhecidas para a MyoVa que ainda não tiveram suas proteínas adaptadoras descobertas, como por exemplo, o transporte de *Lipid Droplets* da célula mãe para a célula filha em *Saccharomyces cerevisiae*. Resultados mostram que esse transporte é dependente de Myo2p (homóloga da MyoVa em *Saccharomyces cerevisiae*), porém ainda não foi identificada a proteína adaptadora que faz a conexão entre a miosina e essa organela⁹¹. Outro exemplo é a ancoragem mitocondrial, observada em culturas neuronais primárias de *Drosophila*. Foi observado que o silenciamento de MyoV nessas células aumentava a velocidade do deslocamento de mitocôndrias nos microtúbulos, e também o comprimento das mitocôndrias, indicando uma clara importância da MyoV para a localização celular de mitocôndrias, porém, sem a identificação da proteína parceira responsável por fazer a adaptação da MyoV com a membrana mitocondrial.

1.1.1.3 Paráloga Miosina Vc

A paróloga MyoVc foi a terceira – e última – miosina de classe V descoberta em humanos, no início do ano 2002³⁰. Diferente das outras duas parálogas, mutações ou deleções no gene MYO5C não apresentam relação direta com nenhuma síndrome ou doença conhecida, o que provavelmente explica o baixo número de publicações sobre a MyoVc desde sua descoberta. Nas primeiras tentativas de estudos mecanoquímicos de seu domínio motor não conseguiram observar atividade processiva em filamentos de actina⁹², e apenas em 2016 foi demonstrada sua capacidade processiva, dependente de feixes (ou superfilamentos) de actina⁹³, o que então permitiu estudos mecanoquímicos comparativos, e que o transporte baseado em MyoVc ocorre com a presença de pequenos grupos de MyoVc (2 a 4 dímeros por carga), com padrão de passos complexo, com diversos passos retrógrados, e troca de filamento de actina do feixe⁹⁴. Além disso, foi sugerido que a formação de feixes de actina podem atuar como um processo regulador do transporte, indicando o caminho que a MyoVc deve seguir⁹³.

Existem poucos dados robustos sobre a função celular da MyoVc. Foi observado que, em células HeLa, a expressão de um dominante negativo da MyoVc promove um acúmulo de

receptores de transferrina em pontos do citoplasma³⁰, porém, estudos em células MCF-7 mostraram não haver colocalização da MyoVc com receptores de transferrina, endossomos primários, corpos multivesiculares ou retículo endoplasmático, mas sim com grânulos secretórios⁹⁵. Em células acinares da glândula lacrimal foi observada a presença de MyoVc em vesículas secretórias maduras⁹⁶, e foi visto que, em células HpeG2 infectadas pelo vírus da dengue, a MyoVc pode estar relacionada com a liberação desse vírus⁹⁷. Recentemente, estudos feitos em melanócitos MNT-1 identificaram que a MyoVc tem papel importante na via de biogênese e secreção de melanossomos, principalmente transportando proteínas integrais de membrana para o melanossomo⁹⁸, e estudos feitos em células epiteliais polarizadas mostraram que a MyoVc é fundamental para o direcionamento do canal KCa3.1, KCNN4 (*intermediate conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel*) para a membrana basolateral (garantindo o funcionamento normal da célula)⁹⁹, provavelmente por um mecanismo semelhante ao do melanossomo.

Assim como os dados de função para a MyoVc são poucos, o conhecimento sobre as proteínas adaptadoras capazes de se ligar à MyoVc é escasso. Até o presente momento, todos os dados de interação proteína-proteína presentes, que indicam que a MyoVc é capaz de interagir com as Rab8A³⁰, Rab32, Rab38⁹⁸ e Rab10¹⁰⁰, são baseados apenas em resultados obtidos por experimentos de duplo híbrido em levedura ou em localização celular, o que apenas pode nos mostrar uma possível evidência de interação, evidenciando a necessidade de novos estudos para comprovar por técnicas ortogonais a existência de formação desses complexos.

1.1.1.4 Fosforilação da Cauda Globular

A Cauda Globular (GTD) das MyoV humanas apresenta um sítio de fosforilação, que na MyoVa se encontra no motivo ¹⁶⁴⁷RKRT(S)SpS¹⁶⁵², entre as hélices 6 e 7 podendo ser fosforilada pela proteína cinase II dependente de calmodulina e Ca²⁺ (CaMKII)⁸¹, confirmada no banco de dados *PhosphoSitePlus*¹⁰¹. As estruturas cristalográficas do GTD das três MyoVs, resolvidas por nosso grupo⁶⁴ ou por outros^{55,60,65}, não apresenta modelagem desse loop, tanto por ele ter sido removido por proteólise limitada, quanto por apresentar elevada flexibilidade conformacional. O papel dessa fosforilação ainda não é totalmente compreendido, pois existem poucos dados e relativamente discrepantes. Sabe-se que quando fosforilada, ou quando mutada para uma forma fosfo-mimética (trocando a serina por um ácido glutâmico) a MyoVa perde a capacidade de se ligar ao melanossomo⁸¹, e dados indicam uma maior presença de MyoV fosforilada nos Speckles Nucleares¹⁰². Por fim, resultados de

SAXS do nosso grupo indicam que a fosforilação reduz a flexibilidade média do MyoVa-GTD⁶⁴. Esses três resultados, em conjunto, não são suficientes para explicar a função dessa fosforilação, porém dão evidências de que ela possa regular o tipo de cargas que as MyoVs devem levar, já que a queda de flexibilidade do MyoVa-GTD indica uma mudança conformacional que poderia criar ou destruir sítios de interação proteína-proteína.

2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é aprofundar o conhecimento sobre o interactoma das Miosinas Va e Vc. Este entendimento será baseado em resultados obtidos por três objetivos principais:

- Identificação de novas proteínas adaptadoras e parceiros de interação para a MyoVa, a partir de um experimento de duplo híbrido em levedura utilizando sua Cauda Globular como isca;
- Avaliar os efeitos da fosforilação da Cauda Globular da MyoVa em sua estrutura e capacidade de interação com outras proteínas, a partir de técnicas biofísicas;
- Confirmar e aprofundar os conhecimentos de uma nova interação entre a MyoVc e uma proteína Rab, identificada em colaboração com o Prof. Fukuda.

3 Material e Método

3.1 Biologia molecular

As construções do MyoVa-GTD (resíduos 1448–1855; UNIPROT: Q9Y4I1) fosfo-mimético (S1651E/S1652E) e não-fosfo-mimético (com as mutações S1651A/S1652A para impedir a ocorrência de fosforilação) no vetor pET28a-TEV, e as construções da MyoVb-GTD (resíduos 1453–1848; UNIPROT: Q9ULV0) e MyoVc-GTD (resíduos 1319–1742; UNIPROT: Q9NQX4) vetor pNIC28-Bsa4, já estavam disponíveis no nosso laboratório e são referentes ao Projeto FAPESP 2009/14257-8, do ex-aluno Andrey F. Z. Nascimento⁶⁴. A construção pGEX-4T1-Rab3A(Q81L) foi enviada pelo Prof. Dr. Mitsunori Fukuda, da Universidade de Tohoku. Os procedimentos de biologia molecular padrões utilizados no laboratório foram extraídos de manuais dos reagentes utilizados e de *handbooks* de laboratório¹⁰³.

3.1.1 Subclonagem das construções do MyoVa-GTD no vetor de duplo-híbrido

Os plasmídeos pET28a-TEV¹⁰⁴ contendo ambos os genes, assim como o plasmídeo pGBKT7 vazio (Takara Bio – Clontech), foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *Sall* por 4h em temperatura ambiente. A digestão foi confirmada por eletroforese em gel de agarose. As bandas, tanto do plasmídeo digerido quanto dos genes, foram cortadas do gel e purificadas com o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), e os insertos foram ligados no plasmídeo pGBKT7 utilizado a enzima T4 DNA Ligase (Promega).

Para a transformação em *E. coli* DH5 α , adicionou-se todo o volume da ligação (10 μ L) à 75 μ L de células termo-competentes, que foram incubadas em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico incubando-as em um banho a 42 °C por 90 segundos e, então, em banho de gelo por 5 minutos. As células foram incubadas com 500 μ L de meio *Lysogeny broth*¹⁰⁵ (LB) a 37 °C e 200 rpm por 1 hora, plaqueadas em meio LB sólido seletivo (contendo 1,5% de Agar Bacteriológico e 50 μ g/mL de canamicina) e cultivadas em estufa a 37 °C por 16 horas.

Uma colônia da placa foi inoculada em 5 ml de meio LB seletivo (com a adição de 50 μ g/mL de canamicina) a 37 °C e 200 rpm por 16 h, para extração do DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Os clones positivos foram confirmados

por sequenciamento do DNA, utilizando-se o sistema Big Dye e o sequenciador automático ABI PRISM 377 Genetic Analyser (Applied Biosystems), seguindo as instruções de reação indicadas pelo fabricante.

3.1.2 Clonagem das construções de SMS e TC2N

Para os estudos *in vitro* da interação entre o MyoVa-GTD e as proteínas pescadas no ensaio de duplo-híbrido, foram desenhadas duas construções para a proteína SMS e três para a TC2N (tabela 1). Tais construções foram amplificadas a partir de bibliotecas de cDNA humano por reação de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando *primers* da tabela 2, e o Kit Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (ThermoFisher), seguindo condições reacionais sugeridas pelo fabricante. Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, e purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), seguindo o manual do fabricante.

Tabela 1: Construções das proteínas SMS e TC2N. As seqüências dos primers utilizados encontram-se na tabela 2.

Nome da construção	Primer Forward	Primer Reverse	pb (inicial/final)	Objetivo
SMS	SMS F	SMS R	1101 (1/1101)	Expressão da SMS <i>Full Length</i>
SMS- ΔN120	121 F	SMS R	744 (358/1101)	Expressão do domínio catalítico da SMS, sem o domínio de dimerização N-terminal ¹⁰⁶
TC2	C2.1 F	C2.2 R	819 (655/1473)	Expressão dos dois domínios C2 em tandem
C2.1	C2.1 F	C2.1 R	348 (655/1038)	Expressão do primeiro domínio C2
C2.2	C2.2 F	C2.2 R	429 (1044/1473)	Expressão do segundo domínio C2

Tabela 2: Seqüência dos primers utilizados nas reações de PCR. Os primers F foram desenhados contendo sítios de restrição *Bam*HI (GGATCC) e *Nde*I (CATATG), e os primers R foram desenhados com um sítio de restrição para a enzima *Xho*I (CTCGAG) e a seqüência TCA, para inserção de stop códon, quando necessário. Ao início de todos os primers foram adicionadas quatro adeninas, para permitir a digestão do produto de PCR.

Primer	Seqüência
SMS F	AAAAGGATCCCATATGGCAGCAGCACGGCAC
SMS R	AAAACTCGAGTCAGGGTTTAGCTTCTTCCAAACAGTG
121 F	AAAAGGATCCCATATGGACAGATACTGGCCACCG
C2.1 F	AAAACATATGGGATCCGGAGATGAAAGGGACTTCGGGAGACTG
C2.1 R	AAAACTCGAGTCATGAAGGTGGTGTATATCCAAAGAGTAATCC
C2.2 F	AAAAGGATCCCATATGTCTGTTTGCCATGCAGAACTTGAATTGG
C2.2 R	AAAACTCGAGTCAAGATGGATTTAATTTGTGCCACCTGA

Os produtos de PCR purificados, e os plasmídeos pGEX-4T-1 e pET28a foram digeridos *overnight* com os pares de enzimas *Bam*HI/*Xho*I ou *Nde*I/*Xho*I, utilizando concentrações de enzimas e tampões determinados pela *DoubleDigest Calculator* (Thermo Scientific)¹⁰⁷. Os produtos digeridos foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit

(Qiagen) ou extraídos de gel de agarose 0,8% com o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Por apresentar um sítio GGATCT algumas bases antes do sítio de *BamHI* (GGATCC), o plasmídeo pGEX-4T-1 se apresentou suscetível a uma clivagem inespecífica de *BamHI*, portanto, nesse caso, a digestão foi feita *overnight*, em tampão específico da enzima *BamHI* (Thermo Scientific) com a enzima *XhoI*, e posteriormente foi adicionada a *BamHI*, por mais duas horas.

Os produtos de PCR digeridos foram ligados nos sítios de restrição *BamHI* e *XhoI* do plasmídeo pGEX-4T-1 ou *NdeI* e *XhoI* do vetor pET28a, utilizando a enzima T4 DNA Ligase e seu respectivo tampão, seguindo as instruções do fabricante (Promega). Após a ligação, os plasmídeos foram inseridos por choque térmico em *E. coli* DH5 α termo-competentes e as bactérias transformadas foram selecionadas em meio LB-sólido contendo os antibióticos apropriados (100 μ g/mL de ampicilina para pGEX-4T-1 e 50 μ g/mL de canamicina para pET28a). Colônias de bactérias transformadas foram inoculadas em meio LB contendo antibióticos, incubadas a 37 °C, 200 rpm por 16 h, centrifugadas e submetidas a extração do DNA plasmidial utilizando o kit comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). Os clones positivos foram confirmados por sequenciamento do DNA, como descrito anteriormente.

3.2 Duplo Híbrido em Levedura (Y2H)

O Método de Duplo Híbrido em Levedura (Y2H) utilizado foi o *Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System* (Takara Bio – Clontech). Todos os protocolos apresentados foram retirados ou adaptados dos manuais fornecidos pela empresa.

3.2.1 Transformação em Levedura

Para a preparação de células competentes, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Y2H Gold® (Takara Bio – Clontech) foram plaqueadas em placa de Petri contendo 25 mL de meio YPDA sólido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose, 0,012% de hemissulfato de adenina e 2% de Agar) e colocadas em estufa a 30 °C por três dias. Uma colônia da placa foi inoculada em 50 mL de meio YPDA líquido, em Erlenmeyers chanfrados, e a cultura foi mantida a 30 °C, sob agitação de 250 rpm por 21 h. Subsequentemente, o meio foi centrifugado por 5 min, 800 g, e o sobrenadante descartado. O *pellet*, contendo as células de *S. cerevisiae*, foi ressuscitado em 50 mL de meio 2xYPDA (2% de extrato de levedura, 4% de peptona, 4% de glicose e 0,024% de hemissulfato de adenina), e novamente incubado a 30 °C, sob agitação de 250 rpm por 3 h. Em seguida, o meio foi novamente centrifugado por 5

min, 800 g, e o pellet submetido a três etapas de lavagem com água destilada autoclavada, nas quais as células foram ressuspensas, centrifugadas e o sobrenadante descartado. Após a terceira lavagem, as células foram ressuspensas em 2 mL de tampão de transformação (100 mM de Acetato de Lítio, 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 40% de PEG3350) e separadas em alíquotas de 50 µL.

A cada alíquota foi adicionado DNA plasmidial e ssDNA – DNA fita simples, que atua como carreador, internalizando o DNA plasmidial. Após 40 min de incubação a 42 °C com agitação de 600 rpm, as alíquotas foram centrifugadas a 20.000 g por 20 s, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensado em água destilada autoclavada e plaqueado em placas de Petri com meios de cultura seletivos.

3.2.1.1 Transformação simples

Foram feitas quatro transformações, de acordo com o protocolo acima, utilizando 50 µg de ssDNA e 100 ng de um dos plasmídeos descritos a seguir:

1. pGBKT7-AA: Expressa o GTD-AA, fusão com GAL4 DNA-BD
2. pGBKT7-EE: Expressa o GTD-EE, fusão com GAL4 DNA-BD
3. pGBKT7-Ø: Expressa somente a GAL4 DNA-BD
4. pGADT7-Ø: Expressa somente a GAL4 AD

Para selecionar as leveduras transformadas, foram utilizados meios de cultura SD (Synthetic Defined) (2% de glicose, 0,5% de sulfato de amônio, 0,14% de YNB (*Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids*, Sigma-Aldrich), 20 mg/L de triptofano, 20 mg/L de Histidina, 20 mg/L de Adenina e 100 mg/L de Leucina) com ausência de aminoácidos específicos para cada plasmídeo: triptofano (W) para o plasmídeo pGBKT7 (que, por conter o gene TRP1, permite o crescimento em meio SD/-W), e leucina (L) para o plasmídeo pGADT7 (que contém o gene LEU2, permitindo o crescimento em meio SD/-L).

3.2.1.2 Cotransformação

Leveduras competentes foram transformadas simultaneamente com 100 ng de cada plasmídeo e 100 µg de ssDNA e selecionadas em meio SD/-W/-L (também chamado de DDO), para a produção dos seguintes controles:

1. Controle Positivo:
 - pGBKT7-53: Expressa a proteína p53, em fusão com GAL4 DNA-BD
 - pGADT7-T: Expressa a proteína SV40 large T-antigen, em fusão com Gal4 AD

2. Controle Negativo:

pGBKT7-Lam: Expressa a proteína Laminin em fusão com GAL4 DNA-BD

pGADT7-T: Expressa a proteína SV40 large T-antigen, em fusão com Gal4 AD

3.2.2 Teste de autoativação

Para verificar se a proteína isca é, por si só, capaz de ativar os genes repórteres de interação presentes no sistema, as leveduras transformadas com os plasmídeos da isca (pGBKT7-AA e pGBKT7-EE, e pGBKT7-Ø como controle) foram plaqueadas em dois tipos de placas: uma com meio SD/-W, para se verificar a eficiência da transformação; e outra com meio SD/-W/X/A (meio SD/-W suplementado com 40 µg/mL de X-α-Gal e 200 ng/mL de aureobasidina A), para se avaliar a atividade dos genes repórteres. Em seguida, as placas foram incubadas a 30 °C por 3 dias, e então fotografadas.

Um dos genes repórteres do sistema, AUR1-C, codifica para resistência a aureobasidina A e o outro, MEL1, para a enzima α-galactosidase - que lisa o X-α-Gal, deixando a colônia azul. Caso ocorra a autoativação, os dois genes serão ativados, permitindo com que a colônia cresça e fique azul. Para fins comparativos, leveduras co-transformadas com os plasmídeos pGBKT7-53 e pGADT7-T (controle positivo) ou com pGBKT7-Lam e pGADT7-T (controle negativo) foram plaqueadas em meio DDO e DDO/X/A (meio DDO suplementado com 40 µg/mL de X-α-Gal e 200 ng/mL de aureobasidina A).

3.2.3 Screening contra a biblioteca humana universal normalizada

Uma colônia de levedura transformada com o plasmídeo pGBKT7-EE foi inoculada em 50 mL de meio SD/-W e o inóculo mantido a 30 °C, sob agitação de 250 rpm por 20 h, até alcançar uma DO_{600nm} de 0,8. O meio foi centrifugado por 5 minutos a 1000 g, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensionado em 4 mL de meio SD/-W.

Às células ressuspensionadas, foram adicionados 1 mL da biblioteca *Mate & Plate™ Library - Universal Human Normalized* (Takara Bio – Clontech) e 45 mL de meio 2xYPDA. As células foram incubadas em Erlenmeyer de 2 litros estéril, a 30 °C, sob agitação de 50 RPM por 24 h. Para se evitar contaminação, o meio foi suplementado com 50 µg/mL de canamicina. Após as 24 h, o meio foi centrifugado e as células foram ressuspensionadas em 10 mL de meio 0,5xYPDA com canamicina, e plaqueadas com bolinhas de vidro estéreis, em 55 placas de Petri de 150 mm contendo 50 ml de meio DDO/A (meio DDO suplementado com 200 ng/mL de aureobasidina A). As placas foram incubadas em estufa, a 30 °C, por cinco

dias. Subsequentemente, cada colônia presente foi repicada para uma placa com meio DDO/X/A.

Para se filtrar eventuais resultados falso-positivos presentes na placa DDO/X/A, cada colônia azul foi repicada para uma placa com meio QDO/X/A (meio SD com a ausência de Triptofano, Leucina, Histidina e Adenina, e suplementado com X- α -Gal e aureobasidina A). Esse meio, mais restritivo, seleciona apenas as interações capazes de ativar os quatro genes repórteres do sistema: AUR1-C (resistência a aureobasidina A) e MEL1 (produção de α -galactosidase), previamente testados na placa DDO/X/A, além de HIS3 (síntese de histidina) e ADE2 (síntese de adenina).

3.2.4 Identificação das proteínas pescadas

Para a identificação das proteínas pescadas, o DNA plasmidial das colônias que cresceram azuis na placa QDO/X/A foi extraído e sequenciado. O resultado do sequenciamento foi comparado com banco de dados de genes utilizando a ferramenta BLASTn¹⁰⁸.

3.2.4.1 Purificação de DNA plasmidial de levedura

A purificação de DNA plasmidial de levedura foi feita utilizando o *Easy Yeast Plasmid Isolation Kit* (Takara Bio – Clontech). Cada colônia azul da placa QDO/X/A foi inoculada em 5 mL de meio SD/-L, e incubada a 30 °C, 250 RPM por 24 h. O meio foi centrifugado por 10 min, 1000 g, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 10 mM EDTA e novamente centrifugadas por 10 min, 1000 g. As células foram ressuspensas no tampão ZYM, e incubadas com Zymolyase, por 1 h a 30 °C, para a ruptura da parede celular da levedura. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 10 min, 2000 g, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, os procedimentos de purificação foram semelhantes aos utilizados para a extração de DNA plasmidial de *E. coli*. - com a lise celular, a captura do DNA plasmidial em uma membrana de sílica por adsorção, e eluição do DNA plasmidial em água. Devido ao baixo rendimento da purificação em levedura, todos os plasmídeos foram inseridos, por choque térmico, em *E. coli* DH5 α , e purificados utilizando o kit comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen).

3.2.4.2 Sequenciamento e identificação por técnicas de bioinformática

Os plasmídeos foram sequenciados pelo método de Sanger, utilizando o sequenciador 3730xL (Applied Biosystems), o kit Big Dye e o primer T7F (TAATACGACTCACTATAGGG), em colaboração com o laboratório LaCTAD da Unicamp. Os resultados dos sequenciamentos foram submetidos a uma busca no banco de dados nr (*non-redundant*) utilizando a ferramenta BLASTn¹⁰⁸ do NCBI.

3.2.5 Validação do *screening* em experimentos “1x1”

Em experimentos de Duplo Híbrido em Levedura, o índice de falso-positivos tende a ser elevado, por isso se faz necessária uma etapa de validação do *screening*¹⁰⁹. Para isso, a transformação de leveduras com dois plasmídeos foi feita em duas etapas. Leveduras previamente transformadas com os plasmídeos pGBKT7-AA, pGBKT7-EE ou pGBKT7-Ø foram inoculadas em 50 mL de meio SD/-W líquido em Erlenmeyer chanfrados, e mantidas a 30 °C, sob agitação de 250 rpm por 24 h. O meio foi centrifugado por 5 min, 800 g e o sobrenadante descartado. O *pellet*, contendo as células, foi ressuspensionado novamente em 50 mL de meio SD/-W líquido, e mantido a 30 °C, sob agitação de 250 RPM por 21 h. Por fim, o meio foi centrifugado por 5 min, 800 g e o *pellet* ressuspensionado em 50 mL de meio 2xSD/-W. Após incubação a 30 °C, sob agitação de 250 rpm, por 3 h, as células foram transformadas com o plasmídeo pGADT7 contendo as presas, como anteriormente descrito, e selecionadas em meio DDO.

Como experimentos controle, foram feitas cotransformações de cada plasmídeo pescado com o pGBKT7-Ø, e também do plasmídeo da presa vazia (pGADT7-Ø) com os plasmídeos das iscas (pGBKT7-AA, pGBKT7-EE e pGBKT7-Ø). Para servir de controle da técnica, leveduras foram cotransformadas com os vetores do controle positivo (pGBKT7-53 e pGADT7-T) e do controle negativo (pGBKT7-Lam e pGADT7-T), semelhantemente ao realizado nos testes de autoativação. Uma colônia de cada cotransformação foi ressuspensionada em água e replicada em placa QDO/X/A. As placas foram mantidas a 30 °C e monitoradas ao longo de cinco dias.

3.2.6 Análises de bioinformática das proteínas confirmadas

A sequência de cada um dos clones validados nos experimentos “1x1” foi submetida a análises de bioinformática com o objetivo de filtrar os possíveis falso-positivos ainda presentes. Inicialmente, as sequências foram novamente analisadas pelos programas BLASTn, porém, desta vez foi observada não só a qual gene pertencia o fragmento pescado, como

também qual porção do gene foi identificada. Essa análise foi fundamental para identificar a presença de regiões 5' ou 3' UTR, que são regiões não codificantes que estão presentes no mRNA e flanqueiam a região codificante.

Nos clones que continham ORFs ou fragmentos de ORF foi analisada a composição de domínios das proteínas identificadas, utilizando a plataforma SMART^{110,111}. Com essa análise foi possível detectar proteínas de domínios únicos truncadas, que provavelmente perderam a capacidade de se enovelar corretamente, comprometendo sua estrutura terciária, e, portanto, sua função.

Em uma última análise, as proteínas identificadas foram analisadas pela plataforma *The Human Protein Atlas*^{112,113}, com o intuito de determinar suas possíveis localizações celulares. Com base nessas análises, foram considerados positivos os clones que continham ORFs ou fragmentos de ORF codificando pelo menos um domínio intacto.

3.2.7 Validações *in-vitro*

3.2.7.1 Teste de expressão das construções de SMS e TC2N

Para testes de expressão, a cepa de *E. coli* BL21(DE3) Δ SlyD, contendo o plasmídeo pRARE2, foi transformada com os clones confirmados por sequenciamento e plaqueadas em meio LB contendo os antibióticos apropriados. Células transformadas com as construções do plasmídeo pGEX-4T-1 foram cultivadas em 5 mL de meio de cultura LB suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina, 37 °C sob agitação. Ao atingir uma OD_{600nm} próxima a 0,6, a expressão do gene de interesse foi induzida com 0,5 mM de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo). Após a indução, culturas contendo as construções da SMS foram mantidas a 15 °C por 16 h, 200 rpm, e aquelas contendo as construções da TC2N foram mantidas a 25 °C por 4 h, 200 rpm. As células foram coletadas por centrifugação, e ressuspensas em tampão de lise (50 mM de HEPES, 500 mM de NaCl, 5% (v/v) de Glicerol, pH 7.4) contendo coquetel inibidor de proteases SigmaFASTTM (Sigma-Aldrich), 0,1 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich) e 50 de μ g/mL de DNase (Sigma-Aldrich).

As bactérias foram lisadas em sonicador VCX750 (Sonics), usando sonda com diâmetro de 5 mm e dois pulsos de 15 s com 30% de amplitude. Em seguida, o lisado celular foi centrifugado a 20000 g, 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi incubado com 50 μ L de resina Glutathiona Sepharose 4B (Amersham Biosciences) a 4 °C, por 2 h sob leve agitação. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 700 g por 3 min, o sobrenadante removido e a resina foi lavada três vezes com 1 mL do tampão de lise. Após as lavagens, a resina foi

incubada por 30 min com 50 μ L de tampão de eluição (tampão de lise, com a adição de 10 mM de Glutathione Reduzida). O eluído foi analisado em SDS-PAGE.

Os testes de expressão das construções da SMS no vetor pET28a foram conduzidos de maneira semelhante (utilizando-se canamicina ao invés de ampicilina), lisadas em tampão de lise, contendo coquetel inibidor de proteases SigmaFASTTM (Sigma-Aldrich), 0,1 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich), 50 μ g/mL de DNase (Sigma-Aldrich) e 15 mM de imidazol. As bactérias foram lisadas em sonicador, e centrifugadas, e então o sobrenadante foi incubado com 50 μ L de resina Ni-NTA Agarose (Qiagen), a 4 °C, por 1 h sob leve agitação. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 700 g por 3 min, o sobrenadante removido e a resina foi lavada três vezes com 1 mL do tampão de lavagem (tampão de lise + 50 mM de imidazol, e então fervida com 50 μ L do tampão de amostra de SDS-PAGE. Por fim, foi analisada, também, por SDS-PAGE.

3.2.7.2 GST pull-down

As construções SMS e SMS- Δ N120 fusionadas a His-tag foram expressas conforme protocolo do teste de expressão. As construções MyoVa-GTD-AA e MyoVa-GTD-EE fusionadas a GST (no vetor pGEX-4T-1) foram expressas de maneira semelhante às no plasmídeo pET28a.

Foram realizados três protocolos diferentes de *pull-down*, variando-se entre eles o tampão de lise (A, B) e o número e tempo das lavagens (L1, L2 e L3). Os *pellets* correspondentes a 12,5 mL das culturas que expressaram GST-MyoVa-GTD-EE, GST-MyoVa-GTD-AA ou GST foram ressuspensos em 1 mL de tampão de lise (A: 50 mM de HEPES, 250 mM de NaCl, 0,5 mM de TCEP, 0,01% Tween-20, 5% (v/v) de Glicerol, pH 7,4, coquetel inibidor de proteases SigmaFASTTM, B: 50 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5% (v/v) de Glicerol, pH 7,4, coquetel inibidor de proteases SigmaFASTTM), lisados por sonicação e centrifugados, de maneira semelhante ao teste de expressão. O sobrenadante foi incubado com 50 μ L de resina Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences) previamente equilibrada com tampão de lise (A ou B), a 4°C, por 2 h sob leve agitação. Em seguida, a resina foi lavada uma vez com 1 mL de tampão de lise (A ou B), centrifugada e o sobrenadante removido.

Os *pellets* correspondentes a 25 mL das culturas que expressaram a construção *His-tag-SMS- Δ N120*, e 50 mL das que expressaram a construção *His-tag-SMS*, foram ressuspensos em tampão de lise (A ou B), lisados por sonicação e centrifugados. Os sobrenadantes dessas amostras foram transferidos para os tubos contendo as proteínas isca,

previamente imobilizadas na resina Glutathiona Sepharose 4B, e incubados a 4°C, por 2 h sob leve agitação. Após esse tempo, as resinas foram lavadas segundo os protocolos de lavagem L1, L2 e L3. Em L1, as resinas foram incubadas durante 10 min, com 1 mL de tampão A, sob agitação leve. Esse procedimento foi repetido três vezes. Em L2, as resinas foram lavadas seis vezes como descrito em L1. Em L3, 1 mL do tampão B foi adicionado à resina, homogeneizado e centrifugado para a remoção do sobrenadante por 4 vezes. Em todos os casos, após as lavagens, as resinas foram centrifugadas (700 g, 3 min) para remoção do sobrenadante e incubadas com 50 µL do tampão de eluição (tampão de lise A ou B contendo 10 mM de glutathiona reduzida) por 30 min. A amostra eluída foi coletada e misturada com o tampão de amostra de SDS-PAGE, fervida e então aplicada no gel, para posterior análise por *western blotting*.

As proteínas presentes nos géis foram transferidas em membrana de PVDF (*fluoreto de polivinilideno*) Hybond™-P (GE Healthcare) por sistema semi-seco (Biorad), utilizando papel de filtro 3 mm (Whatman) umedecido em solução de transferência (16,2 mM Tricina, 47,9 mM Tris, 1,3 mM SDS, 20% (v/v) metanol). Após a transferência (160 mA, 2 h), as membranas foram incubadas em solução de bloqueio, com 5% leite desnatado em pó diluído em tampão TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6), a 4 °C por 2 h sob leve agitação. Cada membrana foi então lavada três vezes com 50 mL de TBS por 10 min, e então incubadas com 5 mL do anticorpo anti-GST produzido em camundongo através de hibridoma¹¹⁴, ou 5 mL do anticorpo anti-His (4 µg/mL) também produzido em camundongo (GE Healthcare), a 4 °C por 16 h sob agitação leve. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com TBS por 10 min, e incubadas com 5 mL do anticorpo secundário, 0,2 µg/mL anti-camundongo produzido em cabra e conjugado com peroxidase (Calbiochem, 401253), a 4 °C por 2 h sob agitação leve. Por fim, a membrana foi novamente lavada com TBS e incubada com reagente luminol ImmunoCruz™ (Santa Cruz Biotechnology) por 1 min à temperatura ambiente. Subsequentemente, um filme quimioluminescente (GE Healthcare) foi exposto à membrana por 15 min, e depois revelado em solução reveladora de autoradiografia GBX (Carestream) e banho em solução fixadora de autoradiografia GBX (Carestream)¹⁰³.

3.3 Biologia Celular

Os experimentos de biologia celular foram realizados no laboratório da Prof. Dr. Enilza M. Espreafico, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, com o auxílio do Dr. Rui Milton Patrício da Silva Júnior.

3.3.1 Cultura de células de mamíferos

Células humanas de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e neuroblastoma (SH-SY5Y) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (GIBCO), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 100 mg/mL de estreptomicina, em garrafas e placas com tratamento para cultura de células (Sarstedt), incubadas em estufa de atmosfera úmida, com 5% de CO₂, a 37 °C.

3.3.2 Silenciamento gênico

O Silenciamento dos genes *MYO5A*, *MYO5C* e *RAB3A* foram feitos utilizando a técnica de *small interfering RNA* (siRNA). Os siRNA foram comprados da empresa Invitrogen, de acordo com as sequências da Tabela 3, e como controle foi utilizado o siRNA de sequência aleatória Stealth RNAi™ siRNA Negative Control High GC Duplex (Invitrogen). Células MCF-7 foram transfectadas utilizando o reagente DharmaFECT 1 Transfection Reagent (GE Lifesciences), seguindo o protocolo de transfecção reversa disponibilizado pelo fabricante.

Tabela 3: Sequência dos siRNA utilizados para os silenciamentos.

Nome do siRNA	Sequência F	Sequência R
MYO5A 1	5'-CCAGGCCCGAUGCUAUGCUAAGUUU-3'	5'-AAACUUAGCAUAGCAUCGGGCCUGG-3'
MYO5A 2	5'-CCUUAUGAUGAAAAGGCUGAGAUUAU-3'	5'-AUAUCUCAGCCUUUCAUCAUUAAGG-3'
MYO5A 3	5'-GAAAUAGCACAAGCAUACAUUGGUU-3'	5'-AACCAAUGUAUGCUUGUGCUAUUUC-3'
MYO5C 1	5'-GGGAGUGCCGAAGAAUUUAAUUUAUA-3'	5'-UAUAAUAAAUUCUUCGGCACUCCC-3'
MYO5C 2	5'-GAGAACAUGAUGAUCCAGACUUUA-3'	5'-UAAAGUCUGGGAUCAUCAUGUUCUC-3'
MYO5C 3	5'-CAGAGCAGGACAAGUGGCUUAUUUA-3'	5'-UAAAUAAGCCACUUGUCCUGCUCUG-3'
RAB3A 1	5'-GCAACGACAAGAGGAUCAAGCUGCA-3'	5'-UGCAGCUUGAUCCUCUUGUCGUUGC-3'
RAB3A 2	5'-GAGAAGAUGUCCGAGUCGUUGGACA-3'	5'-UGUCCAACGACUCGGACAUCUUCUC-3'
RAB3A 3	5'-GCGCUAUGGGCUUCAUCCUCAUGUA-3'	5'-UACAUGAGGAUGAAGCCCAUAGCGC-3'

Os 3 siRNA foram misturados para a formação de um *pool* de siRNA e então o reagente de transfecção foi complexado com o *pool* em meio de cultura sem soro e sem antibiótico, e depositado nos poços de uma placa de 24 poços com lamínulas de vidro, para uma concentração de 25 nM do pool de siRNA, e um volume final de 1 µL do reagente de transfecção, em 100 µL totais de meio. Posteriormente, células MCF-7 foram tripsinizadas e ressuspensas em meio completo, sem antibiótico, para uma contagem de 1×10^4 células/mL,

e então 1 mL foi depositado no poço contendo o meio de transfecção. Após 16 h o meio foi trocado pelo meio completo com antibiótico, e as células foram cultivadas por 4 dias.

3.3.2.1 qRT-PCR

Para avaliar a eficiência de silenciamento, o Dr. Rui Milton Patrício da Silva Júnior extraiu o RNA total das células de acordo com protocolo padrão do reagente TRIzol (Invitrogen). O RNA extraído foi transcrito para cDNA usando o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante, seguido de amplificação no ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com os primers da Tabela 4. Todas as reações foram feitas em triplicata. A expressão de um controle endógeno (GAPDH) foi utilizada para a normalização do *input* de RNA.

Tabela 4: Sequência de primers utilizados na reação de qRT-PCR para a quantificação dos mRNAs da MyoVa, TC2N e SMS.

Nome do Primer	Sequência
MYO5A F	CGGAAAGACCTGGAGCAAACCTC
MYO5A R	TGCTGCACGATGCGGTGATTGA
MYO5C F	TACAGCCGAGGATTCCTGGCAA
MYO5C R	GCACGAATCGTCGGATACTCTG
RAB3A F	CGCTATGCTGACGACTCGTTCA
RAB3A R	GGTAGTATGCGGTGGTGATGGT
TC2N F	CCGTTTCAGAAGTGACGAGACTG
TC2N R	ATGTCTCTGGATGAATCGCTGAG
SMS F	AGGAGATCGTCTGTGTCCCTTC
SMS R	GGAGGTCAGGAAGGCTATTTGC
CD63 F	CAACCACACTGCTTCGATCCTG
CD63 R	GACTCGGTTCTTCGACATGGAAG

Os níveis de expressão gênica foram calculados por quantificação relativa, usando o programa ABI 7500 Real-Time PCR SDS 1.2 (Applied Biosystems) e as variações de expressão foram determinadas utilizando o método¹¹⁵ $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.3.3 Imunocitoquímica

As células cultivadas em lamínulas de vidro foram fixadas com uma solução 2% (v/v) de paraformaldeído pH 7.4 por 20 minutos e permeabilizadas com 0.3% (v/v) Triton X-100 por 10 minutos. Os aldeídos livres foram bloqueados com solução de glicina 100 mM, e os sítios inespecíficos foram bloqueados com uma solução de BSA 3% (m/v) (adaptado de Assis, L. H. P. et al.⁶³). As células fixadas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com os

seguintes anticorpos: *rabbit* anti-TC2N (HPA027549-SIGMA) em diluição 1:100; *rabbit* anti-SMS (HPA029852-SIGMA) em diluição 1:100; *rat polyclonal affinity-purified anti-MyosinVa_Medial_Tail* em diluição 1:50; *rabbit* anti-Rab3A (HPA003160-SIGMA) em diluição 1:200; *goat* anti-MyoVc (sc-160556 Santa Cruz Biotechnology) em diluição 1:100; e *mouse* anti-CD63 em diluição 1:400. Os anticorpos secundários utilizados foram: Alexa Fluor® *anti-rat* 488 (Abcam ab150157); Alexa Fluor® *anti-rabbit* 594 (Molecular Probes A21207); Alexa Fluor® *anti-goat* 594 (Abcam ab150132); Alexa Fluor® *anti-mouse* 488 (Abcam ab150105); Alexa Fluor® *anti-rabbit* 647 (Abcam ab150075), todos em diluição de 1:400. As lamínulas foram montadas em meio *ProLong® Diamond Antifade Mountant medium with DAPI* (Thermofisher P36962), e as imagens foram coletadas nos microscópios confocais invertidos Zeiss LSM780 AxioObserver Multifotons e True Confocal Scanning SP8 (Leica), ambos com a objetiva de 63x. Todas as imagens foram analisadas e processadas no programa *open source* Icy BioImage do Instituto Pasteur (<http://icy.bioimageanalysis.org/>).

3.3.4 GST pull-down contra biblioteca de Rabs

O experimento de GST *Pull-Down* foi realizado sob a forma de colaboração, pelo Dr. Norihiko Ohbayashi e pelo Prof. Dr. Mitsunori Fukuda, do *Laboratory of Membrane Trafficking Mechanisms*, da Universidade de Tohoku. Resumidamente, células COS-7 (10^6 células/placa) foram transfectadas com o plasmídeo pEF-FLAG-MyoVc-tail (resíduos: 1054-1742) usando Lipofectamine-LTX Plus (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Decorridas 36 horas de transfecção, as células foram coletadas e lisadas em tampão de lise (50 mM HEPES-KOH, pH7.2, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, e *complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* (Roche)). *Glutathione-Sepharose beads* (10 µl; GE Healthcare) fusionadas às GST-Rabs da biblioteca, tratadas com o tampão de lise contendo 0.5 mM GTPγS e 2.5 mM EDTA, e depois com 10 mM MgCl₂, foram incubadas com o lisado celular por 2 horas, 4 °C. As *beads* foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (50 mM HEPES-KOH, pH7.2, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, and 0.2% Triton X-100) e analisadas por SDS-PAGE seguido de *wester blotting*, usando os anticorpos HRP-conjugados *anti-FLAG tag antibody* (A8592 Sigma) diluição 1:10000 e *anti-GST antibody* (GERPN1236 Santa Cruz) diluição 1:5000.

3.4 Expressão e Purificação de Proteínas

3.4.1 MyoVa-GTD-EE

3.4.1.1 Expressão

Células *E. coli* BL21(DE3) Δ SlyD contendo o plasmídeo pRARE2 foram transformadas por choque térmico, adicionando-se 700 ng do plasmídeo pET28a-TEV-MyoVa-GTD-EE à 75 μ L de células termo-competentes e utilizando o procedimento já descrito, suplementando o meio LB sólido seletivo (50 μ g/mL de canamicina) com 34 μ g/mL de cloranfenicol.

Para a pré-cultura, uma colônia foi inoculada em 100 mL de meio LB seletivo (contendo 50 μ g/mL de canamicina e 34 μ g/mL de cloranfenicol) e incubada a 37 °C e 200 rpm por 20 h. Quatro erlenmeyers de 2 L contendo 500 ml de meio LB seletivo (contendo 50 μ g/ml canamicina), foram inoculados com 25 ml da pré-cultura cada e incubados a 37 °C e 200 rpm até a DO_{600nm} dos mesmos atingirem valores entre 0,4-0,5. Nesse momento, a expressão do gene de interesse foi induzida com 0,1 mM de IPTG. Após 4 horas de incubação a 25 °C e agitação de 175 rpm, as células foram centrifugadas a 6000 g e o *pellet* foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80 °C.

3.4.1.2 Purificação

Foram utilizados dois protocolos de purificação do MyoVa-GTD-EE, sendo que o segundo, mais refinado, foi utilizado apenas para a produção de amostra para ensaios de cristalização.

3.4.1.2.1 Primeiro Protocolo

A purificação do MyoVa-GTD-EE teve início com a dissolução do *pellet* referente a 4 litros de cultura em 40 ml de tampão de lise (50 mM de HEPES, 500 mM de NaCl, 30 mM de Imidazol, 5% (v/v) de Glicerol, pH 7,4) contendo coquetel inibidor de proteases SigmaFAST™ (Sigma-Aldrich), 0,1 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich) e 50 μ g/mL de DNase (Sigma-Aldrich). Após incubação em agitador orbital a 4 °C por 30 minutos, as células foram sonicadas com pulsos de 5 segundos entre intervalos de 15 segundos, com 40% de amplitude durante 30 minutos. O lisado então foi centrifugado a 40000 g por 1 hora a 4 °C.

O MyoVa-GTD-EE contendo a cauda de poli-histidina foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de níquel imobilizado (Hi-Trap Chelating HP 5 mL; GE Healthcare), no sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare). A fração solúvel foi aplicada na

coluna previamente equilibrada com tampão A (50 mM de Hepes, 500 mM de NaCl, 20 mM de Imidazol, 5% (v/v) de Glicerol, pH 7,4). Em seguida, a coluna foi lavada com 5 volumes de coluna do tampão A para remoção de qualquer contaminante. A eluição foi feita em um gradiente crescente da concentração do tampão B (50 mM de Hepes, 500 mM de NaCl, 500 mM de Imidazol, 5% (v/v) de Glicerol, pH 7,4), de 0 até 50% ao longo de 10 volumes de coluna. As frações coletadas foram analisadas por absorvância a 280 nm e SDS-PAGE, e as de interesse foram unidas e concentradas para 1 mL por centrifugação utilizando o concentrador Amicon Ultra (Millipore) com corte de 10.000 MWCO.

A amostra concentrada foi centrifugada a 20000 g por 10 minutos e aplicada em uma coluna Superdex 200 16/600 (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão GF (50 mM de Hepes, 200 mM de NaCl, 5% (v/v) de Glicerol, pH7,4) com fluxo de 0,5 mL/min. As frações obtidas foram analisadas por absorvância 280 nm e SDS-PAGE, e as de interesse foram unidas e concentradas.

3.4.1.2.2 Segundo Protocolo

O segundo protocolo de purificação do MyoVa-GTD-EE seguiu as mesmas etapas do primeiro para a lise bacteriana e para a cromatografia de afinidade. Porém, ao final da cromatografia de afinidade, foi adicionado mais um critério de seleção das frações a serem utilizadas na etapa subsequente. Antes de serem agrupadas, as frações contendo a proteína pura (segundo os critérios de absorção a 280 nm e SDS-PAGE) foram analisadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e somente aquelas com polidispersão inferior a 20% foram agrupadas e submetidas à próxima etapa.

Para reduzir as potenciais contribuições entrópicas da cauda 6xHis no empacotamento cristalino, aumentando, assim, as chances de cristalização da proteína, foi feita a clivagem da cauda utilizando a TEV protease. Para isso, as frações agrupadas pelo novo critério foram dialisadas na razão de 1:100 (1 volume de solução a ser dialisada para 100 volumes de tampão) de tampão TIA (50 mM de Hepes, 50 mM de NaCl, 5% (v/v) de Glicerol, pH 7,3), contendo a enzima TEV protease na razão de 10 µg de enzima para 1 mg de MyoVa-GTD-EE. A dialise foi feita em membrana com valor de corte de 10.000 MWCO (Spectra/Por®), por 16 horas, a 4 °C.

Com base no ponto isoelétrico (pI) do MyoVa-GTD-EE (pI=7,8), determinado pelo programa PROTPARAM¹¹⁶, optou-se pela realização de uma troca catiônica em pH 7,3. Para tanto, a amostra dialisada foi aplicada na coluna HiTrap SP FF (GE Healthcare), previamente equilibrada com o tampão TIA, utilizando-se um fluxo de 3 mL/min no sistema ÄKTA FPLC

(GE Healthcare). Após lavagem com 5 volumes de coluna de tampão TIA, a proteína foi eluída em um gradiente crescente da concentração do tampão TIB (50 mM de Hepes, 2 M de NaCl, 5% (v/v) de Glicerol, pH 7,3), de 0 a 50% em 20 volumes de coluna. Assim como na cromatografia de afinidade, frações coletadas durante a cromatografia de troca iônica foram analisadas por DLS.

Por fim, as amostras mais homogêneas da troca iônica foram concentradas, e aplicadas em uma cromatografia de exclusão molecular, conforme o protocolo anterior. As frações obtidas foram novamente analisadas por DLS e apenas aquelas com polidispersão inferior a 11% foram unidas e concentradas para os ensaios de cristalização.

3.4.2 MyoVa-GTD-AA

A construção do MyoVa-GTD-AA (mutante S1651A/S1652A) em vetor pET28a-TEV foi expressa e purificada seguindo o protocolo de expressão e o primeiro protocolo de purificação do MyoVa-GTD-EE.

3.4.3 MyoVa-GTD-wt

A construção do MyoVa-GTD-*wt* em vetor pET28a-TEV foi expressa e purificada seguindo o protocolo de expressão e o primeiro protocolo de purificação do MyoVa-GTD-EE.

3.4.4 MyoVb-GTD

A construção do MyoVb-GTD em vetor pNIC28-Bsa4 foi expressa e purificada seguindo o protocolo de expressão e o primeiro protocolo de purificação do MyoVa-GTD-EE.

3.4.5 SMS

A construção completa da proteína SMS foi expressa em *E. coli* BL21(DE3) Δ SlyD contendo o plasmídeo pRARE2. A indução foi feita em D.O.₆₀₀ de 1,2 com 0,5 mM de IPTG, por 16h, 20°C. A purificação foi feita seguindo o primeiro protocolo utilizado para a purificação do MyoVa-GTD-EE.

3.4.6 MyoVc-GTD

A construção MyoVc-GTD em vetor pNIC28-Bsa4 foi expressa em *E. coli* BL21(DE3) Δ SlyD contendo o plasmídeo pRARE2. A indução foi feita em D.O.₆₀₀ de 1,2 com 0,5 mM de IPTG, por 16h, 20°C. A purificação foi feita seguindo o primeiro protocolo

utilizado para a purificação do MyoVa-GTD-EE, porém, utilizando o tampão F (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5% de glicerol, 1 mM de MgCl₂, 0,5 mM de TCEP, pH 7.5) na etapa de cromatografia de exclusão molecular.

3.4.7 Rab3A

A construção pGEX-4T1-Rab3A(Q81L), com a mutação constitutivamente ativa, foi expressa em *E. coli* BL21(DE3) Δ SlyD contendo o plasmídeo pRARE2. A indução foi feita em D.O.₆₀₀ de 1,2 com 0,5 mM de IPTG, por 16h, 20°C. Sua purificação foi padronizada pela bolsista de verão Ana Carolina Schwarzer, e pelo estagiário Daniel Fernando C. Silva. A purificação teve início com a dissolução do *pellet* referente a 3 litros de cultura em 40 ml de tampão de lise (50 mM de Hepes, 500 mM de NaCl, 5% (v/v) de Glicerol, 1 mM de MgCl₂, 0,5 mM de TCEP, pH 7.5) contendo coquetel inibidor de proteases SigmaFAST™ (Sigma-Aldrich), 0,1 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich) e 50 μ g/mL de DNase (Sigma-Aldrich). Após incubação em agitador orbital a 4 °C por 30 minutos, as células foram sonicadas com pulsos de 5 segundos entre intervalos de 15 segundos, com 40% de amplitude durante 30 minutos. O lisado então foi centrifugado a 40000 g por 1 hora a 4 °C.

A Rab3A, fusionada à cauda de GST foi purificada por cromatografia de afinidade em duas colunas *Glutathione Sepharose* (GSTrap FF 5 mL cada, dando um volume de coluna final de 10 ml; GE Healthcare), no sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare). A fração solúvel foi aplicada na coluna previamente equilibrada com tampão A (50 mM de Hepes, 500 mM de NaCl, 5% (v/v) de Glicerol, 1 mM de MgCl₂, 0,5 mM de TCEP, pH 7.5). Em seguida, a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna do tampão A para remoção de qualquer contaminante.

Após a lavagem, a amostra foi tratada por 30 minutos com tampão A com a adição de 1 mM de GTP e 2,5 mM de EDTA, para garantir a presença de GTP em todas as proteínas, e então foi lavada com 2 volumes de coluna do tampão A com a adição de 10mM de MgCl₂. Por fim, a proteína GST-Rab foi incubada com 0,03 mg/mL de trombina, por 16h, 4°C. Após o período de incubação, a eluição da Rab3A sem a cauda de GST foi feita pela simples passagem de tampão A pela coluna, e depois a GST foi removida da coluna com 5 volumes de coluna do tampão B (50 mM de Hepes, 500 mM de NaCl, 5% (v/v) de Glicerol, 1 mM de MgCl₂, 0,5 mM de TCEP, 10 mM de glutathiona reduzida pH 7.5). As frações coletadas foram analisadas por absorbância a 280 nm e SDS-PAGE, e as de interesse foram unidas e

concentradas para 1 mL por centrifugação utilizando o concentrador Amicon Ultra (Millipore) com corte de 10.000 MWCO.

A amostra concentrada foi centrifugada a 20000 g por 10 minutos e aplicada em uma coluna Superdex 75 16/600 (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão F (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5% de glicerol, 1 mM de MgCl₂, 0,5 mM de TCEP, pH 7.5) com fluxo de 0,5 mL/min. As frações obtidas foram analisadas por absorvância 280 nm e SDS-PAGE, e as de interesse foram unidas e concentradas.

3.5 Ensaios de Cristalização

Os ensaios de cristalização foram realizados utilizando a técnica de difusão de vapor em gota sentada. Gotas com volumes finais que variaram de 1 µL à 2 µL, foram equilibradas contra poços contendo 80 µL da solução de cristalização, pipetadas pelo sistema *HoneyBee 963* (Digilab Global) em placas de 96 poços. As placas foram mantidas em duas salas de temperatura constante, de 18 e 4 °C, e fotografadas automaticamente pelo sistema *Rock Imager 1000* (Formulatrix), que utiliza uma rotina de visualização baseada na sequência de Fibonacci, ao longo de 55 dias.

3.5.1 Kits Iniciais

Como procedimento padrão do laboratório, os primeiros ensaios de cristalização foram feitos utilizando-se formulações comerciais: *Crystal Screen 1*, *Crystal Screen 2* e *SaltRx* da Hampton Research, *Wizard Screens I e II*, e *Precipitant Synergy* da Emerald, *PACT* e *JCSG* da Qiagen, totalizando 544 condições que apresentam variações de tampão, concentração de sal, pH e precipitantes, baseadas tanto em técnicas de varredura por matriz esparsa como sistemáticas.

3.5.2 Refinamento

O refinamento das condições de cristalização foi feito variando pH, concentração de sal, tampão e precipitante, em torno das condições dos kits iniciais que apresentaram resultados promissores. Os refinamentos foram montados pelo sistema *Matrix Maker* (Emerald Biosystems) em blocos de 96 poços.

Kits de refinamento baseados em aditivos, como *Additive Screen HT* e o *Silver Bullets*, ambos da Hampton Research, também foram utilizados, de acordo com as instruções do fabricante.

3.5.3 Microseeding

A técnica de *microseeding* consiste em facilitar o processo de cristalização inserindo “sementes” (nanocristais resultantes da maceração de cristais) na gota de cristalização. Dessa forma, é possível se obter cristais sem a necessidade de ocorrer a nucleação, ou seja, tanto em condições supersaturadas que estejam na zona lábil (onde cristais crescem e núcleos se formam) quanto na zona metaestável (onde cristais crescem, mas núcleos não se formam). A técnica foi executada de acordo com as instruções do *Seed Bead kit* (Hampton Research), e a partir do estoque de sementes obtido feitas diluições de 1:10, 1:50 e 1:100 (volume do estoque: volume da solução do poço).

3.5.3.1 Kits iniciais com *microseeding*

A Diluição 1:50 do estoque de sementes foi adicionada às gotas de cristalização dos kits iniciais nas proporções 1:0,7:0,3 (1 μL de proteína, 0,7 μL de solução cristalizante e 0,3 μL de semente), variando-se também a concentração de proteína utilizada (6 mg/ml, 13 mg/ml e 18 mg/ml).

3.5.3.2 Refinamentos com *microseeding*

Os refinamentos foram feitos varrendo sistematicamente as condições mais promissoras dos kits iniciais, sempre adicionando sementes na mesma proporção (1:0,7:0,3), e variando-se o pH, a concentração de sais e precipitantes, assim como a composição de polímeros (PEGs) e tampões, além de ser feitos testes de simplificação da condição, diminuindo progressivamente a concentração de cada componente individual da solução de cristalização, para determinar sua importância.

3.5.4 Teste de difração de raios X

Os dados de difração foram coletados na linha de luz W01B-MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e na linha BL13-XALOC do Síncrotron ALBA, em Barcelona. O cristal foi resfriado em fluxo de gás nitrogênio a $-173\text{ }^{\circ}\text{C}$, sem a necessidade de

solução crioprotetora. O comprimento de onda utilizado foi de 1,458 Å, a distância do cristal ao detector foi de 250 mm e o tempo de exposição foi de 10 segundos. Os dados da difração de raios X foram adquiridos pelo detector Pilatus 2M (Dectris) na MX2 e pelo detector Pilatus 6M (Dectris) na XALOC.

3.6 Caracterizações Biofísicas

3.6.1 Espectrometria de massas

3.6.1.1 Crosslinking químico

3.6.1.1.1 MyoVa-GTD

A reação de *crosslinking* foi realizada tanto com o MyoVa-GTD-EE quando com o MyoVa-GTD-AA, em uma reação contendo 14 µM de proteína e 1,25 mM do *crosslinker* DSS (disuccinimidyl suberate), da Sigma-Aldrich, que foi mantida em temperatura ambiente por 1 hora, e então analisada em SDS-PAGE.

As bandas proteicas identificadas com a presença de *crosslinks* foram recortadas do gel com um bisturi. Cada uma das bandas identificadas foi reduzida, alquilada e digerida com tripsina, de acordo com protocolo¹¹⁷ modificado pelo laboratório de espectrometria de massas do LNBio. Após digestão, as amostras foram secas em um concentrador de vácuo e ressuspendidas em 30 µL de ácido fórmico 0,1% em água.

As amostras foram analisadas no laboratório de Espectrometria de Massas do LNBio em colaboração com a pesquisadora Prof. Dra. Adriana Franco Paes Leme e Dra. Bianca Alves Pauletti, de acordo com protocolos já estabelecidos de análise e validação de *crosslinks*^{118,119}.

3.6.1.1.2 MyoVc-GTD e Rab3A

Os experimentos de *crosslinking* químico do complexo Rab3A•MyoVc-GTD foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo, pelo aluno Renan A. S. Pirolla, no *Dalton Mass Spectrometry Group*, do Instituto de Química da Unicamp. Resumidamente, a reação de *crosslinking* foi feita com ambas as proteínas a uma concentração de 30 µM, com a adição de 3 mM do *crosslinker* DSS, em um volume de 1 mL no tampão MOPS pH 6.5. Após um tempo de incubação de 2 horas, à temperatura ambiente, as proteínas foram desnaturadas pela adição de 6M de guanidina-HCl. Foi adicionado DTT para a redução de ligações dissulfeto, por 30 minutos, 60°C, e foi fim foi feita a alquilação com iodoacetamina, por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Para digestão com tripsina, foi feita troca do tampão para bicarbonato de amônio 100 mM pH 8.0, utilizando cartucho centricon 10 kDa. Uma alíquota de 100 µg do complexo foi retirada e diluída até 600 µL com tampão bicarbonato de amônio 100 mM. Adicionou-se 2 µg de tripsina, que foi mantida a 37 °C por 16 horas. Após a digestão, as amostras foram purificadas em cartucho Oasis HLB (Waters) lavadas com 5 mL de água ultrapura e eluídas com 1 mL de solução H₂O/ACN 50%. Foram concentradas em SpeedVac até volume de 100 µL e injetadas em nanoLC acoplado em um espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Lumos (ThermoScientific).

3.6.1.2 Troca de Hidrogênio por Deutério (HDX)

Os experimentos de troca de hidrogênio por deutério (do inglês: *hydrogen deuterium exchange*, HDX) foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo, pelo aluno Renan A. S. Pirolla, com auxílio da Dr. Mariana Fioramonte no *Dalton Mass Spectrometry Group*, do Instituto de Química da Unicamp. Resumidamente, as amostras MyoVc-GTD, Rab3A e complexo Rab3A•MyoVc-GTD, em tampão F, após a purificação por cromatografia de exclusão molecular, foram diluídas no tampão de troca deuterante (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5% de glicerol, 1 mM de MgCl₂, 0,5 mM de TCEP, pD 7.5, em D₂O). Após os tempos de reação, troca foi parada com tampão quench (0,8 M Guanidina-HCl, 0,8% ácido fórmico, 20 mM de DTT, pH 2.4) a 0°C, com volume igual ao da reação de troca H/D. A cinética da troca foi realizada em triplicata nos tempos 0s, 10s, 1 min, 10 min, 30 min, 1 h e 2 h.

As amostras – 600 pmol de MyoVc-GTD e 600 pmol de complexo Rab3A•MyoVc-GTD – foram injetadas em um sistema nanoAcquity UPLC com tecnologia HDX acoplado a um Synapt G1 HDMS (Waters Corporation, USA) empregando ionização por electrospray e correção por lock-mass (com ácido fosfórico). A digestão online foi realizada utilizando uma coluna de pepsina imobilizada (2x30 mm, Applied Biosystem, USA) por 3 minutos a 15 °C com vazão de 40 µL/min. Os peptídeos gerados foram dessalinizados online em uma pré-coluna (ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 µm VanGuard, Waters) a 0 °C e separados por uma coluna analítica (ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 µm, 1x100 mm, Waters) a 0°C com gradiente linear de acetonitrila (10 a 40%) contendo ácido fórmico (0,1%) em vazão de 40 µL/min. A detecção dos peptídeos foi realizada em modo MSE na faixa m/z 50 – 2000 e as corridas foram processadas nos softwares Protein Lynx Global Server e DynamX (ambos Waters Corporation, USA).

3.6.2 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

Para determinar o perfil de desnaturação térmica dos mutantes MyoVa-GTD-AA e MyoVa-GTD-EE e também determinar suas respectivas T_m s, foi realizado o experimento de DSC em um calorímetro VP-DSC (MicroCal), adicionando 800 μ L de uma solução de proteína 50 μ M, em tampão 20 mM de HEPES, 200 mM de NaCl e 5% (v/v) de Glicerol, pH 7,4, na célula de amostra, e iniciando uma rampa de temperatura de 0,5 $^{\circ}$ C/min no intervalo de 25 a 90 $^{\circ}$ C. As T_m s e a entalpia dos processos de desnaturação (ΔH) foram calculadas pelo programa Origin 8.1 (OriginLab), utilizando o *plug-in* de análise do calorímetro, por processos iterativos de ajuste gaussiano. Como controle, foi feita uma curva utilizando apenas o tampão, a qual foi subtraída da curva medida para cada amostra.

3.6.3 Dicroísmo circular (CD)

Os experimentos de CD foram realizados com o MyoVa-GTD-EE e o MyoVa-GTD-AA, com e sem a presença do peptídeo Mlph-GTBDP (Genscript), no espectropolarímetro Jasco J-810 (JASCO) equipado com um módulo Peltier para o controle da temperatura. Todas as amostras foram centrifugadas por 10 min a 20000 g antes de serem transferidas para a cubeta de quartzo de 1 mm. Os dados foram adquiridos com as proteínas na concentração de 2,5 μ M, em tampão H (1 mM de HEPES, 10 mM de NaCl e 0,25% (v/v) de Glicerol, pH 7,4) e o peptídeo, quando presente, na concentração de 10 μ M. Os espectros foram coletados entre 195 e 260 nm utilizando uma varredura de 100 nm/min e 20 acumulações.

A desnaturação térmica foi lida em 222 nm, com uma temperatura inicial de 20 $^{\circ}$ C e final de 80 $^{\circ}$ C, com uma rampa de 1 $^{\circ}$ C/min, e uma leitura por $^{\circ}$ C, com um tempo de 30 s para estabilização. A T_m foi calculada a partir do ajuste de um modelo de Boltzman aos dados experimentais utilizando o programa Origin 8.1 (OriginLab).

3.6.4 Termoforese em microescala (MST)

3.6.4.1 MyoVa-GTD com Melanofilina

Para se investigar se a mutação fosfomimética afeta a afinidade do MyoVa-GTD pela melanofilina – proteína adaptadora envolvida no transporte de melanosomos⁵⁹ – foram realizados ensaios de MST utilizando os mutantes MyoVa-GTD-AA e MyoVa-GTD-EE em presença da região mínima da melanofilina (Mlph-GTBDP) necessária para a interação com o MyoVa-GTD^{57,59,65,102}.

Para a marcação dos mutantes com o isotiocianato de fluoresceína (FITC), que se liga covalentemente a grupos amina, 500 μ L de MyoVa-GTD-AA e MyoVa-GTD-EE a 50 μ M foram incubados com 150 μ M FITC por 16 h, 4 °C, sob leve agitação. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 20000 g, 4 °C por 15 min e a fração solúvel foi purificada em resina HiTrap Desalting 5 ml (GE) no tampão de interação (20 mM de Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, 2,5 mM de MgCl₂, 1 mM de TCEP)⁵⁵. Após a purificação, as proteínas marcadas foram analisadas em espectrofotômetro UV-visível nos comprimentos de onda de 280 e 495 nm (bandas de absorção da proteína e do FITC, respectivamente). Para os ensaios de MST foi escolhida a fração purificada cuja razão de absorbâncias 280/495 era aproximadamente 0,5.

Os ensaios de MST foram conduzidos usando-se 300 nM das proteínas marcadas e diluição seriada do Mlph-GTBDP na presença de 0,05% (v/v) de tween-20. Os ensaios foram realizados em triplicata em instrumento MonolithTM NT.115 series (NanoTemper Technologies), usando-se capilares MonolithTM NT.115 MST Premium Coated (NanoTemper Technologies), temperatura de 20 °C, LED com intensidade de 20 e 30%, e MST com amplitudes de 20, 30, 40 e 60%. Os resultados foram analisados no software Affinity Analysis (NanoTemper Technologies).

Uma segunda rodada de experimento foi feita, usando a sonda Alexa Maleimide 647 (Thermo Fisher Scientific), que se liga a resíduos de cisteína. A marcação foi feita utilizando as mesmas concentrações de proteína e sonda, porém a leitura em espectrofotômetro UV-visível foi feita com os comprimentos de onda 280 nm (proteína) e 647 nm (sonda). Os ensaios de MST foram conduzidos no mesmo equipamento, com as mesmas configurações.

3.6.4.2 MyoVa-GTD com SMS

Para confirmar, *in-vitro* a interação entre a proteína SMS e MyoVa-GTD foi realizado o experimento de termoforese. A proteína 6xhis-SMS pura foi marcada com a sonda His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA (NanoTemper Technologies), que interage por afinidade com a cauda de histidina. A marcação foi realizada conforme o protocolo disponibilizado no manual do reagente, que, em resumo, consiste na adição de 50 nM da sonda em uma solução 100 nM da SMS, incubação em temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugação a 15000 g por 10 minutos. Para essa sonda não é necessária uma etapa de purificação da sonda livre, como no caso anterior.

Os ensaios foram realizados em triplicata no MonolithTM NT.115 series (NanoTemper Technologies), usando-se capilares MonolithTM NT.115 MST Premium Coated (NanoTemper Technologies), temperatura de 20 °C, LED com intensidade de 40%, e

MST com amplitudes de 20, 40 e 60%. Os resultados foram analisados no software Affinity Analysis (NanoTemper Technologies), e o Kd foi calculado usando a função Hill1 do ajuste sigmoidal do programa Origin 8.0 (OriginLab).

3.6.4.3 MyoVa-GTD, MyoVb-GTD e MyoVc-GTD com Rab3A

Para os ensaios de MST as amostras de 6xHis-MyoVa-GTD, 6xHis-MyoVb-GTD e 6xHis-MyoVc-GTD e Rab3A foram previamente purificadas por cromatografia de exclusão molecular em Tampão F (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5% de glicerol, 1 mM de MgCl₂, 0,5 mM de TCEP, pH 7.5). Os GTD, em uma concentração final de 100 nM, foram incubadas com 50 nM da sonda RED-tris-NTA (NanoTemper), de acordo com seu manual. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 15000 x g, 4°C.

As medidas de MST foram feitas utilizando 50 nM das 6xHis-MioVa-GTD, 6xHis-MyoVb-GTD, ou 6xHis-MioVc-GTD marcadas e uma diluição seriada da Rab3A. As amostras previamente centrifugadas a 15000 x g, 4 °C, por 5 min foram carregadas em capilares revestidos Monolith™ NT.115 MST Premium (NanoTemper Technologies) e os dados de termoforese foram medidos em equipamento Monolith™ NT.115 (NanoTemper Technologies) usando-se a fluorescência intrínseca da sonda RED-tris-NTA. A intensidade do LED foi ajustada para 40%, e variou-se a do laser de infravermelho que gera o gradiente de temperatura em três experimentos, 20%, 40% e 60%. Todas as curvas foram feitas em triplicatas.

3.6.5 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os experimentos de ITC foram realizados pelo Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da Universidade de Campinas. As amostras de MyoVa-GTD-AA e MyoVa-GTD-EE foram entregues ao corpo técnico do LaCTAD em uma concentração de 15 µM. O peptídeo Mlph-GTBDP (Genscript) foi entregue em uma concentração de 150 µM⁵⁷, ambos em tampão contendo 20 mM de HEPES, 200 mM de NaCl, 5% (v/v) de Glicerol, pH 7,4. As amostras foram aplicadas em um calorímetro MicroCal Auto-ITC₂₀₀ (GE), e a titulação foi feita utilizando configurações padrões.

3.6.6 Teste de Expressão de proteínas em sistema de báculo vírus

Os vetores virais desenhados para a expressão das proteínas hMyoVaFL (*human Myosin Va Full Length*), hHMMyoVa (*human Heavy MeroMyosin Va*) e Calmodulina⁴⁵ em células de inseto foram gentilmente doados pela Dr. Kathleen Trybus, professora da Universidade de Vermont.

Células SF9 foram cultivadas em garrafas sem filtro e sem tratamento para cultura de células (Sarstedt), em meio SF-900™ II SFM (Gibco), com a adição de 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco), e 100 U/mL da solução de penicilina-estreptomicina (Gibco). Quando as células em suspensão atingiram uma concentração de 2×10^6 células por mL elas foram diluídas para 1×10^6 com o mesmo meio de cultura, e depositadas em blocos de 24 poços, 5 mL por poço, para então serem infectadas com diversas concentrações de vírus (tabela 5). O vírus A representa uma mistura 2:1 dos vírus contendo, respectivamente, a construção da calmodulina e da hHMMyoVa; o vírus B representa a mesma mistura substituindo-se o vírus contendo hHMMyoVa pelo que contém a construção hMyoVaFL

Tabela 5: Representação dos três blocos utilizados para o teste de expressão, sendo o controle uma cultura de células sem a adição de vírus.

Bloco 1		
1 _{Controle}	15 µL do vírus A	15 µL do vírus B
	45 µL do vírus A	45 µL do vírus B
	135 µL do vírus A	135 µL do vírus B
Bloco 2		
2 _{Controle}	15 µL do vírus A	15 µL do vírus B
	45 µL do vírus A	45 µL do vírus B
	135 µL do vírus A	135 µL do vírus B
Bloco 3		
3 _{Controle}	15 µL do vírus A	15 µL do vírus B
	45 µL do vírus A	45 µL do vírus B
	135 µL do vírus A	135 µL do vírus B

Os blocos foram mantidos a 27 °C sob agitação de 250 rpm, e os blocos 1, 2 e 3 foram retirados após 48, 72 e 96 horas de infecção, respectivamente. As células foram coletadas por centrifugação (10 min, 800 g), e ressuspensas com tampão de amostra de SDS-PAGE. Por fim, essas amostras foram fervidas e centrifugadas por 10 min, 20000 g, e o sobrenadante foi aplicado em gel NuPAGE® Tris-Acetate 7%¹²⁰, e então analisado por *western blotting*.

As proteínas presentes nos géis foram transferidas em membrana de PVDF (*fluoreto de polivinilideno*) Hybond™-P (GE Healthcare) por sistema molhado (Biorad), em solução de transferência (25 mM de Bicina, 25 mM de Bis-Tris, 1 mM de EDTA pH 7,2). Após a

transferência (100 V, 1 h), as membranas foram incubadas em solução de bloqueio, com 5% leite desnatado em pó diluído em tampão TBS (50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 7,6), a 4 °C por 2 h sob leve agitação. Cada membrana foi então lavada três vezes com 50 mL de TBS por 10 min, e então incubadas com 5 mL do anticorpo anti-flag (Sigma) produzido em camundongo, a 4 °C por 1 h sob agitação leve. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com TBS por 10 min, e incubadas com 5 mL do anticorpo secundário, 0,2 µg/mL anti-camundongo produzido em cabra e conjugado com peroxidase (Calbiochem, 401253), a 4 °C por 2 h sob agitação leve. Por fim, a membrana foi novamente lavada com TBS e incubada com reagente luminol ImmunoCruz™ (Santa Cruz Biotechnology) por 1 min à temperatura ambiente, e então revelado em transiluminador Imagequant350 (GE), com tempo de exposição de 10 min.

3.6.7 Cromatografia de exclusão molecular do complexo Rab3A•MyoVc-GTD

O experimento de cromatografia de exclusão molecular do complexo Rab3A•MyoVc-GTD foi realizado pela bolsista de verão Ana Carolina Schwarzer. Resumidamente, as amostras de Rab3A e MyoVc-GTD purificadas por exclusão molecular foram juntas em proporção 1:1, e incubadas por 30 minutos, 4 °C. Após o período de incubação, o complexo Rab3A•MyoVc-GTD foi aplicado em uma coluna Superdex 200 16/600 (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão GF (10 mM de HEPES, 200 mM de NaCl, 5% de glicerol, 0,5 mM de TCEP, pH 7.5) com fluxo de 0,5 mL/min, e as frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE.

3.6.8 Cromatografia de exclusão molecular analítica acoplada a espalhamento de luz em multiângulos (SEC-MALS)

O experimento de cromatografia de exclusão molecular analítica acoplada a espalhamento de luz em multiângulos (do inglês: *size exclusion chromatography with multi-angle light scattering*, SEC-MALS) foi realizado em um equipamento ÄKTApurifier (GE Healthcare Life Sciences) com uma coluna Superdex 200 HR 10/300 (previamente equilibrada com o tampão F (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5% de glicerol, 1 mM de MgCl₂, 0,5 mM de TCEP, pH 7.5)), acoplado ao detector de espalhamento estático de luz de três ângulos miniDAWN™ TREOS (WYATT). O complexo – formado no tampão F, na proporção 1:1, da mesma maneira que na cromatografia de exclusão molecular – e as

amostras Rab3A e MyoVc-GTD sozinhas foram injetadas na coluna através de um loop de 250 μ L, com um fluxo de 0,5 mL/min. Os dados foram processados utilizando o software ASTRA V (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA).

PARTE 1

A expansão do interactoma da Miosina Va indica novos possíveis papéis em infecção viral, secreção celular e doenças neurológicas

4 Resultados

4.1 Duplo Híbrido em Levedura

4.1.1 Subclonagem das construções de MyoVa-GTD no vetor de duplo-híbrido

Para realizar o experimento de duplo híbrido em levedura, é necessário fazer a clonagem da proteína-isca no vetor pGBKT7. Para isso, foi feita a digestão dos plasmídeos pET28a-TEV contendo os genes do MyoVa-GTD-EE (construção fosfomimética) e MyoVa-GTD-AA (construção controle não fosforilada)⁶⁴ com as enzimas *EcoRI* e *SalI*, que liberou os insertos contendo os genes para serem subclonados no vetor pGBKT7, digerido com as mesmas enzimas (Figura 2).

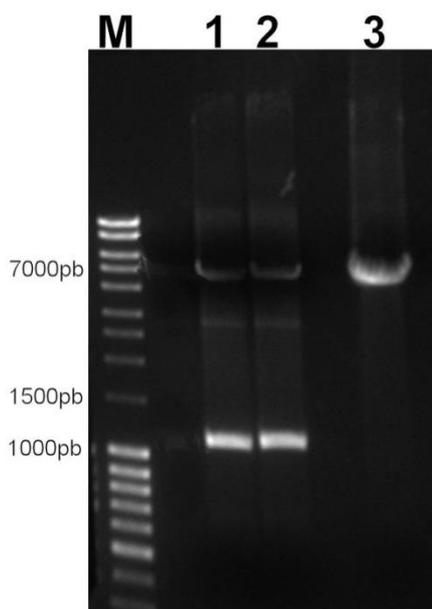


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose da digestão do DNA plasmidial. 1 e 2 representam a digestão dos plasmídeos pET28a-TEV contendo o CBD fosfo-mimético e duplo AA (aprox. 1200 pb), respectivamente. 3 representa a digestão do plasmídeo pGBKT7 (aprox. 7300 pb), para a futura inserção dos genes.

As bandas de interesse foram cortadas e purificadas, e então foi feita a ligação dos insertos no plasmídeo, que foram transformados em DH5 α para a multiplicação do DNA plasmidial. O sucesso da subclonagem foi confirmado por sequenciamento.

4.1.2 Teste de autoativação

É necessário garantir que as proteínas-isca, clonadas no vetor pGBKT7, não sejam capazes de autoativar o sistema de duplo híbrido, e para isso é feito o teste de autoativação, onde a ativação dos *genes reportes* do sistema é avaliada. O teste de autoativação mostrou que ambos os mutantes (MyoVa-GTD-AA e MyoVa-GTD-EE) não autoativam o sistema de duplo híbrido escolhido para esse projeto, o que viabilizou o uso dessa abordagem para a busca por novos parceiros de interação de MyoVa-GTD-EE (figura 3D).

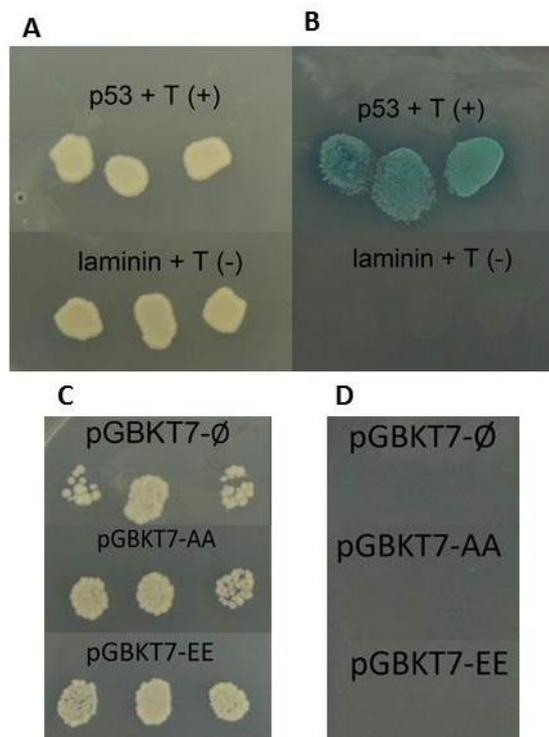


Figura 3: Testes de autoativação das construções MyoVa-GTD-EE e MyoVa-GTD-AA. Os ensaios foram feitos em triplicata e fotografados após três dias de crescimento. A. Placa controle, com colônias em meio DDO, seletivo para a presença dos plasmídeos pGBKT7 e pGADT7, indicando o sucesso da cotransformação. B. Placa controle, com meio DDO/X/A. Para o crescimento nesse meio, é necessária a existência da interação entre as proteínas isca e presa, o que, como esperado, ocorreu apenas no controle positivo. C Placa controle, com colônias em meio SD/-W, seletivo para a presença dos plasmídeos pGBKT7, comprovando o sucesso da transformação. D. Placa teste, com meio SD/-W/X/A. A presença de aureobasidina A faz com que as colônias que não autoativam o gene repórter morram. A ausência de colônias nessa placa indica o sucesso do teste.

4.1.3 Screening Contra a Biblioteca Humana Universal Normalizada

No experimento de *Screening*, todas as colônias presentes na placa com meio DDO/A são leveduras transformadas, apresentando potenciais interações, visto que é necessária uma interação para a ativação do gene repórter que codifica para a resistência a Aureobasidina A. Foi observado o surgimento de colônias no terceiro, quarto e quinto dia de incubação. As colônias foram numeradas e divididas de acordo com o dia em que apareceram, sendo que as colônias de números 1 a 122 (122 colônias) surgiram no terceiro dia de incubação, as colônias

de números 123 a 153 (31 colônias) surgiram no quarto dia, e as colônias de números 154 a 190 (37 colônias) surgiram no quinto e último dia de incubação. As 190 colônias foram replaqueadas em placa DDO/X/A, para testar a ativação de dois genes repórteres simultaneamente (AUR1-C MEL1), e após 5 dias de incubação, apenas 123 das 190 colônias cresceram.

Para selecionar os resultados do *screening* usando critérios mais restritivos, as 123 colônias que cresceram em placa DDO/X/A foram replaqueadas em placa QDO/X/A, onde é necessária a ativação de todos os quatro genes repórteres do sistema para que um clone seja considerado positivo. Neste experimento, um resultado positivo não ocorre unicamente pela presença ou ausência da cor azul, visto que a cor corresponde a apenas um dos genes repórteres, o resultado positivo vem da observação tanto da cor, quando da capacidade da colônia de crescer. Das 123, apenas 54 colônias com coloração azul foram capazes de crescer em meio QDO/A líquido, atendendo ao critério da ativação de todos os genes repórteres, sendo, portanto, consideradas como resultados positivos (Figura 4).

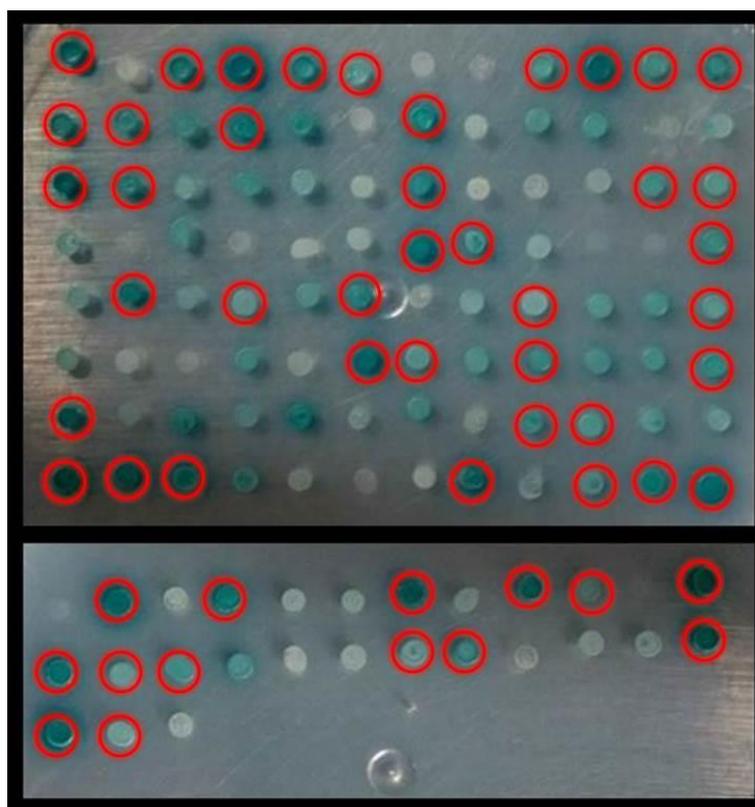


Figura 4: Resultado final do *screening* em placa QDO/X/A. Em vermelho estão destacadas as colônias consideradas positivas não só pela presença da cor azul, mas também pela capacidade de crescer em meio QDO/A líquido.

4.1.4 Identificação das Proteínas Pescadas

O processo de extração de DNA plasmidial de levedura, com a utilização do kit comercial *Easy Yeast Plasmid Isolation Kit* (Takara Bio – Clontech), ocorreu dentro das

expectativa de rendimento do protocolo. Dos 54 DNAs isolados, foi possível clonar 51 deles em *E. coli*, aumentando em uma ordem de grandeza a quantidade de DNA obtida após a extração plasmidial. Todos os 51 DNAs extraídos de *E. coli* foram enviados para o sequenciamento.

4.1.4.1 Sequenciamento e identificação por técnicas de bioinformática

Dos 51 plasmídeos enviados para sequenciamento, apenas quatro não foram sequenciados, devido à baixa qualidade do DNA plasmidial purificado. Os outros 47 foram sequenciados de maneira confiável, como é possível ver na figura 5, que mostra o eletroferograma de um dos sequenciamentos, como exemplo.

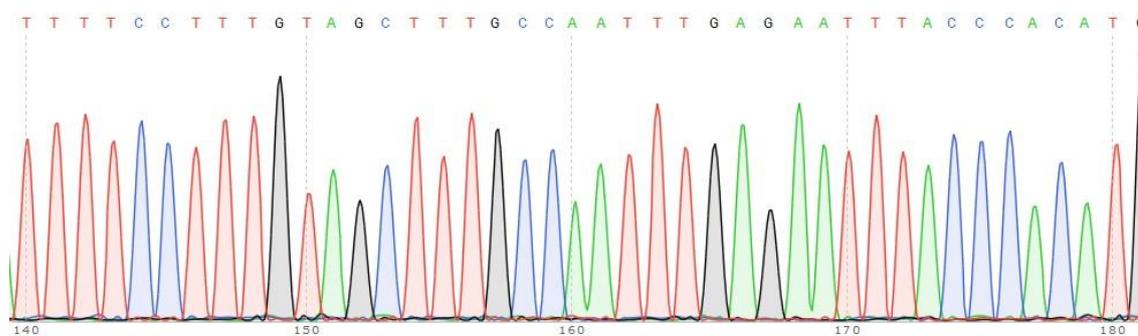


Figura 5: Parte do sequenciamento do plasmídeo da colônia 123, mostrando a alta qualidade dos dados de sequenciamento, resultado que se repetiu para todos os plasmídeos sequenciados.

Para identificar as proteínas pescadas, um arquivo multifasta contendo as 47 sequências foi usado como *template* para uma busca utilizando a ferramenta BLASTn¹⁰⁸. Esta busca retornou 47 genes, sendo que desses, 12 se apresentaram em duplicata. A baixa incidência de resultados duplicados se deve à utilização de uma biblioteca normalizada, que apresenta uma menor quantidade de cópias de genes mais abundantes do que bibliotecas convencionais¹²¹.

4.1.5 Validação do *screening* em experimentos “1x1”

Para testar se as proteínas pescadas são capazes de ativar os genes *reporters* do sistema, os 35 clones diferentes foram levados para o processo de validação 1x1. Nesta etapa, como já descrito, é necessária uma nova transformação de leveduras com os plasmídeos isca e presa. Para garantir uma melhor padronização dos resultados, todas as transformações comparadas entre si foram feitas com no máximo dois dias de diferença.

Em um primeiro momento, todos os 35 clones foram transformados seguindo o protocolo de cotransformação, resultando em 105 transformações (35 dos clones com a

construção fosfomimética, 35 com a construção não fosforilada e 35 com o vetor pGBKT7 vazio, usado como controle). Dos 35 clones, apenas 20 apresentaram sucesso em todas as transformações, e com eles foi feito o primeiro experimento de validação “1x1” (figura 6).

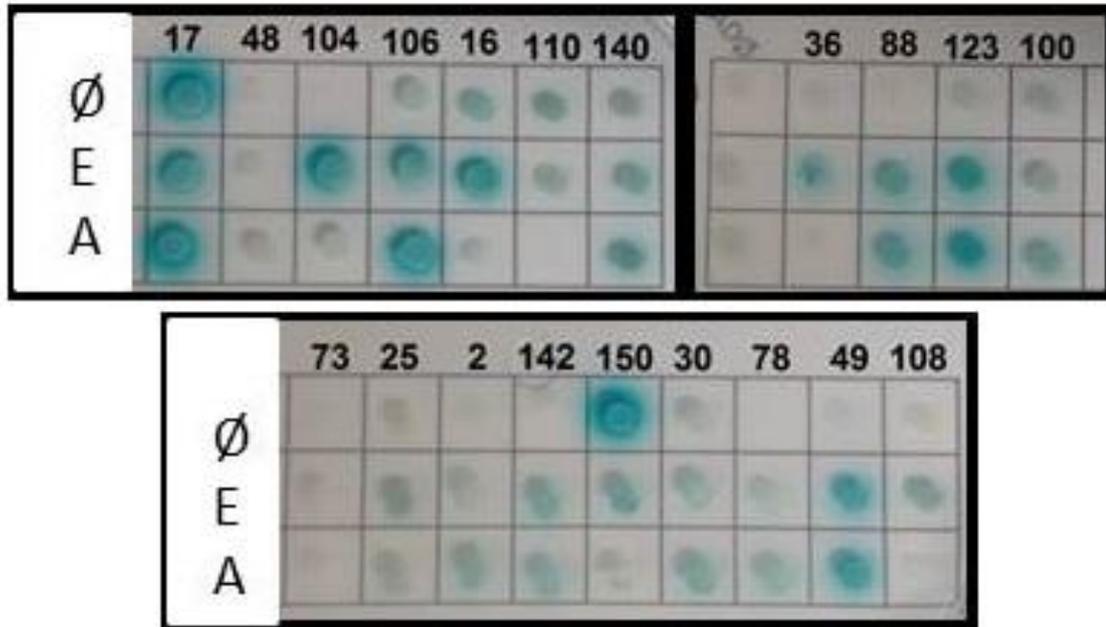


Figura 6: Primeiro resultado da validação “1x1”. Foram testados 20 clones em três placas com meio QDO/X/A, para verificar de fato a ativação dos quatro genes repórteres do sistema (linhas E e A). Além disso, foram testados com ausência do CBD no plasmídeo pGBKT7 (linha Ø) para ver uma possível autoativação causada pela proteína “presa” (como visto claramente no clone 17).

Resultados como o dos clones 49, 88, 106, 123 e 142 mostram a ativação de todos os genes repórteres para as duas construções de miosina, confirmando a interação dessas proteínas com o MyoVa-GTD pela técnica de duplo híbrido (figura 6). Porém, eles também indicam que essas interações não dependem da fosforilação do MyoVa-GTD. Nos testes com os clones 16, 36, 104 e 108, observou-se a ativação dos 4 genes repórteres apenas na presença do MyoVa-GTD-EE, sugerindo que esses clones interagem preferencialmente com a forma fosfomimética do MyoVa-GTD.

Novas rodadas de cotransformações foram feitas, tanto com o intuito de conseguir transformar os 15 clones que não transformaram no primeiro experimento, quanto reproduzir experimentos já realizados. Após seis rodadas de cotransformações, apenas cinco novos clones foram testados (figura 7), e foi possível replicar os ensaios de apenas 11 dos clones já testados (figura 8).

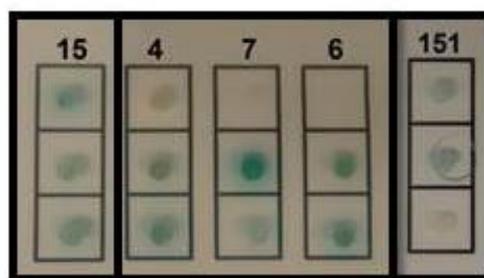


Figura 7: Segunda rodada de experimentos de validação “1x1”. Após diversas tentativas de cotransformação, apenas cinco novos clones foram testados.

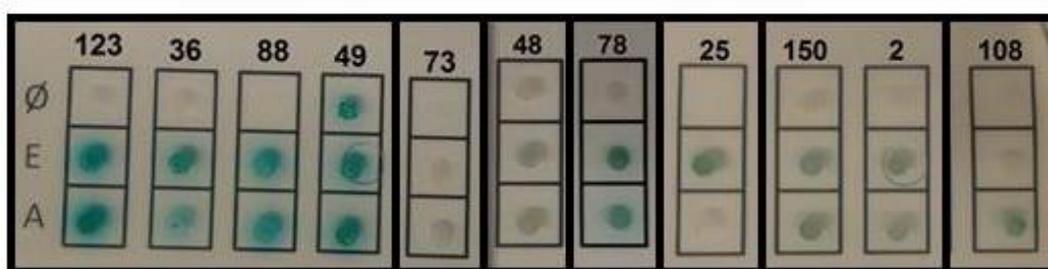


Figura 8: Duplicação de parte dos resultados obtidos no primeiro experimento de validação “1x1”. Alguns resultados, como o dos clones 78, 88, 123, com resultados positivos, e 73 e 48 com resultados negativos, se mostraram reprodutíveis. Porém, resultados contrastantes com o do primeiro teste foram observados para os clones 36, 150, 108 e 49.

Dos 11 resultados replicados, sete clones (123, 88, 73, 48, 78, 25 e 2) apresentaram resultados reprodutíveis, e quatro clones (36, 49, 108, e 150) mostraram resultados divergentes em relação ao primeiro teste. Com bases nos resultados feitos em duplicata, notamos que visualizar alguma diferença de ativação dos genes repórteres entre os mutantes MyoVa-GTD-EE ou MyoVa-GTD-AA não é uma tarefa trivial. Em alguns casos, como o dos clones 36 e 108, a preferência pelo fosfo-mimético em um experimento não se reproduziu no segundo. Devido a essa falta de reprodutibilidade da preferência, os experimentos de validação “1x1” começaram a ser monitorados ao longo do terceiro, quarto e quinto dias de incubação, para vermos se era possível identificar um favorecimento para algum mutante ao longo do crescimento das leveduras.

Para tentar contornar o problema do baixo grau de sucesso das cotransformações, o protocolo de transformação utilizado nessa terceira rodada foi trocado para a dupla transformação sequencial. O novo procedimento mostrou-se mais eficiente, apesar de mais demorado do que a cotransformação. Com ele foi realizado o experimento de validação de 16 clones, sendo que sete (19, 44, 68, 82, 126, 178 e 182) desses ainda não tinham sido avaliados e nove (2, 16, 30, 36, 104, 106, 110, 140 e 142) representam duplicatas (figura 9).

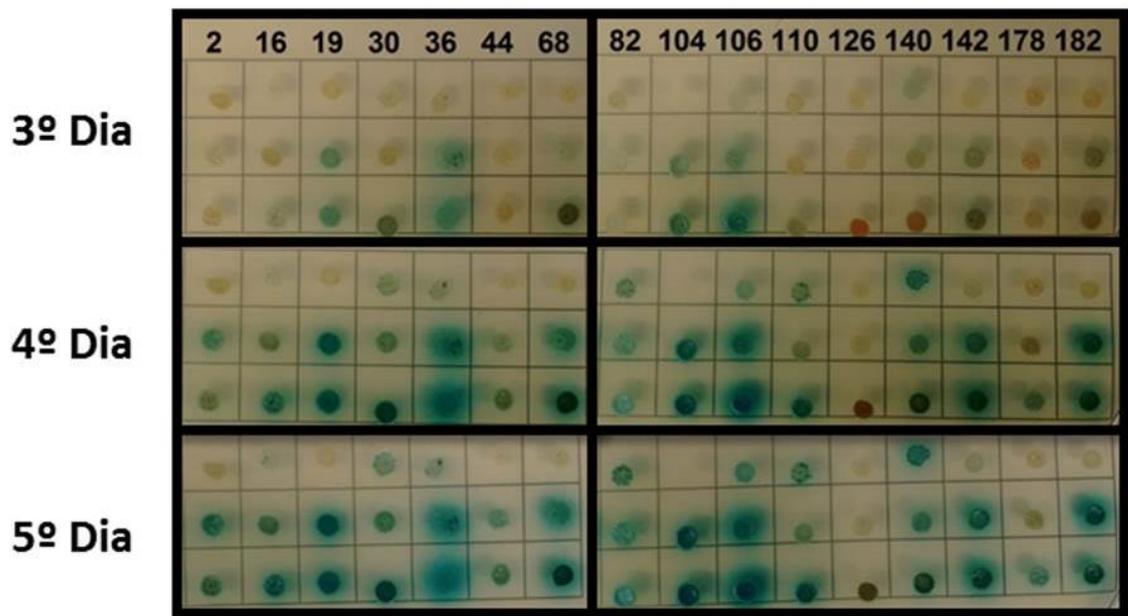


Figura 9: Resultado da terceira rodada de experimentos de validação “1x1”, acompanhado ao longo do terceiro, quarto e quinto dia de incubação.

O resultado dessa validação evidenciou que nenhuma das interações exclusivas observadas anteriormente foi reprodutível. Esta baixa reprodutibilidade, que fica evidente em resultados como dos clones 16, 36 e 104, nos impediu de inferir a presença de interações exclusivas para a construção fosfomimética. Para explicar esse resultado, elaboramos duas hipóteses: (1) a de que a mutação fosfomimética não afeta a interação com novos parceiros identificados, e (2) a de que a técnica de duplo híbrido em levedura não foi sensível o suficiente para detectar um possível efeito da mutação fosfomimética na afinidade dessas interações.

Existiram casos, como vemos nos clones 2, 30, 44 e 68, em que a taxa de crescimento e de formação da coloração azul, foram maiores para um dos mutantes, o que evidencia para a segunda hipótese, porém, sem confirmá-la. Sendo assim, serão necessárias outras técnicas para avaliar a função da fosforilação na interação dessas proteínas, como, por exemplo, o ITC ou MST, que permitem quantificar a constante de dissociação de complexos proteicos.

Em resumo, 32 clones foram testados no experimento de validação 1x1, sendo que desses, 18 tiveram pelo menos uma duplicata. 14 clones não foram duplicados, e apenas três não foram testados por dificuldades na etapa de transformação. Dos 32 clones testados, 21 foram validados pelos experimentos “1x1”, e seguiram para análises de bioinformática.

4.1.6 Análises de bioinformática dos clones confirmados

4.1.6.1 Identificação dos DNAs pescados

As sequências de DNA dos 21 clones validados foram inicialmente comparadas com sequências presentes no banco de dados nr, utilizando a ferramenta BLASTn. Essa comparação mostrou a existência de seis clones que correspondiam a sequências de regiões que, apesar de fazerem parte do RNA mensageiro, não são traduzidas (tabela 6). Tais regiões são denominadas de 5' ou 3'UTR (do inglês *untranslated region*) e flanqueiam a sequência gênica codificante. Como a biblioteca de duplo híbrido compreende cDNAs sintetizados a partir de RNA mensageiros, é de se esperar que alguns clones contenham tais regiões. Um exemplo disso é o caso do clone 106. Clones contendo somente sequências 5' ou 3' UTR foram descartados das próximas análises, já que, muito provavelmente, estão produzindo cadeias polipeptídicas que não correspondem a proteínas naturalmente encontradas em humanos.

Também foi possível identificar, por essa análise, três clones (25, 36 e 108) que não se identificaram com nenhuma sequência gênica conhecida, mas sim com outras regiões cromossômicas, o que fez com que eles também fossem descartados das próximas análises. Por fim, como a literatura de duplo híbrido em levedura reporta que proteínas das famílias ZnF (*Zinc Finger Protein*) e HSP (*Heat Shock Protein*) comumente aparecem como falso-positivos nesse ensaio¹⁰⁹ os clones 2 (ZnF), 16 (ZnF) e 88 (HSP) também foram desconsiderados.

Tabela 6: Análise dos intervalos identificados pelo sequenciamento. Em vermelho os clones correspondentes a regiões 5' ou 3'UTR.

Clone	Código GenBank	Intervalo do hit alinhado (pb inicial e final*)	Intervalo do hit traduzido (pb inicial e final)
<u>2</u>	<u>NM_005180.8</u>	1084-2167	507-1487
<u>4</u>	<u>XM_011519161.1</u>	88-1216	4739-7036
<u>6</u>	<u>NM_001306191.1</u>	793-1779	242-637
<u>7</u>	<u>NM_006016.4</u>	1549-1724	182-775
<u>16</u>	<u>BC050683.1</u>	302-1241	451-1887
<u>19</u>	<u>NM_018442.3</u>	2122-2736	354-2996
<u>25</u>	<u>AC002549.1</u>	92606-91778	
<u>30</u>	<u>NM_020839.3</u>	1395-2380	41-2074
<u>36</u>	<u>AL049695.20</u>	39457-40568	
<u>44</u>	<u>BC016058.1</u>	810-1785	230-1219
<u>49</u>	<u>BC000006.2</u>	584-1255	122-1033
<u>68</u>	<u>NM_001165979.2</u>	7561-7955	635-7495
<u>78</u>	<u>NG_008805.2</u>	8745-9860	396-9011
<u>88</u>	<u>NR_033192.1</u>	198-1074	45-774
<u>104</u>	<u>BC038384.1</u>	894-1513	121-1095
<u>106</u>	<u>NM_138773.2</u>	3372-4495	127-1383
<u>108</u>	<u>AL139288.15</u>	138495-139600	
<u>123</u>	<u>NG_009228.1</u>	293-831	23-1129
<u>142</u>	<u>NM_152332.5</u>	1045-2180	214-1686
<u>151</u>	<u>XM_006716253.2</u>	4257-5384	115-972
<u>186</u>	<u>NM_001007553.2</u>	2590-3749	514-2910

* o pb final corresponde ao final do sequenciamento, e não do gene.

4.1.6.2 Determinação da Composição de Domínios das Proteínas

As sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos nove clones selecionados foram analisadas quanto à presença de domínios únicos ou múltiplos, utilizando a ferramenta SMART^{110,111} (tabela 7). Em alguns casos, essa análise revelou clones que codificam proteínas de um único domínio truncadas em sua região central - como, por exemplo, o clone 49 (figura 10). Esses casos, muito provavelmente, refletem proteínas parcialmente enoveladas ou desenoveladas; já que, por definição, domínios são as menores partes de uma proteína capazes de se enovelar de forma independente. Dessa forma, interações de MyoVa-GTD com proteínas de domínio único truncado devem ser vistas com muita cautela, pois podem ser o resultado de interações inespecíficas entre o MyoVa-GTD e proteínas parcialmente enoveladas ou desenoveladas. Além do clone 49, essa situação inclui o clone 44.

Outros três clones (19, 78 e 104) foram considerados resultados duvidosos. O clone 104 não apresentou domínio proteico predito para a região identificada, correspondente aos

últimos 30 resíduos da proteína YBX1. No caso do clone 78, a região pescada corresponde aos últimos 100 resíduos, preditos como regiões desenoveladas, da proteína *Fibrillin 1*, uma proteína extracelular que atua na formação de microfibrilas¹²². Já o clone 19, apesar de apresentar diversos domínios, corresponde a uma proteína com um enovelamento complexo, que não seria possível sem sua totalidade¹²³.

Tabela 7: Análise da composição de domínios proteicos.

Clone	Intervalo do hit polipeptídico alinhado (aa inicial e final)	Nome (tamanho)	Composição de domínios proteicos (aa inicial e final)
<u>19</u>	589-794*	<i>DDB1 and CUL4 associated factor 6</i> (880)	Diversos domínios WD40.
<u>30</u>	451-677	<i>WD repeat-containing protein 48</i> (677)	WD40 (20-390) e DUF 3337 (509-674)
<u>44</u>	193-329	<i>Cathepsin K</i> (329)	I29 (26-86) e Pept_C1 (105-320)
<u>49</u>	154-303	<i>ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, beta 1 polypeptide</i> (303)	Na_K-APTase (3-297)
<u>78</u>	2783-2871	<i>Fibrillin 1</i> (2871)	Mais de 50 domínios EGF, com, em média 40 aa cada
<u>104</u>	258-324	<i>Y box binding protein 1</i> (324)	CSP (60-128)
<u>123</u>	90-269*	<i>Spermine synthase</i> (366)	Spermine_synth (89-366)
<u>142</u>	277-490	<i>Tandem C2 domains nuclear protein</i> (490)	C2 (240-340) e C2 (375-480)
<u>186</u>	692-798	<i>Cold shock domain-containing protein E1</i> (798)	CSP (26-89), CSP (190-250), CSP (350-420), CSP (520-590), CSP (675-740) e SUZ-C (750-790)

* o aa final reflete o último códon observado no sequenciamento, o que não necessariamente corresponde ao final da proteína.

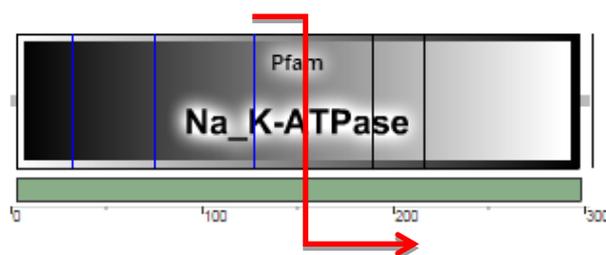


Figura 10: Resultado da predição de domínio da proteína codificada pelo gene referente ao clone 49. O gene identificado (BC000006.2) transcreve a proteína entre as bases 87 e 998, mas a região presente no plasmídeo começa em torno da base 549. A seta vermelha indica o local de início da proteína expressa pelo clone 49.

Dessa forma, quatro clones (30, 123, 142 e 186) que foram validados no ensaio “1x1” apresentaram ao menos um domínio proteico inteiro (Tabela 8). Destes, as proteínas *Spermine Synthase* (SMS) e *Tandem C2 Domains Nuclear Protein* (TC2N) foram escolhidas para futuros estudos. SMS foi escolhida por estar relacionada com a síndrome de Snyder-Robinson, uma doença neurodegenerativa, e por ter sua estrutura cristalográfica determinada,

o que facilitaria os estudos de interação por métodos biofísicos. TC2N foi escolhida por apresentar domínios C2, um tipo de domínio já identificado pelo nosso grupo como sendo capaz de interagir com MyoVa.

Tabela 8. Informações sobre os quatro clones que apresentaram pelo menos um domínio proteico intacto.

Clone	Proteína	Observações
<u>30</u>	<i>WD repeat-containing protein 48, isoform 1</i>	O clone 30 corresponde a região C-terminal da proteína identificada, que contém um domínio DUF 3337 (DUF é sigla para <i>Domain of unknown function</i> , ou domínio sem função identificada). ¹²⁴
<u>123</u>	<i>spermine synthase, isoform 1</i>	Proteína nuclear com estrutura cristalográfica já resolvida, e relacionada com a síndrome de Snyder-Robinson. Essa proteína apresenta uma pequena região responsável por sua dimerização, e o domínio catalítico, que necessita da dimerização para estar ativo. ^{106,125}
<u>142</u>	<i>tandem C2 domains nuclear protein, isoform 1</i>	Proteína nuclear que apresenta dois domínios C2, que são módulos de interação com proteínas e lipídeos, e que também estão presentes em outra proteína que interage com a MioVa, atualmente estudada pelo grupo. ^{63,126}
<u>186</u>	<i>cold shock domain-containing protein E1, isoform 4</i>	Proteína nuclear com cinco domínios CSP (cold shock protein), domínios de ligação de RNA, com atividade regulatória, e um domínio SUZ-C, que é um motivo conservado em diversas proteínas que ligam em RNA. ^{127,128}

4.1.7 Validações *in-vitro*

4.1.7.1 Clonagem das construções de SMS e TC2N

Para dar início aos experimentos de caracterização das proteínas pescadas no dublo-híbrido, e do complexo formados por elas com a MyoVa, amplificamos os insertos SMS (que codifica para a proteína SMS inteira), SMS- Δ N120 (que codifica para o domínio catalítico da proteína SMS), TC2 (que codifica para a região com os dois domínios C2 em tandem), C2.1 (que codifica para o primeiro domínio C2), e C2.2 (que codifica para o segundo domínio C2) a partir de três bibliotecas de cDNA humano distintas (Figura 11)

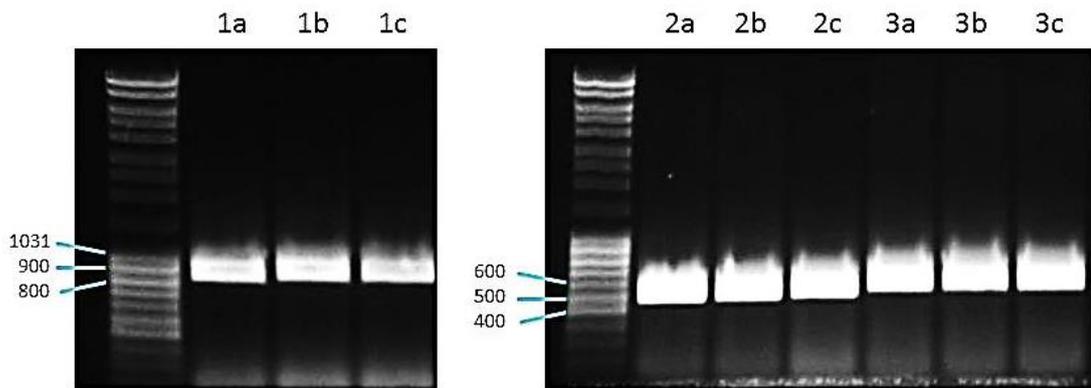


Figura 11: Amplificação das construções SMS, C2.1 e C2.2 por PCR. Géis de agarose de alíquotas das reações de PCR mostrando a amplificação dos insertos (1) SMS (1101 pb), (2) C2.1 (363 pb), (3) C2.2 (426 pb) a partir das bibliotecas de cDNA de cérebro fetal humano (a), medula óssea (b) e leucócitos (c).

Ao final do processo de clonagem, as 10 construções (SMS, SMS- Δ N120, TC2, C2.1 e C2.2, ligadas nos plasmídeos pET28a e pGEX-4T-1) foram sequenciadas, o que confirmou que todas foram amplificadas sem mutações, e ligadas corretamente nos vetores de expressão.

4.1.7.2 Teste de expressão das construções de SMS e TC2N

Para avaliar a expressão proteica das cinco construções inseridas no plasmídeo pGEX-4T-1, foi feito um teste de expressão em pequena escala, e as amostras foram analisadas por SDS-PAGE (Figuras 12 e 13).

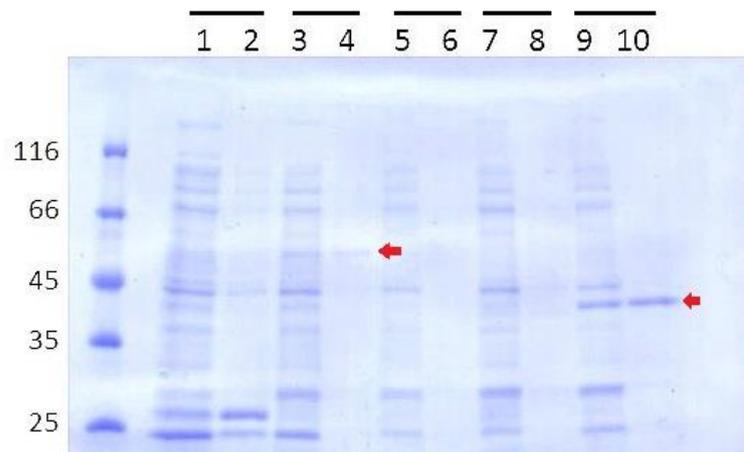


Figura 12: Teste de expressão das cinco construções de SMS e TC2N no plasmídeo pGEX-4T-1. Os poços ímpares representam o extrato solúvel do lisado celular, os poços pares representam as proteínas eluídas da resina de glutationa. As duplas de poços representam as construções (1,2: SMS(67 kDa); 3,4: SMS- Δ N120(54 kDa); 5,6: TC2(55 kDa); 7,8: C2.1(41 kDa); e 9,10: C2.2(42 kDa)). As setas vermelhas indicam as proteínas na fração solúvel. Os números na lateral representam o padrão de massa molecular.

Nesses testes, as construções GST-SMS- Δ N120 e GST-C2.2 apresentaram bandas de tamanho esperado na fração solúvel do extrato celular (figura 12). A construção SMS-GST apresentou duas bandas, porém nas alturas aproximadas de 25 e 27 kDa, ambas menores do

que o esperado (67 kDa), o que pode ser fruto de degradação proteica. A figura 13 representa um gel com as frações insolúveis do lisado celular.

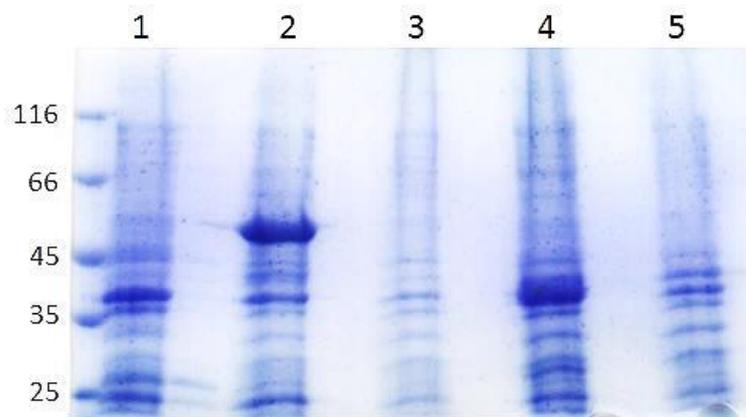


Figura 13: Gel com as frações insolúveis do lisado celular. Os poços 1, 2, 3, 4 e 5 representam as construções SMS, SMS- Δ N120, TC2, C2.1 e C2.2, respectivamente. Os números na lateral representam o padrão de massa molecular.

Podemos ver, pelas figuras 12 e 13 que a construção C2.1 expressou, porém ficou na fração insolúvel, indicando que essa construção pode ter tido dificuldades de se enovelar de forma adequada. A construção TC2 não apresenta banda de expressão proteica, e a construção SMS apresentou uma banda majoritária de aproximadamente 37 kDa, que provavelmente é a outra parte do produto de degradação que originou as bandas de aproximadamente 25 kDa imobilizadas na resina Glutathiona (figura 12).

Em relação às construções fusionadas a *His-tag*, as proteínas SMS e SMS- Δ N120 foram satisfatoriamente produzidas na fração solúvel do lisado celular (Figura 14).

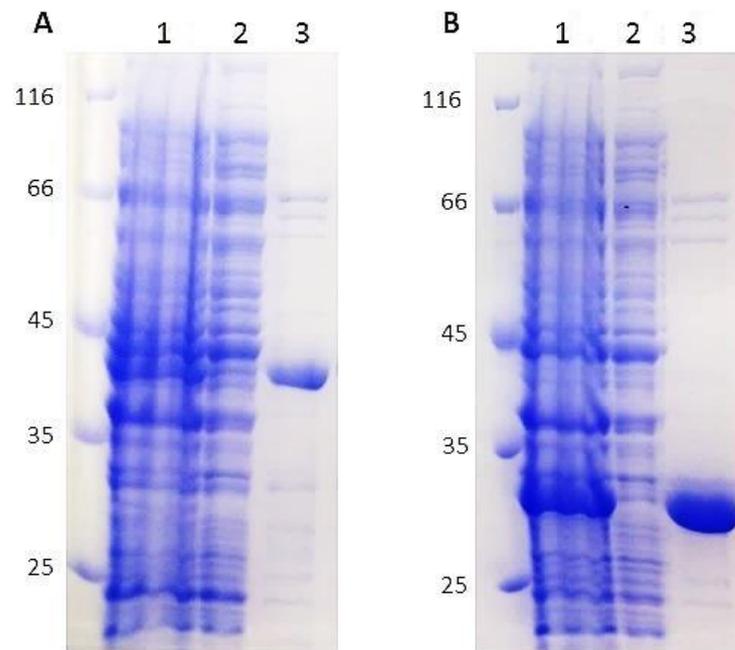


Figura 14: Teste de expressão das duas construções da proteína spermine synthase, SMS (A) e SMS- Δ N120 (B) fusionadas a *His-tag*. O poço 1 representa o extrato total das células, após a lise, o poço 2 representa a parte solúvel que não ligou na resina de níquel (*flow through*), e o poço 3 representa o perfil proteico eluído da resina de níquel, indicando bandas majoritárias do tamanho esperado para (A) SMS (41 kDa) e (B) SMS- Δ N120 (28 kDa). Os números na lateral representam o padrão de massa molecular.

4.1.7.3 GST pull-down

O experimento de GST *pull-down* foi feito com o intuito de avaliar a interação *in vitro* da proteína SMS com o GST-MyoVa-GTD, tanto em sua forma fosfomimética quanto em sua forma não fosforilada. Em L1 as lavagens realizadas não foram suficientes para remover toda SMS livre antes da eluição (figura 15A). Assim, foi proposto o protocolo L2, com mais etapas de lavagem, que resultou na ausência de proteína detectável na eluição (figura 15B), indicando que as diversas etapas de lavagem romperam a interação entre as proteínas. Foi então determinado um protocolo, L3, com um tampão sem a presença do detergente Tween-20 e do agente redutor TCEP, além de uma menor força iônica, com a intenção de mimetizar condições semelhantes as encontradas no ambiente celular. Usando o protocolo L3 (figura 15C), vimos bandas fracas de ambas construções de SMS co-eluídas com os MyoVa-GTDs. Porém, essas bandas também se mostraram presentes no controle negativo, tornando o resultado do experimento inconclusivo.

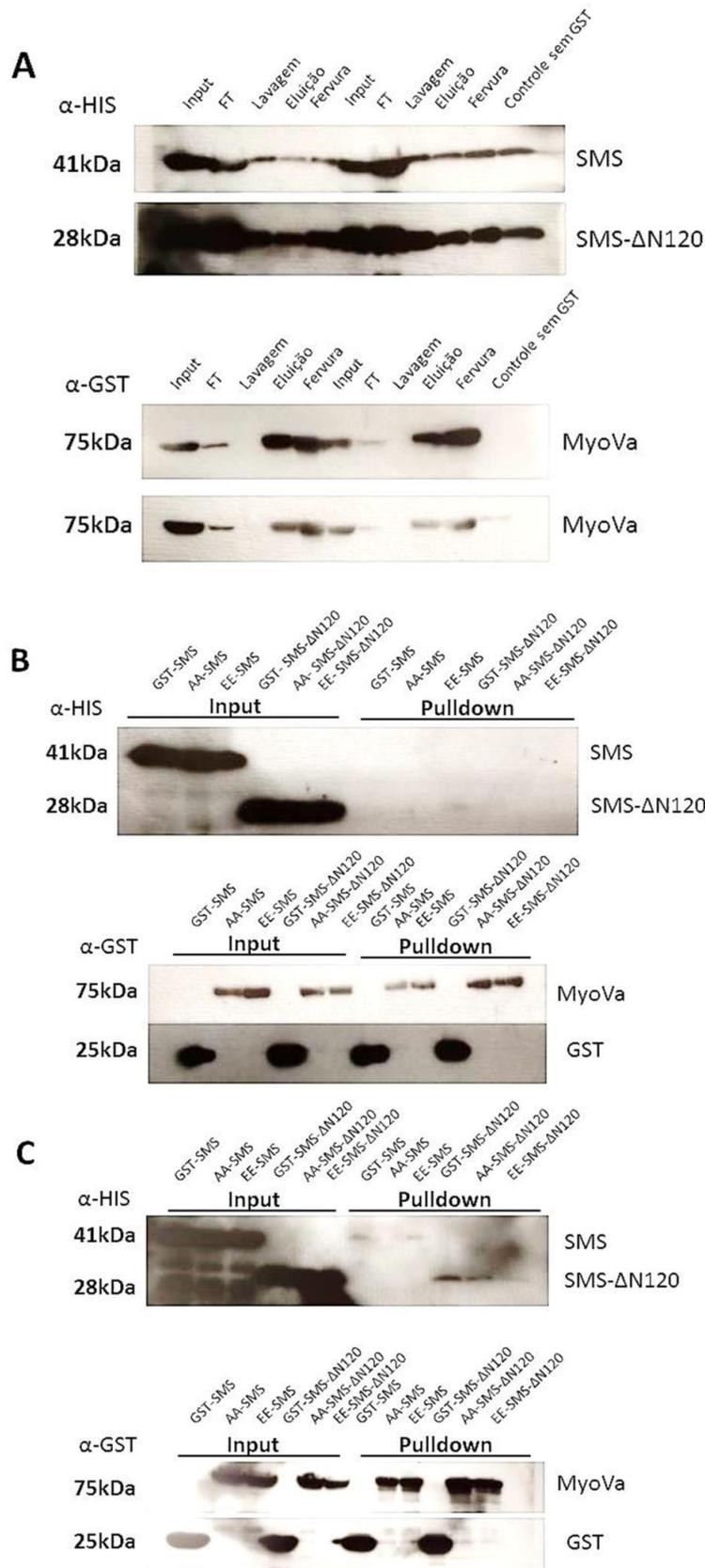


Figura 15: Resultado do western blot.

A: Primeiro protocolo de *pull-down* testado, L1, onde podemos ver a presença das duas construções da *spermine synthase*, tanto nas lavagens, quanto no controle. B: Segundo protocolo de *pull-down*, L2, onde não detectamos nenhuma das duas construções da proteína. C: Terceiro protocolo de *pull-down*, L3, onde é possível ver uma banda fraca da construção SMS no *pull-down* controle e no *pull-down* contra o MyoVa-GTD-EE (EE), e também duas bandas da construção SMS-ΔN120, uma no controle e uma no *pull-down* contra o MyoVa-GTD-AA (AA).

4.1.7.4 Purificação da Proteína SMS

Diante da inconclusividade dos experimentos de *GST pull-down*, optamos por realizar a expressão e purificação da SMS fusionada à his-tag, com o intuito de obter uma amostra homogênea para a realização do experimento de termoforese em microescala. A purificação por cromatografia de afinidade apresentou um perfil com quatro picos de eluição (Figura 16A), e a análise por SDS-PAGE revelou que os dois primeiros picos eram apenas contaminantes, e os dois últimos picos eram, de fato, a proteína de interesse (Figura 16B).

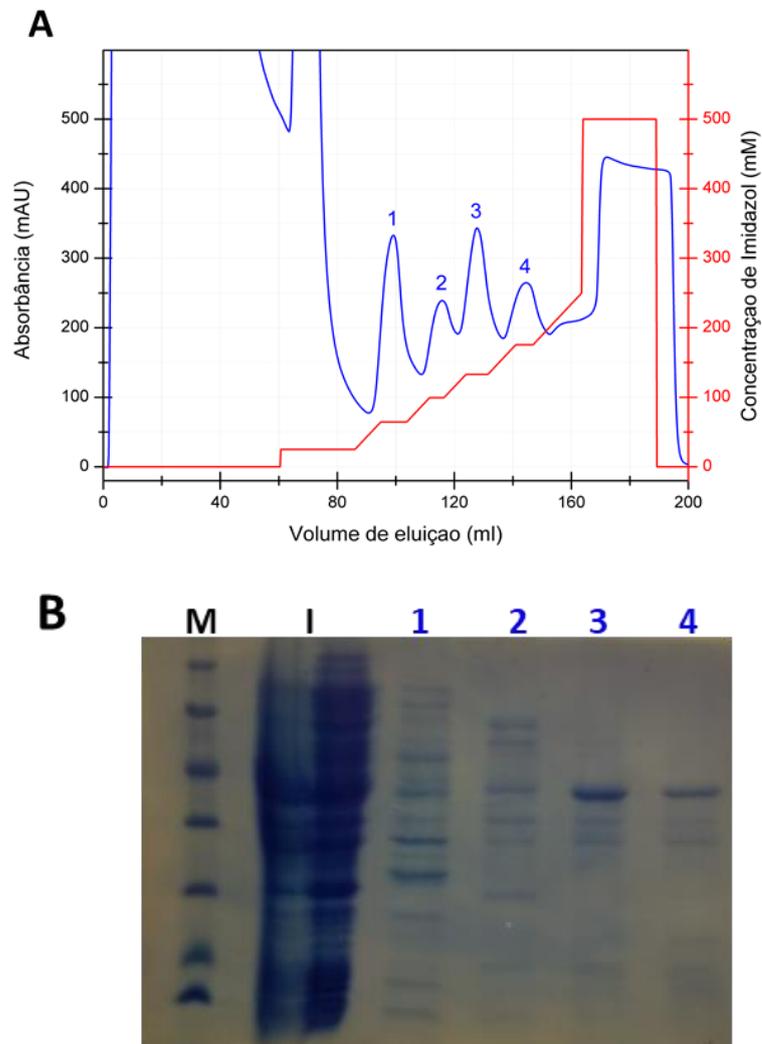


Figura 16: Purificação da SMS por cromatografia de afinidade. A: Cromatograma da purificação, onde é possível ver a eluição de quatro picos ao longo do gradiente de imidazol, saindo com concentrações de 70, 100, 140 e 180 mM de imidazol. B: SDS-PAGE da purificação. O poço M corresponde ao marcador de massa utilizado e I ao *Input* da purificação. Os poços de 1 a 4 correspondem aos picos de 1 a 4 do cromatograma, aonde é possível ver que 1 e 2 apresentam muitos contaminantes, e 3 e 4 apresentam uma fração da proteína SMS enriquecida.

Os picos 3 e 4 foram concentrados separadamente e submetidos a uma cromatografia de exclusão molecular. O pico 3 (Figura 17A) teve um perfil de eluição com um pico de agregados em 42 ml, e um pico contendo a proteína pura e homogênea em 70 mL, um volume de eluição condizente, com a massa molar da forma dimérica da SMS (82 kDa). O pico 4

apresentou um perfil de eluição complexo na cromatografia de exclusão molecular (Figura 17B), e foi descartado.

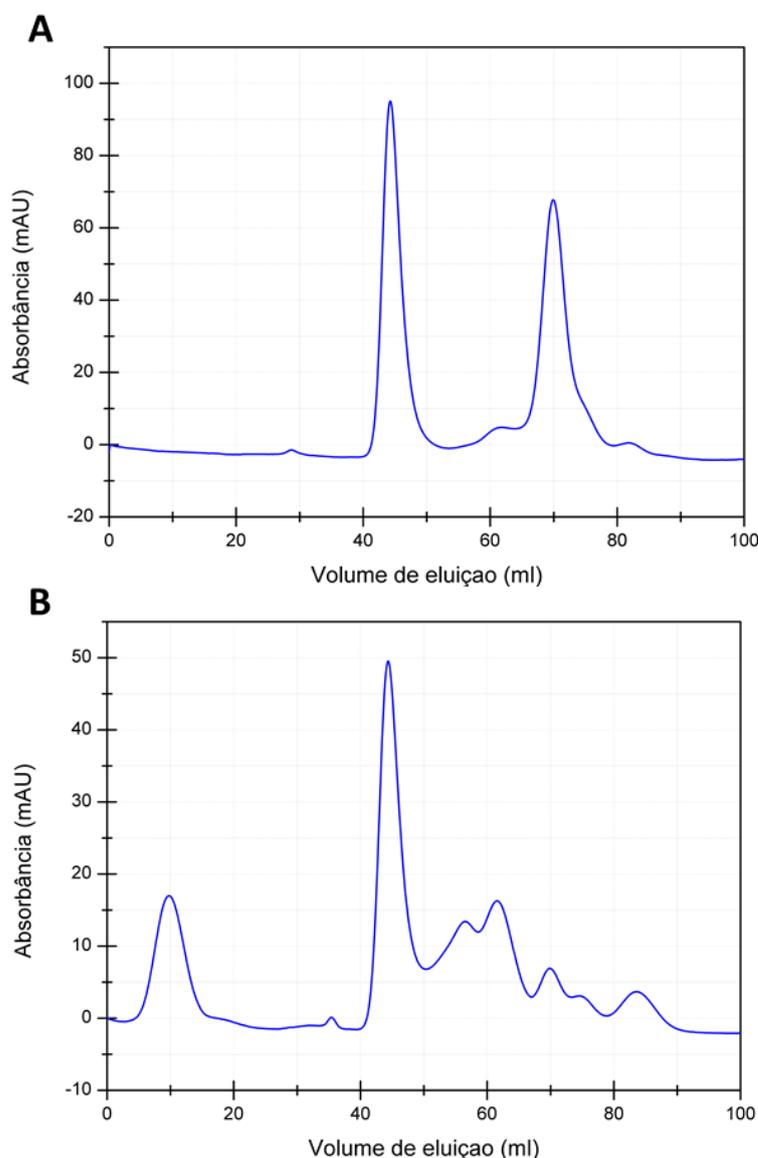


Figura 17: Purificação da SMS por cromatografia de exclusão molecular. **A:** Pico 3 da afinidade, que apresentou um pico de agregado próximo a 42 ml, e o pico correspondente à SMS pura, em 70 mL. **B:** Pico 4 da afinidade, que apresentou o pico de agregado próximo a 42 ml, mas também outros 5 picos encavalados, que foram descartados.

4.1.7.5 Termoforese em microescala

Para confirmar a interação *in vitro* da SMS com a MyoVa, marcamos a proteína SMS (com cauda 6xHis purificada por cromatografia de exclusão molecular) com a sonda RED-tris-NTA (NanoTemper Technologies), e a sua interação com o MyoVa-GTD *wt* foi detectada por termoforese em microescala. A curva de ajuste aos dados indica que a SMS forma um complexo com a MyoVa-GTD *wt* com uma constante de dissociação (K_d) de $3,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (figura 18), o que confirma que a SMS é uma proteína que se liga à MyoVa.

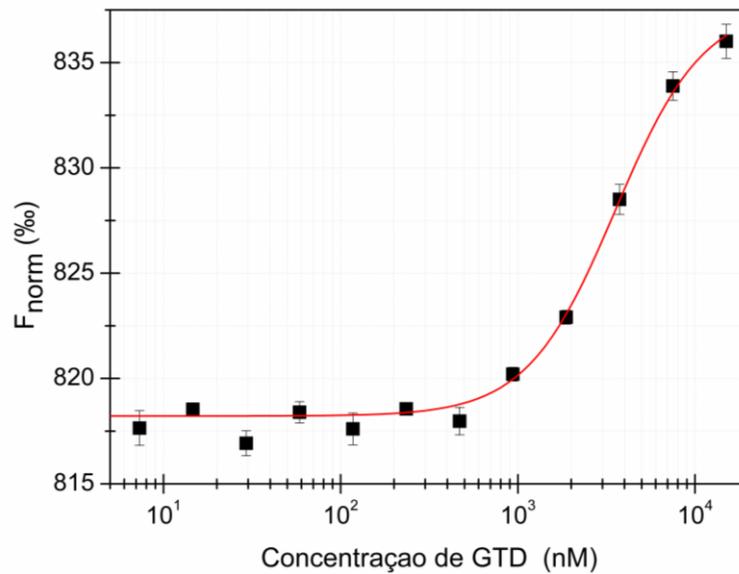


Figura 18: Experimento de MST, mostrando que a proteína SMS se liga ao MyoVa-GTD com uma $K_d = 3,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$

4.2 Biologia Celular

4.2.1 Imunocitoquímica

4.2.1.1 Localização celular

Com o intuito de validar *in vivo* as interações identificadas por duplo híbrido, foi analisada a distribuição celular das proteínas SMS e TC2N, junto com a MyoVa.

A dupla marcação da MyoVa e da SMS mostrou um padrão de localização celular para ambas as proteínas condizente com a literatura¹¹². Foi possível detectar a colocalização entre a MyoVa e a SMS em padrões pontuais discretos no citoplasma, tanto para células MCF-7 quanto para SH-SY5Y (Figura 19).

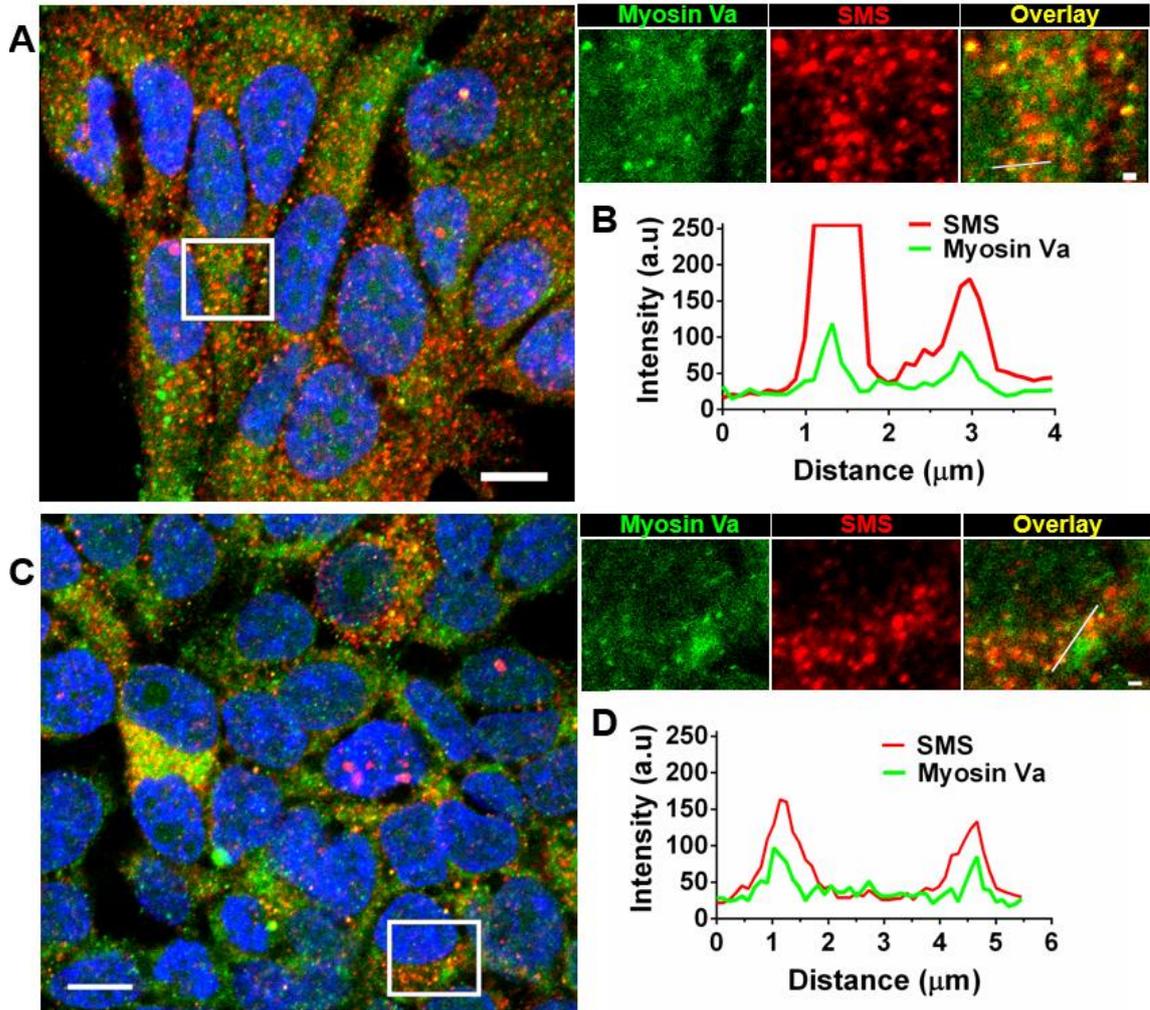


Figura 19: Imunocitoquímica mostrando a colocalização de MyoVa (verde) e SMS (vermelho) marcando em células MCF-7 (A e B) e SH-SY5Y (C e D). Em amarelo, as regiões de colocalização. B e D) *Linescan* de dois sítios representativos de colocalização. Barra de escala de 10 μm no campo e 1 μm no *zoom*.

A marcação da TC2N mostrou o padrão de localização nuclear já descrito¹²⁶, mas também um padrão citoplasmático. Assim como com a SMS, foi possível detectar a colocalização entre a MyoVa e a TC2N em padrões pontuais discretos no citoplasma, tanto para células MCF-7 quanto para SH-SY5Y (Figura 20).

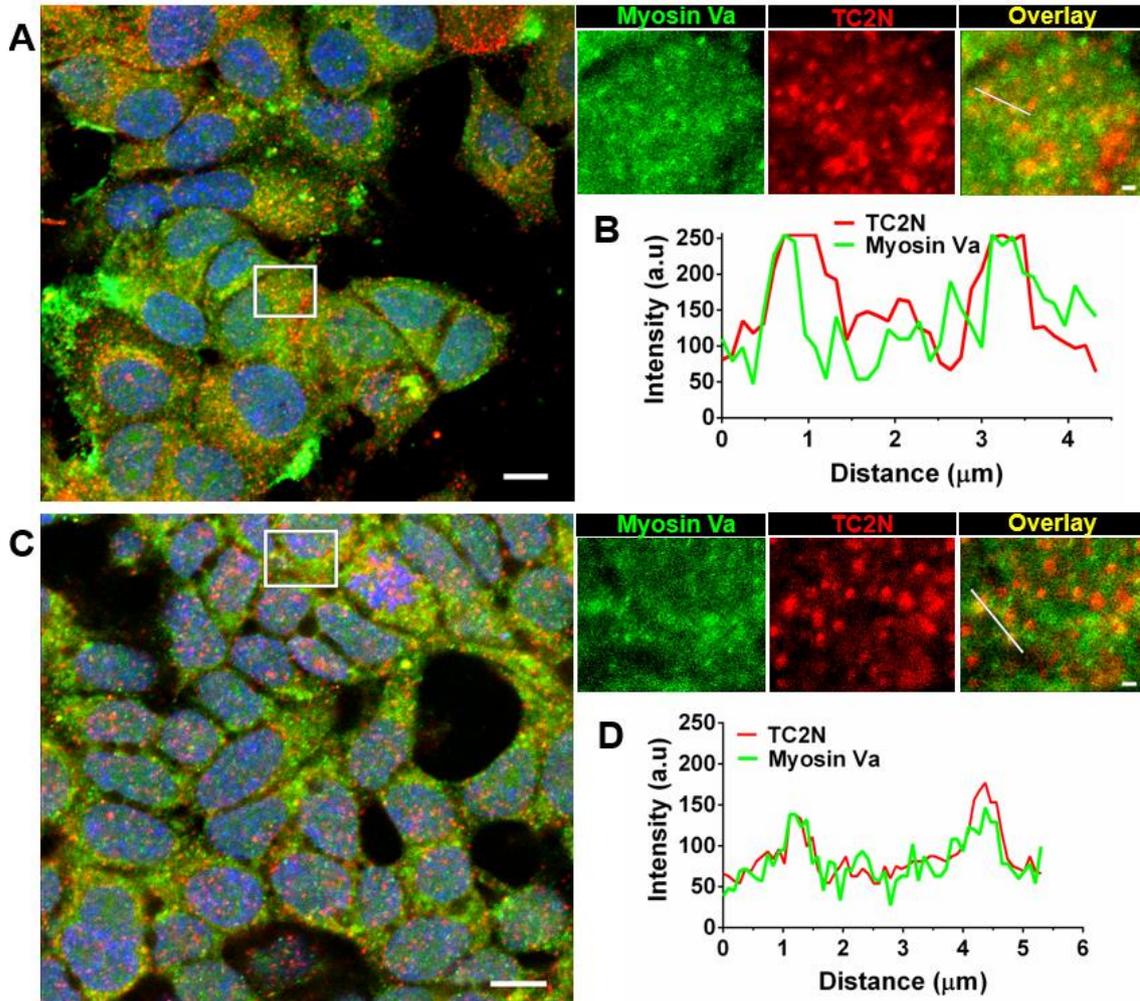


Figura 20: Imunocitoquímica mostrando a colocalização de MyoVa (verde) e TC2N (vermelho) marcando em células MCF-7 (A e B) e SH-SY5Y (C e D). Em amarelo, as regiões de colocalização. B e D) *Linescan* de dois sítios representativos de colocalização. Barra de escala de 10 μm no campo e 1 μm no *zoom*.

4.2.1.2 Silenciamento do gene *MYO5A*

Para entender se a presença da MyoVa é importante para as proteínas SMS e TC2N, foi realizado o silenciamento do gene *MYO5A*, a partir da técnica de siRNA. A queda do nível de expressão da MyoVa foi confirmada por qRT-PCR, mostrando uma diminuição de 85% nos níveis de mRNA para as células silenciadas, em comparação com o controle. Nelas foi possível ver uma variação no padrão de localização celular da SMS (Figura 21), que no controle apresentou uma localização com pontos bem definidos, e nas células silenciadas apresentou um padrão mais disperso, com uma menor intensidade de fluorescência (siCTRL intensidade SMS: 52 ± 3 kA.U N=72; siMYO5A intensidade SMS: 29 ± 1 kA.U N=39). O qRT-PCR mostrou uma queda de 50% na expressão do mRNA da proteína SMS, o que condiz com a diminuição de 44% na intensidade de fluorescência. Já para a proteína TC2N, não houve variação da taxa de expressão de seu mRNA, porém houve um aumento de 80% na

intensidade de fluorescência (siCTRL intensidade TC2N: 65 ± 3 ka.u. N=90; siMYO5A intensidade TC2N: 120 ± 6 ka.u. N=46) na célula silenciada para *MYO5A*, acompanhado de um aumento no número de pontos discretos de localização da TC2N.

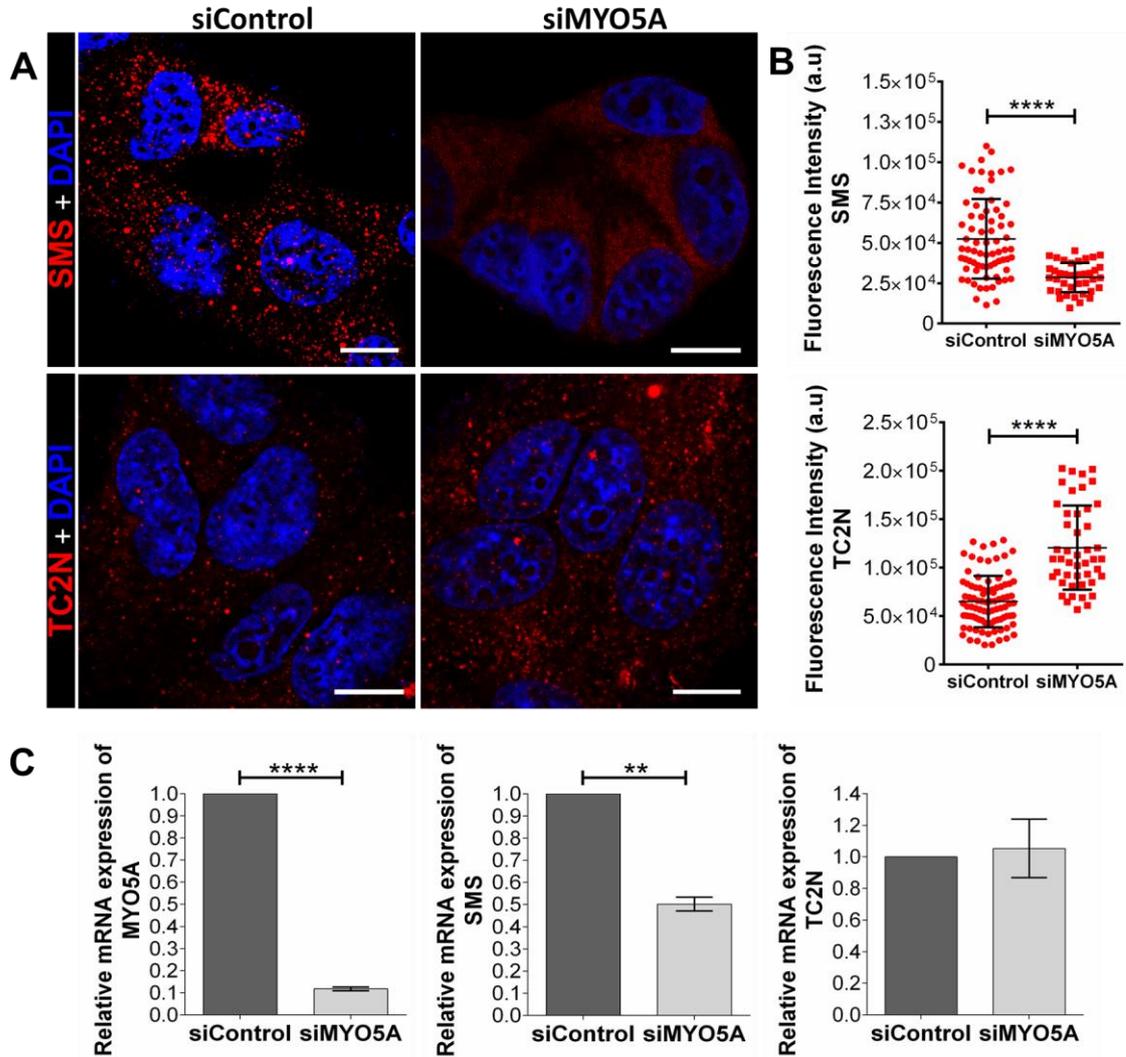


Figura 21: O Silenciamento do gene *MYO5A* afeta a distribuição celular de SMS e a concentração de TC2N em células MCF-7. A) Imunocitoquímica mostrando que a distribuição pontual discreta de SMS (siControl) se torna dispersa em células tratadas com siMYO5A (painel superior). Em células imunomarcadas para TC2N, observamos o acúmulo de pontos positivos para TC2N no citoplasma, causado pelo silenciamento de *MYO5A* (painel inferior). Escala: 10 μ m. B) Quantificação da intensidade de fluorescência dos sinais da SMS ou TC2N em células controle e silenciadas, feita no programa Icy BioImage. C) RT-PCR quantitativo indicando a expressão relativa de mRNA de *MYO5A*, SMS e TC2N nas células controles e silenciadas. O tratamento com siMYO5A foi efetivo em reduzir a expressão do mRNA *MYO5A* em 85%.

5 Discussão e Conclusões

5.1 A descoberta de novos possíveis parceiros de interação para a MyoVa

Apesar do experimento de duplo híbrido em levedura não fornecer pistas sobre a função da fosforilação do MyoVa-GTD, ele identificou quatro novos parceiros de interação para a MyoVa. Como já discutido, o experimento de duplo híbrido foi realizado em um sistema que apresenta uma menor taxa de falsos positivos em relação à sistemas tradicionais, e a lista obtida ainda foi curada *in silico* para a remoção de qualquer resultado duvidoso. Assim, identificamos quatro proteínas como parceiras da MyoVa: *Spermine Synthase* (SMS; Acesso NCBI: EAW98985); *WD repeat-containing protein 48* (WDR48; Acesso NCBI: EAW64548); *Tandem C2 Nuclear Protein* (TC2N; Acesso NCBI: EAW81464); e *Cold Shock Domain-containing protein E1, isoform 4* (CSDE1; Acesso NCBI: NP_001007554) (figura 22).

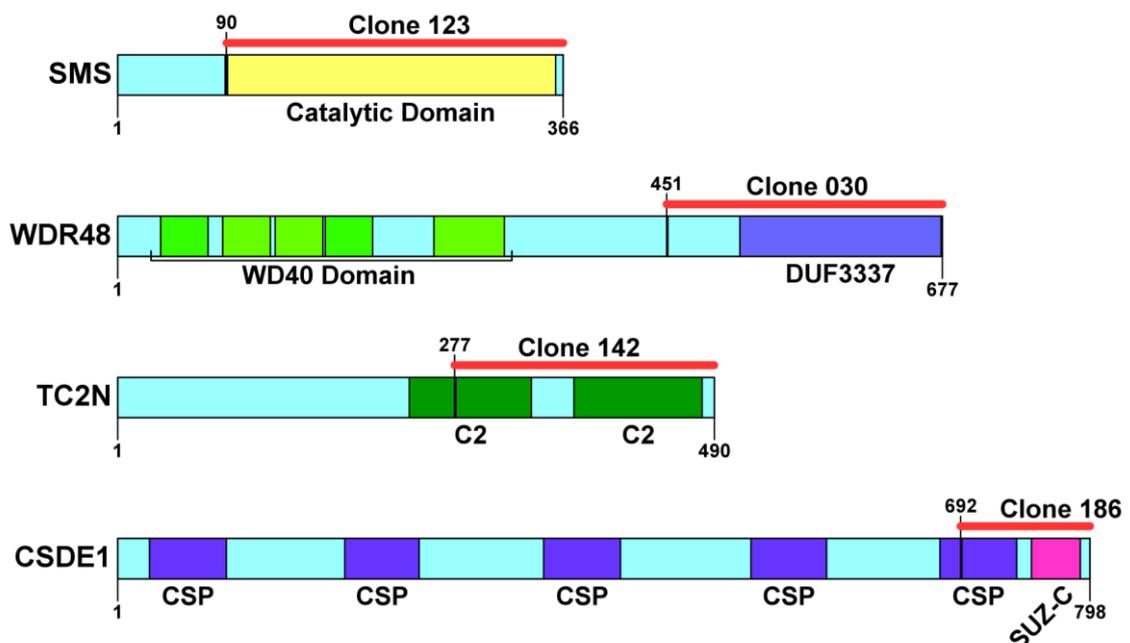


Figura 22: Potenciais proteínas parceiras da MyoVa. Representação esquemática da arquitetura de domínios dos novos parceiros. A barra vermelha indica as fronteiras da presa: Clone 123 = domínio catalítico da proteína Spermine Synthase (SMS; Acesso NCBI: EAW98985); clone 30 = domínio DUF 3337 da proteína WD repeat-containing protein 48 (WDR48; Acesso NCBI: EAW64548); clone 142 = segundo domínio C2 da proteína Tandem C2 Nuclear Protein (TC2N; Acesso NCBI: EAW81464); clone 186 = contém o domínio SUZ-C da cold shock domain-containing protein E1, isoform 4 (CSDE1; Acesso NCBI: NP_001007554). As figuras foram feitas utilizando dados do SMART^{110,111}, e o programa IBS^{129,130}.

5.1.1 WDR48

O clone 30 identificado no duplo híbrido continha o domínio DUF3337 (*domain of unknown function 3337*) da proteína WD repeat-containing protein 48 (WDR48). Proteínas da família WD apresentam uma unidade repetitiva altamente conservada que normalmente termina com os aminoácidos triptofano (W) e ácido aspártico (D)¹³¹ e apresentam uma estrutura de β -*propeller*¹³². A proteína WDR48, que também apresenta a estrutura de β -*propeller*¹³³, é uma proteína endosomal explorada pelo Herpesvirus saimiri recrutar proteínas Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) e receptores de células T para serem degradados no lisossomo^{134,135}. No núcleo, WDR48 forma um complexo de ubiquitinase com a proteína USP1, fundamental para o reparo de DNA^{133,136-138}. Visto que a MyoVa tem efeito sobre a mobilidade de vesículas endocíticas em células dendríticas¹³⁹, e também está presente no nucleosqueleto¹⁴⁰, nossa primeira evidência de interação entre a WDR48 e a MyoVa pode guiar estudos sobre seus potenciais papéis na desregulação de células T causada por infecções virais, e na integridade do genoma, além de fornecer pistas sobre a função do domínio DUF3337

5.1.2 CSDE1

O clone 186 continha o domínio SUZ-C da proteína *cold shock domain-containing protein E1* (CSDE1). A proteína CSDE1, também chamada de Urn (upstream of N-ras) é uma proteína com 5 domínios *cold shock*, que se liga a RNA e é necessária para o início da tradução do RNA do Rinovírus¹⁴¹, CSDE1 é um regulador pós-transcricional da expressão gênica¹⁴², que provavelmente está envolvido no *turnover* de mRNA^{127,143-145}. Além dos domínios *cold shock*, essa proteína contém um domínio SUZ-C, que são comumente encontrados na região C terminal de proteínas que se ligam a RNA, e aparentemente são necessários para o endereçamento dessas proteínas à regiões subcelulares específicas¹²⁸. A identificação desse domínio na presa pescada no duplo híbrido, junto com as crescentes – e recentes – evidências do papel da MyoVa na replicação do Rinovírus¹⁴⁶ e Citomegalovírus¹⁴⁷, e no transporte¹⁴⁸ e *turnover*²³ de mRNA, bem como a necessidade de uma proteína parceira da MyoVa para fazer a ponte entre ela e o mRNA fazem com que nossa descoberta pavimente o caminho para estudos que venham a confirmar essa interação, e a elucidar o papel da MyoVa na infecção viral e no transporte de mRNA.

5.1.3 TC2N

O clone 142 continha o segundo domínio C2 da proteína *Tandem C2 Nuclear Protein* (TC2N), uma proteína nuclear de função desconhecida¹²⁶. Nós escolhemos nos aprofundar nos estudos dessa proteína por causa dos domínios C2 presentes nela, já que existem crescentes evidências de que proteínas com domínios C2 recrutam MyoVa^{62,63,83,149}, e por causa da sua correlação com a variação das concentrações plasmáticas dos fatores de von Willebrand (vWF)¹⁵⁰. Apesar dessa correlação não estar bem descrita, é interessante considerar que já foi demonstrada a função da MyoVa em regular a secreção desses fatores por células endoteliais, interagindo com as proteínas MyRIP e Rab27a¹⁵¹.

Para aprofundarmos o estudo dessa interação, realizamos experimentos de imunocitoquímica e silenciamento gênico da *MYO5A*. Nossos resultados de imunomarcagem (figura 20) mostraram a existência de pontos discretos de colocalização entre MyoVa e TC2N no citoplasma. O silenciamento do *MYO5A* (figura 21) não afetou a taxa de expressão do mRNA de TC2N, e foi possível ver um aumento na quantidade de pontos TC2N-positivos no citoplasma, que correspondeu a um aumento de 80% na intensidade de fluorescência da proteína TC2N. Tais resultados indicam um papel da MyoVa no endereçamento correto, secreção ou reciclagem desses subcompartimentos. Por fim, juntamos evidências experimentais independentes (duplo híbrido e imunocitoquímica) de que a MyoVa é capaz de interagir com a TC2N. Com a descoberta dessa interação abrimos portas para estudos que visem entender a função proteína TC2N, e também o papel histológico de sua interação com a MyoVa.

5.1.4 SMS

Finalmente, o clone 123 continha o domínio catalítico da enzima *spermine synthase* (SMS). Essa enzima tem atividade aminopropiltransferase¹⁵² convertendo a espermidina em espermina (EC 2.5.1.22)^{106,153,154}. A espermina é uma poliamina que atua como um segundo mensageiro da neurotransmissão, se ligando a receptores da membrana pós sináptica¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Nós decidimos focar nossos estudos nessa interação pois defeitos no gene *SMS* causam a síndrome de Snyder-Robinson¹⁵⁸, caracterizada por problemas de desenvolvimento, como deficiência intelectual, convulsões e hipotonia muscular^{125,158-161}, que compartilham semelhança aos problemas de neurodesenvolvimento presentes na síndrome de Elejalde^{72,75}, causada por mutações no gene *MYO5A*⁷⁷ cujos mecanismos moleculares ainda não foram totalmente compreendidos.

Conseguimos expressar e purificar SMS para realizar o experimento de termoforese em microescala, que mostrou sua capacidade de ligar no MyoVa-GTD da MyoVa com uma constante de dissociação na faixa do micromolar, semelhante à outras interações do MyoVa-GTD⁶³. Assim como para a TC2N, realizamos experimentos de imunocitoquímica que comprovam a existência de ambas proteínas juntas em pontos discretos no citoplasma, indicando que a interação descoberta no duplo híbrido, e confirmada *in vitro* pela termoforese, pode ocorrer nas duas linhagens celulares testados. Além disso, pudemos observar que o silenciamento do *MYO5A* causou um rearranjo da distribuição celular da SMS, que saiu de uma localização discreta no citoplasma para uma localização mais dispersa, nos levando a concluir que a MyoVa é fundamental para a correta localização da SMS. O silenciamento do *MYO5A*, que diminuiu em 85% a taxa de expressão do seu mRNA, causou uma queda de 44% na intensidade de fluorescência do sinal da SMS. A queda de 50% da concentração de mRNA da *SMS* explica a redução da intensidade de fluorescência da SMS, porém, apenas com os resultados obtidos, não é possível dizer se essa queda foi por um efeito regulatório relacionado à MyoVa, ou à nova distribuição celular da SMS, ou um efeito *off target* da técnica de siRNA.

Estudos recentes indicam que a síndrome de Snyder-Robinson^{125,161,162} não é apenas causada pela ausência da atividade da SMS, mas também por uma redução dessa atividade, desregulando o equilíbrio entre as poliaminas da célula. O dado de que o silenciamento de *MYO5A* (sendo extrapolado para a situação da síndrome de Elejalde) afeta a distribuição e a concentração de SMS intracelular, juntos com resultados recentes que indicam uma diminuição nas concentrações de ambas SMS e MyoVa em células cerebrais de pacientes com a doença de Huntington, outra doença neurológica¹⁶³, corrobora a suposição de que uma das causas dos efeitos neuronais dessas doenças seja a desregulação do equilíbrio da concentração de poliaminas em neurônios.

6 Perspectivas Futuras

Nossos resultados indicam possíveis novas funções para a MyoVa, relacionando ela com processos de infecção viral, transporte e *turnover* de RNAs, processos secretórios, e doenças neurológicas. Dos quatro novos parceiros identificados, as interações com as proteínas WDR48 e CSDE1 (relacionadas com infecção viral, transporte e *turnover* de RNAs) precisam ser validadas por métodos celulares, como co-imunoprecipitação, PLA (*proximity ligation assay*), GST-pulldown, ou FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), e, caso confirmadas, abrirão portas para estudos que venham a entender o seu papel nesses processos celulares. A possível interação identificada com a proteína TC2N adiciona mais peças à hipótese de que domínios C2 podem atuar como módulos de interação com miosinas, pavimentando a possibilidade de realizar estudos baseados nesse tipo de interações, como duplos híbridos em levedura contra bibliotecas de proteínas com domínios C2, ou coisas semelhantes.

Por fim, a curiosa interação entre a MyoVa e a enzima reguladora de poliaminas, SMS, abrem portas para estudos que busquem confirmar – ou descartar – o papel da MyoVa na regulação desses segundos mensageiros da neurotransmissão, e com isso gerar correlações mais fortes entre as causas dos problemas neuronais em algumas doenças neurodegenerativas. Um próximo passo nesse estudo (além certamente de outros experimentos que comprovem essa interação, como os mencionados acima) poderia ser a replicação dos experimentos de silenciamento do gene *MYO5A*, utilizando outros sistemas de redução de níveis de expressão, como shRNA, ou os novos métodos desenvolvidos com o sistema CRISPR/Cas9, e monitorar não só o comportamento da SMS, mas também as concentrações das poliaminas. Além da quantificação e monitoramento da MyoVa, da SMS e das poliaminas no cérebro de camundongos modelo para essas doenças, como o camundongo *dilute*, que poderia produzir uma forte evidencia dessa relação.

PARTE 2

**Estudos biofísicos sobre a fosforilação
da serina 1652 da Miosina Va**

7 Resultados

7.1 Purificação e Ensaio de Cristalização do MyoVa-GTD-EE

7.1.1 Primeiro Protocolo de Purificação

7.1.1.1 Cromatografia de afinidade

Com o intuito de obter amostras para ensaios de cristalização, foi feita a expressão e purificação da MyoVa-GTD-EE. Durante a cromatografia de afinidade, o mutante fosfomimético, MyoVa-GTD-EE, começou a eluir com 27% de tampão B (referente a 150 mM de imidazol). Nesse momento, o gradiente foi fixado em 27% B até a eluição completa do pico (figura 23). Todas as amostras com absorvância a 280 nm maior que 750 mAU (metade da altura do pico) foram agrupadas e utilizadas na próxima etapa de purificação.

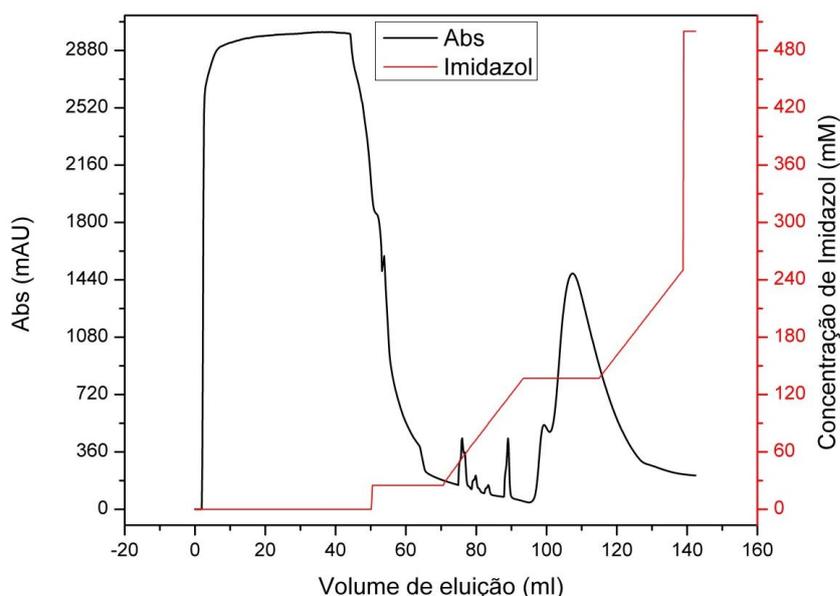


Figura 23: Cromatograma da purificação por afinidade. Em preto a absorvância a 280 nm, e, em vermelho, a concentração de tampão B ao longo das etapas de injeção da amostra (0%), lavagem (5%) e eluição (gradiente de 5 até 50%, com um degrau em 27%).

7.1.1.2 Cromatografia de exclusão molecular

Dando continuidade ao processo de purificação foi feita a cromatografia de exclusão molecular. O MyoVa-GTD-EE eluiu da coluna em 73 mL (figura 24). Esse volume de eluição é muito próximo ao observado para o MyoVa-GTD nativo e duplo AA, indicando que a mimetização da carga negativa do grupo fosforila não induz mudanças no estado oligomérico desse domínio.

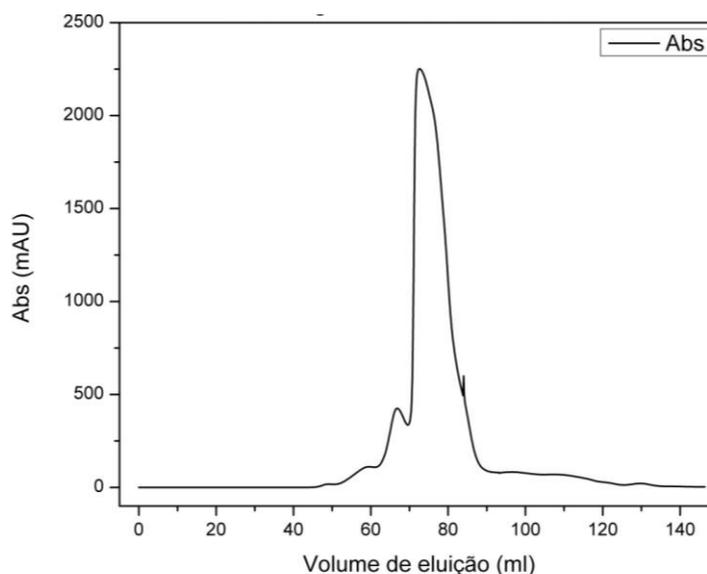


Figura 24: Cromatograma da purificação por exclusão molecular. Absorbância a 280 nm acompanhando a eluição da proteína.

Frações com absorvância a 280 nm maior que a metade da altura do pico, ou seja, maior que 1100 mAU, foram de agrupadas, uma alíquota foi separada para análise por SDS-PAGE e DLS, e o restante foi concentrado e enviado para ensaios de cristalização.

7.1.1.3 DLS

A amostra separada para controle de qualidade foi analisada por DLS e apresentou uma população com raio hidrodinâmico médio de 3,9 nm, o que indica que o MyoVa-GTD-EE mantém a forma monomérica, assim como a proteína selvagem. Também se observou uma polidispersão de 16,9%, indicativo de monodispersão, isto é, com baixa formação de agregados, característica desejável para amostras submetidas a ensaios de cristalização.

7.1.2 Ensaios de Cristalização

A amostra proveniente da cromatografia de exclusão molecular foi concentrada para concentrações que variaram entre 10 e 20 mg/mL e utilizadas para ensaios de cristalização utilizando kits comerciais. Observou-se, como condição mais promissora, uma gota na proporção 1:2 (0,5 μ L de proteína e 1 μ L de condição do poço), com a proteína a 16 mg/mL, na condição 24% de PEG400 e 0,2 M de CaCl_2 , com a placa mantida a 18 $^{\circ}$ C (Figura 25).

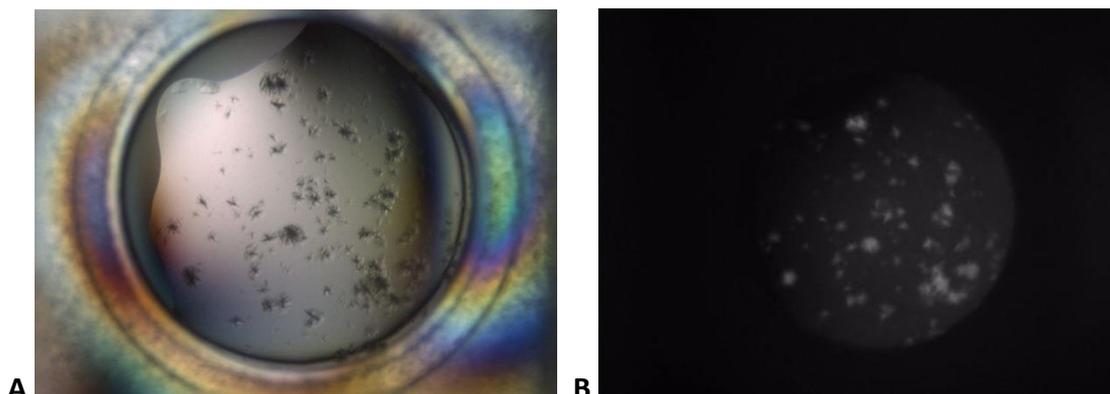


Figura 25: Melhor condição obtida nos primeiros ensaios de cristalização. A: 24% PEG400 e 0,2 M de CaCl_2 , gota inicialmente clara apresentou o surgimento de cluster de agulhas após 22 dias de equilíbrio. B: Foto U.V. da mesma gota, mostrando que os cristais são de proteína, e não de sais.

Os cristais presentes na condição foram identificados como cristais 1D, também conhecidos como agulhas, e além disso, apresentaram *clusterização*, ou seja, cresceram grudados uns nos outros, não sendo adequados para os experimentos de difração de raios X. Na tentativa de melhorar esses cristais, foram definidas três propostas de refinamento:

- Variação de pH, de 0,3 em 0,3 unidades;
- Variação da concentração de PEG400.
- Variação do íon divalente na solução (Cálcio, Magnésio, Manganês, Cobalto, Cadmio e Zinco).

7.1.2.1 Refinamento

A análise das gotas do refinamento mostrou que pHs menores do que 6, independente das concentrações de PEG400 e sal, causaram a precipitação rápida da proteína (figura 26A). A presença dos íons cobalto, cadmio e zinco causaram a desnaturação da proteína, e, conseqüentemente, sua precipitação (figura 26B).

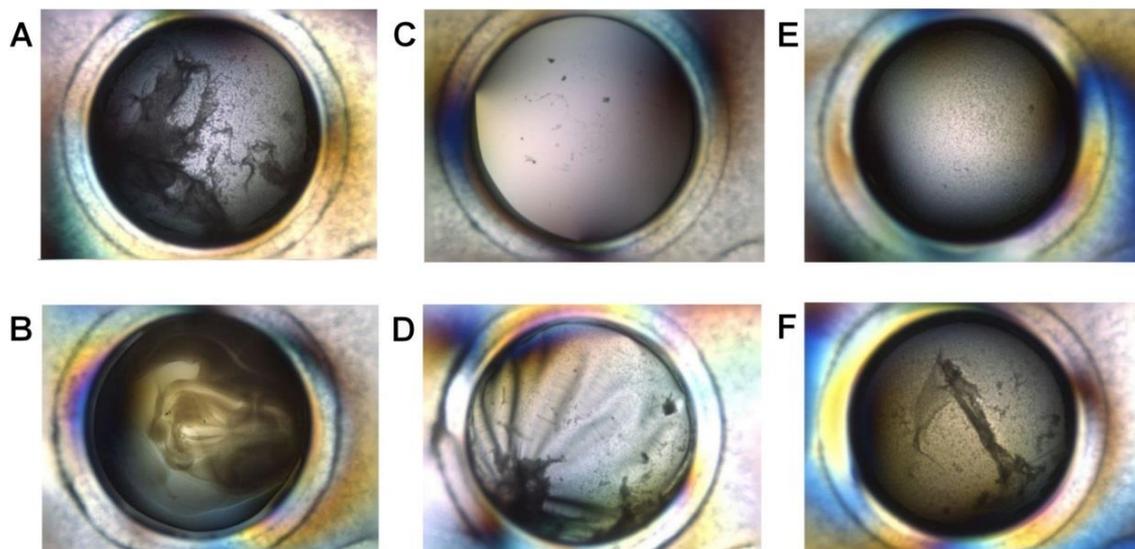


Figura 26: Refinamento das condições de cristalização. A: Condição com 24% de PEG400, 0,2 M de CaCl_2 e tampão 0,1 M de Citrato de Sódio, pH 6, apresentando um precipitado. B: Condição com 24% de PEG400, 0,2 M de CdCl_2 , com a proteína precipitada por desnaturação. C: Condição com 22,6% de PEG400, 0,2 M de CaCl_2 e tampão 0,1 M de BIS-TRIS propano, pH 8,4, com uma gota praticamente clara. D: Condição com 23,4% de PEG400, 0,2 M de MgCl_2 , apresentou a formação de pele, além de um precipitado granular. E: Condição com 24% de PEG400, 0,2 M de CaCl_2 e tampão 0,1 M de BIS-TRIS propano, pH 8,4, apresentando uma formação leve de precipitado granular. F: Condição com 22,6% de PEG400, 0,2 M de CaCl_2 , que apresentou apenas precipitados granulares e alguns amorfos.

Nas demais condições do refinamento observaram-se a presença de gotas claras (figura 26C), formação de “pele”, que é uma precipitação proteica na interface entre a gota e o ar, com precipitação granular (figura 26D) formação leve de precipitado granular (figura 26E), e precipitados granulares e amorfos (figura 26F).

Ao longo desses refinamentos não foi possível reproduzir os resultados observados na condição original, o que gerou uma discussão sobre o protocolo utilizado para a purificação do MyoVa-GTD-EE, indicando uma possível heterogeneidade que potencialmente causou a falta de reprodutibilidade.

Apesar da polidispersão medida por DLS ser menor que 20%, indicativo que a amostra submetida aos primeiros ensaios de cristalização estava monodispersa, os resultados desses ensaios não foram promissores, pois não apresentaram reprodutibilidade nos refinamentos. Esses resultados, somado à presença de uma deformidade no padrão gaussiano da curva na figura 5, que sugere uma população heterogênea sendo eluída, nos fez pensar na necessidade de remover a cauda de 6xHis, e adicionar uma nova etapa de purificação ao protocolo, o que deu origem ao segundo protocolo de purificação.

7.1.3 Segundo protocolo de purificação.

7.1.3.1 Cromatografia de afinidade

Visando aumentar a homogeneidade estrutural da amostra, o protocolo de purificação da MyoVa-GTD-EE foi adaptado. A etapa de cromatografia de afinidade foi feita conforme anterior. As alíquotas que apresentaram uma absorbância a 280 nm maior do que meia altura máxima foram selecionadas para serem analisadas por DLS.

Com os resultados da análise por DLS (tabela 9) foi possível determinar de maneira mais rigorosa quais amostras seriam agrupadas para dar continuidade ao processo de purificação. Como pode ser visto na tabela 9, existe uma certa variabilidade na polidispersão entre as frações, reforçando a hipótese da heterogeneidade da amostra. Desta forma, foram selecionadas as frações 15, 16, 17, 18 e 19, pois elas apresentavam uma baixa polidispersão, além de um raio hidrodinâmico semelhante.

Tabela 9: Raio hidrodinâmico e polidispersão das amostras provenientes da cromatografia de afinidade por metal imobilizado.

Fração	Raio (nm)	Polidispersão (%)
11	3,9	41
12	4,5	16,5
13	3,9	32,1
14	4,1	24,3
15	4,5	13,2
16	4,2	24,6
17	4,5	18,4
18	4,5	14,4
19	4,5	13,1
20	4,3	23,9
21	4,1	27,7
22	4,2	27,3

7.1.3.2 Cromatografia de troca iônica

Após a remoção da cauda de 6xHis, a amostra foi submetida a uma cromatografia de troca iônica. O padrão de eluição do MyoVa-GTD-EE durante a cromatografia de troca iônica apresentou dois picos bem definidos, com 300 mAU e 1100 mAU, além de uma subpopulação que não interagiu com a coluna (figura 27). A presença dessas três subpopulações reforça a hipótese de heterogeneidade conformacional e indica o sucesso dessa etapa cromatográfica na obtenção de uma população mais homogênea. A análise por DLS e por SDS-PAGE (tabela 10 e figura 28, respectivamente) determinou quais frações iriam seguir para a próxima etapa de purificação.

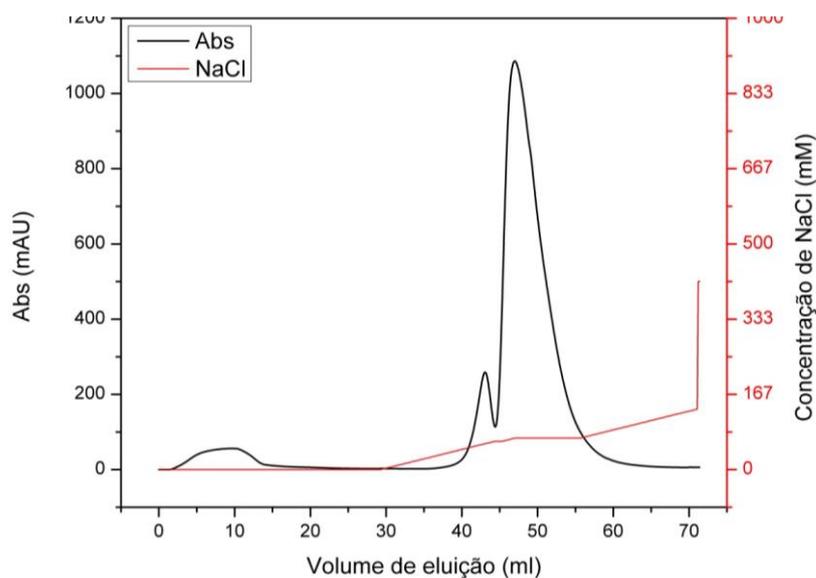


Figura 27: Cromatograma da troca-iônica. Em preto a Absorbância a 280 nm, e em vermelho a concentração de tampão TB ao longo das etapas de injeção da amostra (0%), lavagem (0%) e eluição (gradiente de 0 até 15%, com degrau em 8,4%).

Tabela 10: Raio hidrodinâmico, volume de eluição e polidispersão das amostras provenientes da cromatografia de troca iônica estimados por DLS.

Fração	Raio (nm)	Polidispersão (%)
25	3,6	19
26	3,5	26
27	4,3	11
28	4,2	8,7
29	4	17
30	4,1	6
31	3,8	18,4

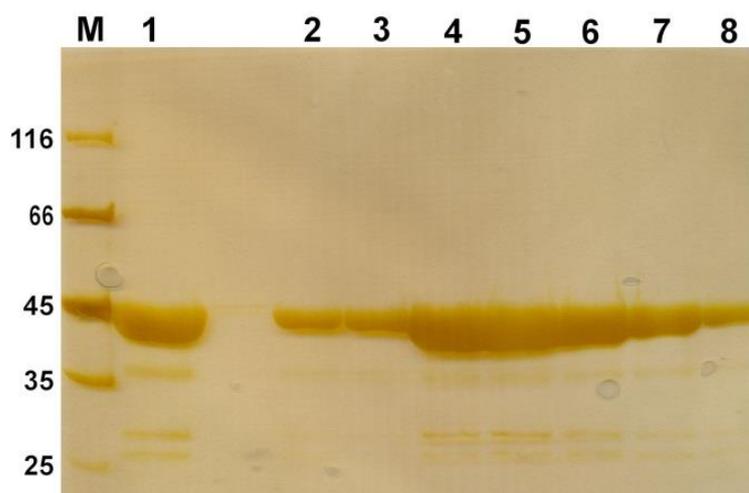


Figura 28: SDS-PAGE de frações da troca-iônica corado com prata. Em 1 a amostra aplicada na coluna. De 2 a 8 as etapas de eluição, referentes às frações 25 a 31.

As frações 25 e 26 (colunas 2 e 3 do SDS-PAGE) representam o primeiro pico que foi eluído, que apesar de apresentar a mesma massa molecular do MyoVa-GTD-EE, resultou em um raio hidrodinâmico menor e uma polidispersão maior, o que provavelmente representa um problema de heterogeneidade estrutural. Já existe no grupo um histórico de proteínas puras no ponto de vista químico apresentarem heterogeneidade estrutural de diversas origens (agregação, misfolding, múltiplas conformações, ...) e isto prevenir a obtenção de cristais adequados à difração ou culminar na irreprodutibilidade experimental. Diante disso, para dar continuidade à última etapa de purificação foram selecionadas as amostras referentes às frações 27 a 30 (colunas 4 a 7 do SDS-PAGE), por apresentarem uma polidispersão baixa e um raio hidrodinâmico médio semelhante.

7.1.3.3 Cromatografia de exclusão molecular

Como podemos observar no cromatograma da purificação por exclusão molecular (figura 29), a proteína foi eluída em um pico simétrico, sem a deformidade que era observada na cromatografia de exclusão molecular do primeiro protocolo de purificação. Isto indica que os passos adicionais de purificação aliados a um rigoroso controle de distribuição populacional levaram a obtenção de uma amostra com qualidade superior tanto no ponto de vista químico como estrutural. Novamente as frações que tiveram uma absorbância a 280 nm maior do que a meia altura máxima foram selecionadas para análise por DLS e SDS-PAGE (tabela 11 e figura 30).

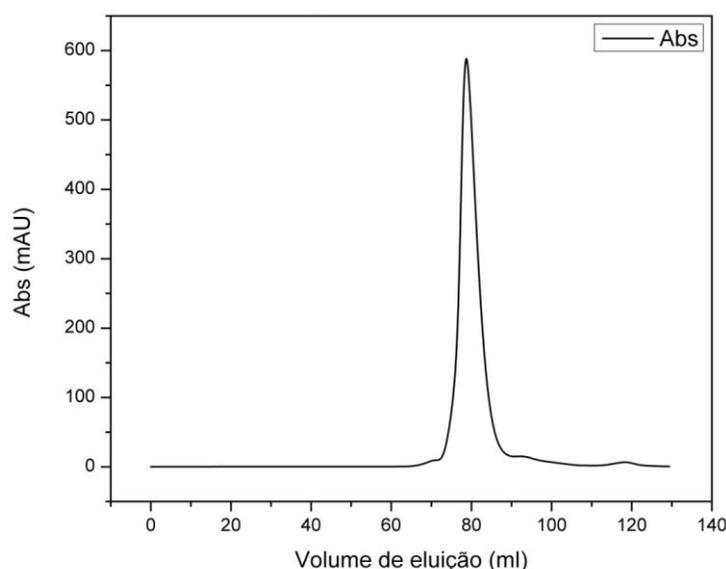


Figura 29: Cromatograma da exclusão molecular. Absorbância a 280 nm, mostrando que a proteína foi eluída em um pico simétrico, em uma coluna superdex 200 16/60.

Tabela 11: Raio, volume de eluição e polidispersão das amostras provenientes da cromatografia de exclusão molecular.

Fração	Raio (nm)	Polidispersão (%)
26	3,6	17,8
27	3,9	10,4
28	3,9	9,4
29	4	7,2
30	3,8	11,5
31	3,7	11,9
32	3,6	13

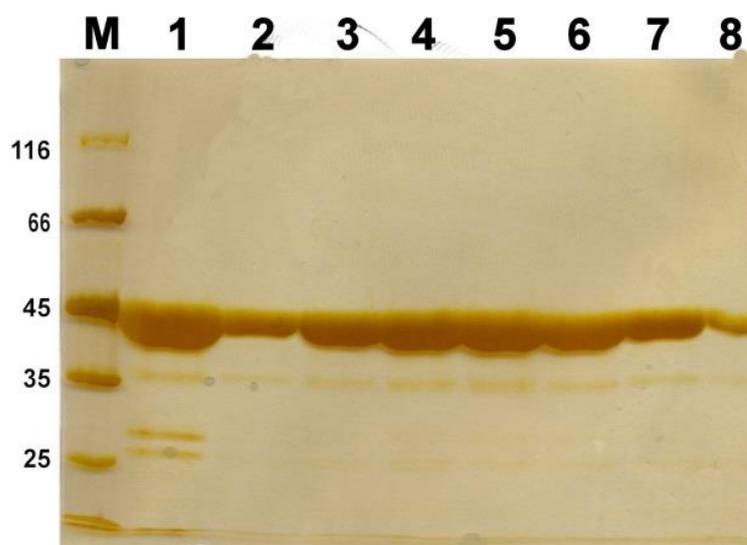


Figura 30: SDS-PAGE de frações da cromatografia de exclusão molecular. Em 1 a amostra aplicada na coluna. De 2 a 8 as etapas de eluição, referentes aos poços 26 a 32.

Analisando os resultados de DLS e SDS-PAGE podemos notar que além de se encontrar em um elevado grau de pureza, a proteína mostrou uma homogeneidade em reação ao raio de Stokes medido por DLS (tabela 11 e figura 30). Além disso, houve uma queda na polidispersão da amostra, que, em relação ao outro protocolo de purificação, caiu de 16,9% para uma média de 10% nesse novo protocolo, representando uma redução absoluta de 40% da polidispersão da amostra, mostrando que a adição de uma nova etapa ao protocolo de purificação foi capaz de resolver (ou pelo menos amenizar) a questão da heterogeneidade estrutural. Por fim, para os ensaios de cristalização, foram selecionadas as amostras 27 a 31 (colunas 3 a 7 do SDS-PAGE).

7.1.4 Novos Ensaios de Cristalização

7.1.4.1 Varredura inicial

Com uma amostra mais homogênea, fizemos novos ensaios de cristalização em gota sentada com kits iniciais, utilizando os kits *Crystal Screen 1 e 2* (Hampton Research) e *Wizard Screens I e II* (Emerald). A condição mais promissora ocorreu em uma gota (figura 31) com a proporção 1:0,7:0,3 (1 μ l de proteína, 0,7 μ l de solução de cristalização e 0,3 μ l de sementes), com a proteína a 13 mg/ml, as sementes na diluição 1:50 e a condição do poço contendo 20% PEG3000, 0,2 M acetato de cálcio e tampão TRIS 0,1 M, pH7 (condição F6 do kit *Wizard Screens I e II* da Emerald).

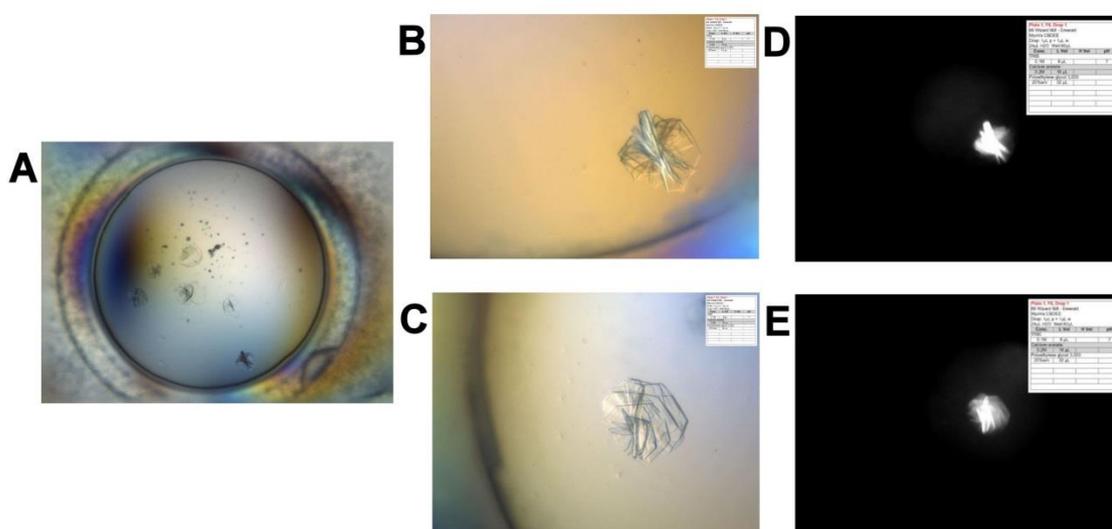


Figura 31: A: Condição F6 do *Wizard Screens I e II* (Emerald), com a formação de cristais 2D. B e C: Zoom nos dois *clusters* de cristais 2D, com luz polarizada. D e E: representam os *clusters* de B e C, vistos com luz U.V.

7.1.4.2 Refinamentos

Com base nessa condição foram feitos 4 refinamentos:

- Utilização de Kits de Refinamento baseados em aditivos *Additive Screen HT* e *Silver Bullets* (Hampton Research);
- Variação da composição e concentração do sistema tamponante;
- Variação fina da concentração de PEG, junto com variação da massa molecular do PEG utilizado;
- Variação da concentração do sal, remoção do sal e variação fina do pH;

Os melhores resultados foram obtidos no refinamento baseado na variação da massa molecular do PEG utilizado (figura 32), estratégia elaborada baseada nas discussões do capítulo 7 do livro *Crystallization of Biological Macromolecules* (Cold Spring Harbor

Laboratory Press) de Alexander McPherson, onde são apresentadas diversas abordagens não usuais para a otimização da condição de cristalização.

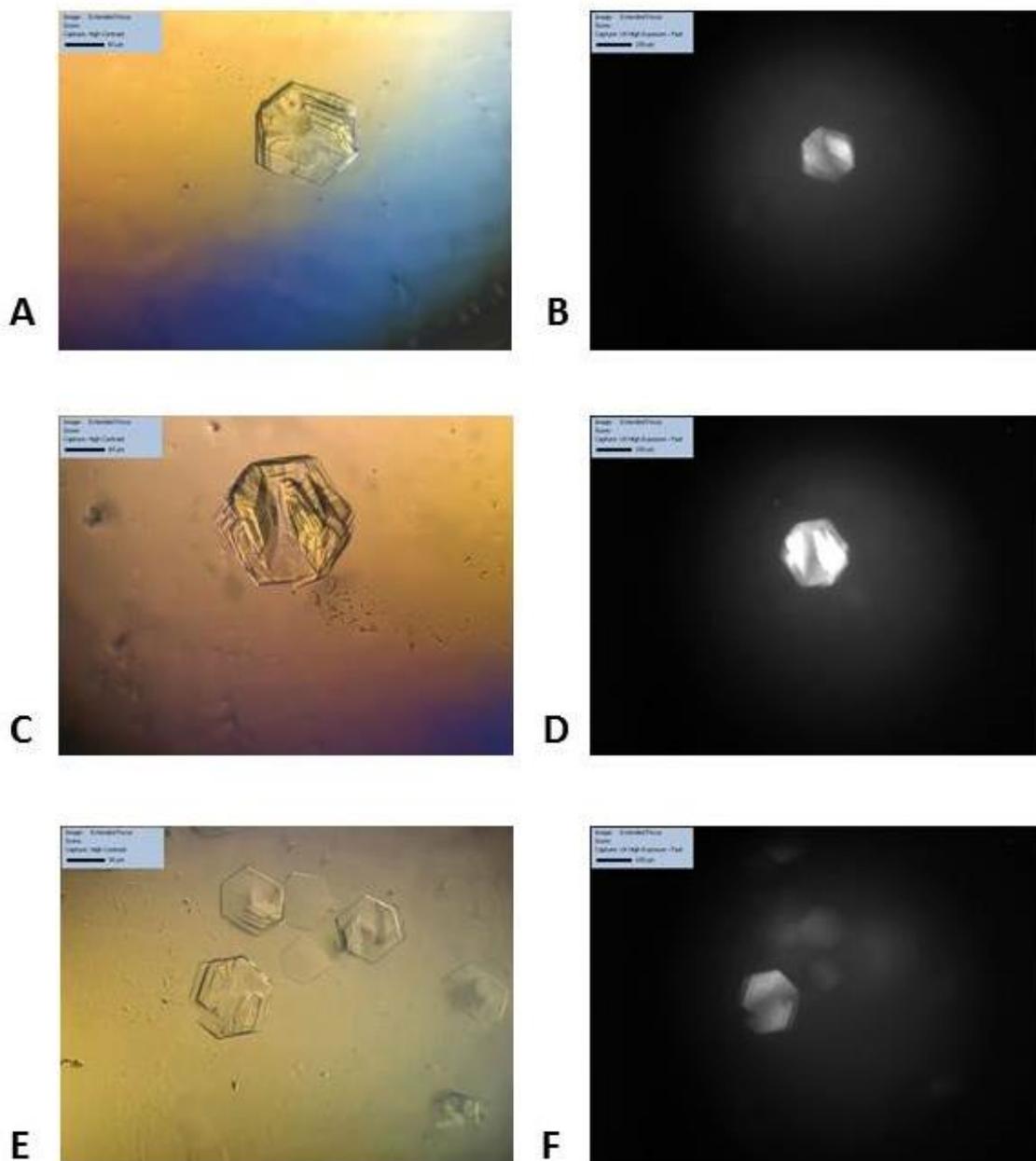


Figura 32: Melhores resultados dos refinamentos. A: Formação de cristais 2D com princípio da formação de *clusters*, condição contendo 18,5% PEG3350, além dos outros componentes da gota, que não foram variados nesse refinamento. C: Formação de cristais 2D semelhantes à condição anterior, ligeiramente maior, condição com 19% PEG3350. E: Formação de cristais 2D sozinhos, além de cristais em diversas etapas da formação de *clusters*, condição com 19,5% PEG4000. B, D e F são fotos com luz U.V. das regiões apresentadas em A, C e E, confirmando que os cristais são de proteína.

Todos os resultados apresentaram cristais 2D, e em muitos deles houve a formação de *clusters*, tanto com placas sobrepostas como com placas perpendiculares, semelhantes às

apresentadas na Figura 32. B. Estes foram os melhores resultados obtidos, e a presença de cristais únicos permitiu os testes de difração de raios X.

7.1.5 Difração de raios X

Apesar dos cristais obtidos não serem ideais para a coleta de dados de difração na linha de luz W01B-MX2 do LNL, por serem muito finos, eles foram submetidos aos primeiros testes. Durante a montagem destes nos laços em bases magnéticas foi possível observar que estes cristais eram demasiadamente frágeis, de modo que ao primeiro contato com o laço, eles se quebravam. Apesar disso, foi possível montar os fragmentos cristalinos, apresentando um padrão de difração a baixa resolução, com reflexões bem definidas abaixo de 13 Å de resolução (Figura 33A). Além disso, os espaçamentos no espaço recíproco confirmam que seja um arranjo cristalino de proteínas com um dos eixos da cela unitária com 170,6 Å (Figura 33B) de acordo com as medidas de distâncias entre as reflexões em uma mesma direção. Assim como na linha de luz W01B-MX2, não foi possível obter padrões de difração à maiores resoluções na linha BL13-XALOC do ALBA.

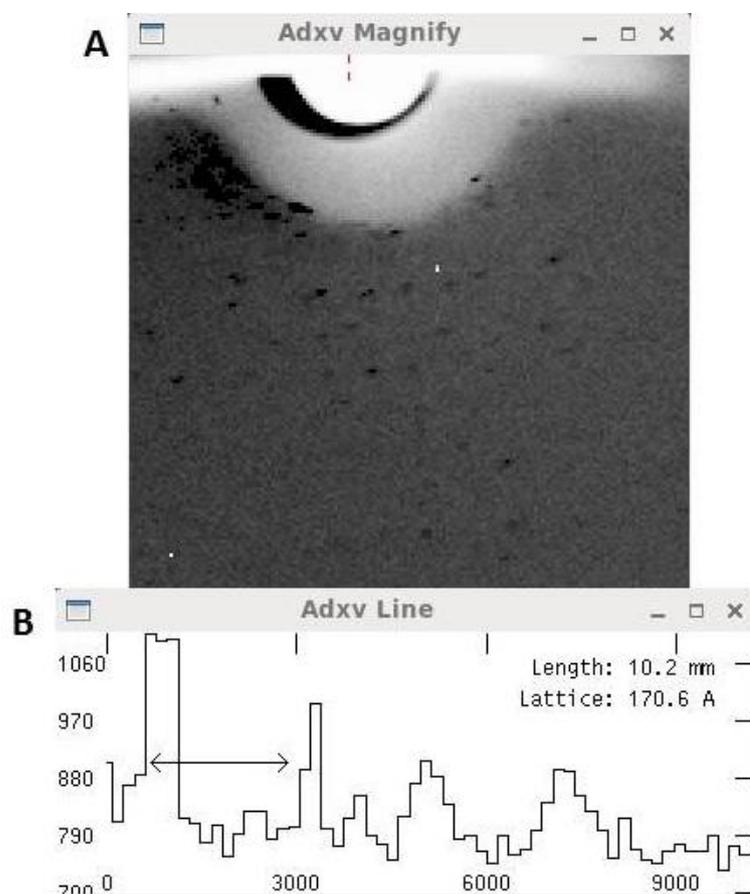


Figura 33: Resultados da difração. A: Padrão de difração obtido, mostrando reflexões bem definidas para resoluções de até 13 Å. B: Análise do padrão de difração, identificando o tamanho de um dos eixos da célula unitária como 170,6

Å, diferente da célula unitária dos cristais utilizados para resolver a estrutura do MyoVa-GTD *wt*, que tinham seus eixos a, b, c em 57,75 Å; 79,42 Å; e 94,28 Å⁶⁴.

7.2 Caracterizações Biofísicas

7.2.1 Crosslinking químico

Diante das dificuldades dos estudos estruturais por métodos clássicos, optamos por empregar distintas abordagens para uma análise integrada que visa elucidar onde o *fosfo-loop* estaria interagindo na superfície do MyoVa-GTD. Neste sentido, conduzimos estudos por *cross-link* associado à espectrometria de massas. Para isso, foi feita uma reação de *cross-link* utilizando-se o espaçador DSS, que foi confirmada por SDS-PAGE (figura 34). A banda referente às proteínas onde o DSS se ligou intramolecularmente (~ 45 kDa) foi cortada do gel, digerida e analisada por espectrometria de massas.

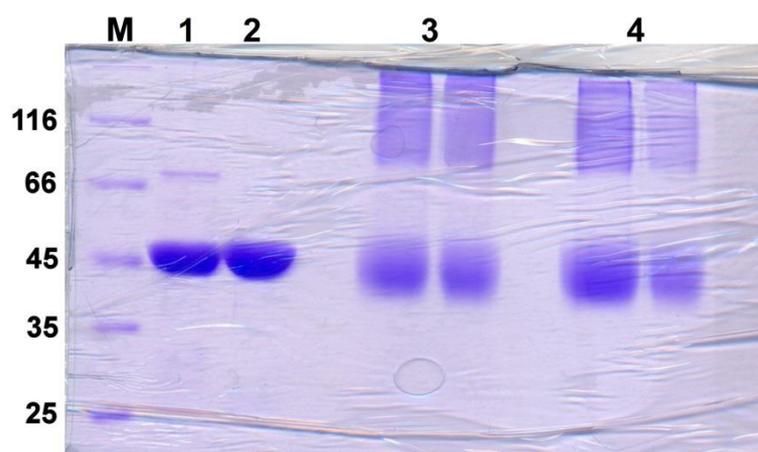


Figura 34: SDS-PAGE da reação de *crosslinking* do domínio MyoVa-GTD com o espaçador DSS. 1 e 2 são os domínios MyoVa-GTD-EE e MyoVa-GTD-AA, respectivamente, antes da reação. 3 e 4 são os domínios MyoVa-GTD-AA e MyoVa-GTD-EE, respectivamente, após a reação de 1h com DSS. É possível notar a dificuldade de migração das proteínas ligadas ao DSS, que ficam dispersas em torno da altura da proteína antes da reação. Além disso, é possível ver em 3 e 4 a existência de *cross-link* intermolecular, gerando agregados de diversas massas, referentes ao arraste com massa superior a 66 kDa observado no gel. Para esse estudo, somente as ligações intramoleculares foram analisadas.

O experimento de espectrometria de massas foi capaz de identificar, de maneira confiável, a presença de três *crosslinks*, sendo que dois deles estavam dentro de um mesmo peptídeo, e o outro ligava dois peptídeos (tabela 12).

Tabela 12. Crosslinks identificados pela análise em espectrometria de massas. Em cores iguais, as lisinas ligadas entre si pelo DSS.

<i>Cross-link</i>	Peptídeo	Exclusivo para construção fosfomimética
1	1468- K EKDFQGMLEYK-1481	Não
2	1468-KEKDFQGMLEY K KEDEQ K LV K -1490	Não
3	1731-D K NLMNSGAK-1742 1545- R -1548 ou 1647- R -1650	Não

O *cross-link* 3 foi o único identificado entre dois peptídeos diferentes, porém um dos peptídeos era pequeno, e não pode ser identificado. Com isso, não é possível saber se o terceiro *cross-link* ocorreu entre o par K1733/K1546, ou entre o par K1733/K1648. Estruturalmente, as lisinas do par K1733/K1546 estão a uma distância maior do que a permitida para o DSS (figura 35), enquanto a lisina K1648 pertence ao *fosfo-loop*, que é flexível e possivelmente assume uma conformação que aproxima o par de lisinas para a formação do *cross-link*. Entretanto, dos três *crosslinks* observados, nenhum se mostrou exclusivo para a forma fosfomimética ou para a forma não fosforilada.

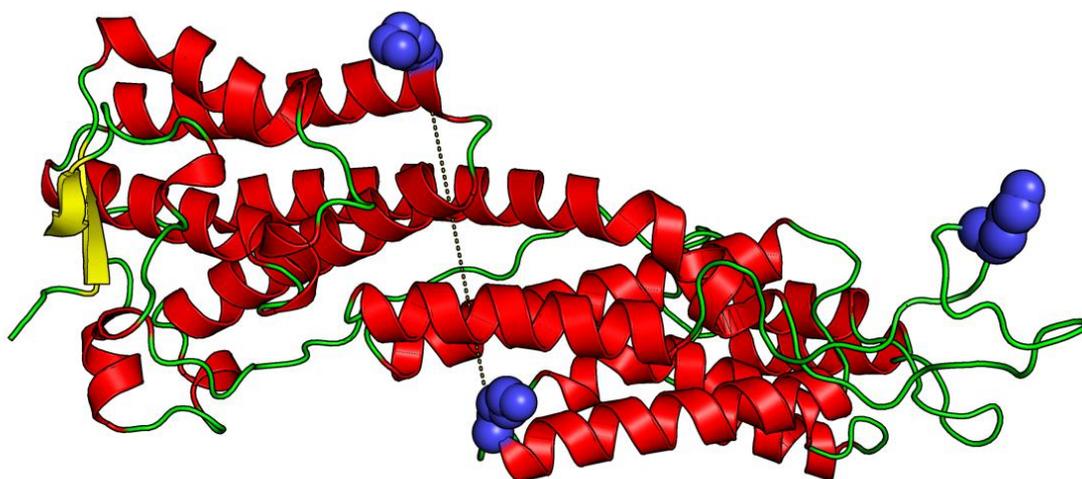


Figura 35: Distância entre as Lisinas do terceiro *cross-link*. Estrutura do MyoVa-GTD modelado pelo servidor ModWeb a partir do PDB ID: 4J5L⁶⁴. Em azul as lisinas K1546, K1648 e K1733. A distância entre as lisinas do par K1733/K1546 (pontilhado) nessa estrutura é de 31,9Å, maior do que a distância permitida para o DSS, sobrando a lisina do *fosfo-loop*.

7.2.2 Calorimetria diferencial de varredura

Para tentar entender melhor as diferenças entre as formas fosfo-mimética e não fosforilada do MyoVa-GTD, foi determinado, para os mutantes MyoVa-GTD-EE e MyoVa-GTD-AA, o perfil de desnaturação térmica por DSC (figura 36).

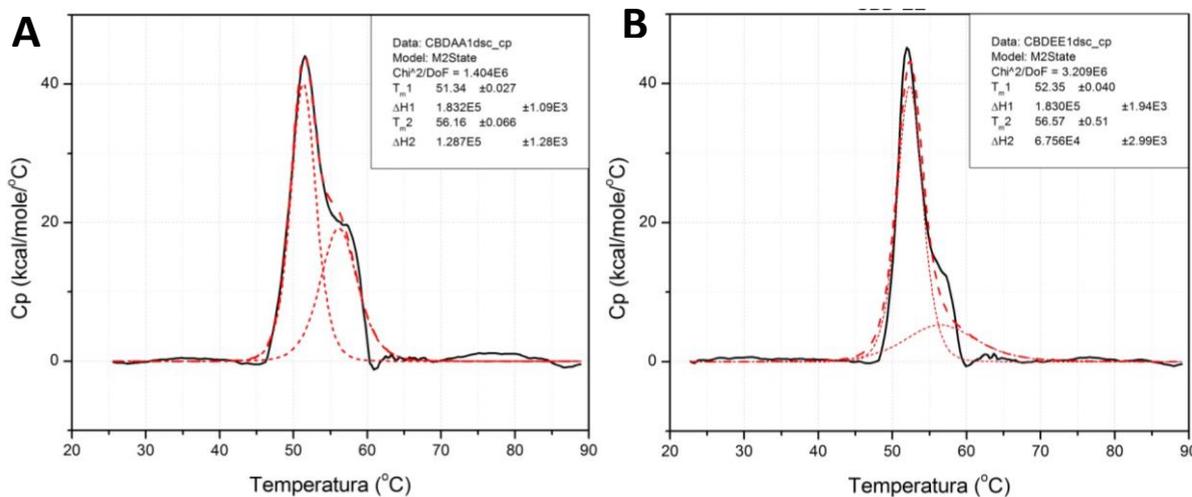


Figura 36: Perfil de desnaturação térmica dos MyoVa-GTDs (em preto), com o ajuste gaussiano de 2 estados (em vermelho tracejado a composição e em vermelho pontilhado cada estado), e as T_m s e ΔH s de cada estado. A: MyoVa-GTD-AA B: MyoVa-GTD-EE.

É possível ver que ambas as proteínas apresentaram um perfil semelhante, com a presença de dois estados de transição, com o primeiro apresentando um ΔH maior do que o segundo. O ajuste gaussiano de dois estados mostrou uma diferença de 1 °C para a T_m da primeira transição da forma fosfomimética em relação ao mutante MyoVa-GTD-AA, uma diferença que não é grande o suficiente para inferir uma variação na estabilidade térmica da proteína. Seria necessário uma ou mais réplicas desse experimento, para determinar se essa diferença possui uma significância real.

7.2.3 Dicroísmo circular

Existem indícios de que a fosforilação do MyoVa-GTD faz com que a miosina se desligue do melanosomo⁸¹ – organela transportada pela MyoVa em complexo com a melanofilina. Porém, ainda não foram determinados todos os mecanismos moleculares envolvidos neste processo de liberação. Para estudar a desnaturação térmica de estruturas secundárias e analisar o efeito da presença do peptídeo Mlph-GTBDP na estabilidade térmica do MyoVa-GTD, foi feito o experimento de CD. Na figura 37A, vemos os espectros de CD das formas fosfomimética (EE) e não fosforilada (AA) do MyoVa-GTD, com mínimos em 208 nm e 222 nm, típico de proteínas ricas em α -hélice, o que se correlaciona com a estrutura

cristalográfica desse domínio⁶⁴. Comparando-se os dois espectros, não vemos diferença significativa entre eles, indicando que a presença da mutação fosfomimética não proporcionou a formação ou desestabilização de estrutura secundária, ou que seria necessária a utilização de uma fonte de luz mais intensa e precisa para o experimento, como o SRCD (*Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy*).

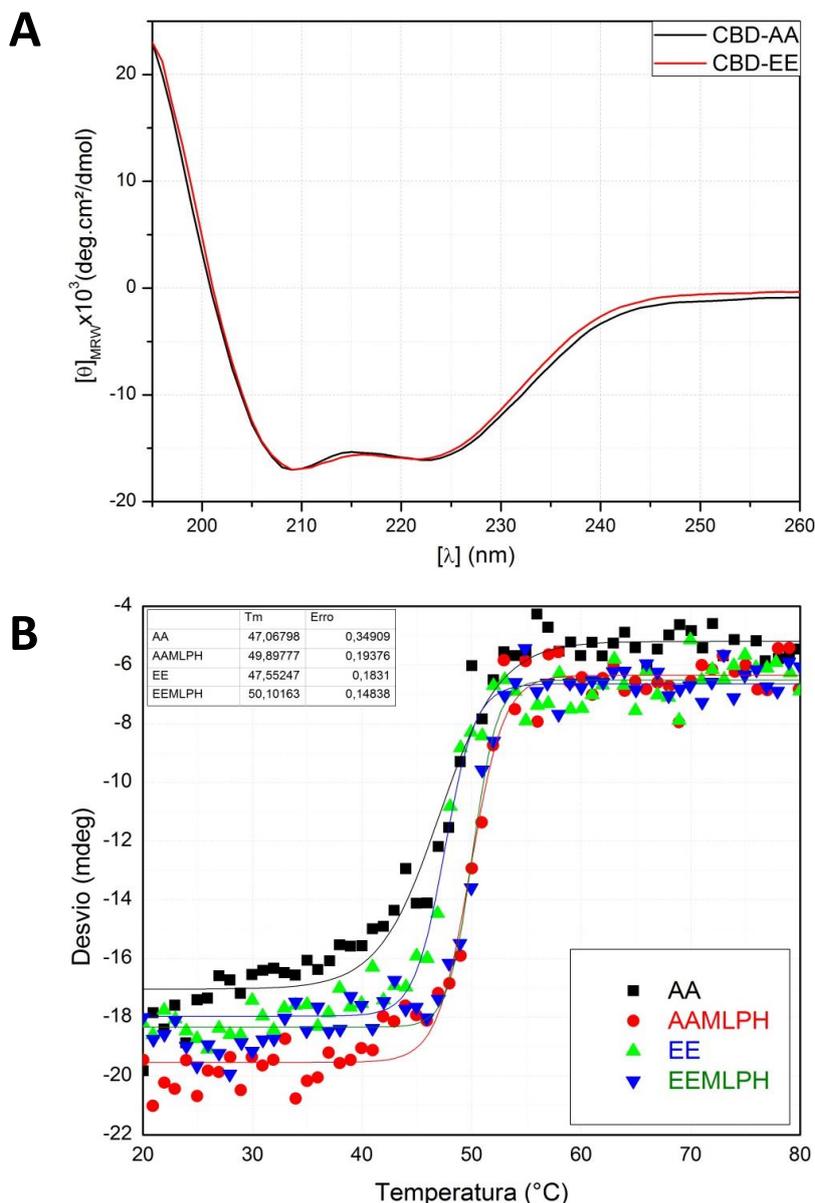


Figura 37: Ensaios de CD. A: Sobreposição dos espectros de absorção obtidos para os dois mutantes do MyoVa-GTD. Ambos apresentam mínimos em 208 nm e 222 nm, característico de estruturas de α -hélices. B: Sobreposição do experimento de desnaturação térmica, medido a 222 nm, mostrando um incremento de 3°C na T_m de ambos MyoVa-GTDs, na presença do Mlph-GTBDP.

Na figura 37B temos o perfil de desnaturação térmica das duas construções do MyoVa-GTD, ambas na presença e ausência do Mlph-GTBDP. Vemos que a presença de 10 μ M do peptídeo foi capaz de estabilizar a estrutura secundária de ambos os MyoVa-GTDs e

aumentar suas T_{ms} em aproximadamente 3 °C, indicando que ambos são capazes de interagir com esse peptídeo. Como nesse ensaio utilizamos um excesso molar de Mlph-GTBDP, novos experimentos seriam necessários para determinar se existe uma preferência do peptídeo ao MyoVa-GTD não fosforilado. Uma alternativa, nesse caso, é o experimento de MST.

7.2.4 Termoforese em microescala com Mlph-GTBDP

Para testar a hipótese de que esse processo ocorre devido a inibição da interação da MyoVa com a melanofilina, decidiu-se realizar experimentos de MST visando comparar as constantes de dissociação (K_d) do MyoVa-GTD-EE e do MyoVa-GTD-AA (que apresenta semelhança estrutural ao MyoVa-GTD *wt*⁶⁴) com o peptídeo mínimo de interação da melanofilina com o MyoVa-GTD (Mlph-GTBDP)⁵⁷.

Uma análise bibliográfica indicou que o K_d esperado para a interação do MyoVa-GTD selvagem com o Mlph-GTBDP é da ordem de 500 nM a 1 μ M, e que era possível determiná-lo tanto por ITC (*Isothermal titration calorimetry*, ou calorimetria de titulação isotérmica), quanto por MST^{59,60}. Por necessitar de uma menor quantidade de amostra, a técnica de MST foi escolhida para a determinação do K_d .

O resultado preliminar - considerando o fato de não se ter atingido a saturação mesmo com 10 μ M do peptídeo - indicou um K_d da ordem 4 μ M para o MyoVa-GTD-AA marcado com FITC, maior do que o esperado com base nos dados da literatura (figura 38). Após analisar o resultado, supusemos que a interação do MyoVa-GTD-AA com o peptídeo estivesse sendo perturbada pela marcação do MyoVa-GTD-AA com a sonda FITC, já que esta pode se ligar a lisinas próximas ao sítio de interação com o peptídeo (figura 39).

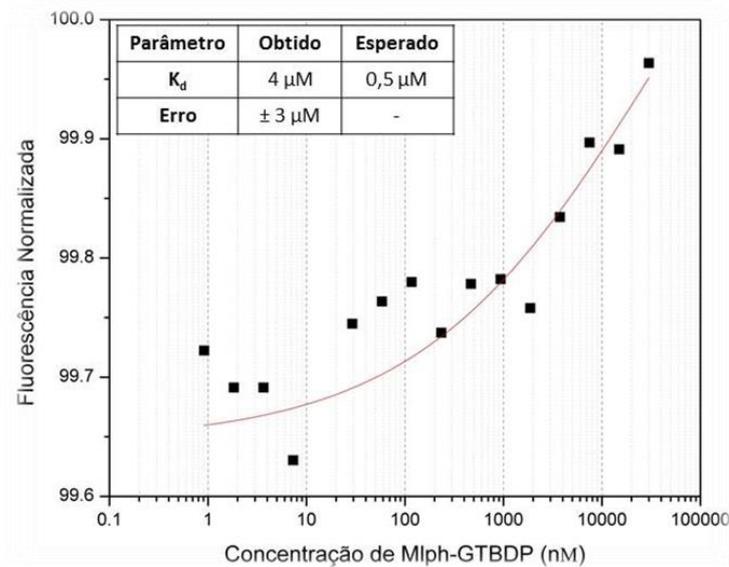


Figura 38: MST da interação entre MyoVa-GTD-AA e Mlph-GTBDP usando a sonda FITC. Intensidade de fluorescência normalizada em função da concentração de Mlph-GTBDP, indicando que o K_d , calculado pelo programa *Affinity Analysis* (NanoTemper Technologies), apresentou-se uma ordem de grandeza maior do que o esperado.

Mlph-GTBDP (região visível no PDB ID 4LX2):
176-RDQPLNSKKKKRLLSFRDVFEESSD-203

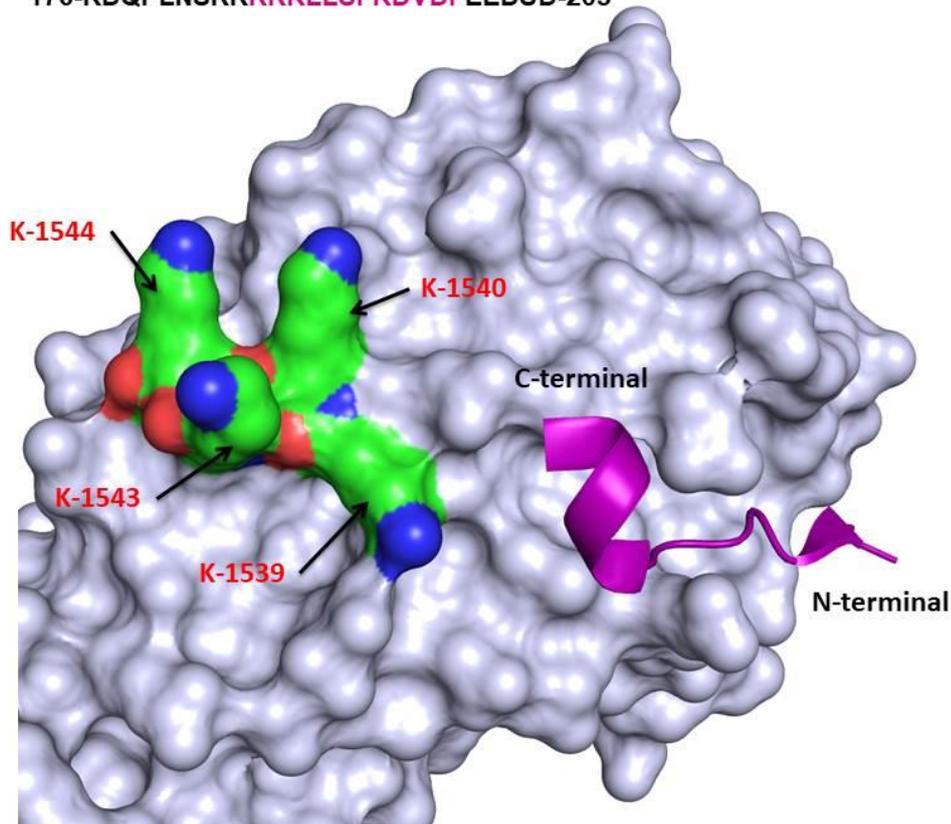


Figura 39: Representação do sítio de ligação do Mlph-GTBDP no MyoVa-GTD. Em roxo a região do peptídeo visível na estrutura cristalográfica. Após o C-terminal indicado na imagem, existem resíduos carregados negativamente (EEDSD) que desempenham um papel importante na interação do peptídeo com o MyoVa-GTD⁶⁰. Estudos de mutagênese sugerem que esses resíduos interagem com um grupo de lisinas do MyoVa-GTD (coloridas em verde)⁶⁰. Como a sonda FITC se liga à cadeia lateral de lisinas, é provável que ela interfira com a interação das lisinas

destacadas em verde com os resíduos ácidos do peptídeo, diminuindo a afinidade do complexo. Imagem baseada nas coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica depositada no PDB com o código 4LX2⁵⁵.

Para tentar contornar esse problema, trocamos a sonda FITC pela Alexa Maleimide 647, que se liga em cisteínas. Entretanto, essa sonda também parece inibir a interação entre o peptídeo e o MyoVa-GTD-AA, impedindo a determinação do K_d do complexo MyoVa-GTD-AA•Mlph-GTBDP por essa abordagem (Figura 40).

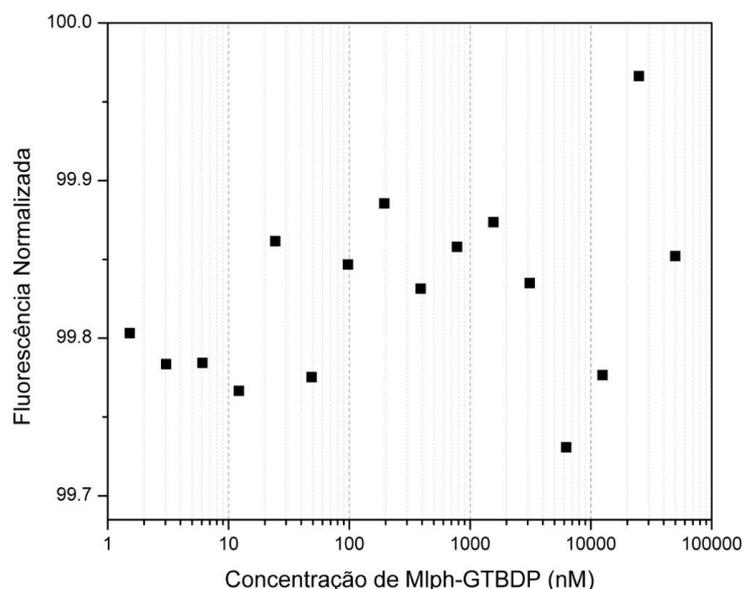


Figura 40: MST da interação entre MyoVa-GTD-AA e Mlph-GTBDP usando a sonda Alexa Maleimide 647. Intensidade de fluorescência normalizada em função da concentração do peptídeo Mlph-GTBDP. O programa *Affinity Analysis* (NanoTemper Technologies) não conseguiu determinar o K_d desta interação, indicando que não houve interação.

7.2.5 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Continuando com o intuito de determinar o valor de K_d do Mlph-GTBDP com os mutantes MyoVa-GTD-AA e MyoVa-GTD-EE, foi realizado o experimento de ITC, que dispensa o uso de sonda. Porém não foi possível obter curvas adequadas para estimativa dos parâmetros termodinâmicos da interação (figura 41). Para isso, seriam necessários ajustes das condições experimentais incluindo uma quantidade maior de amostra, tanto aumentando sua concentração, quanto seu volume, o que será inviável devido as restrições das quantidades de peptídeo disponível, seu custo e tempo de importação^{81,164}.

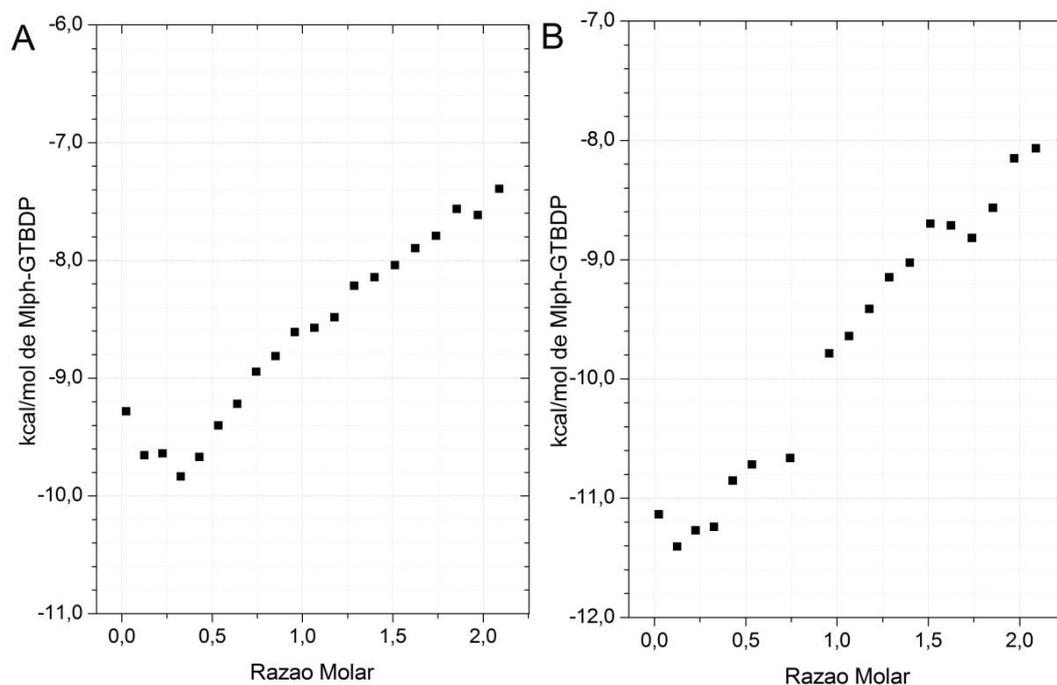


Figura 41: Ensaios de ITC. Gráficos da energia liberada pela razão molar do titulado. A: MyoVa-GTD-AA; B: MyoVa-GTD-EE. Em ambos os experimentos não foi possível determinar o K_d .

7.2.6 Teste de expressão de proteínas em sistema de baculovírus

Para estudar os efeitos da fosforilação na formação do estado auto-inibido da MyoVa, tanto por ensaios de cinética quanto por criomicroscopia eletrônica⁵⁸ é necessário expressar as construções *Full Length* e *Heavy Meromyosin*, e, para tanto, utilizar o sistema de baculovírus para expressão em células de inseto SF9^{45,46}. Inoculamos as células com diversos títulos virais, e acompanhamos a infecção por 96 horas. Porém, infelizmente, não foi possível detectar a expressão dessas construções, apesar de termos detectado indícios de infecção nas células, como o aumento do raio celular, a queda na velocidade de duplicação, e finalmente, a lise celular. Novos testes poderiam ser realizados para a obtenção das construções da MyoVa em células de inseto, entretanto, foi decidido focar os esforços no terceiro desse projeto: a identificação e caracterização de novos parceiros moleculares da forma fosfomimética do MyoVa-GTD.

8 Discussão e Conclusões

8.1 O papel da fosforilação no GTD da MyoVa é elusivo, e permanece obscuro

Com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre a fosforilação da serina 1652 da Miosina Va humana, optamos inicialmente por uma abordagem estrutural: determinar a estrutura do mutante fosfomimético do MyoVa-GTD, e analisar a posição do *fosfo-loop* para determinar se a fosforilação causava alguma alteração conformacional que alterasse os sítios de interação proteína-proteína já conhecidos para o MyoVa-GTD^{55,60}. As atuais estruturas conhecidas do MyoVa-GTD^{55,60,64,65} não apresentam o *loop*, tanto por ser flexível, e então não contribuir aditivamente para o sinal de difração, quanto por ter sido removido por proteólise limitada antes da cristalização. Apesar da evidente melhora dos cristais obtidos ao longo das mais de 8000 condições de cristalização testadas, com diferentes qualidades de amostra e estratégias de refinamento, não foi possível obter cristais que difratassem com resolução adequada, mesmo em linhas de luz de síncrotrons de terceira geração. Portanto, não foi possível resolver a estrutura do MyoVa-GTD fosfomimético. Como vemos na figura 11, os melhores cristais obtidos apresentavam apenas dois eixos, sendo comumente chamados de placas, ou cristais 2D. A falta de crescimento dos cristais em um dos eixos pode ser interpretada como uma ausência de contatos cristalinos fortes em alguma face da célula unitária formadora do cristal, o que, de certo modo, evidencia que, mesmo com a mutação fosfomimética, o *fosfo-loop* ainda apresentou um grau de flexibilidade que provavelmente atrapalhou a formação de contatos cristalinos na sua vizinhança.

Uma outra abordagem para estudar a possível interferência da fosforilação no interactoma da MyoVa é estudar interações já conhecidas. Evidências indicam que a fosforilação do MyoVa-GTD (ou a mutação fosfomimética) faz com que a MyoVa se desligue do melanossomo⁸¹, indicando que talvez a fosforilação não crie novos sítios de interação, mas sim interfira em sítios já existentes. Para isso, foi analisada a interação entre o MyoVa-GTD e o Mlph-GTBDP, primeiro realizando um experimento de desnaturação térmica por CD, na presença do peptídeo. A figura 37B mostra que, na presença do peptídeo, houve um aumento de 3°C da T_m para ambas as construções de miosina. Esse aumento de T_m indica uma maior estabilidade da proteína, e, portanto, que ambas as formas da miosina foram capazes de interagir com o peptídeo, o que contrasta com a ideia de que a fosforilação atrapalharia essa

interação. Para investigar mais profundamente essa interação, foram feitos experimentos para determinar o K_d dessa interação, já que, assim, poderíamos ver se a fosforilação alteraria esse K_d , o que seria um indício de que ela regularia essa interação. Porém, por diversos problemas técnicos já apresentados, tanto o experimento de termoforese em microescala quanto a calorimetria de titulação isotérmica foram inconclusivos.

Uma das possíveis hipóteses de função para a fosforilação é de que, quando fosforilado, o *fosfo-loop* interaja com a superfície do MyoVa-GTD, alterando os sítios de interação com cargas já conhecidos, e, dessa forma, regulando os tipos de proteínas que tem a capacidade de se ligar à MyoVa. Para estudar essa hipótese, foi feito um *screening* de duplo híbrido em levedura, utilizando a construção fosfomimética do MyoVa-GTD como isca, contra uma biblioteca humana universal normalizada. Para minimizar o número de resultados falso-positivos, comum à técnica de duplo híbrido em levedura, foi utilizado o sistema *Matchmaker® Gold* (Takara – Clontech), um dos mais modernos e confiáveis sistemas disponíveis atualmente, pois apresenta 4 *genes reporters* ativados por 3 promotores diferentes. Os *hits* iniciais pescados foram submetidos às rodadas de confirmação 1x1 tanto contra a isca fosfomimética, quando contra a construção não fosforilada do MyoVa-GTD. Após a confirmação 1x1, os resultados positivos foram curados, removendo-se os falso-positivos recorrentes e os resultados que apresentavam proteínas que, pelas predições baseadas em sequência, possivelmente estariam mal enoveladas ou desenoveladas. Ao final da técnica de duplo híbrido, todos os 4 resultados positivos encontrados foram capazes de interagir com ambas as construções do MyoVa-GTD, e, portanto, não foi possível identificar uma interação que dependesse da fosforilação para ocorrer.

O conjunto de resultados apresentados não exclui a hipótese de que a fosforilação regularia as possíveis interações do GTD com outras proteínas, porém favorece outra hipótese: a de que a fosforilação atua como um repressor da auto-inibição do domínio motor pelo GTD, inibindo sua atividade ATPásica¹⁶⁵. Para avaliar essa hipótese nós pretendíamos realizar a criomicroscopia eletrônica da construção inteira da MyoVa, avaliando se a mutação fosfomimética inibia a formação de sua conformação fechada. Porém, os testes de expressão células SF9, com sistema de baculovírus não foram bem-sucedidos. Por fim, analisando os resultados obtidos por essas abordagens, concluímos que a compreensão do papel da fosforilação do MyoVa-GTD requer mais estudos para ser elucidada.

9 Perspectivas Futuras

Os experimentos de *crosslinking* químico, calorimetria diferencial de varredura, e dicroísmo circular não foram capazes de identificar variações estruturais entre as formas fosfomimética e não fosforilada da MyoVa-GTD, o que pode levantar uma hipótese de que, apesar de menos flexível, não existe uma mudança conformacional considerável causada pela fosforilação. Com isso, para continuar estudando as características estruturais relacionadas à fosforilação, o ideal seria realizar um experimento de ressonância magnética nuclear (NMR do inglês: *nuclear magnetic resonance*). Apesar do tamanho relativamente grande da proteína, o que impossibilitaria o assinalamento total do espectro, seria possível identificar as variações presentes no espectro, causadas pela mutação fosfomimética, o que confirmaria ou descartaria a mudança conformacional. Outras possibilidades de experimentos para fazer a análise estrutural desse sistema seria o monitoramento das taxas de troca de hidrogênio por deutério dos resíduos do *loop*, que também analisaria sua mudança de flexibilidade, ou até mesmo a repetição do experimento de *crosslink* químico, visto que com os desenvolvimentos de novos tipos de espaçadores, e com a melhora dos métodos de coleta e análise de dados, ambos avanços recentes da área, talvez fosse possível mapear melhor a região do *loop*.

Independente das variações estruturais, fica evidente que essa fosforilação necessita ser abordada por métodos de biologia celular, que busquem entender profundamente o contexto celular em que ela ocorre, e também que busquem identificar a fosfatase responsável pela desfosforilação dessa serina.

PARTE 3

**Estudo sobre a nova interação entre a
Miosina Vc e a pequena GTPase Rab3A**

10 Resultados

10.1 GST *pull-down* contra biblioteca de Rabs

Visto que existem diversas proteínas Rabs que atuam como adaptadores para Miosinas de classe V, o Dr. Norihiko Ohbayashi e o Prof. Dr. Mitsunori Fukuda, da Universidade de Tohoku, realizaram um experimento de GST *pull-down* da MyoVc contra uma biblioteca de Rabs. Na figura 42 vemos um dos *hits* positivos desse experimento, as Rab3A/B/C/D, com a interação sendo mais pronunciada para a Rab3A.

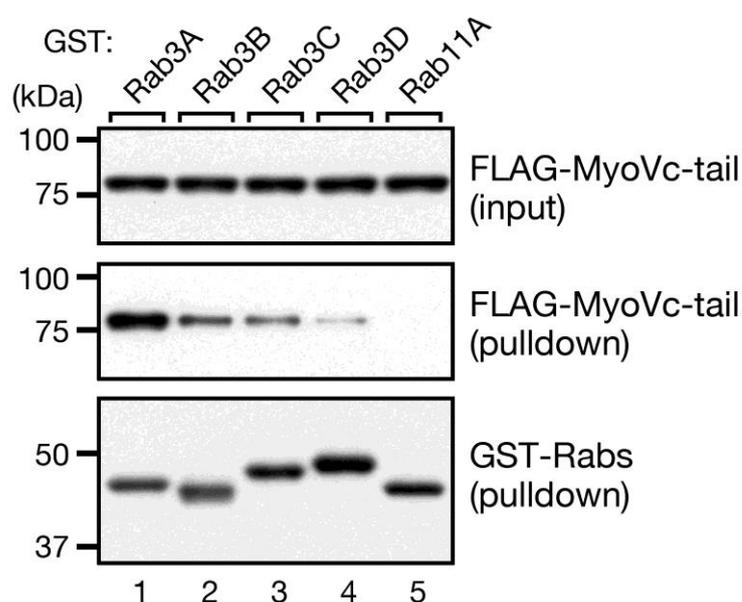


Figura 42: GST *pull-down*. Vemos que as Rabs 3A, 3B, 3C e 3D são capazes de interagir com a construção da cauda da MyoVc, e que a Rab3A possivelmente tem uma afinidade maior. Como controle vemos que a Rab11A não é capaz de interagir com a MyoVc, o que já era conhecido.

10.2 Purificação da Proteína e Rab3A

Para os estudos *in vitro* da interação entre a MyoVc-GTD e a Rab3A foi necessário a expressão heteróloga e purificação dessas proteínas. A MyoVc-GTD foi purificada como já descrito⁶⁴. A purificação da Rab3A foi feita em duas etapas, cromatografia de afinidade adaptada (figura 43A) e cromatografia de exclusão molecular (figura 43B).

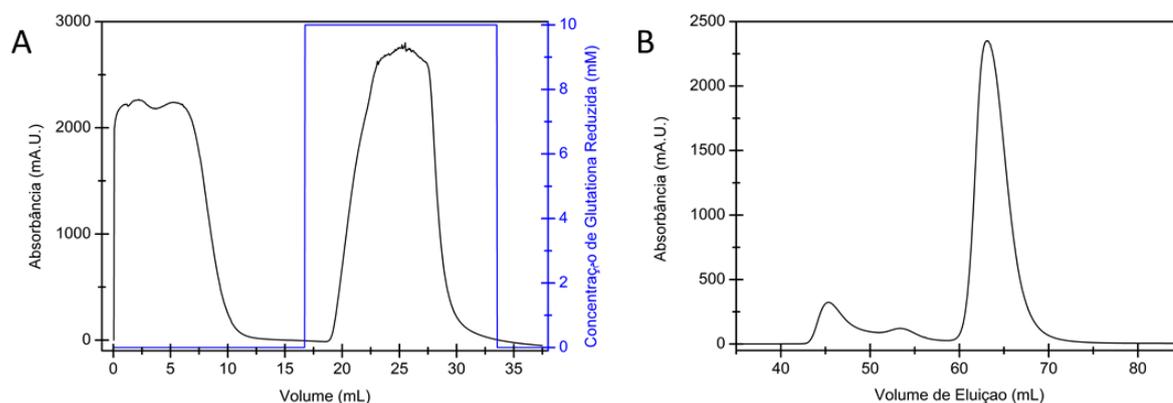


Figura 43: Purificação da Rab3A. (A) Cromatograma da cromatografia de afinidade adaptada, mostrando a eluição da Rab3A clivada na coluna (pico 1) e a posterior eluição da GST, para a limpeza da coluna (pico 2, com 10mM de Glutathione Reduzida). (B) Cromatograma da Cromatografia de exclusão molecular, que apresentou pequenos picos de contaminantes e um pico simétrico em um volume de eluição condizente com a massa esperada para a Rab3A.

10.3 Cromatografias de exclusão molecular

Para confirmar a interação *in vitro* por outras técnicas, realizamos estudos de cromatografia de exclusão molecular, e posteriormente cromatografia de exclusão molecular analítica acoplada ao espalhamento de luz em multiângulos (SEC-MALS). No experimento de cromatografia de exclusão molecular do complexo, feito com o apoio da bolsista de verão Ana Carolina Schwarzer, obtivemos um padrão com 2 picos (figura 44A), e pudemos observar no SDS-PAGE (figura 44B) que o primeiro pico continha tanto a MyoVc quanto a Rab3A, mostrando que a MyoVc conseguiu arrastar a Rab3A na exclusão molecular.

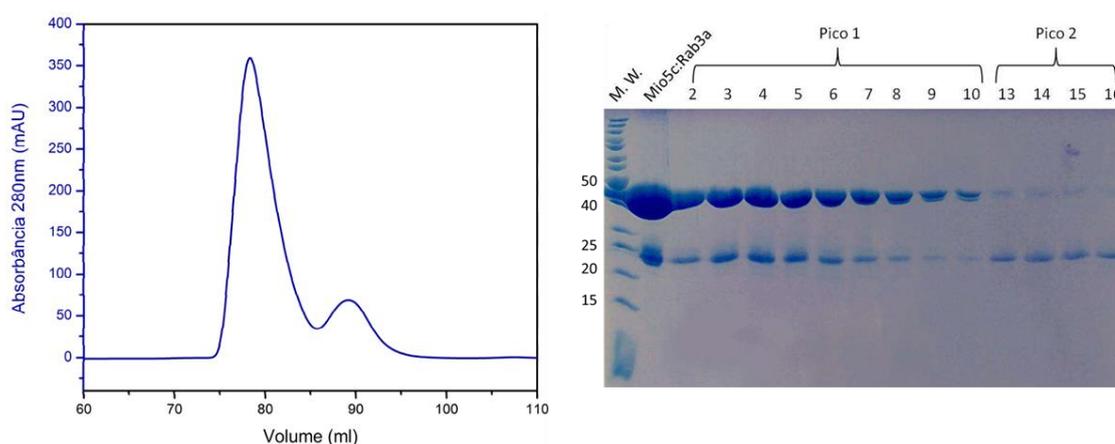


Figura 44: Cromatografia de exclusão molecular do complexo Rab3A•MyoVc-GTD. (A): Cromatograma, com a presença de dois picos. (B) SDS-PAGE das frações dos picos do cromatograma, indicando que o pico 1 apresenta uma mistura de MyoVc e Rab3A, enquanto o pico 2 contém apenas Rab3A.

Para confirmar que a presença de Rab3A no primeiro pico é um efeito causado pela interação entre as duas proteínas, e não uma agregação da Rab3A, e também para determinar a estequiometria da interação, utilizamos a técnica de SEC-MALS. Comparando o

cromatograma do complexo (figura 45A) com os da MyoVc e Rab3A isoladas (figura 45B e 45C) vemos que a mudança no volume de eluição do pico da MyoVc causado pela presença da Rab3A é muito pequena, mas que há uma mudança considerável na massa calculada para esse pico (figura 45D), que era de 45 ± 3 kDa sem a presença da Rab3A, e passou a ter 67 ± 9 kDa, um valor de massa compatível com a massa esperada para o complexo Rab3A•MyoVc-GTD (que deveria ser 69 kDa).

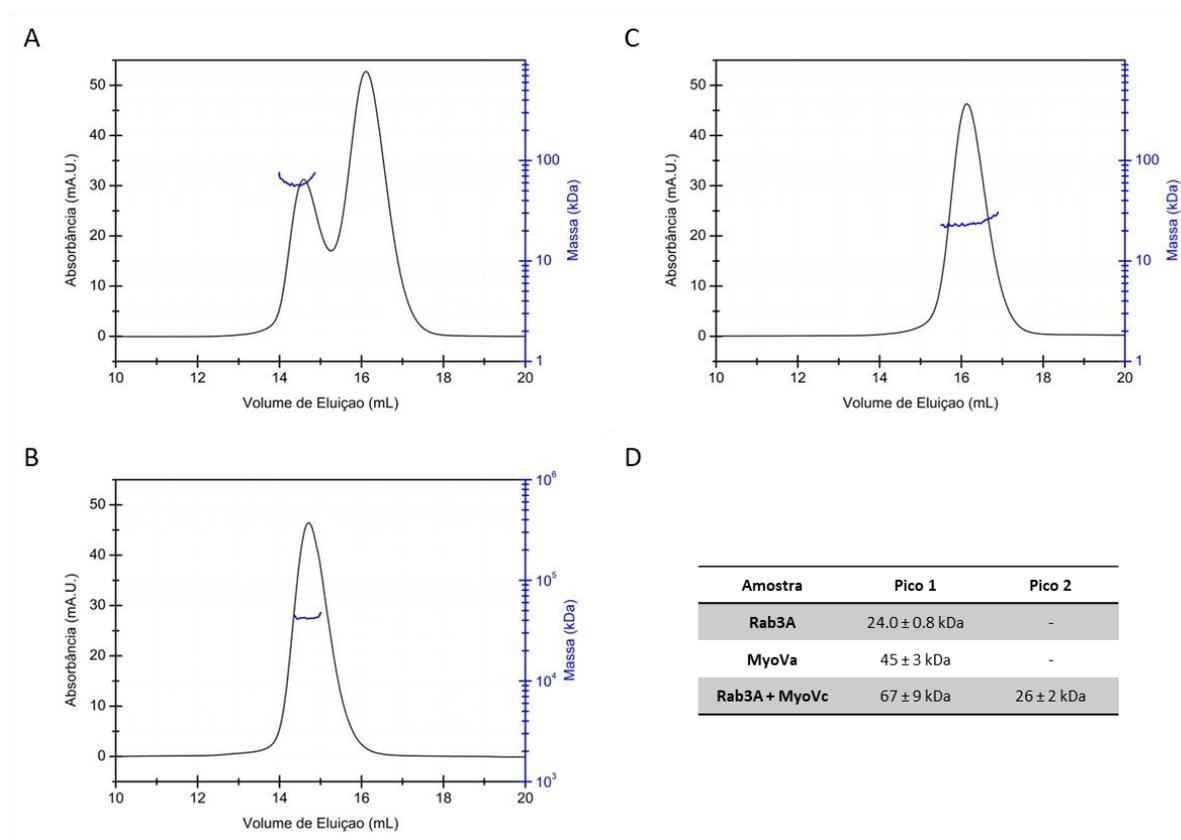


Figura 45: SEC-MALS do complexo Rab3A•MyoVc-GTD. (A) Cromatograma e massa calculada pelo espalhamento estático de luz, para o complexo. (B) Cromatograma e massa calculada pelo espalhamento estático de luz, para a MyoVc. (C) Cromatograma e massa calculada pelo espalhamento estático de luz, para a Rab3A. (D) Resumo das massas calculadas para cada pico presente nas cromatografias. É possível notar que a formação do complexo aconteceu, apesar do pequeno deslocamento do volume de eluição da MyoVc.

10.4 Termoforese em microescala

Confirmada a interação *in vitro*, e a estequiometria de 1:1, foram feitos experimentos de termoforese em microescala para determinar a constante de dissociação (K_d) do complexo, e também para analisar se a interação descoberta para a MyoVc acontecia com algum outro parólogo humano. Vemos que a Rab3A é capaz de interagir com o GTD de ambas MyoVa e MyoVc (figura 46A e 46C), apresentando valores de K_d próximos ao já reportados na literatura para interações entre Rabs e MyoVs (figura 46E). Surpreendentemente, a Rab3A não foi capaz de interagir com a MyoVb-GTD (figura 46B), mesmo ela sendo mais similar à MyoVa-GTD do que a MyoVc-GTD (figura 46D).

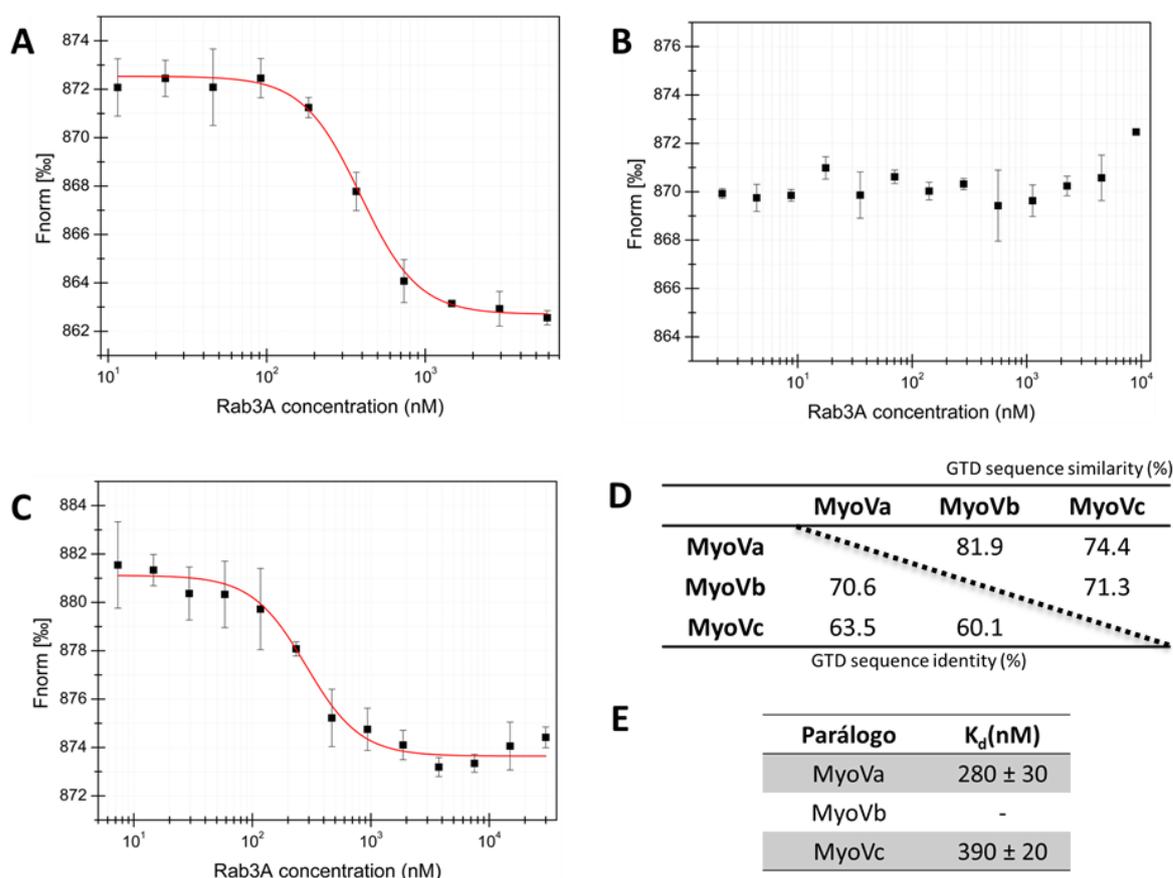


Figura 46: Termoforese em microescala da Rab3A contra o GTD de (A): MyoVa; (B): MyoVb; (C): MyoVc; (D): Identidade e similaridade de sequência entre GTDs dos três parálogos de MyoV de seres humanos. MyoVa e MyoVc compartilham identidade e similaridade de alta sequência, enquanto o MyoVc é o mais divergente (Adaptado de: Andrey F. Z. Nascimento, et al.⁶⁴). (E) Resultados calculados de K_d usando o ajuste sigmoidal Hill1, do programa Origin 8.0.

10.5 Troca de Hidrogênio por Deutério

Com o intuito de identificar o sítio de interação da Rab3A na MyoVc-GTD realizamos o experimento de HDX em colaboração com o Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo, e o aluno Renan A. S. Pirolla, com auxílio da Dr. Mariana Fioramonte. Analisando a variação das taxas de troca H/D dos peptídeos da MyoVc-GTD causada pela presença da Rab3A foi possível identificar a região da proteína que teve uma redução na troca, o que provavelmente decorre do impedimento estereoquímico causado pela ligação da Rab3A, diminuindo a acessibilidade ao solvente daquela região.

Na figura 47 vemos a estrutura cristalográfica da MyoVc-GTD (número de acesso pdb: 4L8T), colorida de acordo com a variação da taxa de troca. O motivo de três hélices, que aparece em azul, indica a região onde possivelmente existe o sítio de ligação da Rab3A. Ao lado, a região vermelha indica uma região que, provavelmente, foi deslocada pela presença do ligante (em especial o loop no final da hélice, que não está presente na estrutura).

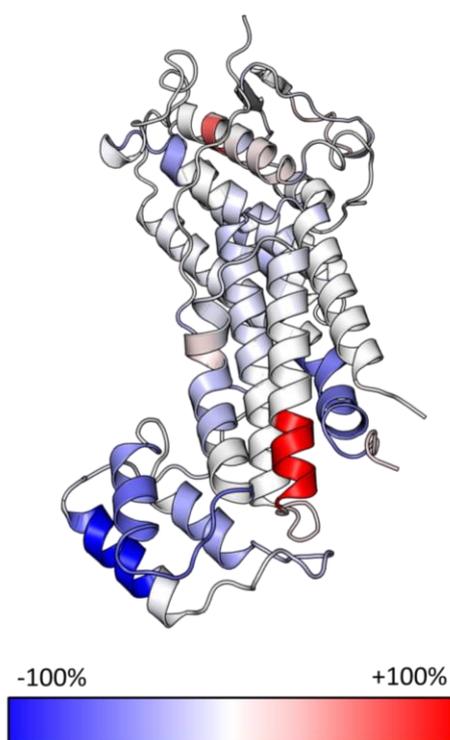


Figura 47: Resultado do HDX. Estrutura cristalográfica da MyoVc-GTD (número de acesso pdb: 4L8T) colorido pela diferença da taxa de troca de hidrogênio/deutério entre as amostras MyoVc + Rab3a e MyoVc. Em azul, os peptídeos onde a interação com Rab3A baixou a troca (o azul escuro indica o local de ligação) e em vermelho, onde aumentou a troca (provavelmente devido a mudanças conformacionais induzidas pela ligação de Rab3A).

10.6 Localização celular da Rab3A com a MyoVc

Após confirmada a interação *in vitro*, por diversos métodos, é necessário entender o contexto biológico em que essa interação ocorre. Um primeiro passo para isso é estudar a localização celular das duas proteínas, identificando a presença de subcompartimentos celulares onde as duas proteínas ocorrem simultaneamente. Para isso foram feitos experimentos de imunocitoquímica.

Vimos na figura 48 que a dupla marcação da MyoVc com a Rab3A mostrou um padrão de localização celular condizente com a literatura¹¹² para as duas proteínas. Foi possível detectar sobreposição de sinal das duas proteínas em padrões pontuais discretos no citoplasma das células MCF-7, o que indica que essas duas proteínas podem ser encontradas em um mesmo subcompartimento celular, provavelmente vesículas, indicando que a interação identificada *in vitro* possa ter um papel celular.

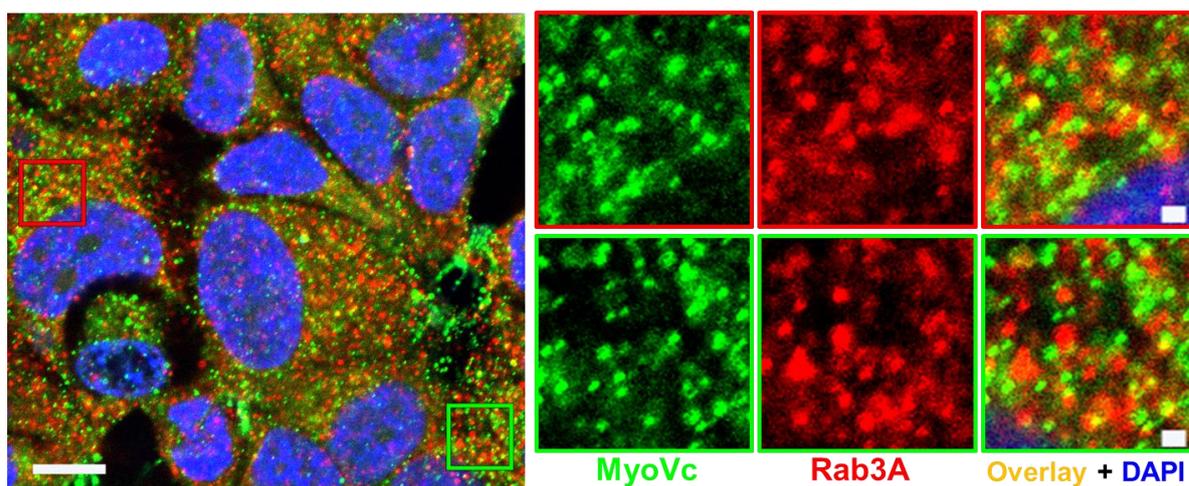


Figura 48: Microscopia confocal de fluorescência de células MCF-7, imunomarcadas para MyoVc (verde) e Rab3A (vermelho). É possível ver a existência de um padrão parcial de sobreposição em pontos discretos do citoplasma. Barra de escala de 10 µm no campo e 1 µm no *zoom*.

10.7 Silenciamento dos genes *MYO5C* e *RAB3A*

Para começar a buscar o papel celular da interação entre a Rab3A e a MyoVc, realizamos o silenciamento dos genes *MYO5C* e *RAB3A*, e analisamos o comportamento celular dessas proteínas. Observamos que na condição que o gene *MYO5C* foi silenciado houve uma queda aparente na intensidade do sinal da Rab3A, algo que não ocorreu com a MyoVc quando o gene *RAB3A* foi silenciado (Figura 48).

Além de analisar a localização celular da Rab3A e da MyoVc nas condições de *knockdown*, fizemos a imunomarcagem para vesículas CD63-positivas, e notamos que o

silenciamento de ambos os genes *MYO5C* e *RAB3A* alteraram drasticamente a distribuição celular dessas vesículas, em células MCF-7 (Figura 49).

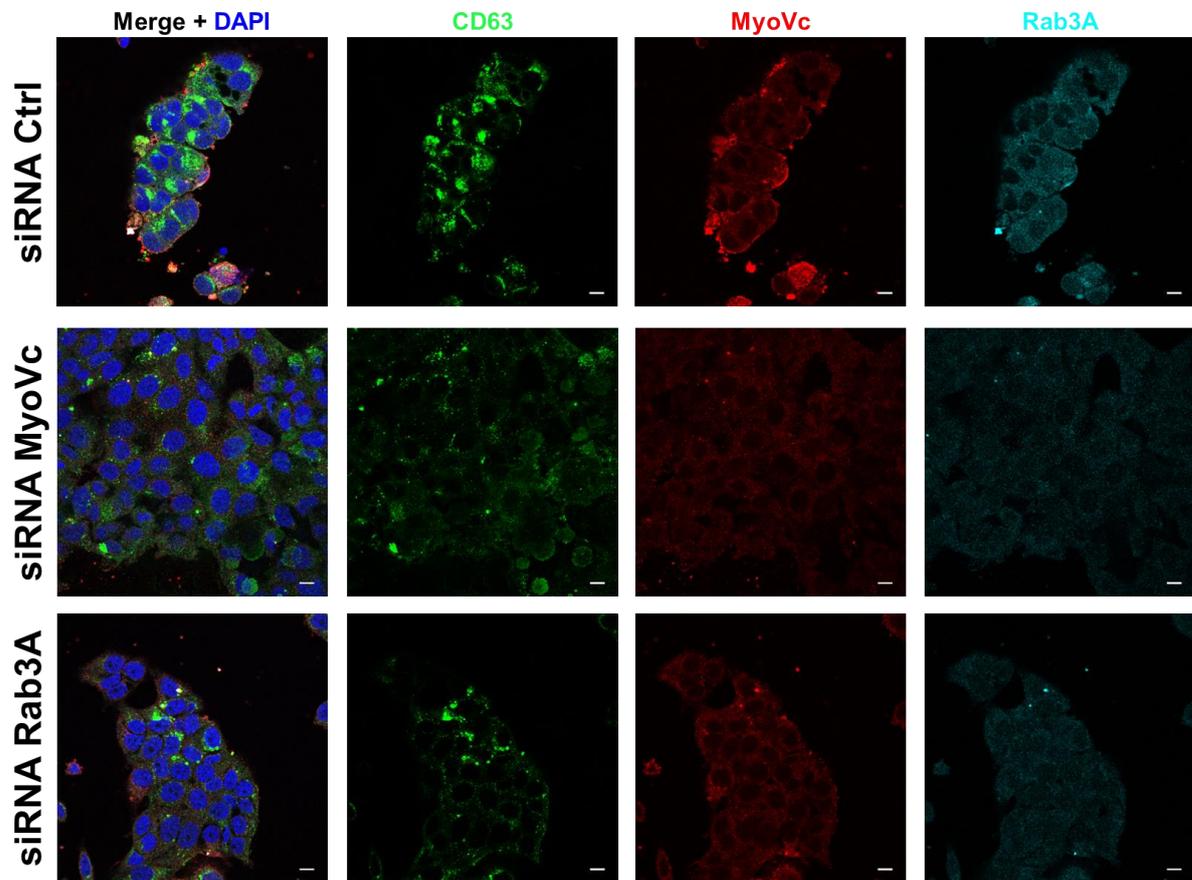


Figura 49: O Silenciamento dos genes *MYO5C* e *RAB3A* afeta a distribuição celular de vesículas CD63-Positivas em células MCF-7. Escala: 10 μ m.

11 Discussão, Conclusões e Perspectivas Futuras

11.1 Rab3A interage com as caudas globulares da MyoVa e da MyoVc, mas não com a da MyoVb

Esse trabalho foi iniciado com resultados obtidos através de uma colaboração com o Prof. Dr. Mitsunori Fukuda, indicando que a proteína Rab3A poderia ser um parceiro de interação da MyoVc. Foram utilizadas diversas técnicas biofísicas para comprovar *in vitro* a formação do complexo Rab3A•MyoVc-GTD bem como sua afinidade. Em uma etapa seguinte do estudo, foram conduzidos experimentos para investigar se essa interação aconteceria com os três parálogos de MyoV em humanos. Resultados da literatura mostram que a Rab11A é capaz de interagir com a MyoVa⁵⁶ e a MyoVb⁵⁵, apresentando um sistema de redundância de funções, e resultados preliminares em um sistema de duplo híbrido de levedura indicavam a MyoVa como um possível parceiro de interação da Rab3A⁵⁴. Nossos resultados de termoforese em microescala mostram que a Rab3A é capaz de interagir com os parálogos MyoVa e MyoVc (com constantes de dissociação semelhantes), e não com o parálogo MyoVb, possivelmente gerando o primeiro indício de redundância de funções entre essas proteínas, o que é um tanto quanto inesperado, visto que em humanos a MyoVc é a proteína mais divergente entre as três parálogas (figura 46D).

Com o intuito de entender os mecanismos estruturais relacionados com essa seletividade, optamos por realizar abordagens de biologia molecular estrutural baseadas em espectrometria de massas, em colaboração com o Prof. Dr. Fábio C. Gozzo. Para isso, realizamos o experimento de HDX, que foi capaz de indicar um possível sítio de interação entre a MyoVc-GTD e a Rab3A. O sítio indicado – na região do motivo de três hélices da estrutura – apresentou uma distribuição de cargas locais semelhantes para os parálogos MyoVa e MyoVc, e com certa divergência com o MyoVb, fortalecendo os dados de seletividade de interação. Para a confirmação dessa região como sítio de interação, foi feito o experimento de *crosslink* químico da MyoVc-GTD com a Rab3A, porém esses dados ainda não foram analisados.

Com os resultados dos dados se *crosslink*, será possível realizar um *docking* molecular, utilizando os *crosslinks* identificados como restrições, e então identificaremos os principais resíduos de aminoácidos responsáveis pela interação. Para comprovar esse sítio de interação, realizaremos mutagênese sítio-dirigida desses resíduos, e esperamos que algumas

delas cause a perda de interação, e assim, poderemos desenvolver um modelo que explique o mecanismo de seletividade da Rab3A, que é capaz de formar um complexo com a MyoVa-GTD e com a MyoVc-GTD, mas não com a MyoVb-GTD.

11.2 MyoVc se localiza com Rab3A em pontos discretos do citoplasma, e seus silenciamentos afetam o tráfego de membranas

Dando continuidade aos estudos sobre a interação entre a Rab3A e a MyoVc-GTD, realizamos experimentos de localização celular que nos evidenciaram que a interação, descoberta e validada *in vitro*, pode ocorrer no contexto celular, já que existiam pontos discretos de sobreposição das duas proteínas no citoplasma das células MCF-7. Para tentar entender a importância celular dessa interação, foram realizados os silenciamentos dos genes *MYO5C* e *RAB3A*, e obtivemos resultados, preliminares, que indicam uma importância dessas proteínas no tráfego de vesículas positivas para CD63, marcador intimamente relacionado com corpos multivesiculares e vias secretórias, sendo essas últimas muito interessantes, pois existem evidências da presença e importância tanto da MyoVc⁹⁵ quanto da Rab3A¹⁶⁶ em grânulos secretórios.

Com isso, planejamos experimentos que serão realizados em colaboração com o Dr. Rui M. P. Silva-Junior, a Prof. Dr. Enilza M. Espreafico e o Prof. Dr. Luis Lamberti, todos da FMRP-USP. Em um primeiro momento, o silenciamento será comprovado por PCR quantitativo e por *western blotting*, e as imagens obtidas dele serão analisadas e quantificadas. Posteriormente realizaremos novas marcações, com o intuito de identificar qual grupo de vesículas CD63-positivas estão sendo afetadas pelos silenciamentos, e também realizaremos a quantificação das taxas de secreção de exossomos para células silenciadas, para identificar se a interação entre a MyoVc e a Rab3A ocorre na via de secreção de exossomos.

Por fim, nosso trabalho apresenta o primeiro complexo proteico de uma Rab com a cauda globular da MyoVc. Com a descoberta da interação, geramos a primeira evidencia de redundância de interações – e talvez funções – entre a MyoVc e a MyoVa, e, além disso, obtivemos resultados preliminares que ajudarão na identificação de mais uma função celular para a MyoVc.

12 Referências

- 1 Hartman, M. A. & Spudich, J. A. The myosin superfamily at a glance. *J Cell Sci* **125**, 1627-1632, doi:10.1242/jcs.094300 (2012).
- 2 Various Themes of Myosin Regulation. doi:10.1016/j.jmb.2016.01.022 (2016).
- 3 Burgess, S. *et al.* The prepower stroke conformation of myosin V. *J Cell Biol* **159**, 983-991, doi:10.1083/jcb.200208172 (2002).
- 4 Sellers, J. R. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 3-22 (2000).
- 5 Kühne, W. W., 1837-1900. *Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität*, (1864).
- 6 Pollard, T. D. & Korn, E. D. Acanthamoeba myosin. I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. *J Biol Chem* **248**, 4682-4690 (1973).
- 7 Odrionitz, F. & Kollmar, M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol* **8**, R196, doi:10.1186/gb-2007-8-9-r196 (2007).
- 8 Cheney, R. E. *et al.* Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* **75**, 13-23 (1993).
- 9 Trybus, K. M. Myosin V from head to tail. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1378-1389, doi:10.1007/s00018-008-7507-6 (2008).
- 10 Dunn, B. D., Sakamoto, T., Hong, M. S., Sellers, J. R. & Takizawa, P. A. Myo4p is a monomeric myosin with motility uniquely adapted to transport mRNA. *J Cell Biol* **178**, 1193-1206, doi:10.1083/jcb.200707080 (2007).
- 11 Coelho, M. V. & Larson, R. E. 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 (1993).
- 12 Heissler, S. M. & Sellers, J. R. Myosin light chains: Teaching old dogs new tricks. *Bioarchitecture* **4**, 169-188, doi:10.1080/19490992.2015.1054092 (2014).
- 13 Saitoh, T. *et al.* Differential localization of non-muscle myosin II isoforms and phosphorylated regulatory light chains in human MRC-5 fibroblasts. *FEBS Lett* **509**, 365-369 (2001).

- 14 Syamaladevi, D. P., Spudich, J. A. & Sowdhamini, R. Structural and functional insights on the Myosin superfamily. *Bioinform Biol Insights* **6**, 11-21, doi:10.4137/bbi.s8451 (2012).
- 15 Howard, J. Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. *Nature* **389**, 561-567, doi:10.1038/39247 (1997).
- 16 Ikebe, M. Regulation of the function of mammalian myosin and its conformational change. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 157-164, doi:10.1016/j.bbrc.2008.01.057 (2008).
- 17 Kalhammer, G. & Bahler, M. Unconventional myosins. *Essays Biochem* **35**, 33-42 (2000).
- 18 Boldogh, I. R., Ramcharan, S. L., Yang, H. C. & Pon, L. A. A Type V Myosin (Myo2p) and a Rab-like G-Protein (Ypt11p) Are Required for Retention of Newly Inherited Mitochondria in Yeast Cells during Cell Division V. *Mol Biol Cell* **15**, 3994-4002, doi:10.1091/mbc.E04-01-0053 (2004).
- 19 Hammer, J. A., 3rd & Wagner, W. Functions of Class V Myosins in Neurons. *J Biol Chem* **288**, 28428-28434, doi:10.1074/jbc.R113.514497 (2013).
- 20 Espreafico, E. M. *et al.* Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol* **119**, 1541-1557 (1992).
- 21 Mercer, J. A., Seperack, P. K., Strobel, M. C., Copeland, N. G. & Jenkins, N. A. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature* **349**, 709-713, doi:10.1038/349709a0 (1991).
- 22 Reck-Peterson, S. L., Provance, D. W., Jr., Mooseker, M. S. & Mercer, J. A. Class V myosins. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 36-51 (2000).
- 23 McCaffrey, M. W. & Lindsay, A. J. Roles for myosin Va in RNA transport and turnover. *Biochem Soc Trans* **40**, 1416-1420, doi:10.1042/bst20120172 (2012).
- 24 Hammer, J. A., 3rd & Sellers, J. R. Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 13-26, doi:10.1038/nrm3248 (2012).
- 25 Li, J. F. & Nebenfuhr, A. The tail that wags the dog: the globular tail domain defines the function of myosin V/XI. *Traffic* **9**, 290-298, doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00687.x (2008).
- 26 Taylor, K. A. Regulation and recycling of myosin V. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 67-74, doi:10.1016/j.ceb.2006.12.014 (2007).

- 27 Bement, W. M., Hasson, T., Wirth, J. A., Cheney, R. E. & Mooseker, M. S. Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosin genes in vertebrate cell types. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6549-6553 (1994).
- 28 Engle, L. J. & Kennett, R. H. Cloning, analysis, and chromosomal localization of myoxin (MYH12), the human homologue to the mouse dilute gene. *Genomics* **19**, 407-416, doi:10.1006/geno.1994.1088 (1994).
- 29 Müller, T. *et al.* MYO5B mutations cause microvillus inclusion disease and disrupt epithelial cell polarity. *Nature Genetics* **40**, 1163-1165, doi:doi:10.1038/ng.225 (2008).
- 30 Rodriguez, O. C. & Cheney, R. E. Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells. *J Cell Sci* **115**, 991-1004 (2002).
- 31 Toth, J., Kovacs, M., Wang, F., Nyitray, L. & Sellers, J. R. Myosin V from *Drosophila* reveals diversity of motor mechanisms within the myosin V family. *J Biol Chem* **280**, 30594-30603, doi:10.1074/jbc.M505209200 (2005).
- 32 Coureux, P. D., Sweeney, H. L. & Houdusse, A. Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *Embo j* **23**, 4527-4537, doi:10.1038/sj.emboj.7600458 (2004).
- 33 Coureux, P. D. *et al.* A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature* **425**, 419-423, doi:10.1038/nature01927 (2003).
- 34 Volkmann, N. *et al.* The structural basis of myosin V processive movement as revealed by electron cryomicroscopy. *Mol Cell* **19**, 595-605, doi:10.1016/j.molcel.2005.07.015 (2005).
- 35 Cappello, G. *et al.* Myosin V stepping mechanism. doi:10.1073/pnas.0706653104 (2007).
- 36 Pierobon, P. *et al.* Velocity, Processivity, and Individual Steps of Single Myosin V Molecules in Live Cells. *Biophys J* **96**, 4268-4275, doi:10.1016/j.bpj.2009.02.045 (2009).
- 37 Warshaw, D. M. *et al.* Differential Labeling of Myosin V Heads with Quantum Dots Allows Direct Visualization of Hand-Over-Hand Processivity. *Biophys J* **88**, L30-32, doi:10.1529/biophysj.105.061903 (2005).
- 38 Yildiz, A. *et al.* Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300**, 2061-2065, doi:10.1126/science.1084398 (2003).
- 39 Walker, M. L. *et al.* Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature* **405**, 804-807, doi:10.1038/35015592 (2000).

- 40 Desnos, C., Huet, S. & Darchen, F. Vol. 99 411 - 423 (Biology of the Cell, 2007).
- 41 Houdusse, A. *et al.* Crystal structure of apo-calmodulin bound to the first two IQ motifs of myosin V reveals essential recognition features. doi:10.1073/pnas.0609436103 (2006).
- 42 Terrak, M., Rebowksi, G., Lu, R. C., Grabarek, Z. & Dominguez, R. Structure of the light chain-binding domain of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12718-12723, doi:10.1073/pnas.0503899102 (2005).
- 43 Lu, H., Krementsova, E. B. & Trybus, K. M. Regulation of Myosin V Processivity by Calcium at the Single Molecule Level. doi:10.1074/jbc.M605181200 (2006).
- 44 Trybus, K. M. *et al.* Effect of Calcium on Calmodulin Bound to the IQ Motifs of Myosin V. doi:10.1074/jbc.M701636200 (2007).
- 45 Krementsov, D. N., Krementsova, E. B. & Trybus, K. M. Myosin V: regulation by calcium, calmodulin, and the tail domain. *J Cell Biol* **164**, 877-886, doi:10.1083/jcb.200310065 (2004).
- 46 Li, X. D., Mabuchi, K., Ikebe, R. & Ikebe, M. Ca²⁺-induced activation of ATPase activity of myosin Va is accompanied with a large conformational change. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 538-545, doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.084 (2004).
- 47 Cameron, L. C. *et al.* Calcium-induced quenching of intrinsic fluorescence in brain myosin V is linked to dissociation of calmodulin light chains. *Arch Biochem Biophys* **355**, 35-42, doi:10.1006/abbi.1998.0700 (1998).
- 48 Nascimento, A. A. C., Cheney, R. E., Tauhata, S. B. F., Larson, R. E. & Mooseker, M. S. Enzymatic Characterization and Functional Domain Mapping of Brain Myosin-V. doi:10.1074/jbc.271.29.17561 (1996).
- 49 Tang, F. *et al.* Regulated degradation of a class V myosin receptor directs movement of the yeast vacuole. *Nature* **422**, 87-92, doi:10.1038/nature01453 (2003).
- 50 Lambert, J., Naeyaert, J. M., Callens, T., De Paepe, A. & Messiaen, L. Human myosin V gene produces different transcripts in a cell type-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun* **252**, 329-333, doi:10.1006/bbrc.1998.9644 (1998).
- 51 Hodi, Z. *et al.* Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein. *Biochemistry* **45**, 12582-12595, doi:10.1021/bi060991e (2006).
- 52 Wagner, W., Fodor, E., Ginsburg, A. & Hammer, J. A., 3rd. The binding of DYNLL2 to myosin Va requires alternatively spliced exon B and stabilizes a portion of the

- myosin's coiled-coil domain. *Biochemistry* **45**, 11564-11577, doi:10.1021/bi061142u (2006).
- 53 Wu, X. S. *et al.* Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol* **4**, 271-278, doi:10.1038/ncb760 (2002).
- 54 Lindsay, A. J. *et al.* Identification and characterization of multiple novel Rab–myosin Va interactions. *Mol Biol Cell* **24**, 3420-3434, doi:10.1091/mbc.E13-05-0236 (2013).
- 55 Pylypenko, O. *et al.* Structural basis of myosin V Rab GTPase-dependent cargo recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 20443-20448, doi:10.1073/pnas.1314329110 (2013).
- 56 Pylypenko, O. *et al.* Coordinated recruitment of Spir actin nucleators and myosin V motors to Rab11 vesicle membranes. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.17523 (2016).
- 57 Geething, N. C. & Spudich, J. A. Identification of a minimal myosin Va binding site within an intrinsically unstructured domain of melanophilin. *J Biol Chem* **282**, 21518-21528, doi:10.1074/jbc.M701932200 (2007).
- 58 Yao, L.-L. *et al.* Melanophilin Stimulates Myosin-5a Motor Function by Allosterically Inhibiting the Interaction between the Head and Tail of Myosin-5a. *Scientific Reports*, Published online: 3 June 2015; | doi:10.1038/srep10874, doi:doi:10.1038/srep10874 (2015).
- 59 Provance, D. W., James, T. L. & Mercer, J. A. Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes. *Traffic* **3**, 124-132 (2002).
- 60 Wei, Z., Liu, X., Yu, C. & Zhang, M. Structural basis of cargo recognitions for class V myosins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 11314-11319, doi:10.1073/pnas.1306768110 (2013).
- 61 Lise, M. F. *et al.* Myosin-Va-interacting protein, RILPL2, controls cell shape and neuronal morphogenesis via Rac signaling. *J Cell Sci* **122**, 3810-3821, doi:10.1242/jcs.050344 (2009).
- 62 van Diepen, M. T. *et al.* MyosinV controls PTEN function and neuronal cell size. *Nat Cell Biol* **11**, 1191-1196, doi:10.1038/ncb1961 (2009).
- 63 Assis, L. H. *et al.* The molecular motor Myosin Va interacts with the cilia-centrosomal protein RPGRIP1L. *Sci Rep* **7**, 43692, doi:10.1038/srep43692 (2017).
- 64 Nascimento, A. F. *et al.* Structural insights into functional overlapping and differentiation among myosin V motors. *J Biol Chem*, doi:10.1074/jbc.M113.507202 (2013).

- 65 Velvarska, H. & Niessing, D. Structural insights into the globular tails of the human type v myosins Myo5a, Myo5b, And Myo5c. *PLoS One* **8**, e82065, doi:10.1371/journal.pone.0082065 (2013).
- 66 Li, X. D., Jung, H. S., Mabuchi, K., Craig, R. & Ikebe, M. The globular tail domain of myosin Va functions as an inhibitor of the myosin Va motor. *J Biol Chem* **281**, 21789-21798, doi:10.1074/jbc.M602957200 (2006).
- 67 Sellers, J. R. & Knight, P. J. Folding and regulation in myosins II and V. *J Muscle Res Cell Motil* **28**, 363-370, doi:10.1007/s10974-008-9134-0 (2007).
- 68 Li, X. D. *et al.* The globular tail domain puts on the brake to stop the ATPase cycle of myosin Va. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1140-1145, doi:10.1073/pnas.0709741105 (2008).
- 69 Zhang, W.-B., Yao, L.-L. & Li, X.-d. The Globular Tail Domain of Myosin-5a Functions As a Dimer in Regulating the Motor Activity. doi:10.1074/jbc.M116.724328 (2016).
- 70 Zhang, N., Yao, L. L. & Li, X. D. Regulation of class V myosin. *Cell Mol Life Sci*, doi:10.1007/s00018-017-2599-5 (2017).
- 71 Seperack, P. K., Mercer, J. A., Strobel, M. C., Copeland, N. G. & Jenkins, N. A. Retroviral sequences located within an intron of the dilute gene alter dilute expression in a tissue-specific manner. *Embo j* **14**, 2326-2332 (1995).
- 72 Elejalde, B. R. *et al.* Mutations affecting pigmentation in man: I. Neuroectodermal melanolysosomal disease. *Am J Med Genet* **3**, 65-80, doi:10.1002/ajmg.1320030112 (1979).
- 73 Miyata, M. *et al.* A role for myosin Va in cerebellar plasticity and motor learning: a possible mechanism underlying neurological disorder in myosin Va disease. *J Neurosci* **31**, 6067-6078, doi:10.1523/jneurosci.5651-10.2011 (2011).
- 74 Pastural, E. *et al.* Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat Genet* **16**, 289-292, doi:10.1038/ng0797-289 (1997).
- 75 Duran-McKinster, C. *et al.* Elejalde syndrome--a melanolysosomal neurocutaneous syndrome: clinical and morphological findings in 7 patients. *Arch Dermatol* **135**, 182-186 (1999).
- 76 Thomas, E. R. *et al.* Griscelli syndrome type 1: a report of two cases and review of the literature. *Clin Dysmorphol* **18**, 145-148, doi:10.1097/MCD.0b013e328317b870 (2009).

- 77 Cagdas, D. *et al.* Griscelli syndrome types 1 and 3: analysis of four new cases and long-term evaluation of previously diagnosed patients. *Eur J Pediatr* **171**, 1527-1531, doi:10.1007/s00431-012-1765-x (2012).
- 78 Schiaffino, M. V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 1094-1104, doi:10.1016/j.biocel.2010.03.023 (2010).
- 79 Wu, X., Bowers, B., Wei, Q., Kocher, B. & Hammer, J. A., 3rd. Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. *J Cell Sci* **110 (Pt 7)**, 847-859 (1997).
- 80 Menasche, G. *et al.* Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1). *J Clin Invest* **112**, 450-456, doi:10.1172/jci18264 (2003).
- 81 Karcher, R. L. *et al.* Cell cycle regulation of myosin-V by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Science* **293**, 1317-1320, doi:10.1126/science.1061086 (2001).
- 82 Brozzi, F. *et al.* MyRIP interaction with MyoVa on secretory granules is controlled by the cAMP-PKA pathway. *Mol Biol Cell* **23**, 4444-4455, doi:10.1091/mbc.E12-05-0369 (2012).
- 83 Brozzi, F. *et al.* Molecular mechanism of myosin Va recruitment to dense core secretory granules. *Traffic* **13**, 54-69, doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01301.x (2012).
- 84 Bittins, C. M., Eichler, T. W. & Gerdes, H. H. Expression of the dominant-negative tail of myosin Va enhances exocytosis of large dense core vesicles in neurons. *Cell Mol Neurobiol* **29**, 597-608, doi:10.1007/s10571-009-9352-z (2009).
- 85 Chaudhury, A., He, X. D. & Goyal, R. K. Myosin Va plays a key role in nitroergic neurotransmission by transporting nNOS α to enteric varicosity membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**, G498-507, doi:10.1152/ajpgi.00164.2011 (2011).
- 86 Roder, I. V. *et al.* Role of Myosin Va in the plasticity of the vertebrate neuromuscular junction in vivo. *PLoS One* **3**, e3871, doi:10.1371/journal.pone.0003871 (2008).
- 87 Puthalakath, H. *et al.* Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**, 1829-1832, doi:10.1126/science.1062257 (2001).
- 88 Izidoro-Toledo, T. C. *et al.* in *Cell Death Dis* Vol. 4 e547- (2013).
- 89 Ohashi, S. *et al.* 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, doi:10.1074/jbc.M203608200 (2002).
- 90 Yoshimura, A. *et al.* Myosin-Va facilitates the accumulation of mRNA/protein complex in dendritic spines. *Curr Biol* **16**, 2345-2351, doi:10.1016/j.cub.2006.10.024 (2006).
- 91 Knoblach, B. & Rachubinski, R. A. Transport and retention mechanisms govern lipid droplet inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* **16**, 298-309, doi:10.1111/tra.12247 (2015).
- 92 Takagi, Y. *et al.* Human myosin Vc is a low duty ratio, nonprocessive molecular motor. *J Biol Chem* **283**, 8527-8537, doi:10.1074/jbc.M709150200 (2008).
- 93 Sladewski, T. E., Kremntsova, E. B. & Trybus, K. M. Myosin Vc Is Specialized for Transport on a Secretory Superhighway. *Curr Biol* **26**, 2202-2207, doi:10.1016/j.cub.2016.06.029 (2016).
- 94 Kremntsova, E. B., Furuta, K., Oiwa, K., Trybus, K. M. & Ali, M. Y. Small teams of myosin Vc motors coordinate their stepping for efficient cargo transport on actin bundles. *J Biol Chem* **292**, 10998-11008, doi:10.1074/jbc.M117.780791 (2017).
- 95 Jacobs, D. T., Weigert, R., Grode, K. D., Donaldson, J. G. & Cheney, R. E. Myosin Vc is a molecular motor that functions in secretory granule trafficking. *Mol Biol Cell* **20**, 4471-4488, doi:10.1091/mbc.E08-08-0865 (2009).
- 96 Marchelletta, R. R., Jacobs, D. T., Schechter, J. E., Cheney, R. E. & Hamm-Alvarez, S. F. The class V myosin motor, myosin 5c, localizes to mature secretory vesicles and facilitates exocytosis in lacrimal acini. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C13-28, doi:10.1152/ajpcell.00330.2007 (2008).
- 97 Xu, X. F., Chen, Z. T., Gao, N., Zhang, J. L. & An, J. Myosin Vc, a member of the actin motor family associated with Rab8, is involved in the release of DV2 from HepG2 cells. *Intervirology* **52**, 258-265, doi:10.1159/000230669 (2009).
- 98 Bultema, J. J. *et al.* Myosin Vc Interacts with Rab32 and Rab38 Proteins and Works in the Biogenesis and Secretion of Melanosomes*. *J Biol Chem* **289**, 33513-33528, doi:10.1074/jbc.M114.578948 (2014).
- 99 Farquhar, R. E., Rodrigues, E. & Hamilton, K. L. The Role of the Cytoskeleton and Myosin-Vc in the Targeting of KCa3.1 to the Basolateral Membrane of Polarized Epithelial Cells. *Front Physiol* **7**, doi:10.3389/fphys.2016.00639 (2016).

- 100 Roland, J. T., Lapierre, L. A. & Goldenring, J. R. Alternative Splicing in Class V Myosins Determines Association with Rab10[S]. *J Biol Chem* **284**, 1213-1223, doi:10.1074/jbc.M805957200 (2009).
- 101 Li, J. *et al.* The Molecule Pages database. *Nature* **420**, 716-717, doi:10.1038/nature01307 (2002).
- 102 Pranchevicius, M. C. *et al.* Myosin Va phosphorylated on Ser1650 is found in nuclear speckles and redistributes to nucleoli upon inhibition of transcription. *Cell Motil Cytoskeleton* **65**, 441-456, doi:10.1002/cm.20269 (2008).
- 103 **J. Sambrook, E. F. F., T. Maniatis.** *Molecular cloning : a laboratory manual* (2001).
- 104 Kapust, R. B. *et al.* Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng* **14**, 993-1000 (2001).
- 105 Bertani, G. STUDIES ON LYSOGENESIS I. : The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli1. *J Bacteriol* **62**, 293-300 (1951).
- 106 Wu, H. *et al.* Crystal structure of human spermine synthase: implications of substrate binding and catalytic mechanism. *J Biol Chem* **283**, 16135-16146, doi:10.1074/jbc.M710323200 (2008).
- 107 Fisher, T. *DoubleDigest Calculator—Thermo Scientific*, <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>> (2017).
- 108 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410, doi:10.1016/s0022-2836(05)80360-2 (1990).
- 109 Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. & Schlattner, U. in *Int J Mol Sci* Vol. 10 2763-2788 (2009).
- 110 Letunic, I., Doerks, T. & Bork, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. doi:10.1093/nar/gku949 (2015).
- 111 Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. (1998).
- 112 Uhlén, M. *et al.* A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1920-1932, doi:10.1074/mcp.M500279-MCP200 (2005).

- 113 Uhlen, M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419, doi:10.1126/science.1260419 (2015).
- 114 Lemos, T. A., Passos, D. O., Nery, F. C. & Kobarg, J. Characterization of a new family of proteins that interact with the C-terminal region of the chromatin-remodeling factor CHD-3. *FEBS Lett* **533**, 14-20 (2003).
- 115 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).
- 116 Walker, J. M. E. G. E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. *The Proteomics Protocols Handbook, Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. 571-607 (2013).
- 117 Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-858 (1996).
- 118 Lima, D. B. *et al.* SIM-XL: A powerful and user-friendly tool for peptide cross-linking analysis. *J Proteomics* **129**, 51-55, doi:10.1016/j.jprot.2015.01.013 (2015).
- 119 Aragao, A. Z. *et al.* Identification of novel interaction between ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) and thioredoxin-1. *J Biol Chem* **287**, 43071-43082, doi:10.1074/jbc.M112.364513 (2012).
- 120 Cubillos-Rojas, M. *et al.* Simultaneous electrophoretic analysis of proteins of very high and low molecular mass using Tris-acetate polyacrylamide gels. *ELECTROPHORESIS* **31**, 1318-1321, doi:10.1002/elps.200900657 (2017).
- 121 DeGrado-Warren, J. *et al.* Construction and characterization of a normalized yeast two-hybrid library derived from a human protein-coding clone collection. *Biotechniques* **44**, 265-273 (2008).
- 122 Sakai, L. Y., Keene, D. R. & Engvall, E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* **103**, 2499-2509 (1986).
- 123 Li, T., Robert, E. I., van Breugel, P. C., Strubin, M. & Zheng, N. A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 105-111, doi:10.1038/nsmb.1719 (2010).
- 124 Bateman, A., Coghill, P. & Finn, R. D. DUFs: families in search of function. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **66**, 1148-1152, doi:10.1107/s1744309110001685 (2010).

- 125 Peron, A. *et al.* Snyder-Robinson syndrome: a novel nonsense mutation in spermine synthase and expansion of the phenotype. *Am J Med Genet A* **161a**, 2316-2320, doi:10.1002/ajmg.a.36116 (2013).
- 126 Fukuda, M. & Mikoshiba, K. in *FEBS Lett* Vol. 503 217-218 (2001).
- 127 Doniger, J., Landsman, D., Gonda, M. A. & Wistow, G. The product of unr, the highly conserved gene upstream of N-ras, contains multiple repeats similar to the cold-shock domain (CSD), a putative DNA-binding motif. *New Biol* **4**, 389-395 (1992).
- 128 Song, M. H., Aravind, L., Muller-Reichert, T. & O'Connell, K. F. The conserved protein SZY-20 opposes the Plk4-related kinase ZYG-1 to limit centrosome size. *Dev Cell* **15**, 901-912, doi:10.1016/j.devcel.2008.09.018 (2008).
- 129 Liu, W. *et al.* IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics* **31**, 3359-3361, doi:10.1093/bioinformatics/btv362 (2015).
- 130 Ren, J. *et al.* in *Cell Res* Vol. 19 271-273 (2009).
- 131 Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R. & Smith, T. F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297-300, doi:10.1038/371297a0 (1994).
- 132 Li, D. & Roberts, R. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci* **58**, 2085-2097 (2001).
- 133 Yin, J. *et al.* Structural Insights into WD-Repeat 48 Activation of Ubiquitin-Specific Protease 46. *Structure* **23**, 2043-2054, doi:10.1016/j.str.2015.08.010 (2015).
- 134 Park, J. *et al.* Herpesviral protein targets a cellular WD repeat endosomal protein to downregulate T lymphocyte receptor expression. *Immunity* **17**, 221-233 (2002).
- 135 Park, J. *et al.* Distinct roles of cellular Lck and p80 proteins in herpesvirus saimiri Tip function on lipid rafts. *J Virol* **77**, 9041-9051 (2003).
- 136 Cohn, M. A., Kee, Y., Haas, W., Gygi, S. P. & D'Andrea, A. D. UAF1 is a subunit of multiple deubiquitinating enzyme complexes. *J Biol Chem* **284**, 5343-5351, doi:10.1074/jbc.M808430200 (2009).
- 137 Park, E. *et al.* Inactivation of Uaf1 causes defective homologous recombination and early embryonic lethality in mice. *Mol Cell Biol* **33**, 4360-4370, doi:10.1128/mcb.00870-13 (2013).
- 138 Gangula, N. R. & Maddika, S. WD repeat protein WDR48 in complex with deubiquitinase USP12 suppresses Akt-dependent cell survival signaling by stabilizing PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1 (PHLPP1). *J Biol Chem* **288**, 34545-34554, doi:10.1074/jbc.M113.503383 (2013).

- 139 Holt, J. P., Bottomly, K. & Mooseker, M. S. Assessment of myosin II, Va, VI and VIIa loss of function on endocytosis and endocytic vesicle motility in bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **64**, 756-766, doi:10.1002/cm.20220 (2007).
- 140 Simon, D. N. & Wilson, K. L. The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 695-708, doi:10.1038/nrm3207 (2011).
- 141 Hunt, S. L., Hsuan, J. J., Totty, N. & Jackson, R. J. unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes Dev* **13**, 437-448 (1999).
- 142 Anderson, E. C. & Catnaigh, P. O. Regulation of the expression and activity of Unr in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* **43**, 1241-1246, doi:10.1042/bst20150165 (2015).
- 143 Chang, T. C. *et al.* UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. *Genes Dev* **18**, 2010-2023, doi:10.1101/gad.1219104 (2004).
- 144 Grosset, C. *et al.* A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell* **103**, 29-40 (2000).
- 145 Jeffers, M., Paciucci, R. & Pellicer, A. Characterization of unr; a gene closely linked to N-ras. *Nucleic Acids Res* **18**, 4891-4899 (1990).
- 146 Real-Hohn, A. *et al.* Impairing the function of MLCK, myosin Va or myosin Vb disrupts Rhinovirus B14 replication. *Sci Rep* **7**, 17153, doi:10.1038/s41598-017-17501-z (2017).
- 147 Wilkie, A. R. *et al.* A role for myosin Va in human cytomegalovirus nuclear egress. doi:10.1128/JVI.01849-17 (2018).
- 148 Sotelo, J. R. *et al.* Myosin-Va-dependent cell-to-cell transfer of RNA from Schwann cells to axons. *PLoS One* **8**, e61905, doi:10.1371/journal.pone.0061905 (2013).
- 149 Hammer, J. A., 3rd & Wagner, W. Functions of class V myosins in neurons. *J Biol Chem* **288**, 28428-28434, doi:10.1074/jbc.R113.514497 (2013).
- 150 Smith, N. L. *et al.* Novel associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor: The CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology) Consortium. *Circulation* **121**, 1382-1392, doi:10.1161/circulationaha.109.869156 (2010).

- 151 Rojo Pulido, I. *et al.* Myosin Va acts in concert with Rab27a and MyRIP to regulate acute von-Willebrand factor release from endothelial cells. *Traffic* **12**, 1371-1382, doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01248.x (2011).
- 152 Ikeguchi, Y., Bewley, M. C. & Pegg, A. E. Aminopropyltransferases: function, structure and genetics. *J Biochem* **139**, 1-9, doi:10.1093/jb/mvj019 (2006).
- 153 Hibasami, H., Borchardt, R. T., Chen, S. Y., Coward, J. K. & Pegg, A. E. Studies of inhibition of rat spermidine synthase and spermine synthase. *Biochem J* **187**, 419-428 (1980).
- 154 Pajula, R. L., Raina, A. & Eloranta, T. Polyamine synthesis in mammalian tissues. Isolation and characterization of spermine synthase from bovine brain. *Eur J Biochem* **101**, 619-626 (1979).
- 155 Casero, R. A., Jr. & Marton, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 373-390, doi:10.1038/nrd2243 (2007).
- 156 Williams, K. Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. *Cell Signal* **9**, 1-13 (1997).
- 157 Ogden, K. K. & Traynelis, S. F. New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **32**, 726-733, doi:10.1016/j.tips.2011.08.003 (2011).
- 158 Cason, A. L. *et al.* X-linked spermine synthase gene (SMS) defect: the first polyamine deficiency syndrome. *Eur J Hum Genet* **11**, 937-944, doi:10.1038/sj.ejhg.5201072 (2003).
- 159 Pegg, A. E. & Michael, A. J. Spermine synthase. *Cell Mol Life Sci* **67**, 113, doi:10.1007/s00018-009-0165-5 (2010).
- 160 Becerra-Solano, L. E. *et al.* A missense mutation, p.V132G, in the X-linked spermine synthase gene (SMS) causes Snyder-Robinson syndrome. *Am J Med Genet A* **149a**, 328-335, doi:10.1002/ajmg.a.32641 (2009).
- 161 de Alencastro, G. *et al.* in *J Med Genet* Vol. 45 539-543 (2008).
- 162 Schwartz, C. E., Wang, X., Stevenson, R. E. & Pegg, A. E. Spermine synthase deficiency resulting in X-linked intellectual disability (Snyder-Robinson syndrome). *Methods Mol Biol* **720**, 437-445, doi:10.1007/978-1-61779-034-8_28 (2011).
- 163 Ratovitski, T. *et al.* Quantitative Proteomic Analysis Reveals Similarities between Huntington's Disease (HD) and Huntington's Disease-Like 2 (HDL2) Human Brains. *J Proteome Res* **15**, 3266-3283, doi:10.1021/acs.jproteome.6b00448 (2016).

- 164 Nall, M. M. P. C. S. R. A. B. T. (ed University of Texas Health Science Center Department of Biochemistry, 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, Texas, 78284–7760) (1999).
- 165 Velvarska, H. *Structural and functional studies on myosin type V* Ph.D thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, (2012).
- 166 Handley, M. T., Haynes, L. P. & Burgoyne, R. D. Differential dynamics of Rab3A and Rab27A on secretory granules. *J Cell Sci* **120**, 973-984, doi:10.1242/jcs.03406 (2007).

ANEXOS

Anexo A

No anexo A encontra-se um manuscrito submetido para publicação na revista *Scientific Reports*, com o número de rastreio SREP-17-53683, que contém os resultados e discussões apresentados na parte 1 dessa tese.

Expansion of Myosin Va interactome indicates new putative roles in viral infection and cell secretion

Luciano G. Dolce^{1,2,3}, Rui M. P. Silva-Junior⁴, Leandro H. P. Assis^{1,2}, Andrey F. Z. Nascimento^{1,5}, Enilza M. Espreafico⁴, Priscila O. de Giuseppe^{2,3*} and Mário T. Murakami^{2,3*}

¹ Graduate Program in Functional and Molecular Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

² Brazilian Biosciences National Laboratory, Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, SP, Brazil;

³ Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory, Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, SP, Brazil;

⁴ Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil;

⁵ Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, SP, Brazil

*To whom the correspondence should be addressed:

Mario Tyago Murakami, Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Zip Code 13083-970, Campinas, Sao Paulo, Brazil. Tel.: +55 (19) 3518-3198.

E-mail: mario.murakami@ctbe.cnpem.br

Priscila Oliveira de Giuseppe, Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Zip Code 13083-970, Campinas, Sao Paulo, Brazil. Tel.: +55 (19) 3518-3145.

E-mail: priscila.giuseppe@ctbe.cnpem.br

Abstract

Myosin Va (MyoVa) is an actin-based molecular motor that plays key roles in the final stages of secretory pathways, including those related to melanosomes delivery and neurotransmitter release. The globular tail domain (GTD) of MyoVa can be phosphorylated, but whether and how this modification affects its ability to interact with other proteins remains unclear. Thus, in this work, we performed a yeast two-hybrid screening using a phosphomimetic mutant of MyoVa GTD as bait. Although the identified interactions were not phosphospecific, we unveiled four novel potential MyoVa-binding partners: the proteins WDR48 and CSDE1, which play roles in viral infection, the enzyme SMS, which synthesizes the secreted neuromodulator spermine, and the synaptotagmin-like protein TC2N, whose function is unknown. The complex between MyoVa GTD and SMS displayed a K_d in the low micromolar range. This enzyme and TC2N localized together with MyoVa in discrete puncta in the cytoplasm of MCF-7 and SH-SY5Y cells. *MYO5A* knockdown rendered the distribution of SMS disperse and raised the number of TC2N-labeled puncta in the cytoplasm. Together, our results expand our knowledge about the MyoVa interactome and provide a framework for studies aiming to better understand the role of this motor during viral infection and in cell secretion.

Keywords: Myosin Va, WDR48, CSDE1, TC2N, SMS, secretion, mRNA turnover, membrane trafficking, C2 domain, spermine.

Introduction

Class V myosins are processive motors that transport or tether vesicles, organelles and macromolecules to actin filaments, playing key roles in synaptic transmission, hormone secretion and plasma membrane homeostasis¹⁻¹¹. In humans, three paralogous genes encode for class V myosins: *MYO5A*, *MYO5B* and *MYO5C*¹². Defects in the *MYO5A* gene, for instance, are related to the Griscelli syndrome type 1 (also known as Elejalde Syndrome)^{9,13-15}, which is characterized by partial albinism and severe neurological disorders. The molecular mechanisms behind the partial albinism involves the specific role of myosin Va (MyoVa) in the transport of melanosomes^{16,17}. However, the neurological disorders caused by mutations in *MYO5A* gene might have a pleiotropic origin¹⁴, considering the several roles and interactions reported for this molecular motor in neurons so far^{8,18-22}.

MyoVa function can be regulated by the phosphorylation of the residue S1652, which is positioned in a highly flexible loop between the helices $\alpha 6$ and $\alpha 7$ of the globular tail domain (GTD)²³⁻²⁵. When CaMKII phosphorylates this site, MyoVa is released from melanosomes and a phosphomimetic mutation at S1652 induces the same phenomenon²⁶. In contrast, the phosphorylation of the same site by Akt2 enhances the MyoVa-mediated transport of GLUT4 to the plasma membrane in adipocytes²⁷. Furthermore, cellular studies using a monoclonal antibody specific for the phosphorylated GTD detected MyoVa in the nuclear speckles, indicating a possible nuclear function for this molecular motor²⁵. However, how phosphorylation modulates MyoVa interaction with its binding partners is still unclear.

In our previous study, we evidenced that a phosphomimetic mutation of MyoVa GTD decreases the overall flexibility of this domain and hypothesized that GTD phosphorylation might favor the interaction of MyoVa with specific proteins²⁴. To test this hypothesis, in this work, we performed a yeast two-hybrid screening using a phosphomimetic mutant of MyoVa GTD as bait and a universal human normalized cDNA library as prey, aiming to find out phosphospecific-binding proteins. Unexpectedly, the four proteins identified in the screening also interacted with the non-phosphorylated GTD, contradicting our hypothesis. Further analysis indicated that the preys spermine synthase (SMS) and Tandem C2 domains nuclear protein (TC2N) localize together with MyoVa in discrete puncta in the cytoplasm of MCF-7 and SH-SY5Y cell lines. Moreover, *MYO5A* gene silencing led to a disperse distribution of SMS and to an increase of TC2N-labeled puncta in the cytoplasm, indicating the biological relevance of these novel interactions. Although our results did not clarify the role of phosphorylation in MyoVa recruitment, they provide novel connections between MyoVa and proteins implicated in viral infection (WDR48, CSDE1), the first link between MyoVa and the secretion of polyamines - which are crucial for brain activity - and new clues about the cellular roles of TC2N, a remote homolog of synaptotagmins whose function remains obscure.

Results

Novel putative MyoVa-binding proteins

To identify proteins that interact with the phosphorylated GTD of MyoVa, we performed a yeast two-hybrid screen with a phosphomimetic construction of the GTD (GTD-EE)^{24,26} as bait against an universal human normalized cDNA library. 190 colonies were picked from the first screen and tested for the activation of all 4 reporters genes from the Matchmaker® Gold yeast two-hybrid system to ensure a low incidence of false positives. 54 clones lasted in this high stringency test and returned 35 different genes, according to DNA sequence analysis of the prey plasmids.

To further validate these results, we performed a pairwise two-hybrid assay in yeast cells co-transformed with each prey and the GTD-EE construct. In this assay, 21 clones activated all four reporter genes, but nine of them were from non-coding regions, such as 5' and 3' UTRs of mRNA, and three encoded zinc finger proteins or heat shock proteins, that are recurrent false positives in yeast two-hybrid assays²⁸ (Supplementary Table S1).

After the exclusion of truncated (probably misfolded) single-domain proteins (Supplementary Table S1), we classified four clones as potential binding partners of MyoVa-GTD (Figure 1). Moreover, we evaluated if these preys were capable to bind to the non-phosphorylated mutant of MyoVa-GTD. Interestingly, the four proteins interacted with both the GTD-EE and GTD-AA constructs in the pairwise two-hybrid assay, indicating that their binding to GTD are independent of the phosphomimetic mutation under the tested conditions (Figure 1A).

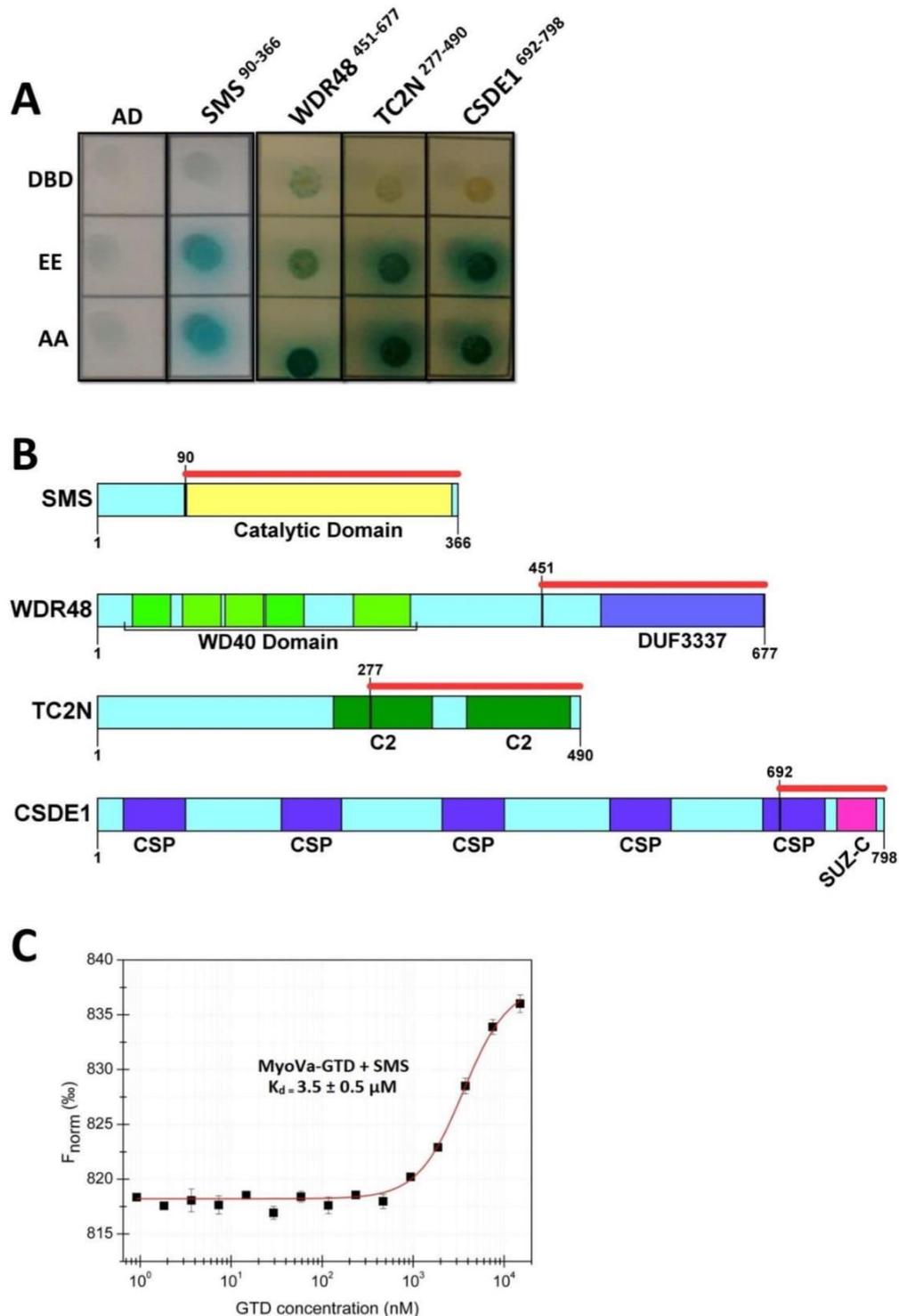


Figure 1. Yeast two-hybrid assay reveals four novel binding partners for MyoVa. **A)** Pairwise two-hybrid assays showing the activation of four reporter genes (QDO/X/A selective medium) in yeast cells co-transformed with pGADT7-prey (or empty pGADT7 as a control) plasmids and pGBKT7-GTD constructs (EE=phosphomimetic and AA=non-phosphorylated). The first line represents the negative control assays, where each clone was tested against the empty pGBKT7 vector (DBD). Note that all reporter genes were activated when preys were in presence of both GTD-EE and GTD-AA mutants, indicating that their interaction with MyoVa-GTD is independent of the

phosphomimetic mutation. **B)** Schematic representation of the domain architecture of the new found partners. The red bar indicates the prey boundaries found in the yeast two-hybrid screening: SMS⁹⁰⁻³⁶⁶ = catalytic domain of Spermine Synthase (SMS; NCBI accession number: EAW98985); WDR48⁴⁵¹⁻⁶⁷⁷ = DUF3337 domain of the WD repeat-containing protein 48 (WDR48; NCBI accession number EAW64548); TC2N²⁷⁷⁻⁴⁹⁰ = contains the second C2 domain of the Tandem C2 domains nuclear protein (TC2N; NCBI accession number: EAW81464); CSDE1⁶⁹²⁻⁷⁹⁸ = contains the SUZ-C domain of the cold shock domain-containing protein E1, isoform 4 (CSDE1; NCBI accession number: NP_001007554). Figures were made using SMART²⁹ and IBS³⁰ **C)** MST assays showing that MyoVa-GTD binds to SMS with a K_d in the low micromolar range.

We also expressed and purified to homogeneity both MyoVa GTD and SMS proteins. Further studies by microscale thermophoresis indicated these proteins form a complex with a dissociation constant of $3.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$ (Figure 1C), supporting SMS as a novel MyoVa-binding partner. Unfortunately, our constructs of C2 domains from TC2N rendered absent or insoluble expression in *E. coli*, precluding a more detailed characterization of the interaction between MyoVa and TC2N.

MyoVa is implicated in the SMS and TC2N distributions in the cytoplasm

To search for biological relevance of identified interactions, we first investigated the subcellular distribution of SMS and TC2N, as well as their co-localization with MyoVa in MCF-7 and SH-SY5Y cell lines. We found that SMS and TC2N co-localized with a subset of MyoVa-labeled puncta in the cytoplasm of both cell lines (Figures 2 and 3). We also noticed *MYO5A* knockdown reduced the overall fluorescence signal of immunolabeled SMS in 50 %, but increased the signal of TC2N in about 90% (Figures 4A and B). According to quantitative RT-PCR analysis, the expression levels of SMS, but not of TC2N, are affected by *MYO5A*-silencing, that correlates with a lower SMS protein content in siMYO5A-treated cells (Figure 4B-C, Supplementary Fig. S1A and S2). Interestingly, *MYO5A* knockdown not only reduced the total mean fluorescence signal of SMS-labeling but also induced a more disperse distribution of SMS in the cytoplasm, in contrast to the fewer, but sharper puncta distribution observed at the control (Figure 4A). This pattern suggests that MyoVa may play a role in the transport of SMS-containing vesicles to their mature destination compartment. On the other hand, *MYO5A*-silencing increased the number of vesicle-like puncta labeled for TC2N (Figure 4A), yielded stronger fluorescence intensity (Figure 4B) and a higher TC2N protein content (Supplementary Fig. S1B and S2), indicating that MyoVa might play a role in the transport of TC2N-containing vesicles to final destination and/or turnover.

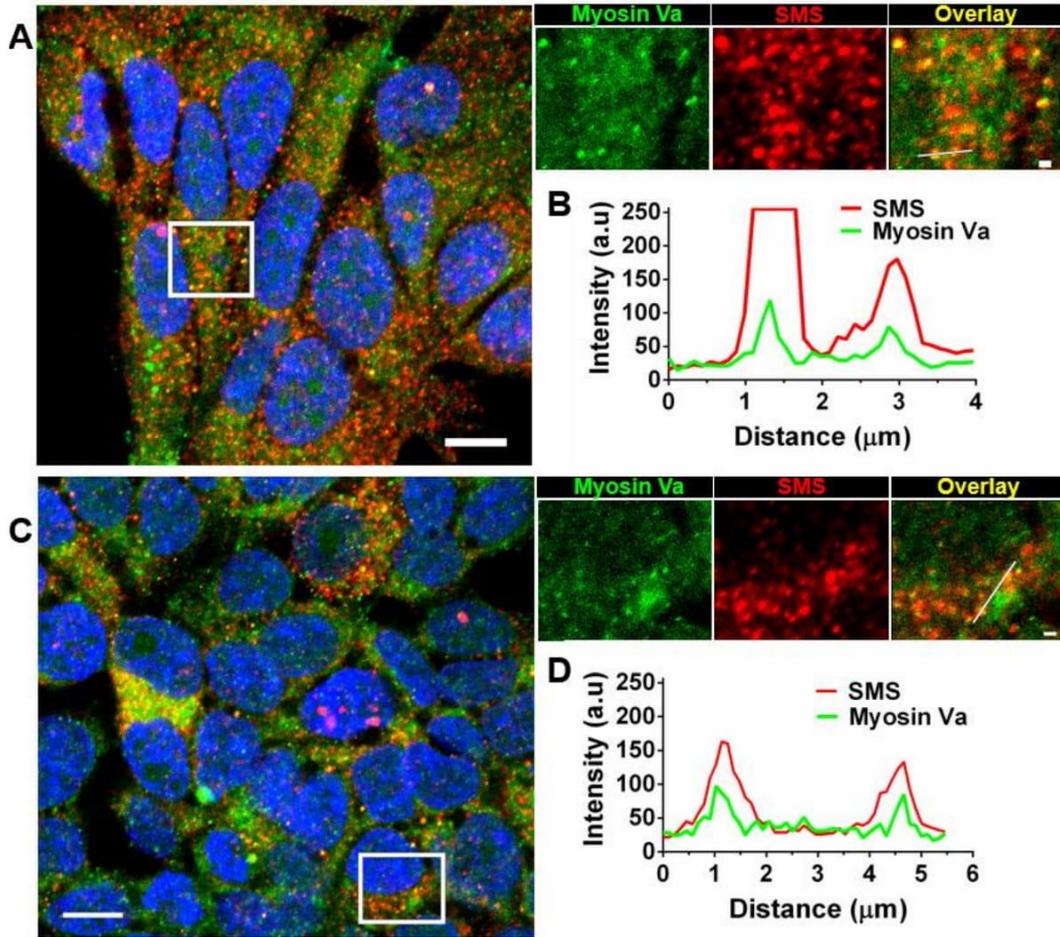


Figure 2: Immunocytochemistry showing the colocalization between MyoVa (green; anti-MyoVa_Medial_Tail) and SMS (red) in MCF-7 (A and B) and SH-SY5Y (C and D) cell lines. The colocalization between both proteins is presented in yellow. Nucleus were stained with DAPI (Blue). Scale bar: 10 μm (field), 1 μm (zoom). (B and D) Linescan analysis of two representative colocalization sites.

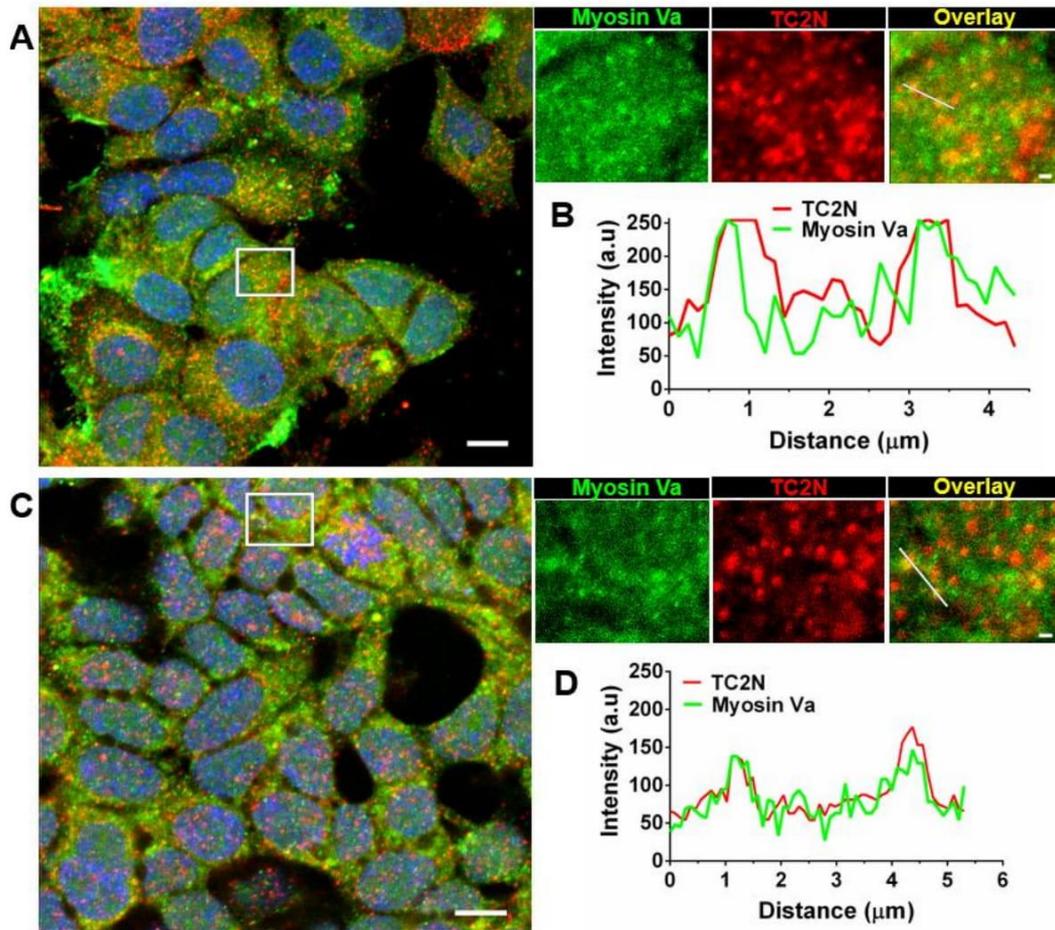


Figure 3: Immunocytochemistry showing the colocalization between MyoVa (green; anti-MyoVa_Medial_Tail) and TC2N (red) in MCF-7 (A and B) and SH-SY5Y (C and D) cell lines. The colocalization between both proteins is presented in yellow. Nucleus were stained with DAPI (Blue). Scale bar: 10 μm (field), 1 μm (zoom). (B and D) Linescan analysis of two representative colocalization sites.

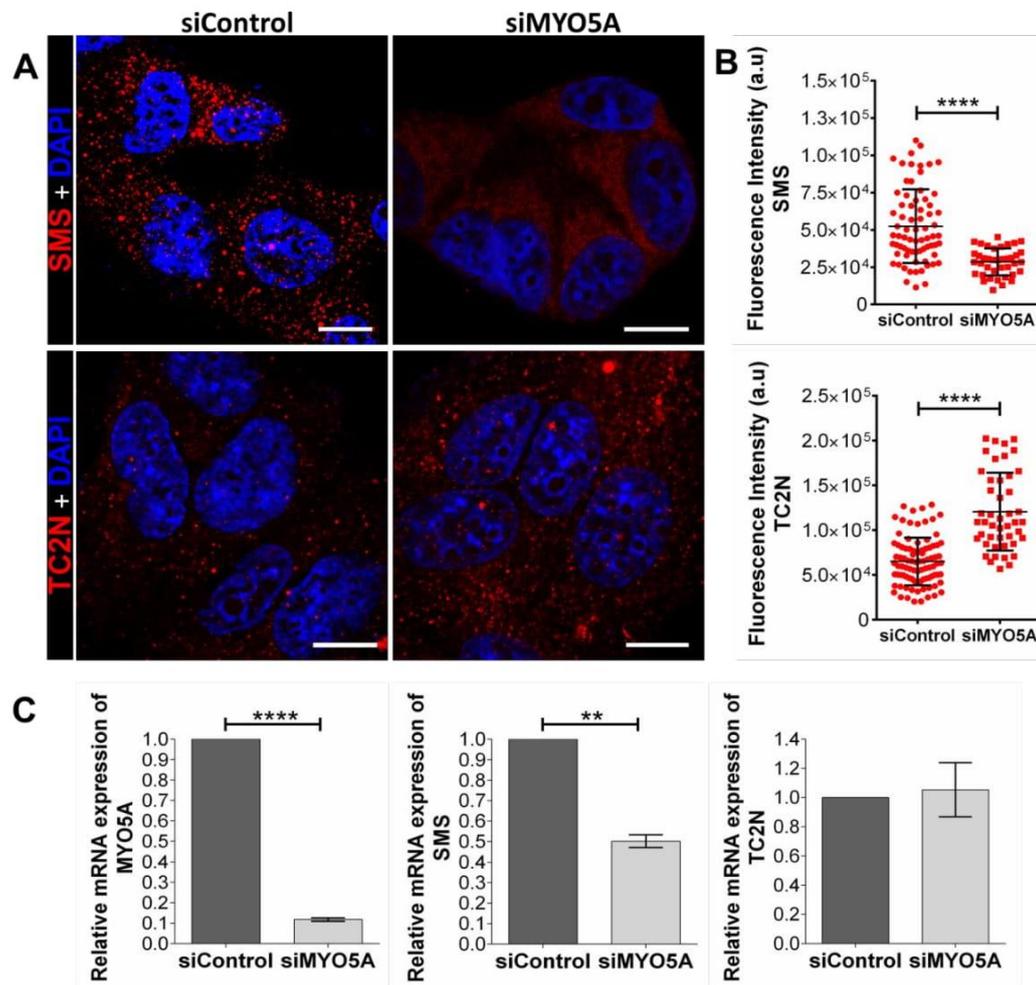


Figure 4: *MYO5A* knockdown affects both SMS distribution and TC2N protein content in MCF-7 cells. **A)** Immunocytochemistry showing that the puncta distribution of SMS (siControl) became disperse in cells treated with siMYO5A (upper panel). In cells immunolabeled for TC2N, we observed an accumulation of vesicle-like puncta containing TC2N when *MYO5A* gene expression was silenced (lower panel). Scale bar: 10 μ m. **B)** Quantification of fluorescence intensity of SMS or TC2N signal in cells treated with siControl and siMYO5A using the Icy BioImage software. Mean SMS intensity \pm SD was 52485 ± 2904 (N=72) in siControl and 28540 ± 1465 (N=39) upon siMYO5A treatment. Mean TC2N intensity \pm SD was 64987 ± 2810 (N=90) in siControl and 120641 ± 6395 (N=46) in siMYO5A-treated cells. **C)** RT-PCR showing the relative mRNA expression of *MYO5A*, *SMS* and *TC2N* in cells treated with siControl or siMYO5A. The siMYO5A treatment was effective to reduce *MYO5A* mRNA expression. The decrease of SMS-labeling intensity upon siMYO5A treatment correlates with a reduction of *SMS* mRNA expression. However, the significant increase of TC2N fluorescence signal is not associated with an increase in *TC2N* mRNA expression, but correlates with an accumulation of vesicle-like puncta containing TC2N protein. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.

Discussion

Although the primary aim of this study was to understand the role of phosphorylation in MyoVa recruitment, we ended up with the finding of four novel potential MyoVa-binding

proteins – WDR48, CSDE1, TC2N and SMS - and a set of evidences that support the biological relevance of SMS and TC2N interaction with this molecular motor. Our final list of MyoVa potential recruiters was curated both *in vivo*, by choosing only interactions that activated all gene reporters from the yeast two-hybrid system, and *in silico*, by selecting only the positive hits likely encoding for folded proteins. Moreover, the physical interaction between MyoVa-GTD and SMS was validated *in vitro* and displayed a dissociation constant similar to those already reported for other complexes involving MyoVa-GTD²⁰.

The four preys identified in the yeast two-hybrid screen were capable to interact both with the phosphomimetic (S1651E/S1652E), and unphosphorylated (S1651A/S1652A) mutants of MyoVa GTD, indicating that their binding to MyoVa occurs independently of S1652 phosphorylation in the tested conditions. These results do not exclude our hypothesis that S1652 phosphorylation may induce MyoVa binding to specific proteins, but support the idea that the major role of such phosphorylation may be the release of MyoVa from the auto-inhibited state³¹.

Based on the literature, we found that the new interactions reported here open new possibilities to better understand the multiple roles of MyoVa motor in humans. The WDR48, for instance, is an endosomal protein exploited by the Saimiriine herpesvirus to recruit Lck and T-cell receptor into lysosomes for degradation^{32,33}. In the nucleus, WDR48 forms a deubiquitinase complex with USP1 that is crucial for DNA repair³⁴⁻³⁷. Since MyoVa participates in endocytic vesicle motility in dendritic cells³⁸ and is also part of the nucleoskeleton³⁹, our primary evidence about WDR48 binding to MyoVa suggests potential roles of this molecular motor in T cell deregulation upon viral infection and genome integrity. On the other hand, the CSDE1 is a RNA-binding protein required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA⁴⁰, and is probably involved in the translationally coupled mRNA turnover⁴¹⁻⁴⁵. This particular interaction is consistent with the growing evidences that MyoVa has a role in RNA transport⁴⁶ and turnover, as discussed by McCaffrey and coworkers⁴⁷.

Our cellular assays provide evidence that the proteins TC2N and SMS might bind to MyoVa in specific vesicles in the cytoplasm, and that MyoVa knockdown led to a disperse distribution of SMS and an accumulation of TC2N-labeled puncta in the cytoplasm. Since the SMS mRNA expression was reduced by 50% upon siMYO5A treatment, even using a siRNA technology that minimize off-target effects (Stealth RNAi™), a deeper investigation is required to better understand whether and how the decrease of *MYO5A* expression affects *SMS* expression. On the other hand, the mRNA levels of TC2N were similar in siControl- and siMYO5A-treated cells, indicating that the increase in TC2N-labeling and TC2N protein content in *MYO5A*-silenced cells reflects events downstream the mRNA expression. Based on our data, we suggest that the vesicle-like puncta containing TC2N protein accumulates upon *MYO5A* knockdown likely due to defects in vesicle trafficking pathways induced by the decrease of MyoVa protein population.

We chose to further characterize the interaction between TC2N and MyoVa because proteins containing C2 domains, such as RPGRIP1L, Rph-3a, Gran-a and PTEN, are common recruiters of MyoVa^{18,20,48,49}. TC2N is a protein of unknown function that has been observed in the nucleus⁵⁰, in extracellular vesicles derived from different tissues⁵¹ as well as at discrete puncta in the cytoplasm (this work). Particularly, our results corroborate the data of the Human Protein Atlas showing the cytoplasmic expression of TC2N in most analyzed tissues, including the cerebral cortex⁵². In humans, polymorphisms in *TC2N* gene correlate with variations in plasma levels of von Willebrand factor (vWF)⁵³. However, the role of TC2N protein in this process is still obscure. Interestingly, it has been demonstrated that MyoVa regulates acute von-Willebrand factor release from endothelial cells by interacting with MyRIP and Rab27a⁵⁴. Thus, it is tempting to hypothesize that the complex formed by TC2N and MyoVa might play a role in the secretory pathway of vWF in endothelial cells.

Another possible function we suggest for the TC2N-MyoVa interaction is related to the release of neurotransmitters. Sequence-based analysis using the Superfamily server⁵⁵ indicates that the C2 domains of TC2N are homolog to synaptotagmins, many of which seem to be involved in membrane trafficking by binding to the SNARE heterodimer (syntaxin 1 and SNAP-25)⁵⁶. Previous studies show that the neck of MyoVa interacts with syntaxin 1 to regulate exocytosis of synaptic vesicles⁵⁷. Moreover, both MyoVa and TC2N proteins are abundantly found in the synapses-enriched brain areas called neuropils⁵⁸ and *MYO5A*^{59,60} and *TC2N* expression is upregulated in differentiated neurons (Supplementary Fig. S3A-B). Together, these data lead us to hypothesize that MyoVa and TC2N complex might play a role in the docking of synaptic vesicles with the presynaptic membrane in neurons.

The unexpected interaction between MyoVa and the enzyme SMS and the co-occurrence of both proteins in cytoplasmic vesicles open new lines of investigation about the molecular mechanisms involved in SMS release via exosomes^{61,62} and spermine secretion by neurons and astrocytes^{63,64}. Mutations in the *SMS* gene are related to the Snyder-Robinson syndrome, characterized by developmental disorders, some of which are also caused by *MYO5A* gene mutations, including intellectual disability, seizures and hypotonia⁶⁵⁻⁶⁹. Both *MYO5A*^{59,60} and *SMS* expression is upregulated in differentiated neurons (Supplementary Fig. S3A,C), but these proteins are less abundant in human brains with Huntington's disease, a progressive neurodegenerative disorder⁷⁰.

The enzyme SMS converts spermidine into spermine (EC 2.5.1.22)⁷¹⁻⁷³, a polyamine that acts as second messenger in neurotransmission, targeting receptors in postsynaptic membranes⁷⁴⁻⁷⁶. The vesicular storage of spermine and spermidine involves an active transporter from the SLC18 family, but the mechanisms coupling spermine synthesis to secretion are still elusive. In this context, our work provides the first link between the enzyme that produce spermine and an actin-based motor that has crucial roles in the final stages of secretory

pathways⁷⁷. In summary, our results expand our knowledge about the MyoVa interactome, supporting future studies aiming to understand the role of this molecular motor during viral infection, via interaction with WDR48 and CSDE1, in spermine secretion, and TC2N function.

Methods

Yeast two-hybrid screen

The yeast two-hybrid screen was performed using the Matchmaker® Gold yeast two-hybrid system (Takara Bio – Clontech, Mountain View, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The MyosinVa-GTD-S1651E/S1652E²⁴ coding sequence (residues 1448–1855; NP_000250.3) was subcloned into the *EcoRI* and *SalI* sites of pGBKT7 (pGBKT7-EE construct), and this one was used to transform *Saccharomyces cerevisiae* Y2H Gold® strain (Takara Bio – Clontech, Mountain View, CA, USA). The transformed cells were mated with the Mate & Plate™ Library - Universal Human Normalized (Takara Bio – Clontech, Mountain View, CA, USA) harbored in yeast strain Y187, plated in petri dishes with synthetic defined agar medium without tryptophan and leucine (glucose 2%, ammonium sulfate 0,5%, YNB (Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids) 0,14%, histidine 20 mg/L, adenine 20 mg/L), supplemented with 200 ng/mL Aureobasidin A (Takara Bio – Clontech, Mountain View, CA, USA) (sDDO/A), and incubated at 30 °C for 5 days. All colonies were replicated to a plate with sDDO/A supplemented with 40 µg/mL X-α-Gal (Takara Bio – Clontech, Mountain View, CA, USA) (sDDO/X/A), and then to a synthetic defined agar medium without tryptophan, leucine, histidine and adenine, supplemented with 200 ng/mL aureobasidin A and 40 µg/mL X-α-Gal (sQDO/X/A), testing for all four gene reporters present in the system (HIS3, ADE2 AUR1-C and MEL1).

The positives colonies in the sQDO/X/A plates were cultivated in 5 mL of synthetic defined medium without leucine (SD/-L) at 30 °C for 24 h, and the library vector (pGADT7-Prey) were extracted using the Easy Yeast Plasmid Isolation Kit (Takara Bio – Clontech, Mountain View, CA, USA). The purified vectors were transformed into *Escherichia coli* DH5α competent cells, extracted with the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced using the Big Dye system in the ABI PRISM 377 Genetic Analyser (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For the identification of the prey-proteins, the sequencing results were compared to non-redundant sequence databases using BLASTn and BLASTx⁷⁸.

Yeast two-hybrid pairwise validation

To validate the positive hits identified in the yeast two-hybrid screen and to test whether the interactions were dependent of the phosphomimetic mutation, *S. cerevisiae* Y2H Gold®

(Takara Bio – Clontech, Mountain View, CA, USA) cells were co-transformed with a pair of pGBKT7 and pGADT7 vectors (Table 1), and grown on sQDO/X/A plates (30 °C for 4 days), testing all four gene reporters. To remove false-positive results, we tested the activation of all gene reporters in Y2H Gold® cells co-transformed with pGADT7-Prey and empty pGBKT7 vectors.

Bioinformatics validation

The nucleotide sequences of preys validated at the previous step were subjected to bioinformatics analyses in order to filter out possible false positives still present. Initially, the sequences were analyzed using BLASTn⁷⁸ to remove those hits containing 5' or 3' untranslated regions (UTR) in frame with the GAL4 AD sequence, that would generate artificial fusion proteins. For constructs containing truncated ORFs, only those hits containing at least one intact domain were considered as true positives, according to protein sequence analyses using the SMART server^{29,79}.

Molecular cloning

The SMS and TC2N constructions (Table 2) were amplified from a human cDNA library by PCR, using Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (ThermoFisher - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the primers shown in Supplementary Table S2. The PCR product was purified with QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), digested using *NdeI* and *XhoI* restriction enzymes and inserted into the *NdeI/XhoI* sites of pET28a tobacco etch virus (TEV) vector²⁴ using T4 DNA Ligase (Promega, Madison, WI, USA). All clones were confirmed by sequencing.

Microscale thermophoresis

To perform the microscale thermophoresis (MST) experiment, the MyoVa-GTD and the SMS were expressed in BL21(DE3) Δ SlyD pRARE2 strain, in LB medium⁸⁰ at 25 °C for 4 h, and 20 °C for 16 h, respectively. The cell lysis was performed by sonication (Vibra-cells, Sonics Newtown, CT, USA) with lysis buffer (50 mM HEPES, 500 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, 20 mM imidazole, pH 7.4 supplemented with 0.1 mg/mL lysozyme, and SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). All proteins were purified by two chromatographic steps, using a HiTrap Chelating column (GE Healthcare Little Chalfont, UK) with an imidazole gradient for protein elution, and a HiLoad Superdex 200 16/60 column (GE Healthcare Little Chalfont, UK). The size-exclusion chromatography was carried out in buffer 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, pH 7.4. Purified MyoVa-GTD was treated with a His-tagged TEV protease⁸¹ (4 °C, 20 h) for the cleavage of the 6xHis-tag, re-applied to the HiTrap Chelating column, and collected from the flow through.

The MST experiment was performed using a Monolith™ NT.115 (NanoTemper Technologies, Munich, Germany) device, with a LED power of 40% and a MST power of 60%. SMS was labeled with the His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA (NanoTemper Technologies, Munich, Germany), following the manufacturer's labeling protocol, and loaded into Monolith™ NT.115 MST Premium Coated capillaries (NanoTemper Technologies, Munich, Germany). All assays were performed in triplicate and data were processed using the NTAffinity Analysis software (NanoTemper Technologies, Munich, Germany). The dissociation constant (K_d) was calculated using the sigmoidal Hill1 function fitting from Origin 8.0 software.

Immunocytochemistry and gene silencing assays

Immunocytochemistry assays were performed on human neuroblastoma (SH-SY5Y) and human mammary adenocarcinoma (MCF-7) cells cultured in DMEM medium (GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 100 mg/mL of streptomycin and kept in a humid atmosphere containing 5% (v/v) CO₂ at 37 °C. The Stealth RNAi™ siRNA targeting *MYO5A* were purchased from Invitrogen as the following sequences:

5'-CCAGGCCCGAUGCUAUGCUAAGUUU-3';

5'-AAACUUAGCAUAGCAUCGGGCCUGG-3';

5'-CCUUAUGAUGAAAGGCUGAGAUAU-3';

5'-AUAUCUCAGCCUUUCAUCAUUAAGG-3';

5'-GAAAUAGCACAAGCAUACAUUGGUU-3';

5'-AACCAAUGUAUGCUUGUGCUAUUUC-3'.

A scramble sequence Stealth RNAi™ siRNA Negative Control High GC Duplex (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as a control. MCF-7 cells were transfected using DharmaFECT 1 Transfection Reagent (GE Healthcare Little Chalfont, UK) according to the manufacturer's instructions. Cells were fixed with 2% (v/v) paraformaldehyde pH 7.4 for 20 min, and then permeabilized with 0.3% (v/v) Triton X-100, blocked with 100 mM glycine, and then 3% (w/v) BSA (adapted from Assis, L. H. P. et al.²⁰). The following antibodies were used: 2 µg/mL rabbit anti-TC2N (SIGMA: HPA027549), 1 µg/mL rabbit anti-SMS (SIGMA: HPA029852) and 2 µg/mL rat polyclonal affinity-purified anti-MyoVa_Medial_Tail. Secondary antibodies used were 2 µg/mL Alexa Fluor® goat anti-rat 488 (Abcam: ab150157) and 2 µg/mL Alexa Fluor® donkey anti-rabbit 594 (Molecular Probes: A21207) IgG. The slides were mounted on ProLong® Diamond Antifade Mountant medium with DAPI (Thermo Fisher Scientific: P36962) and the images were collected on Zeiss LSM780 AxioObserver multifotons inverted confocal microscope, with a 63x objective. The Icy BioImage open source software from the Pasteur Institute (<http://icy.bioimageanalysis.org/>) was used for image processing.

RNA isolation and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from the cells samples according to standard TRIzol protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Total RNA (1 µg) was reverse transcribed to cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to a standard manufacturer's protocol followed by amplification on the ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), using primers from the Supplementary Table S3. All quantitative RT-PCR were performed in triplicate. The expression of endogenous control (GAPDH) was used for the normalization of RNA input.

Gene expression levels were calculated by relative quantitation using the ABI 7500 Real-Time PCR SDS 1.2 software (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the fold expression changes were determined by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method⁸². The data are presented as the fold change of mRNA expression in siRNA relative to siControl cells treated after normalization to an endogenous control (GAPDH or TBP). The RT-PCR data were described as mean ± standard deviation and analyzed using the *t*-Student test, with P<0.05 considered statistically significant.

Availability of materials and data

Materials, data and associated protocols will be promptly available to readers without undue qualifications in material transfer agreements.

References

- 1 Cheney, R. E. *et al.* Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* **75**, 13-23 (1993).
- 2 Mehta, A. D. *et al.* Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* **400**, 590-593, doi:10.1038/23072 (1999).
- 3 Reck-Peterson, S. L., Provance, D. W., Jr., Mooseker, M. S. & Mercer, J. A. Class V myosins. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 36-51 (2000).
- 4 Trybus, K. M. Myosin V from head to tail. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1378-1389, doi:10.1007/s00018-008-7507-6 (2008).
- 5 Sellers, J. R. & Veigel, C. Walking with myosin V. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 68-73, doi:10.1016/j.ceb.2005.12.014 (2006).
- 6 Sladewski, T. E., Kremmentsova, E. B. & Trybus, K. M. Myosin Vc Is Specialized for Transport on a Secretory Superhighway. *Curr Biol* **26**, 2202-2207, doi:10.1016/j.cub.2016.06.029 (2016).
- 7 Hammer, J. A., 3rd & Sellers, J. R. Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 13-26, doi:10.1038/nrm3248 (2012).
- 8 Hammer, J. A., 3rd & Wagner, W. Functions of Class V Myosins in Neurons. *J Biol Chem* **288**, 28428-28434, doi:10.1074/jbc.R113.514497 (2013).
- 9 Desnos, C., Huet, S. & Darchen, F. Vol. 99 411 - 423 (Biology of the Cell, 2007).
- 10 Varadi, A., Tsuboi, T. & Rutter, G. A. in *Mol Biol Cell* Vol. 16 2670-2680 (2005).
- 11 Boldogh, I. R., Ramcharan, S. L., Yang, H. C. & Pon, L. A. A Type V Myosin (Myo2p) and a Rab-like G-Protein (Ypt11p) Are Required for Retention of Newly Inherited Mitochondria in Yeast Cells during Cell Division. *Mol Biol Cell* **15**, 3994-4002, doi:10.1091/mbc.E04-01-0053 (2004).
- 12 Berg, J. S., Powell, B. C. & Cheney, R. E. in *Mol Biol Cell* Vol. 12 780-794 (2001).
- 13 Elejalde, B. R. *et al.* Mutations affecting pigmentation in man: I. Neuroectodermal melanolyosomal disease. *Am J Med Genet* **3**, 65-80, doi:10.1002/ajmg.1320030112 (1979).
- 14 Miyata, M. *et al.* A role for myosin Va in cerebellar plasticity and motor learning: a possible mechanism underlying neurological disorder in myosin Va disease. *J Neurosci* **31**, 6067-6078, doi:10.1523/jneurosci.5651-10.2011 (2011).
- 15 Pastural, E. *et al.* Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat Genet* **16**, 289-292, doi:10.1038/ng0797-289 (1997).
- 16 Provance, D. W., James, T. L. & Mercer, J. A. Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes. *Traffic* **3**, 124-132 (2002).
- 17 Schiaffino, M. V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 1094-1104, doi:10.1016/j.biocel.2010.03.023 (2010).
- 18 van Diepen, M. T. *et al.* MyosinV controls PTEN function and neuronal cell size. *Nat Cell Biol* **11**, 1191-1196, doi:10.1038/ncb1961 (2009).
- 19 Pylypenko, O. *et al.* Coordinated recruitment of Spir actin nucleators and myosin V motors to Rab11 vesicle membranes. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.17523 (2016).
- 20 Assis, L. H. *et al.* The molecular motor Myosin Va interacts with the cilia-centrosomal protein RPGRIP1L. *Sci Rep* **7**, 43692, doi:10.1038/srep43692 (2017).
- 21 Kohli, P. *et al.* The ciliary membrane-associated proteome reveals actin-binding proteins as key components of cilia. doi:10.15252/embr.201643846 (2017).
- 22 Lise, M. F. *et al.* Myosin-Va-interacting protein, RILPL2, controls cell shape and neuronal morphogenesis via Rac signaling. *J Cell Sci* **122**, 3810-3821, doi:10.1242/jcs.050344 (2009).

- 23 Coelho, M. V. & Larson, R. E. Ca²⁺-dependent phosphorylation of the tail domain of myosin-V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. *Braz J Med Biol Res* **26**, 465-472 (1993).
- 24 Nascimento, A. F. *et al.* Structural insights into functional overlapping and differentiation among myosin V motors. *J Biol Chem*, doi:10.1074/jbc.M113.507202 (2013).
- 25 Pranchevicius, M. C. *et al.* Myosin Va phosphorylated on Ser1650 is found in nuclear speckles and redistributes to nucleoli upon inhibition of transcription. *Cell Motil Cytoskeleton* **65**, 441-456, doi:10.1002/cm.20269 (2008).
- 26 Karcher, R. L. *et al.* Cell cycle regulation of myosin-V by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Science* **293**, 1317-1320, doi:10.1126/science.1061086 (2001).
- 27 Yoshizaki, T. *et al.* Myosin 5a Is an Insulin-Stimulated Akt2 (Protein Kinase B β) Substrate Modulating GLUT4 Vesicle Translocation. doi:10.1128/MCB.02298-06 (2007).
- 28 Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. & Schlattner, U. in *Int J Mol Sci* Vol. 10 2763-2788 (2009).
- 29 Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. (1998).
- 30 Liu, W. *et al.* IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics* **31**, 3359-3361, doi:10.1093/bioinformatics/btv362 (2015).
- 31 Velvarska, H. *Structural and functional studies on myosin type V* Ph.D thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, (2012).
- 32 Park, J. *et al.* Distinct roles of cellular Lck and p80 proteins in herpesvirus saimiri Tip function on lipid rafts. *J Virol* **77**, 9041-9051 (2003).
- 33 Park, J. *et al.* Herpesviral protein targets a cellular WD repeat endosomal protein to downregulate T lymphocyte receptor expression. *Immunity* **17**, 221-233 (2002).
- 34 Gangula, N. R. & Maddika, S. WD repeat protein WDR48 in complex with deubiquitinase USP12 suppresses Akt-dependent cell survival signaling by stabilizing PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1 (PHLPP1). *J Biol Chem* **288**, 34545-34554, doi:10.1074/jbc.M113.503383 (2013).
- 35 Yin, J. *et al.* Structural Insights into WD-Repeat 48 Activation of Ubiquitin-Specific Protease 46. *Structure* **23**, 2043-2054, doi:10.1016/j.str.2015.08.010 (2015).
- 36 Cohn, M. A., Kee, Y., Haas, W., Gygi, S. P. & D'Andrea, A. D. UAF1 is a subunit of multiple deubiquitinating enzyme complexes. *J Biol Chem* **284**, 5343-5351, doi:10.1074/jbc.M808430200 (2009).
- 37 Park, E. *et al.* Inactivation of Uaf1 causes defective homologous recombination and early embryonic lethality in mice. *Mol Cell Biol* **33**, 4360-4370, doi:10.1128/mcb.00870-13 (2013).
- 38 Holt, J. P., Bottomly, K. & Mooseker, M. S. Assessment of myosin II, Va, VI and VIIa loss of function on endocytosis and endocytic vesicle motility in bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **64**, 756-766, doi:10.1002/cm.20220 (2007).
- 39 Simon, D. N. & Wilson, K. L. The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 695-708, doi:10.1038/nrm3207 (2011).
- 40 Hunt, S. L., Hsuan, J. J., Totty, N. & Jackson, R. J. unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes Dev* **13**, 437-448 (1999).
- 41 Anderson, E. C. & Catnaigh, P. O. Regulation of the expression and activity of Unr in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* **43**, 1241-1246, doi:10.1042/bst20150165 (2015).
- 42 Chang, T. C. *et al.* UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. *Genes Dev* **18**, 2010-2023, doi:10.1101/gad.1219104 (2004).

- 43 Doniger, J., Landsman, D., Gonda, M. A. & Wistow, G. The product of unr, the highly conserved gene upstream of N-ras, contains multiple repeats similar to the cold-shock domain (CSD), a putative DNA-binding motif. *New Biol* **4**, 389-395 (1992).
- 44 Grosset, C. *et al.* A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell* **103**, 29-40 (2000).
- 45 Jeffers, M., Paciucci, R. & Pellicer, A. Characterization of unr; a gene closely linked to N-ras. *Nucleic Acids Res* **18**, 4891-4899 (1990).
- 46 Sotelo, J. R. *et al.* Myosin-Va-dependent cell-to-cell transfer of RNA from Schwann cells to axons. *PLoS One* **8**, e61905, doi:10.1371/journal.pone.0061905 (2013).
- 47 McCaffrey, M. W. & Lindsay, A. J. Roles for myosin Va in RNA transport and turnover. *Biochem Soc Trans* **40**, 1416-1420, doi:10.1042/bst20120172 (2012).
- 48 Hammer, J. A., 3rd & Wagner, W. Functions of class V myosins in neurons. *J Biol Chem* **288**, 28428-28434, doi:10.1074/jbc.R113.514497 (2013).
- 49 Brozzi, F. *et al.* Molecular mechanism of myosin Va recruitment to dense core secretory granules. *Traffic* **13**, 54-69, doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01301.x (2012).
- 50 Fukuda, M. & Mikoshiba, K. in *FEBS Lett* Vol. 503 217-218 (2001).
- 51 Kalra, H. *et al.* in *PLoS Biol* Vol. 10 (2012).
- 52 Uhlén, M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419, doi:10.1126/science.1260419 (2015).
- 53 Smith, N. L. *et al.* Novel associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor: The CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology) Consortium. *Circulation* **121**, 1382-1392, doi:10.1161/circulationaha.109.869156 (2010).
- 54 Rojo Pulido, I. *et al.* Myosin Va acts in concert with Rab27a and MyRIP to regulate acute von-Willebrand factor release from endothelial cells. *Traffic* **12**, 1371-1382, doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01248.x (2011).
- 55 Gough, J., Karplus, K., Hughey, R. & Chothia, C. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *J Mol Biol* **313**, 903-919, doi:10.1006/jmbi.2001.5080 (2001).
- 56 Rickman, C., Craxton, M., Osborne, S. & Davletov, B. Comparative analysis of tandem C2 domains from the mammalian synaptotagmin family. *Biochem J* **378**, 681-686, doi:10.1042/bj20031407 (2004).
- 57 Watanabe, M. *et al.* Myosin-Va regulates exocytosis through the submicromolar Ca²⁺-dependent binding of syntaxin-1A. *Mol Biol Cell* **16**, 4519-4530, doi:10.1091/mbc.E05-03-0252 (2005).
- 58 Uhlen, M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419, doi:10.1126/science.1260419 (2015).
- 59 Uhlén, M. *et al.* A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1920-1932, doi:10.1074/mcp.M500279-MCP200 (2005).
- 60 Rodriguez, O. C. & Cheney, R. E. Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells. *J Cell Sci* **115**, 991-1004 (2002).
- 61 Overbye, A. *et al.* Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. *Oncotarget* **6**, 30357-30376, doi:10.18632/oncotarget.4851 (2015).
- 62 Rouillard, A. D. *et al.* The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database (Oxford)* **2016**, doi:10.1093/database/baw100 (2016).
- 63 Hiasa, M. *et al.* Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. *Sci Rep* **4**, 6836, doi:10.1038/srep06836 (2014).
- 64 Masuko, T. *et al.* Polyamine transport, accumulation, and release in brain. *J Neurochem* **84**, 610-617 (2003).

- 65 Pegg, A. E. & Michael, A. J. Spermine synthase. *Cell Mol Life Sci* **67**, 113, doi:10.1007/s00018-009-0165-5 (2010).
- 66 Peron, A. *et al.* Snyder-Robinson syndrome: a novel nonsense mutation in spermine synthase and expansion of the phenotype. *Am J Med Genet A* **161a**, 2316-2320, doi:10.1002/ajmg.a.36116 (2013).
- 67 Becerra-Solano, L. E. *et al.* A missense mutation, p.V132G, in the X-linked spermine synthase gene (SMS) causes Snyder-Robinson syndrome. *Am J Med Genet A* **149a**, 328-335, doi:10.1002/ajmg.a.32641 (2009).
- 68 Cason, A. L. *et al.* X-linked spermine synthase gene (SMS) defect: the first polyamine deficiency syndrome. *Eur J Hum Genet* **11**, 937-944, doi:10.1038/sj.ejhg.5201072 (2003).
- 69 de Alencastro, G. *et al.* in *J Med Genet* Vol. 45 539-543 (2008).
- 70 Ratovitski, T. *et al.* Quantitative Proteomic Analysis Reveals Similarities between Huntington's Disease (HD) and Huntington's Disease-Like 2 (HDL2) Human Brains. *J Proteome Res* **15**, 3266-3283, doi:10.1021/acs.jproteome.6b00448 (2016).
- 71 Hibasami, H., Borhardt, R. T., Chen, S. Y., Coward, J. K. & Pegg, A. E. Studies of inhibition of rat spermidine synthase and spermine synthase. *Biochem J* **187**, 419-428 (1980).
- 72 Pajula, R. L., Raina, A. & Eloranta, T. Polyamine synthesis in mammalian tissues. Isolation and characterization of spermine synthase from bovine brain. *Eur J Biochem* **101**, 619-626 (1979).
- 73 Wu, H. *et al.* Crystal structure of human spermine synthase: implications of substrate binding and catalytic mechanism. *J Biol Chem* **283**, 16135-16146, doi:10.1074/jbc.M710323200 (2008).
- 74 Casero, R. A., Jr. & Marton, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 373-390, doi:10.1038/nrd2243 (2007).
- 75 Williams, K. Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. *Cell Signal* **9**, 1-13 (1997).
- 76 Ogden, K. K. & Traynelis, S. F. New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **32**, 726-733, doi:10.1016/j.tips.2011.08.003 (2011).
- 77 Bond, L. M., Brandstaetter, H., Sellers, J. R., Kendrick-Jones, J. & Buss, F. Myosin motor proteins are involved in the final stages of the secretory pathways. *Biochem Soc Trans* **39**, 1115-1119, doi:10.1042/bst0391115 (2011).
- 78 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410, doi:10.1016/s0022-2836(05)80360-2 (1990).
- 79 Letunic, I., Doerks, T. & Bork, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. doi:10.1093/nar/gku949 (2015).
- 80 Bertani, G. STUDIES ON LYSOGENESIS I. : The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli1. *J Bacteriol* **62**, 293-300 (1951).
- 81 Kapust, R. B. *et al.* Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng* **14**, 993-1000 (2001).
- 82 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).

Acknowledgements

We are grateful to Professor Jörg Kobarg for the assistance with the two-hybrid screen, to the Spectroscopy and Calorimetry Lab from LNBio, and to Dr. Fernanda A. H. Batista, Silmara Banzi Reis, Benedita de Souza and Eduardo Tozatto for the technical assistance. We also thank the Multiuser Laboratories on Confocal and Multiphoton Microscopy from the Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) grants 2014/09720-9 (to M.T.M.); FAPESP student stipends 2014/00584-5 (to L.G.D.), 2011/20229-7 (to L.H.P.A) and 2009/14257-8 (to A.F.Z.N.); FAPESP grant to multiuser facilities (Multiuser Laboratories of Multiphoton Microscopy, 2009/54014-7 and Confocal Microscopy, 2004/08868-0); and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grants 478059/2009-4 and 486841/2012-0 (to M.T.M.). This work was supported by grants to E.M.E. from São Paulo Research Foundation - FAPESP (2014/18189-5) and National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (457603/2013-5 and 309187/2015-0). R.M.P.S.J. received fellowship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel -CAPES (88887.137811/2017-00). E.M.E. is member of Center for Cell-Therapy, CEPID/FAPESP (2013/08135-2). This study is part of the National Institute of Science and Technology in Pharmaceutical Nanotechnology: a transdisciplinary approach INCT-NANOFARMA, which is supported by FAPESP (2014/50928-2) and by CNPq (465687/2014-8).

Author contributions

Molecular cloning (L.G.D., L.H.P.A. and A.F.Z.N.); yeast two-hybrid (L.G.D. and L.H.P.A.); protein expression and purification (L.G.D. and A.F.Z.N.); microscale thermophoresis (L.G.D.); cell culture, siRNA knockdown, quantitative RT-PCR and immunocytochemistry (L.G.D., R.M.P.S.J.); conception and design (L.G.D., R.M.P.S.J., E.M.E., P.O.G. and M.T.M.); data analysis and interpretation (L.G.D., L.H.P.A., R.M.P.S.J., E.M.E., P.O.G. and M.T.M.); manuscript writing (L.G.D., P.O.G. and M.T.M.); figures preparation (L.G.D., R.M.P.S.J. and P.O.G.); manuscript revision (all authors).

Additional Information

Competing financial interests

Authors declare no competing financial interests.

Tables

Table 1: List of the pairwise validation co-transformants. pGADT7-Prey = prey plasmids identified in the screen, purified and sequenced. \emptyset = empty vector. pGBKT7-EE = MyoVa-GTD-S1651E/S1652E construct. pGBKT7-AA = MyoVa-GTD-S1651A/S1652A construct.

Assay	Vector pair
Negative control	pGADT7 \emptyset + pGBKT7 \emptyset
Prey auto-activation control	pGADT7-Prey + pGBKT7 \emptyset
Bait auto-activation control	pGADT7 \emptyset + pGBKT7-EE or pGADT7 \emptyset + pGBKT7-AA
Prey•GTD-EE interaction	pGADT7-Prey + pGBKT7-EE
Prey•GTD-AA interaction	pGADT7-Prey + pGBKT7-AA

Table 2: SMS and TC2N constructs.

Constructs	Forward Primer	Reverse Primer	Length (begin/end)	Aim
SMS	SMS F	SMS R	1101 (1/1101)	Expression of full length SMS
TC2	C2.1 F	C2.2 R	819 (655/1473)	Expression of both C2 domains
C2.1	C2.1 F	C2.1 R	348 (655/1038)	Expression of first C2 domain
C2.2	C2.2 F	C2.2 R	429 (1044/1473)	Expression of second C2 domain

Expansion of Myosin Va interactome indicates new putative roles in viral infection and cell secretion

Luciano G. Dolce^{1,2,3}, Rui M. P. Silva-Junior⁴, Leandro H. P. Assis^{1,2}, Andrey F. Z. Nascimento^{1,5}, Enilza M. Espreafico⁴, Priscila O. de Giuseppe^{2,3*} and Mário T. Murakami^{2,3*}

Table S1: Overall yeast two hybrid result, with the 21 preys capable of activate all 4 gene reporters, and the results of our bioinformatic curation.

Clone	Blastn Result	Prey Interval Aligned to the mRNA (pb)	mRNA Translation Interval (pb)	Prey Interval Aligned to the Polypeptide (aa)	Protein Name (Length)	Domain Composition (Position)	Description
2	NM_005180.8	1084-2167	507-1487				ZnF – Recurrent False Positive
4	XM_011519161.1	88-1216	4739-7036				5' UTR
6	NM_001306191.1	793-1779	242-637				3' UTR
7	NM_006016.4	1549-1724	182-775				3' UTR
16	BC050683.1	302-1241	451-1887				ZnF – Recurrent False Positive
19	NM_018442.3	2122-2736	354-2996	589-794*	<i>DDB1 and CUL4 associated factor 6</i> (880)	Several WD40 domains	Probably Misfolded Protein
25	AC002549.1	92606-91778					Chromosomal Untranscribed Regions
30	NM_020839.3	1395-2380	41-2074	451-677	<i>WD repeat-containing protein 48</i> (677)	WD40 (20-390) e DUF 3337 (509-674)	Putative Interaction
36	AL049695.20	39457-40568					Chromosomal Untranscribed Regions
44	BC016058.1	810-1785	230-1219	193-329	<i>Cathepsin K</i> (329)	I29 (26-86) e Pept_C1 (105-320)	Probably Misfolded Protein
49	BC000006.2	584-1255	122-1033	154-303	<i>ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide</i> (303)	Na_K-APTase (3-297)	Probably Misfolded Protein
68	NM_001165979.2	7561-7955	635-7495				3' UTR
78	NG_008805.2	8745-9860	396-9011	2783-2871	<i>Fibrillin 1</i> (2871)		Unfolded Region
88	NR_033192.1	198-1074	45-774				HSP – Recurrent False Positive
104	BC038384.1	894-1513	121-1095	258-324	<i>Y box binding protein 1</i> (324)	CSP (60-128)	Unfolded Region
106	NM_138773.2	3372-4495	127-1383				3' UTR
108	AL139288.15	138495-139600					Chromosomal Untranscribed Regions
123	NG_009228.1	293-831	23-1129	90-269*	<i>Spermine synthase</i> (366)	Spermine_synth (89-366)	Putative Interaction
142	NM_152332.5	1045-2180	214-1686	277-490	<i>Tandem C2 domains nuclear protein</i> (490)	C2 (240-340) e C2 (375-480)	Putative Interaction
151	XM_006716253.2	4257-5384	115-972				3' UTR
186	NM_001007553.2	2590-3749	514-2910	692-798	<i>Cold shock domain-containing protein E1</i> (798)	CSP (26-89), CSP (190-250), CSP (350-420), CSP (520-590), CSP (675-740) e SUZ-C (750-790)	Putative Interaction

* The final pb identified in our sequencing, not the final pb in the prey.

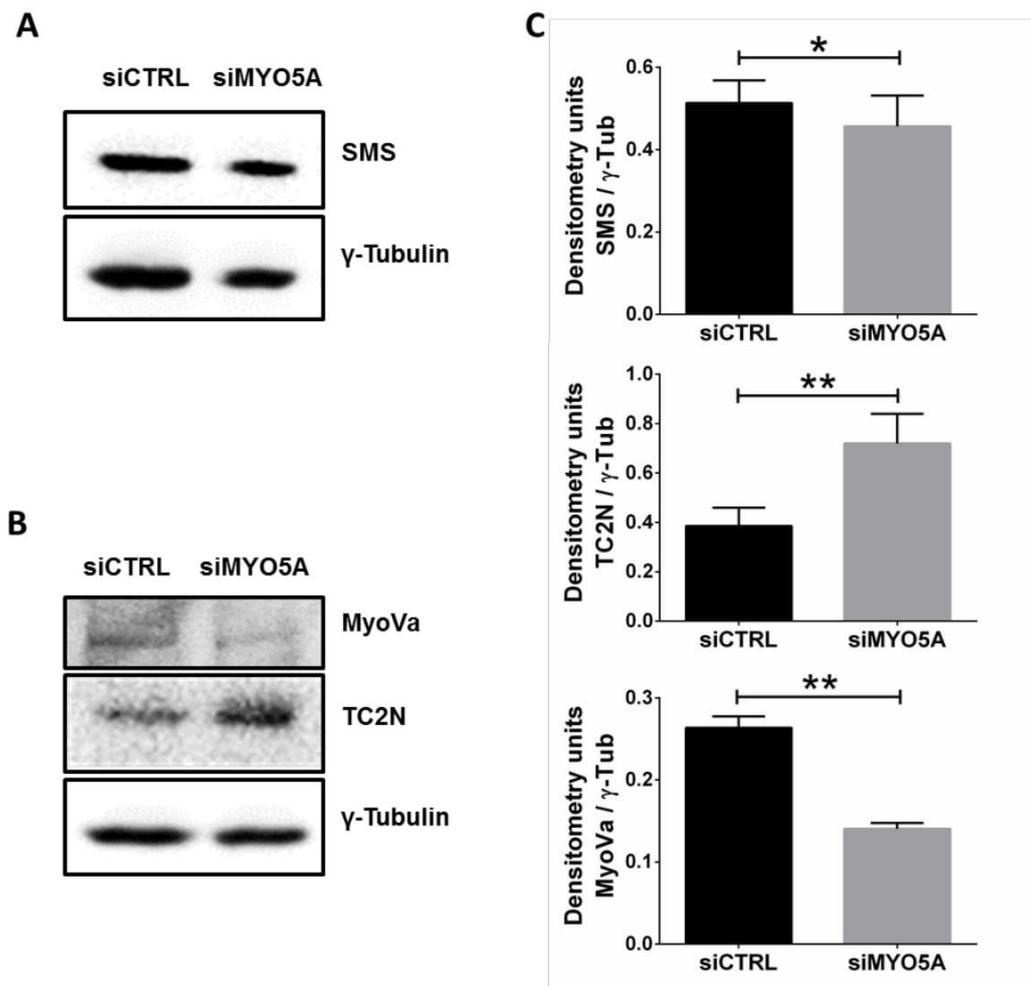


Figure S1. Western blotting analysis of (A) SMS; (B) MyoVa and TC2N proteins from MCF7-cells treated with siControl (siCTRL) and siMYO5A. Black outlines indicate cropped parts from the same membrane (shown in figure S2). C) Protein quantification using western blotting data normalized by the internal loading control (γ -Tubulin). Paired sample *t*-test, * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

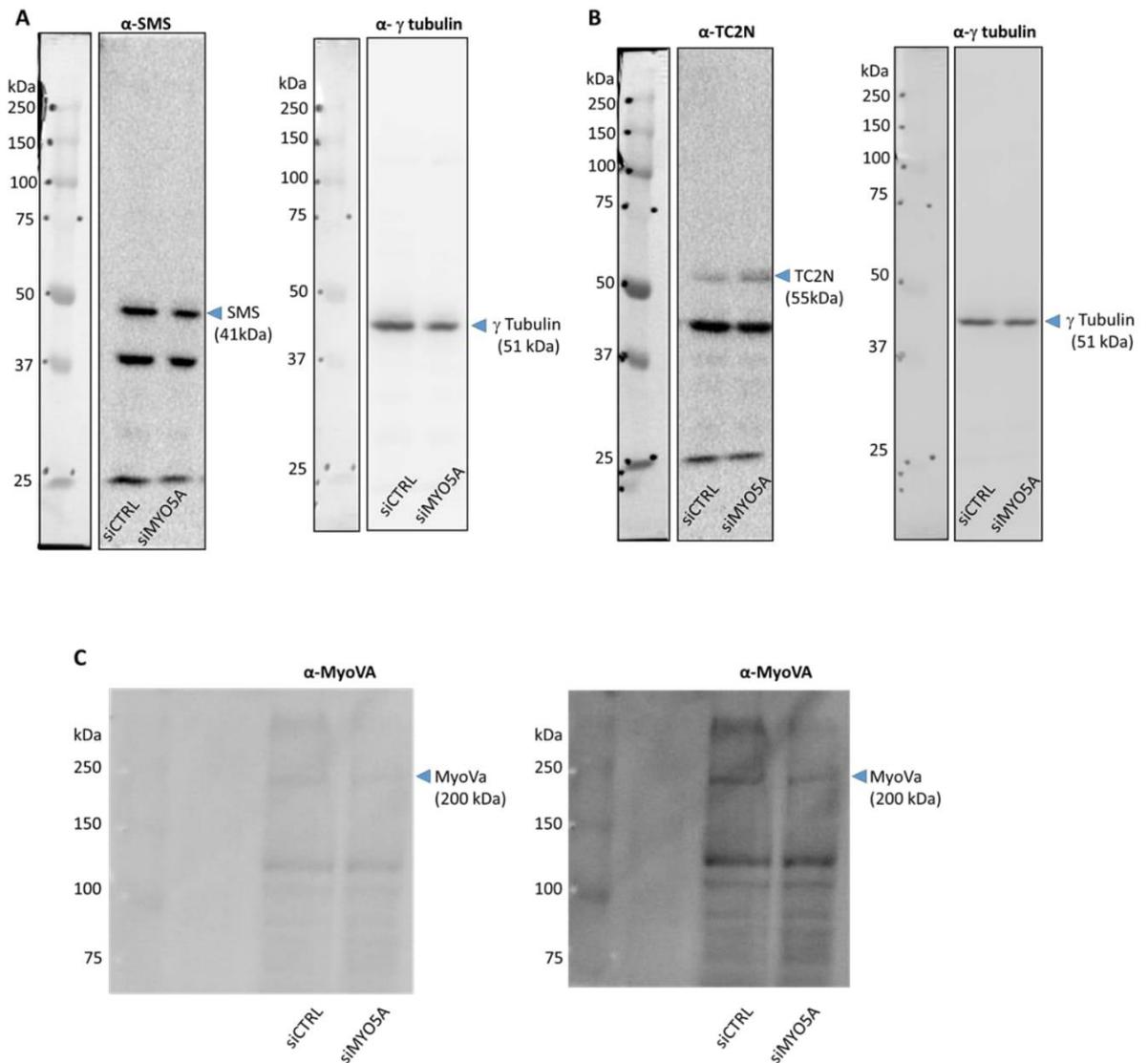


Figure S2. Western blotting membranes whose cropped regions were shown in figures S1A and B. Blue arrowheads indicate the protein bands used for protein quantification and that agree with the migration profile expected for the target proteins (according to the technical specification of purchased antibodies). Black outlines indicate cropped parts from the same membrane. (A) Membrane I, which was used to reveal SMS and γ tubulin (loading control). (B) Membrane II, which was used to reveal TC2N and γ tubulin (loading control). (C) Membrane II revealed with anti-MyoVa antibody imaged with two exposure times.

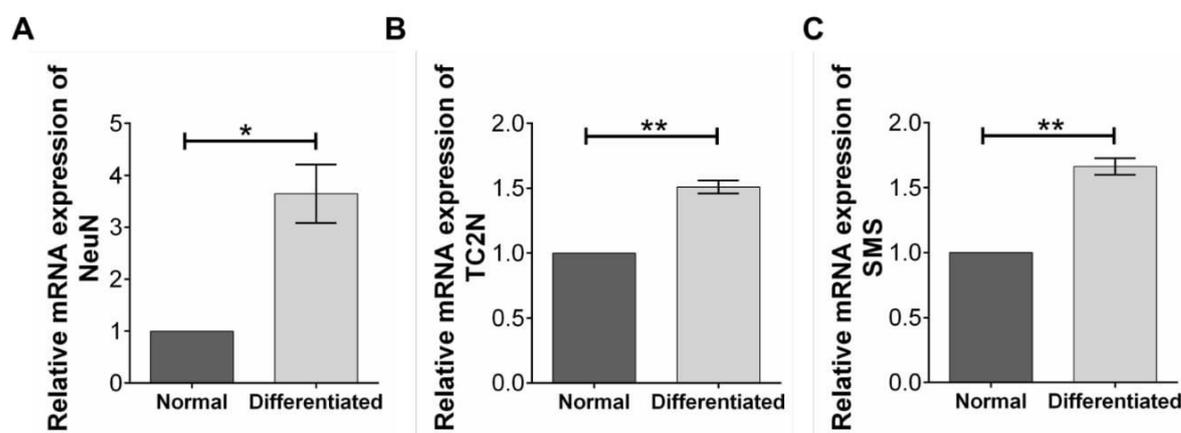


Figure S3. qPCR analysis of expression of the marker for neuronal differentiation NeuN (A), SMS (B) and TC2N (C) in normal and differentiated neuronal SH-SY5Y cells.

Table S2. Primers for amplification of SMS and TC2N constructs.

Primer	Sequence
SMS F	AAAAGGATCCCATATGGCAGCAGCACGGCAC
SMS R	AAAACCTCGAGTCAGGGTTTAGCTTCTTCCAAACAGTG
121 F	AAAAGGATCCCATATGGACAGATACTGGCCCACCG
C2.1 F	AAAACATATGGGATCCGGAGATGAAAGGGACTTCGGGAGACTG
C2.1 R	AAAACCTCGAGTCATGAAGGTGGTGTATATCCAAAGAGTAATCC
C2.2 F	AAAAGGATCCCATATGTCTGTTTGCCATGCAGAACTTGAATTGG
C2.2 R	AAAACCTCGAGTCAAGATGGATTTAATTTGTGCCACCTGA

Table S3. Primers used for qPCR assays.

Primer	Sequence 5' - 3'
MYO5A <i>H. sapiens</i> - F	CGGAAAGACCTGGAGCAAACCTC
MYO5A <i>H.sapiens</i> - R	TGCTGCACGATGCGGTGATTGA
TC2N <i>H. sapiens</i> - F	CCGTTTCCAGAAAGTACGAGACTG
TC2N <i>H.sapiens</i> - R	ATGTCTCTGGATGAATCGCTGAG
SMS <i>H. sapiens</i> - F	AGGAGATCGTCTGTGTCCCTTC
SMS <i>H.sapiens</i> - R	GGAGGTCAGGAAGGCTATTTTGC
HRNBP3 (NeuN) <i>H. sapiens</i> - F	TACGCAGCCTACAGATACGCTC
HRNBP3 (NeuN) <i>H. sapiens</i> - R	TGGTTCCAATGCTGTAGGTCGC

Supplementary methods

Western blotting

MCF-7 cells were plated and transfected in 6-well plates using DharmaFECT 1 Transfection Reagent (GE Healthcare Little Chalfont, UK) according to the manufacturer's instructions, with the Stealth RNAi™ siRNA targeting *MYO5A* and the scramble sequence Stealth RNAi™ siRNA Negative Control High GC Duplex (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), as described in the manuscript. Protein lysates were extracted using RIPA buffer (Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 150mM, 1% Triton X-100, 0,5% Sodium deoxycholate, 0,1% SDS), containing Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). 20 µg of protein from whole-cell lysates were fractionated by 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with blocking solution (3% BSA in TBS-Tween 0,05%) for 1 h at room temperature, and then blotted with the following antibodies: rabbit anti-TC2N (SIGMA: HPA027549), rabbit anti-SMS (SIGMA: HPA029852), rabbit anti-Myosin Va (SIGMA: M4812), and mouse anti-γ-tubulin (SIGMA: T6557) diluted according to manufacturer's instructions in TBS-Tween 0,05% and incubated for 2 hours at room temperature. HRP-conjugated secondary antibodies, anti-mouse IgG (Promega: W4021) and anti-rabbit IgG (Promega: W4011) were diluted according to manufacturer's instructions in TBS-Tween 0,05% and incubated for 1 hour at room temperature. Detection was made by chemiluminescence on the ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Neuronal differentiation

SH-SY5Y cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1% penicillin/streptomycin solution (GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and kept in a humid atmosphere containing 5% (v/v) CO₂ at 37 °C. Cellular differentiation was induced as described by Encinas and coworkers¹ with some modifications. Briefly, 2.5 x 10⁴ cells/cm² were plated on DMEM medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin solution, in culture plates or on 13 mm² glass coverslips previously treated with 0.1 mg/mK poli-lysin D (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). The next day, the medium was removed and replaced with medium II [DMEM medium containing 1% (v/v) fetal bovine serum (GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% penicillin/streptomycin solution (GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 10 µM retinoic acid (Abcam: ab120728)]. After 3 days of growth, medium was replaced with fresh medium II supplemented with 50 ng/mL BDNF (Sigma-Aldrich: SRP3014) and cells grown for further 4 days. RNA extraction and q-RT-PCR assays were performed as described in the manuscript.

Supplementary reference

- 1 Encinas, M. *et al.* Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* **75**, 991-1003 (2000).

Anexo B

No anexo B encontra-se o artigo “**The molecular motor Myosin Va interacts with the cilia-centrosomal protein RPGRIP1L**” (publicado na revista *Scientific Reports*, doi:10.1038/srep43692) referente ao trabalho de doutorado do Dr. Leandro H. P. Assis, do qual eu tive o prazer de participar, realizando experimentos de mutagênese sítio-dirigida, e auxiliando nos experimentos de expressão e purificação de proteínas.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

The molecular motor Myosin Va interacts with the cilia-centrosomal protein RPGRIP1L

Received: 01 September 2016

Accepted: 30 January 2017

Published: 07 March 2017

L. H. P. Assis^{1,2,*}, R. M. P. Silva-Junior^{3,*}, L. G. Dolce^{1,2}, M. R. Alborghetti¹, R. V. Honorato¹, A. F. Z. Nascimento^{1,2}, T. D. Melo-Hanchuk⁴, D. M. Trindade¹, C. C. C. Tonoli¹, C. T. Santos³, P. S. L. Oliveira¹, R. E. Larson³, J. Kobarg⁴, E. M. Espreafico³, P. O. Giuseppe¹ & M. T. Murakami¹

Myosin Va (MyoVa) is an actin-based molecular motor abundantly found at the centrosome. However, the role of MyoVa at this organelle has been elusive due to the lack of evidence on interacting partners or functional data. Herein, we combined yeast two-hybrid screen, biochemical studies and cellular assays to demonstrate that MyoVa interacts with RPGRIP1L, a cilia-centrosomal protein that controls ciliary signaling and positioning. MyoVa binds to the C2 domains of RPGRIP1L via residues located near or in the Rab11a-binding site, a conserved site in the globular tail domain (GTD) from class V myosins. According to proximity ligation assays, MyoVa and RPGRIP1L can interact near the cilium base in ciliated RPE cells. Furthermore, we showed that RPE cells expressing dominant-negative constructs of MyoVa are mostly unciliated, providing the first experimental evidence about a possible link between this molecular motor and cilia-related processes.

Class V myosins are motor proteins that transport and/or tether vesicles, organelles and macromolecules, using the energy of ATP hydrolysis to walk toward the plus end of actin filaments¹. They are found from fungi to vertebrates² and are involved in important cellular processes such as organelle inheritance in budding yeast³ and organelle transport into neuronal dendritic spines⁴. Three class V myosin genes (*MYO5A*, *MYO5B*, and *MYO5C*) are present in vertebrates⁵, of which *MYO5A* has crucial roles in melanocytes and neurons⁶.

Loss-of-function mutations in *MYO5A* are associated with the Griscelli syndrome type 1 in humans, characterized by partial albinism and severe neurological disorders⁷. The partial albinism is due to a defect in the capture and transport of melanosomes by the protein myosin Va (MyoVa) in melanocytes^{3,8}, whereas the neurological impairment has probably pleiotropic origins, considering the several functions reported for MyoVa in the brain⁶. These functions include regulation of the exocytosis of large dense-core vesicles^{9,10}, the transport of endoplasmic reticulum into Purkinje cell dendritic spines¹¹ and the targeting of proteins involved in signaling pathways that control neuronal cell size and shape, such as PTEN¹² and RILPL2¹³.

Interestingly, PTEN and RILPL2 have been demonstrated to control cilia assembly/disassembly and to regulate ciliary membrane content, respectively^{14,15}. Cilia are microtubule-based organelles that emerge from the centrosome to form a cell surface projection when cells exit mitosis¹⁶. Neuronal cells usually exhibit a single non-motile cilium, called primary cilium, which modulates key processes such as neurogenesis, cell polarity, axonal guidance and possibly adult neuronal function¹⁷. Besides PTEN and RILPL2, other binding partners of MyoVa, such as the small GTPases Rab11 and Rab8, also play a role in cilia, by coordinating the assembly of the primary cilium membrane¹⁸. However, whether MyoVa participates in processes related to the primary cilium function has not previously been investigated.

Studies on several cell lines have shown that a subpopulation of MyoVa localizes to the centrosome during interphase and to the mitotic spindle poles and fibers during cell division^{19–22}. These have been intriguing

¹Brazilian Biosciences National Laboratory, National Center for Research in Energy and Materials, Campinas, SP, Brazil. ²Graduate Program in Functional and Molecular Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. ³Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. ⁴Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.O.G. (email: priscila.giuseppe@lnbio.cnpem.br) or M.T.M. (email: mario.murakami@lnbio.cnpem.br)

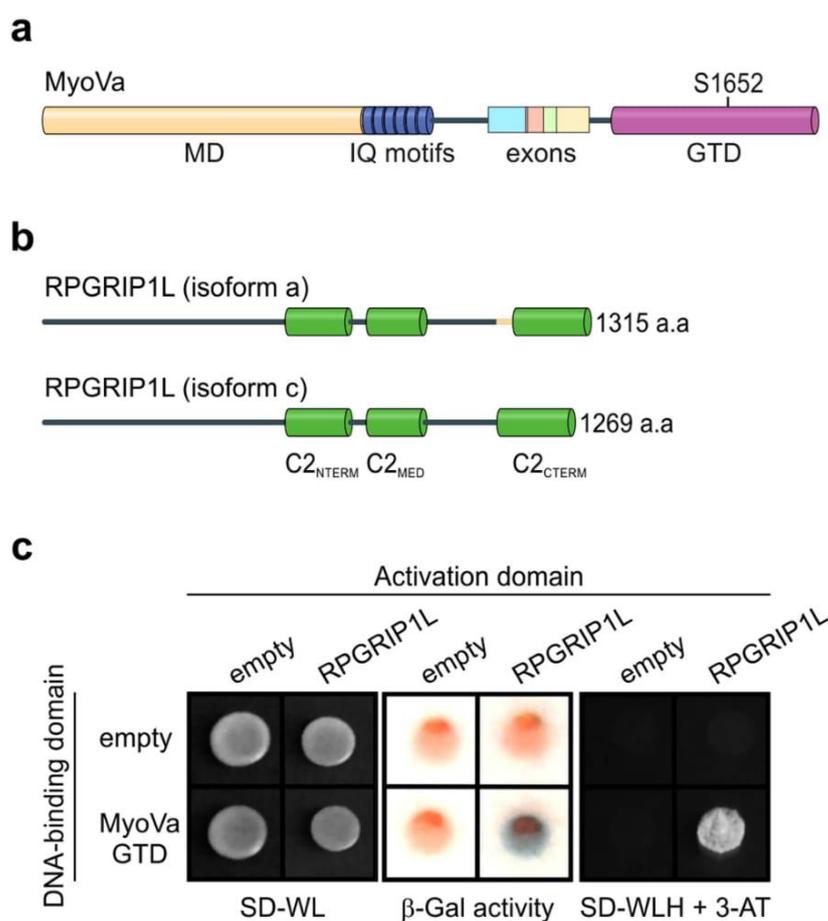


Figure 1. MyoVa interacts with the isoform c of RPGRIP1L. (a) Schematic representation of the human MyoVa domain architecture highlighting the Motor domain (MD, yellow), the IQ motifs (blue), the alternatively spliced exons at the medial tail (A–E, exon F was omitted), and the GTD (pink) as well as the phosphorylation site at S1652 (top). (b) Comparison between the longest isoform of RPGRIP1L (isoform a) with that identified in this work (full-length isoform c). The isoform a is encoded by all the 27 exons of *RPGRIP1L* gene whereas isoform c lacks 46 residues (yellow) encoded by the exon 23. Both isoforms contain three C2 domains (green). (c) Activation of the *LacZ* and *HIS3* reporter genes in YTH assays indicates that MyoVa-GTD interacts with the isoform c of RPGRIP1L. Yeast cells expressing only Gal4 Activation domain and/or LexA DNA-binding domain were used as negative controls.

observations, because, for several decades, the centrosome was viewed as a center devoted to nucleate, anchor and release microtubules²³. However, this paradox has been changing with the recent discovery that the centrosome is also an actin-organizing center²⁴, which correlates with the abundant presence of the actin-based motor MyoVa at this organelle.

The centrosomal targeting of MyoVa depends on its globular tail domain (GTD)^{19,20}, but the molecular mechanisms linking this motor protein to the centrosome have been elusive. Here, we show that the GTD of MyoVa binds to the C2 domains of RPGRIP1L, a cilia-centrosomal protein that regulates basal body positioning and ciliary signaling pathways, such as Wnt and sonic hedgehog^{25–28}. Moreover, we provide the first evidence that dominant-negative constructs of MyoVa interfere with ciliogenesis, paving new connections between the actin-based transport machinery and centrosome-regulated processes.

Results

MyoVa-GTD interacts with the C2 domains of RPGRIP1L. Yeast two-hybrid (YTH) screen using MyoVa-GTD as bait and a cDNA library of human fetal brain as prey revealed RPGRIP1L, among other proteins, as a potential binding partner of MyoVa (Fig. 1, Supplementary Table S1). The transcript identified in the screening comprises the whole open reading frame of *RPGRIP1L* variant 3 (NCBI accession number: NM_001308334.2). This variant encodes the RPGRIP1L isoform c, a multi-domain protein composed of a region predicted to form coiled-coils followed by three C2 domains, named here as C2_{NTERM}, C2_{MED} and C2_{CTERM} (Fig. 1b). Compared to the longest isoform reported for RPGRIP1L (isoform a, NCBI accession number: NP_056087.2), the isoform c lacks only 46 amino-acid residues (encoded by the exon 23) between the last two C2 domains (Fig. 1b).

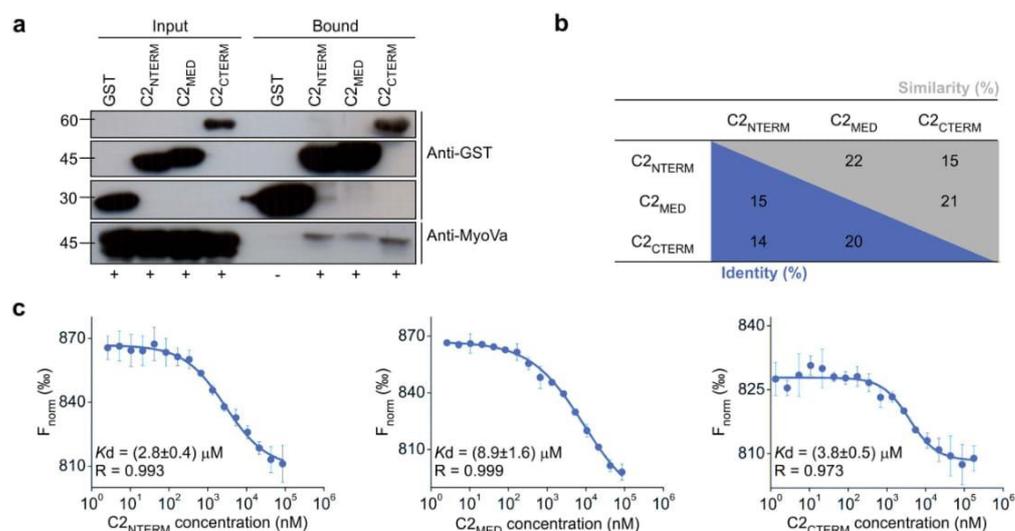


Figure 2. MyoVa-GTD binds to the C2 domains of RPGRIP1L. **(a)** Pull-down assays showing that 6xHis-MyoVa-GTD construct interacts with the three C2 domains of RPGRIP1L fused to GST. Bacteria expressing only 6xHis-MyoVa-GTD and GST were used as negative control. **(b)** Amino acid sequence identity and similarity between the C2 domains of human RPGRIP1L, according to structural alignment of the homology models of C2_{MED} and C2_{CTERM} (predicted using the HHPred server⁵⁴) and the RMN structure of C2_{NTERM} (PDB ID: 2YRB) using the service PDBeFold⁵⁵. **(c)** MST assays showing that MyoVa-GTD binds to C2_{NTERM} (left), C2_{MED} (center) and C2_{CTERM} (right).

To validate this interaction in the YTH system, we co-transformed the yeast strain L40 with the bait (pBTM116 or pBTM116_MyoVa-GTD) and prey plasmids (pACT2 or pACT2_RPGRIP1L) and evaluated the activation of two reporter genes, *LacZ* and *HIS3*. As expected, only the colonies expressing both MyoVa-GTD and RPGRIP1L displayed β -galactosidase activity and grew in presence of 10 mM 3-AT, indicating that RPGRIP1L binds to MyoVa-GTD (Fig. 1c).

As aforementioned, RPGRIP1L contains three C2 domains and there is increasing evidence that they can mediate protein-protein interactions, especially in the ciliary transition zone^{28,29}. Therefore, to characterize the RPGRIP1L-MyoVa interaction and to evaluate the role of these C2 domains in MyoVa binding, we performed pull-down assays (Fig. 2a). The three C2 domains were able to interact with MyoVa-GTD, despite their low sequence identity (Fig. 2a,b). Microscale thermophoresis (MST) experiments showed that RPGRIP1L-C2 domains bind to MyoVa-GTD with dissociation constants in the 3–9 μ M range, with the C2_{NTERM} and C2_{CTERM} displaying the highest affinity for MyoVa-GTD (Fig. 2c).

RPGRIP1L binds to a conserved site of MyoVa and Vb GTDs. The GTDs of MyoVa and Vb share a protein-binding site at the face C of lobule II, which is also conserved in the class V myosin Myo2p from yeast³⁰. To investigate if RPGRIP1L also binds to this region, we mutated some conserved residues at this site to alanine and performed YTH assays (Fig. 3a), following a strategy similar to that used to map the protein-binding sites of Myo2p³¹. Additionally, we evaluated alanine mutants of residues involved in PTEN recognition (K1757 and K1759)¹². As a control, residues from the other face of the MyoVa-GTD (face M), including one that is crucial for the binding of MyoVa motor domain (K1781) in the auto-inhibited state³², were also mutated. Analysis of these mutants indicated that the residues W1713, Y1721, Q1755 and F1792 are required for the interaction between MyoVa and RPGRIP1L (Fig. 3a). Based on these data, we suggest that the RPGRIP1L-binding site overlaps with those of Kar9 and Inp2 to Myo2p and that of Rab11a to MyoVb^{31,33} (Fig. 3b). In agreement with this result, YTH assays showed that RPGRIP1L also interacts with MyoVb-GTD (Fig. 3c), indicating a redundant role for MyoVa and Vb in RPGRIP1L binding.

As MyoVa-GTD can be phosphorylated on residue S1652 by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)^{34,35}, which results in its release from melanosomes and inhibition of melanosome transport³⁶, we also investigated whether S1652 phosphorylation could affect RPGRIP1L binding. For this purpose, we used phospho-mimetic (S1652E and S1651E/S1652E) and non-phospho-mimetic (S1652A and S1651A/S1652A) mutations previously validated by Karcher and co-workers³⁶. YTH analyses showed that RPGRIP1L was capable to interact with both mimetic mutants, indicating that S1652 phosphorylation does not prevent the binding of RPGRIP1L to MyoVa-GTD (Fig. 3d).

MyoVa interacts with RPGRIP1L at the centrosome. To validate the interaction between endogenous MyoVa and RPGRIP1L, we performed proximity ligation assays (PLA) in RPE cells, a model system for studying primary cilium formation and function¹⁸. Since it is well known that a pool of MyoVa^{19–22} and of RPGRIP1L^{25,28,37} localize at the centrosome, we investigated whether they interact at this microenvironment in ciliated cells. As

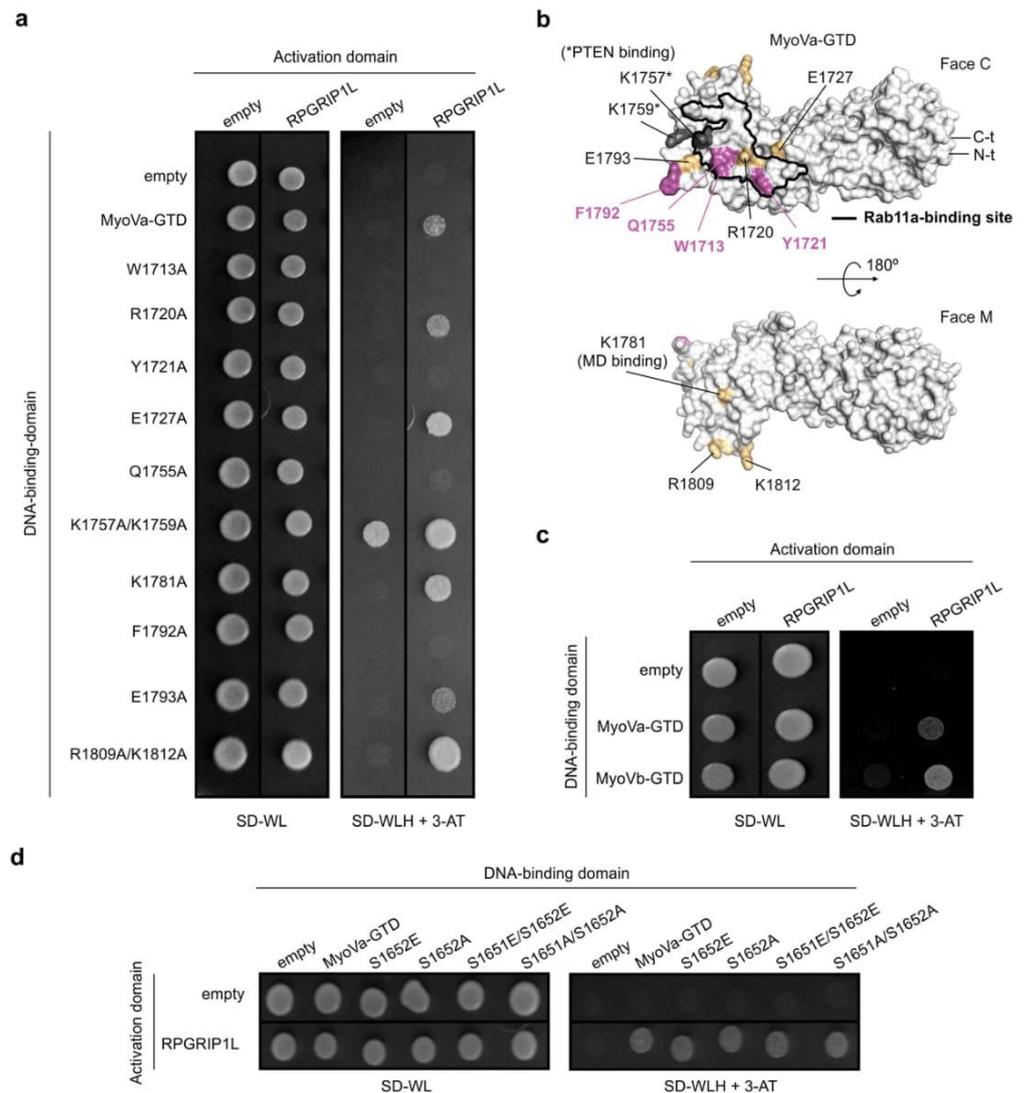


Figure 3. RPGRIP1L binds to a conserved binding site of class V myosins. (a) YTH assays showing that mutations on the face C of MyoVa-GTD (W1713A, Y1721A, Q1755A and F1792A) disrupt the interaction between MyoVa-GTD and RPGRIP1L. (b) Surface representation of MyoVa-GTD³⁰ (PDB ID: 4J5L) highlighting the residues identified as being involved in RPGRIP1L binding (pink), and other residues whose Ala mutants displayed auto-activation (K1757A, K1759A; grey) or a result similar to the wild-type MyoVa-GTD (yellow) in the YTH assay (panel A). The Rab11a-binding site, inferred from the crystal structure of MyoVb-Rab11a complex³³ (PDB ID: 4LX0), as well as the N- and C-termini of MyoVa-GTD (N-t and C-t) are indicated. (c) YTH assays showing that the isoform c of RPGRIP1L also interacts with MyoVb-GTD. Yeast cells expressing only Gal4 Activation domain and/or LexA DNA-binding domain were used as negative controls. (d) Phospho-mimetic (Ser to Glu) and non-phospho-mimetic (Ser to Ala) mutants of MyoVa-GTD interacted with RPGRIP1L in YTH assays, similarly to the wild-type protein. Yeast cells expressing only Gal4 Activation domain and/or LexA DNA-binding domain were used as negative controls.

expected, the presence of PLA dots evidenced the physical interaction between MyoVa and RPGRIP1L near the primary cilium base (Fig. 4), indicating that the binding of MyoVa to RPGRIP1L can occur at the centrosome and might be involved in cilia-related processes.

Dominant-negative expression of MyoVa inhibits ciliogenesis. The fact that RPGRIP1L, as well as other MyoVa-binding proteins (PTEN, Rab8, Rab11 and RILPL2), is involved with the regulation of the primary cilium structure and or composition^{14,15,18,38} prompted us to investigate the effect of overexpressing two dominant-negative constructs of MyoVa in ciliogenesis, EGFP-GTD and EGFP-mGTD (GTD + 45 upstream amino-acid residues from the medial tail) (Supplementary Figure S1). Interestingly, these two constructs displayed different distribution patterns, being EGFP-mGTD localized in discrete foci near the nucleus, whereas

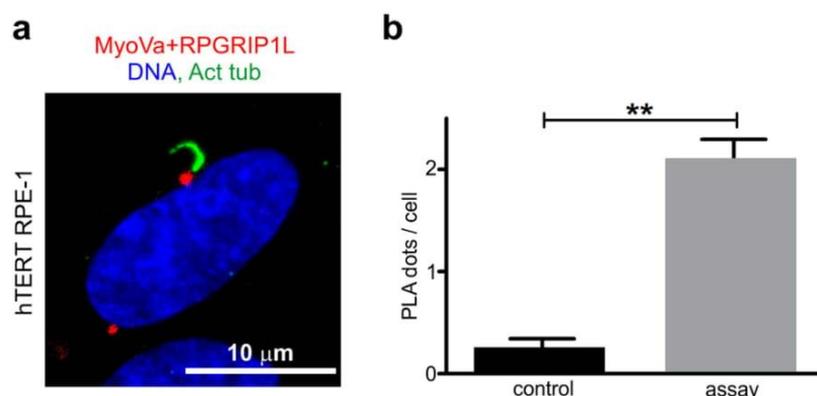


Figure 4. MyoVa interacts with RPGRIP1L at the centrosome. (a) PLA indicate the presence of endogenous complexes between MyoVa and RPGRIP1L (red dots) in a radius of 2 μm from the center of primary cilium base in 16% of hTERT RPE-1 ciliated cells (n = 522). Primary cilium axoneme is marked with acetylated- α -tubulin antibody (green). (b) The mean PLA dot count per cell was 2.12 ± 0.17 (mean \pm SEM) in the assay and 0.26 ± 0.08 (mean \pm SEM) in the control without primary antibodies ($P < 0.005$, two-tailed Student's *t*-test).

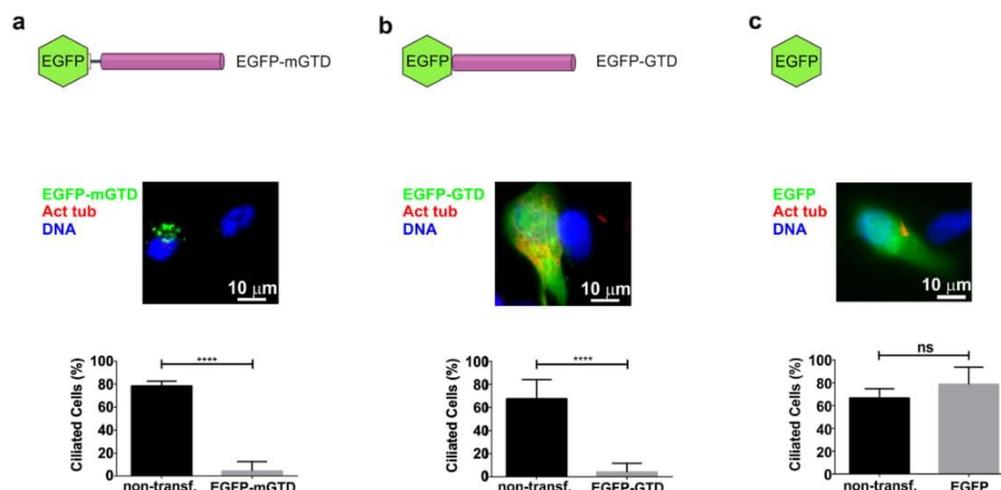


Figure 5. Overexpression of dominant-negative constructs of MyoVa suppressed ciliogenesis. Overexpression of EGFP-mGTD (a) or EGFP-GTD (b) in transfected RPE cells (n = 31 or 83) severely decreased the proportion of ciliated cells compared to their non-transfected neighbors (n = 170 or 373). Means \pm SD represent the average data of 4 (a) or 17 (b) analyzed fields. (c) Overexpression of EGFP alone (negative control) did not affect the proportion of ciliated cells (n = 37) compared to the non-transfected condition (n = 238). Means \pm SD represent the average data of eight analyzed fields. ns = nonsignificant; **** $P \leq 0.0001$ (two-tailed Student's *t*-test).

EGFP-GTD was diffusely distributed at the cytoplasm (Fig. 5a and b), indicating that these additional residues might be critical for GTD targeting. Despite this observation, the overexpression of both constructs strongly suppressed the assembly of primary cilium in RPE cells (Fig. 5a and b), which did not occur in cells expressing EGFP alone (Fig. 5c). The same phenotype was also observed in melanoma B16 cells (data not shown), indicating that MyoVa might play a role in cilia-related processes.

Discussion

In the present work, we revealed that MyoVa interacts with the cilia-centrosomal protein RPGRIP1L at the centrosome. Moreover, we showed structural features of MyoVa required for RPGRIP1L recognition and provided the earliest evidence for a role of MyoVa in the primary cilium development and process.

We demonstrated *in vitro* that the three C2 domains of RPGRIP1L can recruit the GTD of MyoVa with affinity typical of transient protein-protein interactions (low micromolar K_d), being the C2_{NTERM} and C2_{CTERM} domains those that best recognize MyoVa-GTD. *In vivo*, the affinity between RPGRIP1L and MyoVa might be further enhanced by MyoVa dimerization and the tandem disposition of the three C2 domains in RPGRIP1L, which likely increase the probability of their binding. Attempts to identify residues of RPGRIP1L involved in MyoVa

recognition using *in silico* predictions and site-directed mutagenesis were inconclusive, indicating the need of a deeper investigation to elucidate the molecular basis of MyoVa recruitment by the C2 domains of RPGRIP1L (Supplementary Figure S2).

C2 domains are recurrent in ciliary proteins from the transition zone, such as RPGRIP1L²⁹ and CC2D2A³⁹, as well as in MyoVa-interacting proteins, such as PTEN and the Rab effectors granuphilin-a/b (Gran-a/b) and rabphilin-3A (Rph-3A)^{12,40}. Although the role of PTEN-C2 domain in MyoVa binding is still elusive¹², the C2 domains of Gran-a/b and Rph-3A interact with an alternatively spliced region of MyoVa tail, but in a region different from the binding site of RPGRIP1L-C2 domains⁴⁰. Together, these examples illustrate an emerging role for C2 domains in linking proteins to the actin cytoskeleton via the recruitment of MyoVa.

Using YTH assays and site-directed mutagenesis, we showed that RPGRIP1L binds to both MyoVa and Vb, being recognized by a conserved region that overlaps with the Rab11a-binding site³³. Interestingly, active Rab11 (GTP-bound form) is also recruited to the centrosome – specifically to the mother centriole appendages – where it is “turned off” (GDP-bound form) by Evi5⁴¹. Inactivation of Rab11a induces the release of effector proteins like MyoVa/Vb, suggesting that, in this microenvironment, the association of MyoVa with RPGRIP1L might be favoured over that with Rab11a. In agreement with this hypothesis, the Rab11a•GDP binding to MyoVb-GTD monomer³³ displays a K_d 6 times higher than that of RPGRIP1L-C2_{NTERM} domain to MyoVa-GTD.

Our results also evidenced a direct interaction between MyoVa and RPGRIP1L at the vicinity of the basal body, indicating that the MyoVa•RPGRIP1L complex might play a role in primary cilium development. Genetic diseases related to defects in *MYO5A* and *RPGRIP1L* genes are characterized by common neurologic impairments, suggesting they function in correlated pathways in the brain^{7,25,28,42,43}. One of such pathways might involve the primary cilium, since the protein RPGRIP1L has been linked to signaling pathways that depend on this organelle and play a key role in brain development (sonic hedgehog and Wnt) or brain function (leptin receptor signaling)^{26,27,44–46}. Furthermore, in neuron photoreceptors, RPGRIP1L localizes not only in the connecting cilium but also near the plasma membrane of the calyceal processes²⁸ – microvillus-like projections rich in actin filaments – suggesting a potential role for RPGRIP1L in anchoring membranes to the actin cytoskeleton via MyoVa.

By overexpressing two dominant-negative constructs of MyoVa in RPE cells, we showed that loss of myosin V transport function suppresses ciliogenesis. Together with the fact that most proteins known to bind to MyoVa GTD regulate cilia assembly (Rab11), transition zone establishment (RPGRIP1L), cilia dynamics (PTEN) or cilia composition (RILPL2), our data support a role for MyoVa in cilia-related processes.

In summary, our studies revealed RPGRIP1L as a novel MyoVa-binding protein – the first to be demonstrated to interact with MyoVa at the centrosome – and uncover an unprecedented link between MyoVa and ciliogenesis, providing new perspectives for studies aiming to better understand why defects in MyoVa cause neurological disorders in Griscelli syndrome patients.

Methods

Molecular cloning and site-directed mutagenesis. MyoVa-GTD (residues 1448–1855; NP_000250.3) constructs (wild-type and mutants S1652E, S1652A, S1651E/S1652E, S1651A/S1652A) previously cloned into pET28a tobacco etch virus (TEV) vector³⁰ were subcloned into pBTM116 vector between *EcoRI* and *SalI* restriction sites. The gene region encoding for MyoVb-GTD (residues 1453–1848; NP_001073936.1) was amplified by PCR from a human fetal brain cDNA library (Clontech, Mountain View, CA) and cloned into pBTM116 vector between the *BamHI* and *SalI* restriction sites. RPGRIP1L constructs encoding for C2_{NTERM} (residues 561–737), C2_{MED} (residues 781–930) and C2_{CTERM} (residues 1037–1269) were amplified by PCR using as template the pACT2_RPGRIP1L plasmid (NM_001308334.2) identified in the YTH screen described below. RPGRIP1L constructs were cloned into pGEX-4T-1 vector between *EcoRI* and *NotI* restriction sites. MyoVa (W1713A, R1720A, Y1721A, E1727A, Q1755A, K1757A/K1759A, K1781A, F1792A, E1793A, R1809A/K1812A) mutants were generated using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Yeast two-hybrid screen (YTH). YTH screen was performed in *Saccharomyces cerevisiae* strain L40 (trp1-901, his3D200, leu2–3, ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop)8-lac GAL4) using MyoVa-GTD cloned into pBTM116 (LexA DNA-binding domain, DBD) as bait and a human fetal brain cDNA library (Clontech) cloned into pACT2 (Gal4 activation domain, AD) as prey. Yeast cells were transformed with pBTM116_MyoVa-GTD vector and the library as described by Alborghetti and co-workers⁴⁷. The screen was performed in solid Synthetic Defined Medium without tryptophan, leucine and histidine (SD-WLH) containing 5 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). To identify the preys, the pACT2 plasmids of positive clones were isolated and sequenced. The DNA sequences were then compared with those available in the NCBI data bank using the BLASTX program⁴⁸. The clone identified as encoding for the full-length RPGRIP1L isoform c (NP_001295263.1) was further selected for *in vitro* and *in cell* validation and characterization.

Yeast reporter gene assays. To confirm the interaction between pBTM116_MyoVa-GTD and pACT2_RPGRIP1L, *S. cerevisiae* L40 cells were transformed with both constructs. As negative controls, we used L40 cells transformed with pBTM116_MyoVa-GTD and empty pACT2 or pACT2_RPGRIP1L and empty pBTM116. Cells were plated in Synthetic Defined Medium without tryptophan and leucine (SD-WL) and then incubated at 30 °C for 3 days. For β -galactosidase activity assay, cells were transferred to Whatman[®] 3 MM paper (Sigma-Aldrich), permeabilized with liquid nitrogen and wrapped on a second paper soaked in Z buffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM MgCl₂, 50 mM β -mercaptoethanol and pH 7.0) containing 2 μ g/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal; Sigma-Aldrich). Cells were incubated at 37 °C for a couple of hours until the blue color appears, indicating the β -galactosidase activity. For *HIS3* activation assay, cells were plated in SD-WLH containing 10 mM 3-AT, incubated for 3 days at 30 °C and imaged.

GST pull-down assays. *Escherichia coli* BL21(DE3) Δ SlyD strain cells (containing the pRARE2 plasmid) were transformed with recombinant pET28a-TEV and pGEX-4T-1 to co-express 6xHis-tagged MyoVa-GTD and GST-tagged RPGRIP1L constructs. Cells were cultivated in Terrific Broth (TB) medium containing 100 μ g/mL ampicillin, 50 μ g/mL kanamycin and 34 μ g/mL chloramphenicol. Recombinant protein expression was induced with 0.1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) at OD₆₀₀ ~0.6, during 16 h at 18 °C, 200 rpm. Cells were harvested, incubated for 1 h at 4 °C with lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 250 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, 0.01% (v/v) tween-20, 1 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)) (Sigma-Aldrich) containing 0.1 mg/mL lysozyme (Sigma-Aldrich) and free-EDTA SigmaFast Protease Inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and lysed in VCX750 Sonics ultrasound (Sonics & Materials, Newtown, CT). The soluble fraction was incubated with Glutathione Sepharose 4B resin (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) for 2 h at 4 °C under gentle agitation. Unbound proteins were discarded and resin was washed three times with lysis buffer. Immobilized proteins were eluted with 10 mM reduced glutathione (Sigma-Aldrich) in lysis buffer.

Immunodetection by Western blot. Proteins were analyzed in 10% SDS-PAGE and transferred to a PVDF Hybond™-P membrane (GE Healthcare) using the Semi-Dry Blotting system (Biorad, Hercules, CA). Membranes were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: rabbit anti-MyoVa at 0.4 μ g/mL (M4812, Sigma-Aldrich) or mouse anti-GST hybridoma (*in house*, Campinas, Brazil)⁴⁹. After overnight incubation, membranes were washed with TBS buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl and pH 7.6) and incubated with the following secondary antibodies diluted in 0.01% (w/w) powdered milk in TBS buffer: peroxidase labeled goat anti-rabbit at 0.02 μ g/mL (04-15-06, KPL, Gaithersburg, MD) or peroxidase labeled goat anti-mouse at 0.2 μ g/mL (401253, Calbiochem, Darmstadt, Germany). Membranes were washed with TBS buffer and incubated with ImmunoCruz™ Luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Immunostaining were visualized using High Performance Chemiluminescence film (GE Healthcare), Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer (Carestream, Rochester, NY) and Carestream® Kodak® autoradiography GBX fixer (Carestream).

Protein expression and purification. *E. coli* BL21(DE3) Δ SlyD strain containing the pRARE2 plasmid and expressing GST-tagged RPGRIP1L constructs were cultivated in TB medium containing 100 μ g/mL ampicillin and 34 μ g/mL chloramphenicol. Protein expression was induced at OD₆₀₀ ~0.6 with 0.1 mM IPTG during 16 h at 18 °C, 200 rpm. Cells were harvested and resuspended in lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol and pH 7.2) containing 0.1 mg/mL lysozyme, free-EDTA SigmaFast Protease Inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and 50 μ g/mL DNase (Sigma-Aldrich).

Cells were disrupted by sonication and centrifuged at 40,000 x g. The supernatant was loaded onto a 5 mL GSTrap FF column (GE Healthcare), pre-equilibrated with lysis buffer, using an Äkta FPLC (GE Healthcare). GST-tagged constructs were eluted using lysis buffer added by 10 mM reduced glutathione (Sigma-Aldrich). The recombinant protein was dialyzed against ligation buffer (50 mM HEPES, 20 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, pH 7.5) and subsequently incubated with 1% (m/m) trypsin (Sigma-Aldrich), at 4 °C, during 30 min under gentle agitation, for GST-tag cleavage. The reaction was stopped with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (USB Corporation, Cleveland, OH) and loaded onto a 5 mL HiTrap Q FF column (GE Healthcare) pre-equilibrated with ligation buffer using an Äkta FPLC (GE Healthcare). After washing the resin, the target protein was eluted using a step-gradient from 20 mM to 1000 mM NaCl. Residual contamination with GST was removed by affinity chromatography using a 5 mL GSTrap FF column (GE Healthcare). All purification steps were carried out at 4 °C. MyoVa-GTD was expressed and purified as described by Nascimento and co-workers³⁰. All proteins were quantified by the Edelhoch method⁵⁰ using a NanoDrop™ 2000/2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE) and analyzed by dynamic light scattering (DLS), using a ZetaSizer Nano ZS90 equipment (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom), in order to check the structural homogeneity.

Microscale thermophoresis (MST). MyoVa-GTD was incubated with three times molar excess of fluorescein isothiocyanate (FITC) (Molecular Probes, Eugene, OR) dye in buffer 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol and pH 8.0 at 4 °C during 16 h under gentle agitation. The FITC-labeled MyoVa-GTD was purified and FITC excess removed using a 5 mL HiTrap Desalting column (GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol and pH 7.2. Labeling efficiency was evaluated by measuring the absorbance ratio 280/495 nm using a NanoDrop™ 2000/2000c spectrophotometer (Thermo Scientific).

MST assays⁵¹ were performed using 300 nM of FITC-labeled MyoVa-GTD and a serial dilution of RPGRIP1L-C2 domains in interaction buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, 0.05% (v/v) tween-20 and pH 7.2). Samples were loaded into Monolith™ NT.115 MST Premium Coated capillaries (NanoTemper Technologies, Munich, Germany) and thermophoresis data were measured in the Monolith™ NT.115 device (NanoTemper Technologies) using a LED power of 20% and a MST power of 60%. Initial fluorescence and back diffusion were measured for 5 s whereas the thermophoretic movement was recorded for 30 s. All assays were performed in triplicate and data were processed using the NTAffinity Analysis software (NanoTemper Technologies) and Origin 8.0. The dissociation constant (K_d) was calculated from changes in the normalized fluorescence (F_{norm}) as a function of the RPGRIP1L-C2 domains concentration.

In situ Proximity Ligation Assay (PLA). Human hTERT RPE-1 cells (ATCC, Manassas, VA) were cultivated at 37 °C and 5% (v/v) CO₂ in Dulbecco Modified Eagle medium (DMEM) supplied with HAM F-12 nutrient (Sigma-Aldrich) and 10% (v/v) fetal bovine serum (Life Technologies, Carlsbad, CA). Cells at concentration 1,500 cells/mL were cultivated on 13 mm diameter cover slips (Knittel, Braunschweig, Germany) into 24-well plates (Corning incorporated Costar®, Corning, NY) for 24 h. To induce primary cilium formation, confluent cells were cultivated for additional 24 h in medium without fetal bovine serum. For the confocal analysis, cells were fixed with 3.7% (v/v) formaldehyde solution (Sigma-Aldrich) in PBS pH 7.4 for 10 min, washed with 1% (w/v)

BSA (Sigma-Aldrich), 0.2% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS pH 7.4 (wash buffer) and permeabilized with 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS pH 7.4 for 10 min. Free aldehydes were blocked by incubating cells with 10 mM glycine (Promega, Madison, WI) in PBS pH 7.4 for 5 min. Cells were blocked with 3% (w/v) BSA, 0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS pH 7.4 for 30 min. PLA was performed using rabbit anti-MyoVa at 0.2 µg/mL (M4812, Sigma-Aldrich), goat anti-RPGRIP1L at 1 µg/mL (sc-165400, Santa Cruz) and Duolink® *in situ* red starter kit goat/rabbit (DUO92105, Sigma-Aldrich) whereas counterstaining used DAPI, mouse anti-acetylated- α -tubulin at 0.7 µg/mL (32–2700, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) and chicken anti-mouse 488 at 10 µg/mL (A21200, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) antibodies. All procedures were performed according to the manufacturer's protocol. ProLong® Gold Antifade (Life Technologies) was used as mounting medium. Cells were imaged in True Confocal Scanning (TCS) SP8 microscope (Leica, Wetzlar, Germany) at the Biological Imaging facility from the Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio). Images were obtained using oil immersion HC PL APO CS2 63x/1.4 objective lens and 1.4 numerical aperture. Microscopy images were previously analyzed in the LAS AF lite program (Leica). The maximum intensity projection and channel levels correction were performed using the FIJI platform⁵².

Dominant-negative overexpression. For dominant-negative overexpression assays, 3×10^4 hTERT RPE-1 cells (ATCC) were incubated overnight on 13 mm diameter cover slips (Knittel, Braunschweig, Germany) into 24-well plates (Corning incorporated Costar®). The cells were transfected using Lipofectamine® 3000 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA). For overexpression, pEGFP-C1 plasmids encoding chicken brain MyoVa-mGTD (residues 1377–1830; CAA77782.1) or MyoVa-GTD (residues 1423–1830; CAA77782.1) fused to EGFP as well as the empty plasmid encoding only EGFP as control were used. MyoVa-mGTD was identical to the one described in^{19,20}, except that the insert, previously in pS65T-C1, was transferred to pEGFP-C1. MyoVa-GTD (residues 1423–1830; CAA77782.1) was PCR amplified using as template a chicken brain MyoVa full tail cDNA clone⁵³, and the PCR product was inserted into pEGFP-C1 plasmid in fusion with EGFP. The transfections were carried out in a final volume of 500 µL medium following the manufacturer's instructions. After 72 h of incubation for overexpression of EGFP or EGFP-MyoVa-GTD, cells were washed with PBS, fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde pH 7.4 for 15 min, washed with PBS and processed for immunofluorescence and data acquisition as described above. For these assays, cells were imaged using a Leica CTR 6000 microscope (Leica).

References

1. Trybus, K. M. Myosin V from head to tail. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **65**, 1378–1389, doi: 10.1007/s00018-008-7507-6 (2008).
2. Odronitz, F. & Kollmar, M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome biology* **8**, R196, doi: 10.1186/gb-2007-8-9-r196 (2007).
3. Hammer, J. A., 3rd & Sellers, J. R. Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 13–26, doi: 10.1038/nrm3248 (2012).
4. Hammer, J. A., 3rd & Wagner, W. Functions of class V myosins in neurons. *J Biol Chem* **288**, 28428–28434, doi: 10.1074/jbc.R113.514497 (2013).
5. Berg, J. S., Powell, B. C. & Cheney, R. E. A millennial myosin census. *Molecular biology of the cell* **12**, 780–794 (2001).
6. Rudolf, R., Bittins, C. M. & Gerdes, H. H. The role of myosin V in exocytosis and synaptic plasticity. *Journal of neurochemistry* **116**, 177–191, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07110.x (2011).
7. Pastural, E. *et al.* Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nature genetics* **16**, 289–292, doi: 10.1038/ng0797-289 (1997).
8. Evans, R. D. *et al.* Myosin-Va and dynamic actin oppose microtubules to drive long-range organelle transport. *Current biology: CB* **24**, 1743–1750, doi: 10.1016/j.cub.2014.06.019 (2014).
9. Bittins, C. M., Eichler, T. W. & Gerdes, H. H. Expression of the dominant-negative tail of myosin Va enhances exocytosis of large dense core vesicles in neurons. *Cellular and molecular neurobiology* **29**, 597–608, doi: 10.1007/s10571-009-9352-z (2009).
10. Bittins, C. M., Eichler, T. W., Hammer, J. A., 3rd & Gerdes, H. H. Dominant-negative myosin Va impairs retrograde but not anterograde axonal transport of large dense core vesicles. *Cellular and molecular neurobiology* **30**, 369–379, doi: 10.1007/s10571-009-9459-2 (2010).
11. Wagner, W., Brenowitz, S. D. & Hammer, J. A., 3rd. Myosin-Va transports the endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje neurons. *Nature cell biology* **13**, 40–48, doi: 10.1038/ncb2132 (2011).
12. van Diepen, M. T. *et al.* MyosinV controls PTEN function and neuronal cell size. *Nature cell biology* **11**, 1191–1196, doi: 10.1038/ncb1961 (2009).
13. Lise, M. F. *et al.* Myosin-Va-interacting protein, RILPL2, controls cell shape and neuronal morphogenesis via Rac signaling. *Journal of cell science* **122**, 3810–3821, doi: 10.1242/jcs.050344 (2009).
14. Shnitsar, I. *et al.* PTEN regulates cilia through Dishevelled. *Nature communications* **6**, 8388, doi: 10.1038/ncomms9388 (2015).
15. Schaub, J. R. & Stearns, T. The Rilp-like proteins Rilp1 and Rilp2 regulate ciliary membrane content. *Molecular biology of the cell* **24**, 453–464, doi: 10.1091/mbc.E12-08-0598 (2013).
16. Fliegau, M., Benzing, T. & Omran, H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 880–893, doi: 10.1038/nrm2278 (2007).
17. Lee, J. H. & Gleeson, J. G. The role of primary cilia in neuronal function. *Neurobiology of disease* **38**, 167–172, doi: 10.1016/j.nbd.2009.12.022 (2010).
18. Knodler, A. *et al.* Coordination of Rab8 and Rab11 in primary ciliogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 6346–6351, doi: 10.1073/pnas.1002401107 (2010).
19. Espreafo, E. M. *et al.* Localization of myosin-V in the centrosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 8636–8641 (1998).
20. Tsakraklides, V. *et al.* Subcellular localization of GFP-myosin-V in live mouse melanocytes. *Journal of cell science* **112** (Pt 17), 2853–2865 (1999).
21. Lionne, C., Buss, F., Hodge, T., Ihrke, G. & Kendrick-Jones, J. Localization of myosin Va is dependent on the cytoskeletal organization in the cell. *Biochemistry and cell biology—Biochimie et biologie cellulaire* **79**, 93–106 (2001).
22. Wu, X., Kocher, B., Wei, Q. & Hammer, J. A., 3rd. Myosin Va associates with microtubule-rich domains in both interphase and dividing cells. *Cell motility and the cytoskeleton* **40**, 286–303, doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1998)40:3<286::AID-CM7>3.0.CO;2-B (1998).
23. Doxsey, S. Re-evaluating centrosome function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 688–698, doi: 10.1038/35089575 (2001).
24. Farina, F. *et al.* The centrosome is an actin-organizing centre. *Nature cell biology* **18**, 65–75, doi: 10.1038/ncb3285 (2016).

25. Delous, M. *et al.* The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nature genetics* **39**, 875–881, doi: 10.1038/ng2039 (2007).
26. Vierkotten, J., Dildrop, R., Peters, T., Wang, B. & Ruther, U. Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling. *Development* **134**, 2569–2577, doi: 10.1242/dev.003715 (2007).
27. Mahuzier, A. *et al.* Dishevelled stabilization by the ciliopathy protein Rpgrip1l is essential for planar cell polarity. *The Journal of cell biology* **198**, 927–940, doi: 10.1083/jcb.201111009 (2012).
28. Arts, H. H. *et al.* Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome. *Nature genetics* **39**, 882–888, doi: 10.1038/ng2069 (2007).
29. Remans, K., Burger, M., Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. C2 domains as protein-protein interaction modules in the ciliary transition zone. *Cell reports* **8**, 1–9, doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.049 (2014).
30. Nascimento, A. F. *et al.* Structural insights into functional overlapping and differentiation among myosin V motors. *The Journal of biological chemistry* **288**, 34131–34145, doi: 10.1074/jbc.M113.507202 (2013).
31. Eves, P. T., Jin, Y., Brunner, M. & Weisman, L. S. Overlap of cargo binding sites on myosin V coordinates the inheritance of diverse cargoes. *The Journal of cell biology* **198**, 69–85, doi: 10.1083/jcb.201201024 (2012).
32. Li, X. D. *et al.* The globular tail domain puts on the brake to stop the ATPase cycle of myosin Va. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 1140–1145, doi: 10.1073/pnas.0709741105 (2008).
33. Pylypenko, O. *et al.* Structural basis of myosin V Rab GTPase-dependent cargo recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 20443–20448, doi: 10.1073/pnas.1314329110 (2013).
34. Costa, M. C., Mani, F., Santoro, W., Jr., Espreafico, E. M. & Larson, R. E. Brain myosin-V, a calmodulin-carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase II and activates its kinase activity. *The Journal of biological chemistry* **274**, 15811–15819 (1999).
35. Pranchevicius, M. C. *et al.* Myosin Va phosphorylated on Ser1650 is found in nuclear speckles and redistributes to nucleoli upon inhibition of transcription. *Cell motility and the cytoskeleton* **65**, 441–456, doi: 10.1002/cm.20269 (2008).
36. Karcher, R. L. *et al.* Cell cycle regulation of myosin-V by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Science* **293**, 1317–1320, doi: 10.1126/science.1061086 (2001).
37. Sang, L. *et al.* Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell* **145**, 513–528, doi: 10.1016/j.cell.2011.04.019 (2011).
38. Jensen, V. L. *et al.* Formation of the transition zone by Mks5/Rpgrip1L establishes a ciliary zone of exclusion (CIZE) that compartmentalises ciliary signalling proteins and controls PIP2 ciliary abundance. *The EMBO journal* **34**, 2537–2556, doi: 10.15252/embj.201488044 (2015).
39. Noor, A. *et al.* CC2D2A, encoding a coiled-coil and C2 domain protein, causes autosomal-recessive mental retardation with retinitis pigmentosa. *American journal of human genetics* **82**, 1011–1018, doi: 10.1016/j.ajhg.2008.01.021 (2008).
40. Brozzi, F. *et al.* Molecular mechanism of myosin Va recruitment to dense core secretory granules. *Traffic* **13**, 54–69, doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01301.x (2012).
41. Hehnly, H., Chen, C. T., Powers, C. M., Liu, H. L. & Doxsey, S. The centrosome regulates the Rab11-dependent recycling endosome pathway at appendages of the mother centriole. *Current biology*: *CB* **22**, 1944–1950, doi: 10.1016/j.cub.2012.08.022 (2012).
42. Pastural, E. *et al.* Two genes are responsible for Griscelli syndrome at the same 15q21 locus. *Genomics* **63**, 299–306, doi: 10.1006/geno.1999.6081 (2000).
43. Juric-Sekhar, G., Adkins, J., Doherty, D. & Hevner, R. F. Joubert syndrome: brain and spinal cord malformations in genotyped cases and implications for neurodevelopmental functions of primary cilia. *Acta neuropathologica* **123**, 695–709, doi: 10.1007/s00401-012-0951-2 (2012).
44. Khanna, H. *et al.* A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. *Nature genetics* **41**, 739–745, doi: 10.1038/ng.366 (2009).
45. Yoder, B. *Ciliary Function in Mammalian Development*. (Elsevier Science, 2011).
46. Stratigopoulos, G. *et al.* Hypomorphism for RPGRIP1L, a ciliary gene vicinal to the FTO locus, causes increased adiposity in mice. *Cell metabolism* **19**, 767–779, doi: 10.1016/j.cmet.2014.04.009 (2014).
47. Alborghetti, M. R., Furlan, A. S. & Kobarg, J. FEZ2 has acquired additional protein interaction partners relative to FEZ1: functional and evolutionary implications. *PLoS one* **6**, e17426, doi: 10.1371/journal.pone.0017426 (2011).
48. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**, 403–410, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2 (1990).
49. Lemos, T. A., Passos, D. O., Nery, F. C. & Kobarg, J. Characterization of a new family of proteins that interact with the C-terminal region of the chromatin-remodeling factor CHD-3. *FEBS letters* **533**, 14–20 (2003).
50. Edelhoch, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**, 1948–1954 (1967).
51. Seidel, S. A. *et al.* Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods* **59**, 301–315, doi: 10.1016/j.ymeth.2012.12.005 (2013).
52. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* **9**, 676–682, doi: 10.1038/nmeth.2019 (2012).
53. Espreafico, E. M. *et al.* Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *The Journal of cell biology* **119**, 1541–1557 (1992).
54. Soding, J., Biegert, A. & Lupas, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic acids research* **33**, W244–248, doi: 10.1093/nar/gki408 (2005).
55. Krissinel, E. & Henrick, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **60**, 2256–2268, doi: 10.1107/S0907444904026460 (2004).

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Silvio R. Consonni (Biological Imaging Lab) and Dr. Juliana Fattori (Spectroscopy and Calorimetry Lab) from the Brazilian Biosciences National Laboratory for the technical assistance. We also thank the Multiuser Laboratories on Confocal and Multiphoton Microscopy from the Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) grants 2009/08312-6 and 2014/09720-9 (to M.T.M.), 2014/18189-5 (to E.M.E.); FAPESP student stipends 2011/20229-7 (to L.H.P.A.) and 2009/54882-9 (to C.T.S.); FAPESP grant to multiuser facilities (Multiuser Laboratories of Multiphoton Microscopy, 2009/54014-7 and Confocal Microscopy, 2004/08868-0); and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grants 478059/2009-4 and 486841/2012-0 (to M.T.M.), 506780/2013-9 (to E.M.E) and CNPq student stipend 140133/2012-7 (to R.M.P.S.J.).

Author Contributions

Molecular cloning (L.H.P.A. and C.C.C.T.); site-directed mutagenesis (P.O.G., L.G.D. and A.F.Z.N.); yeast-two hybrid (L.H.P.A., M.R.A. and P.O.G.); proximity ligation assay, GST-pull-down, Western-blot and microscale thermophoresis (L.H.P.A.); protein expression, purification and limited-proteolysis (L.H.P.A. and L.D.G.); cell culture and immunocytochemistry (L.H.P.A., T.D.M.H. and R.M.P.S.J.); dominant-negative assays (R.M.P.S.J. and C.T.S.); *in silico* analysis (R.V.H. and P.S.L.O.); conception and design (L.H.P.A., R.M.P.S.J., R.E.L., J.K., E.M.E., P.O.G. and M.T.M.); data analysis and interpretation (L.H.P.A., R.M.P.S.J., M.R.A., D.M.T., P.O.G. and M.T.M.); manuscript writing (L.H.P.A., P.O.G. and M.T.M.); figures preparation (L.H.P.A., R.M.P.S.J. and P.O.G.); manuscript revision (all authors).

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing Interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Assis, L. H. P. *et al.* The molecular motor Myosin Va interacts with the cilia-centrosomal protein RPGRIP1L. *Sci. Rep.* 7, 43692; doi: 10.1038/srep43692 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Anexo C

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2015-09

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

1. Título do projeto: Entendimento do papel da fosforilação do domínio de ligação a cargas (CBD) na regulação da função de Miosinas não convencionais da classe V

2. Pesquisador responsável: Mario Tyago Murakami

3. Experimentador: Luciano Graciani Dolce

Nível do treinamento do experimentador: -Iniciação científica, -mestrado, -doutorado, -doutorado direto, -pós-doutorado, -nível técnico, -outro, especifique: _____

4. Unidade operativa: LNLS LNNano CTBE LNBio

5. Classe de risco do OGM: Risco I Risco II Risco III Risco IV

6. O projeto é confidencial? não sim

7. O título do projeto pode constar em lista aberta no CNPEM? não sim

8. Qual é o objetivo do projeto? Determinar alterações nos possíveis complexos proteicos formados pelas formas não fosforiladas e fosforiladas do CBD da MyoVa humana

9. Informe um número e nome para cada OGM, organismo receptor, organismo doador e o transgene.

(1) Ecoli-BL21-pRARE2-PET-hMyoVaCBDEE: bactéria E Coli, expressando CBDEE.

(2) Ecoli-BL21-pRARE2-PET-hMyoVaCBDAA: bactéria E Coli, expressando CBDAA.

10. Descreva brevemente a função dos transgenes de cada OGM: (1) PET-hMyoVaCBD: Vetor de expressão proteica.

11. Algum OGM produz proteína tóxica, oncogênica ou pode gerar produtos deletérios para saúde humana, animal ou meio ambiente? Não

12. Algum transgene confere infectividade ou patogenicidade para os OGMs? Descreva. Não

O pesquisador principal tem conhecimento de que os experimentadores envolvidos devem ser supervisionados na execução do projeto e que é o responsável pelo treinamento de biossegurança adequado às suas necessidades para a manipulação, armazenamento, descarte e transporte de OGMs, atendendo a legislação e normativas preconizadas pela CTNBio, Anvisa e outros órgãos e agências regulamentadoras e fiscalizadoras.

Assinatura eletrônica do pesquisador responsável:



Uso exclusivo da CIBio:

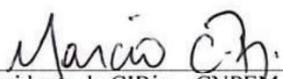
Número de projeto / processo: 2015-09

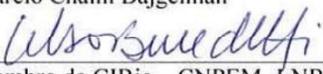
Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

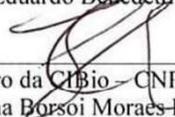
A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 18/3/16 .

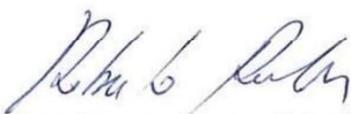
Parecer final: -projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências.

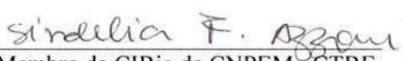
comentários da CIBio:

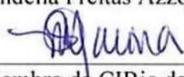

 Presidente da CIBio – CNPEM-LNBio
 Marcio Chaim Bajgelman


 Membro da CIBio – CNPEM -LNBio
 Celso Eduardo Benedetti


 Membro da CIBio – CNPEM -LNBio
 Carolina Borsoi Moraes-H. Freitas


 Membro da CIBio da CNPEM –CTBE
 Roberto Ruller


 Membro da CIBio da CNPEM –CTBE
 Sindélia Freitas Azzoni


 Membro da CIBio da CNPEM –CTBE
 Marina Camara Mattos Martins Soldi

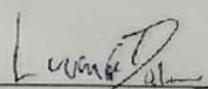


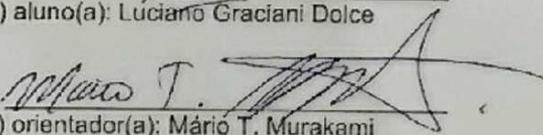
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "**Estudo do Interactoma das Miosinas V Humanas**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Luciano Graciani Dolce

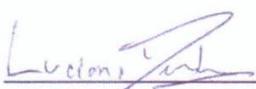
Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Mário T. Murakami

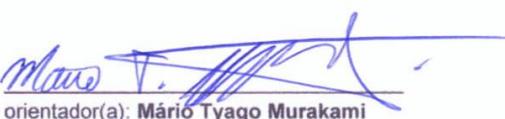
Data: 15/12/2017

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Estudos do interactoma das miosinas V humanas**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 02/02/2018

Assinatura: 
Nome do(a) autor(a): **Luciano Graciani Dolce**
RG n.º 27.838.500-X

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): **Mário Tyago Murakami**
RG n.º 33.273.637-4