

**TRPML REGULA LA MIGRACIÓN Y FAGOCITOSIS EN
HEMOCITOS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEDIANTE
LA LIBERACIÓN LOCALIZADA DE CALCIO DESDE LOS
LISOSOMAS**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

**Doctor en Ciencias Biológicas con mención en
Biología Molecular, Celular y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Sandra Sofía Edwards Jorquera

Enero 2019

Director de Tesis

Dr. Álvaro Glavic Maurer

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Sandra Sofía Edwards Jorquera

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 07 de enero, 2019.

Director de Tesis

Dr. Álvaro Glavic Maurer

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Christian González (presidente)

Dr. John Ewer

Dr. Rodolfo Madrid

Dr. Marco Tulio Núñez

“Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos”

Aristóteles

BIOGRAFÍA



Nací el año 1989 en Copenhague, Dinamarca, donde viví los primeros años de mi vida. A la edad de 8 años me mudé con mi familia a Chile. Durante mi infancia estudié en varios colegios, pero culminé mi etapa de formación escolar en el Liceo Carmela Carvajal de Prat.

Siempre presenté gran interés por la biología y los avances en investigación biológica, motivo por el cual ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la

Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Cuando ingresé a la universidad, descubrí nuevos desafíos y viví experiencias maravillosas junto a mis compañeros de generación. El año 2011 realicé un semestre de intercambio estudiantil con la Universidad de Copenhague, con el fin de conocer otra perspectiva de la investigación, así como el establecimiento de redes con científicos jóvenes de distintas partes del mundo. Fue un periodo maravilloso donde no solo logré satisfacer dichas metas, sino que también me permití conocer de mejor manera las diversas culturas y sitios históricos que caracterizan al continente viejo.

Al concluir mi carrera, ingresé al laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo bajo la tutela de la Dra. Verónica Palma, donde trabajé con células troncales mesenquimáticas provenientes del cordón umbilical humano, para estudiar su aplicación clínica en la reparación de heridas cutáneas de gran extensión.

Posteriormente, decidí ingresar a un doctorado con el fin de perfeccionar mis conocimientos y capacidades críticas en el campo de la biología experimental. Elegí el programa de doctorado en ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, impartido por la misma casa de estudio.

Durante el curso de mi doctorado trabajé bajo la tutela del Dr. Álvaro Glavic, en el laboratorio de Biología del Desarrollo, estudiando el proceso de migración de las células del sistema inmune en *Drosophila melanogaster*. Durante el curso de esta tesis, tuve la oportunidad de viajar en 3 oportunidades a Francia, para trabajar en colaboración con los laboratorios de la Dra. Ana María Lennon y el Dr. Yohanns Bellaiche, en el Instituto Curie de París.

Asimismo, tuve la fortuna de asistir a varios eventos internacionales, entre los cuales destaca el curso de Embriología, dictado por MBL (Marine Biological Laboratory) en Woods Hole (Massachusetts, Estados Unidos), donde aprendí a manipular una vasta gama de organismos, conocí su desarrollo embrionario, y las ventajas que presenta el trabajo con cada uno de ellos. Conocí a científicos del más alto nivel, provenientes de distintas partes del mundo, y tuve el honor de sostener la medalla del premio Nobel de Thomas Morgan, quien contribuyó importantemente a nuestros conocimientos actuales en genética, mediante el uso del modelo de estudio que se utilizó para la elaboración del presente trabajo, *Drosophila melanogaster*.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, agradezco a mi querida familia. A mis padres, que me entregaron la vida y los valores que me convirtieron en la persona que soy hoy en día. Gracias a ustedes logré sacar adelante tanto mi carrera de pregrado como la de doctorado. A mis hermanos, que pese a las distancias que nos separan, han sido un pilar fundamental en mi formación y los adoro muchísimo. Y al resto de la familia, los tíos(as) y primos(as), por todos los bonitos recuerdos y maravillosas vacaciones.

A mis amigas de la vida, tanto del colegio (Belén, Maca A. y Paz) como del condominio (Javi, Coni, Dani R. y Maca T.), que estuvieron presentes durante mi etapa escolar y toda mi carrera universitaria. Gracias por todos los buenos momentos, por seguir siendo parte de mi vida, y que pese a no tener el mismo tiempo para vernos como teníamos antes, las quiero más que nunca.

Agradezco a mis compañeros de pregrado, “la progeria”, por todos los momentos que pasamos dentro de la universidad como en cada junta fuera de ella. Pese a que hayamos tomado rumbos distintos en la vida, cada vez que nos juntamos, siento como si el tiempo no pasara. Gracias por la buena onda y espontaneidad que siempre me hacen reír tanto. Hago especial mención a mi grupito (Dani U, Lele y Kessi) quienes me acompañaron más de cerca en este proceso y con quienes compartí más durante todos estos años. ¡Los quiero mucho!

A la Pauli, mi wachi, que pude conocer durante el curso de mi tesis de pregrado, y que nos hemos vuelto grandes amigas. Gracias por estar siempre ahí, tanto en las buenas como en las malas. Afortunadamente han sido más celebraciones que

enfermedades... Tengo la certeza de que la vida nos seguirá reuniendo pese a que la distancia nos separe en el futuro. ¡Te adoro!

Al Diego, “la negra”, quien me enseñó a trabajar con las moscas y a quien he tenido la oportunidad de conocer más de cerca recientemente, desde que se mudó a la casa con Geri. Chiquillos, mi nueva “familia postiza”, gracias por todos los buenos momentos. Los quiero mucho y deseo lo mejor en los desafíos que se vienen.

Por supuesto que también agradezco al amor de mi vida, el Mati. Mi amor, agradezco muchísimo tu apoyo incondicional durante el curso de mi doctorado, por dejar todo para ir a estar conmigo en París, por aguantarme el malgenio en los momentos de mayor estrés y frustración, así como por acompañarme en todos los viajes maravillosos y por traer tanta alegría a mi vida. Eres lo máximo, ¡¡¡te amo infinito!!!

Gracias a mi jefe Álvaro por abrirme las puertas de su laboratorio para la realización de este trabajo y depositar la confianza en mí para la participación en un proyecto de colaboración internacional, que me permitió crecer como científica, tanto en mis habilidades prácticas como teóricas. Agradezco también a nuestros colaboradores en Francia, Ana María y Yohanns, que me permitieron usar las instalaciones con tecnología de punta, así como también, me dieron la posibilidad de discutir mis datos e interpretarlos desde una perspectiva diferente.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio y de los laboratorios vecinos por integrarme en su grupo de trabajo, así como también a las salidas extraprogramáticas, altamente necesarias para olvidarse de las malas rachas y experimentos fallidos. Especial mención al Nano, por enseñarme a trabajar con hemocitos.

Finalmente agradezco a mi beca Conicyt 21140289, y a los proyectos Redes 140004, Fondecyt 1140522, Anillo ACT 1401 y Fondap 15090007, que financiaron tanto los insumos para la realización del presente trabajo, así como el muy agradecido sueldo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. Migración celular	5
3.2. Protrusiones en el frente de migración	7
3.3. Miosina-II: estructura y regulación de su actividad	10
3.4. Participación de Miosina-II en migración celular, polaridad y adhesión	13
3.5. Segregación espacial de Miosina-II durante la migración celular.....	16
3.6. Células del sistema inmune	18
3.7. Fagocitosis y fisiología lisosomal	21
3.8. Fisiología lisosomal y vínculo con migración celular.....	24
3.9. Canal catiónico TRPML.....	25
3.10. TRPML en migración celular	27
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
4.1. Hipótesis.....	29
4.2. Objetivo General	29
4.3. Objetivos Específicos	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Genética de <i>Drosophila melanogaster</i> y manejo de líneas transgénicas	30
5.1.1. Manejo de animales.....	30

5.1.2.	Sistema de expresión ectópica Gal4/UAS.....	31
5.1.3.	Nomenclatura de genotipos.....	32
5.1.4.	Genotipos utilizados.....	33
5.2.	Biología Molecular.....	35
5.2.1.	Extracción de ARN.....	35
5.2.2.	Síntesis de ADN complementario.....	35
5.2.3.	qPCR.....	36
5.3.	Biología Celular.....	37
5.3.1.	Cultivo primario de hemocitos larvarios.....	37
5.3.1.1.	Registro de células en cultivo primario.....	38
5.3.1.2.	Ensayos de Fagocitosis y Procesamiento Fagocítico.....	39
5.3.1.3.	Inducción de polarización de hemocitos.....	40
5.3.1.4.	Microscopía de Fuerzas de Tracción (TFM).....	41
5.3.1.5.	Medición de actividad de reportero Trpml-GCaMP5 <i>ex vivo</i>	43
5.3.2.	Migración de hemocitos embrionarios.....	44
5.3.3.	Migración de hemocitos pupales.....	44
5.3.3.1.	Velocidad de migración de hemocitos pupales.....	45
5.3.3.2.	Morfología de hemocitos pupales durante migración.....	46
5.3.3.3.	Actividad de reportero Trpml-GCaMP5 <i>in vivo</i>	46
5.3.4.	Ensayos de sobrevida y reclutamiento a la herida.....	46
5.4.	Análisis de datos.....	47

5.4.1.	Distribución de Actina y Miosina	47
5.4.2.	Dinámica de citoesqueleto de actina	48
5.4.3.	Velocidad de Flujo Retrógrado	49
6.	RESULTADOS	50
6.1.	Trpml regula la migración y fagocitosis en hemocitos de <i>Drosophila melanogaster</i> durante distintos estadios de desarrollo	50
6.1.1.	La fagocitosis y procesamiento fagocítico son dependientes de Trpml.....	50
6.1.2.	Trpml modula la eficiencia de migración de hemocitos embrionarios y pupales.....	56
6.1.3.	La expresión de <i>trpml</i> en hemocitos es relevante para la respuesta inmune ante infección bacteriana y reclutamiento al sitio de la herida	60
6.2.	La dinámica del citoesqueleto de actina y miosina dependen de la actividad de Trpml	62
6.2.1.	Trpml modula la morfología de hemocitos migratorios <i>in vivo</i>	62
6.2.2.	Trpml determina la estructura del citoesqueleto de hemocitos <i>ex vivo</i>	63
6.2.3.	Trpml modula la contractilidad del citoesqueleto de actomiosina.....	67
6.2.4.	Trpml es importante en la redistribución subcelular del citoesqueleto de actomiosina y lisosomas en hemocitos polarizados.....	75
6.3.	Trpml modula diferencialmente los procesos de migración y fagocitosis. .	80
6.3.1.	El rol de Trpml en migración celular es independiente de la fusión fagolisosomal.....	80

6.3.2.	Rescate de migración con la ganancia de función de Miosina-II.....	84
6.3.3.	El rol de Trpml en fagocitosis es independiente de la actividad de Miosina-II	91
6.3.4.	Trpml presenta actividad diferencialmente localizada durante los procesos de migración y fagocitosis	93
7.	DISCUSIÓN	97
7.1.	Trpml regula la fagocitosis y procesamiento fagocítico en hemocitos de <i>Drosophila melanogaster</i>	97
7.2.	Trpml modula la eficiencia de migración de hemocitos durante distintos estadios de desarrollo	101
7.3.	La actividad Trpml modula positivamente la contractilidad Miosina-II... 108	
7.4.	Trpml regula el procesamiento fagocítico de manera independiente de la actividad de Miosina-II	118
7.5.	Proyecciones futuras.....	120
8.	CONCLUSIONES	122
9.	BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXO 1.	Generación de un protocolo para inducir la polarización de hemocitos <i>ex vivo</i>.....	137
ANEXO 2.	Rol de TOR en la dinámica del citoesqueleto y migración de hemocitos.....	146
ANEXO 3.	Contribución materna de transcritos <i>trpml</i>	149

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pasos de la Migración Celular en 2 dimensiones	6
Figura 2. Migración de tipo Ameboide y Mesenquimal	10
Figura 3. Estructura y dominios de Miosina-II.....	13
Figura 4. Migración bifásica de células dendríticas.....	17
Figura 5. Sistema Gal4/UAS.....	31
Figura 6. Modelo explicativo para cálculos de distribución de señal en células polarizadas.....	41
Figura 7. Trpml es requerido para la fagocitosis de bacterias y la degradación fagolisosomal	53
Figura 8. Complementación y rescate genético de fenotipos <i>trpml</i> ¹ en procesamiento fagocítico.....	54
Figura 9. Trpml es requerido para el movimiento centrípeto de lisosomas durante la maduración de fagosomas	55
Figura 10. Trpml participa en la migración de hemocitos embrionarios y pupales, así como la sobrevivencia de animales ante infección con bacterias.....	59
Figura 11. Sobrevivencia ante infección con bacterias y reclutamiento al sitio del daño.....	61
Figura 12. Trpml modula la morfología de hemocitos migratorios in vivo.....	65
Figura 13. Trpml modula la distribución de Miosina-II y extensión de la lamela en hemocitos larvarios	66
Figura 14. La actividad de Trpml induce la dinámica de la lamela de hemocitos de manera dependiente de Miosina-II.....	72

Figura 15. La actividad de Trpml modula el flujo retrógrado de miosina y las fuerzas ejercidas sobre el sustrato.....	73
Figura 16. Complementación y rescate genético de fenotipos <i>trpml</i> ¹ en dinámica del citoesqueleto de actina y miosina.....	74
Figura 17. Trpml es importante para la redistribución de lisosomas y nucleación de actina en hemocitos polarizados.....	79
Figura 18. Trpml participa en el proceso de migración celular de manera independiente de Vamp7.....	83
Figura 19. La ganancia de función de Miosina-II es epistática sobre el fenotipo de <i>trpml</i> en el citoesqueleto y la migración de hemocitos	89
Figura 20. La ganancia de función de miosina no rescata la polarización de lisosomas en hemocitos.....	90
Figura 21. El rol de Trpml en procesamiento fagocítico es independiente de la actividad de Miosina-II	92
Figura 22. Modelo de mecanismo de actividad dual de Trpml en los procesos de migración celular y fagocitosis	95
Figura 23. Actividad de Trpml en hemocitos pupales in vivo	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizadas	33
Tabla II. Lista de partidores utilizados para ensayos de qPCR	37
Tabla III. Lista de reactivos utilizados en los cultivos primarios de hemocitos.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS ANEXAS

Figura Anexa 1. Montaje experimental para generar confinamiento	138
Figura Anexa 2. Polarización de hemocitos en respuesta a Ecdisona sin confinamiento.....	139
Figura Anexa 3. Polarización de hemocitos pupales y respuesta a Ecdisona.....	141
Figura Anexa 4. Actividad caspasa en hemocitos larvarios en respuesta a Ecdisona	142
Figura Anexa 5. Rearreglos subcelulares durante la polarización de hemocitos ...	145
Figura Anexa 6. Los niveles de actividad de dTor inciden en la migración y dinámica del citoesqueleto, pero no en la actividad de Trpml.....	148
Figura Anexa 7. La contribución de transcritos maternos de trpml suprimen el fenotipo en embriones tempranos	151

1. RESUMEN

La fisiología lisosomal ha mostrado ser importante para el correcto funcionamiento de células inmunes, abarcando tanto sus propiedades migratorias como fagocíticas. En este trabajo, se quiso ahondar en el proceso migratorio de células del sistema inmune para comprender el nexo existente entre la dinámica del citoesqueleto y la capacidad degradativa de los lisosomas.

En particular, se caracterizó el rol del canal lisosomal permeable a calcio, Trpml, en el proceso de migración celular, al igual que la respuesta inmune y su vínculo con la fisiología lisosomal, usando como modelo de estudio, los macrófagos de *Drosophila melanogaster* denominados hemocitos.

Los hemocitos, son el componente celular de la respuesta inmune de *Drosophila*, cumpliendo funciones claves durante el desarrollo, así como durante la defensa ante infección por microorganismos o parásitos. Estas células son altamente migratorias *in vivo*, e importantemente, presentan un sustancial grado de conservación funcional y estructural con las células del sistema inmune innato de mamíferos. Convenientemente, *Drosophila* posee sólo un gen que codifica para el canal Trpml, cuyo fenotipo mutante semeja al de pacientes con Mucopolisidosis tipo IV, quienes presentan pérdida de función del gen homólogo que codifica Trpml en humanos, *MCOLN1*.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que Trpml cumple un rol fundamental en la degradación fagolisosomal, y la migración de hemocitos *in vivo*, y que estaría participando en estos dos procesos mediante mecanismos parcialmente independientes.

A partir de los resultados obtenidos podemos proponer que Trpml es fundamental para el procesamiento degradativo, mediante el favorecimiento de la fusión fagolisosomal, y consecuente degradación fagocítica. Esto posiblemente se sustenta en la necesidad de iones Ca^{2+} para la fusión de las membranas del fagosoma con el lisosoma.

Por su parte, en el proceso migratorio, la activación localizada de Trpml desde los lisosomas en la región posterior de células polarizadas, promovería la activación de Miosina-II no muscular en esta región, evento necesario para la translocación del cuerpo celular.

2. ABSTRACT

Lysosomal physiology has been shown to be important for the correct functioning of immune cells, including their migratory and their phagocytic properties. In this work, we aimed to explore the migratory process of immune cells and understand the connection between cytoskeletal dynamics and lysosomal degradative capacity.

Specifically, we characterized the role of the calcium permeable channel Trpml in the process of cell migration, as well as that of the immune response and its connection with lysosomal physiology, using as model of study the *Drosophila melanogaster* macrophages, called hemocytes.

Hemocytes are the cellular component of the immune response in *Drosophila*, performing key functions during development, as well as in immune defense in response to bacterial or parasitic infection. These cells are highly migratory *in vivo* and, importantly, present a substantial degree of functional and structural conservation with mammalian innate immune cells. Conveniently, the *Drosophila* genome contains only one gene coding for the Trpml channel, and its mutant phenotype resembles that of Mucopolidosis type IV patients, which bear a loss of function mutation in *MCOLN1*, the human homolog of the *Drosophila trpml* gene.

Results presented in this thesis demonstrate that Trpml plays a fundamental role in phagolysosomal degradation and *in vivo* hemocyte migration, and that it participates in these processes through partially independent mechanisms.

The most likely scenario is that Trpml is important for the degradative process by favoring phagolysosomal fusion and further phagocytic degradation. This is supported by the fact that calcium ions are needed for the fusion of phagosomal and lysosomal membranes.

On the other hand, for the migratory process, localized Trpml activation from the lysosomes in the rear of polarized hemocytes, would promote the local activation of non-muscle myosin-II, which is necessary event to trigger cell body translocation during movement.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Migración celular

La migración celular es el proceso mediante el cual las células se desplazan de una ubicación a otra, y es fundamental para la supervivencia de múltiples organismos. En especies unicelulares, como las amebas, es utilizada en la búsqueda de nutrientes, la reproducción, o bien, para el alejamiento de fuentes de peligro. En organismos multicelulares en cambio, los patrones de migración son más complejos, jugando un rol esencial durante el desarrollo, y mantención de la homeostasis en los tejidos, así como de su protección ante una situación de daño o infección (Vicente-Manzanares y cols., 2005).

Durante el desarrollo embrionario, complejos patrones de migración celular son necesarios para una apropiada formación de tejidos y órganos. El proceso de reparación tisular involucra la migración de múltiples tipos celulares coordinados finamente en el tiempo y espacio para recuperar la homeostasis del tejido dañado. Por su parte, ante una situación de infección, se desencadena una respuesta inmune, donde los leucocitos deben ser capaces de migrar hacia los tejidos inflamados y nodos linfáticos.

Así como la migración celular es clave para la supervivencia y el desarrollo, una migración celular defectuosa puede dar origen a patologías de diversa índole como las enfermedades vasculares, autoinmunes, la invasión tumoral y metástasis (Wells & Parsons, 2011). Por lo tanto, es fundamental conocer a cabalidad los mecanismos que subyacen a este proceso en distintos tipos celulares, tanto las vías de señalización que

la regulan, como las propiedades biofísicas de los sustratos donde migran, así como las interacciones célula-sustrato.

Los primeros reportes sobre migración celular se centraron en estudios *in vitro* en 2 dimensiones (2D), que permitieron comprender un vasto número de mecanismos que regulan la dinámica del citoesqueleto, el recambio de moléculas de adhesión, así como la mecánica de la interacción célula-sustrato y célula-célula. Gracias a estos estudios se pudo generar un modelo generalizado, aunque simplificado, de migración en 2D, donde las células migran adheridas a un sustrato rígido, y de forma repetida, se polarizan, extienden protrusiones ricas en actina en el frente de migración, generando nuevos puntos de adhesión con el sustrato y luego retraen la región posterior de su cuerpo mediante la acción de motores moleculares, a la vez que desensamblan los puntos de adhesión antiguos con el sustrato (Figura 1).

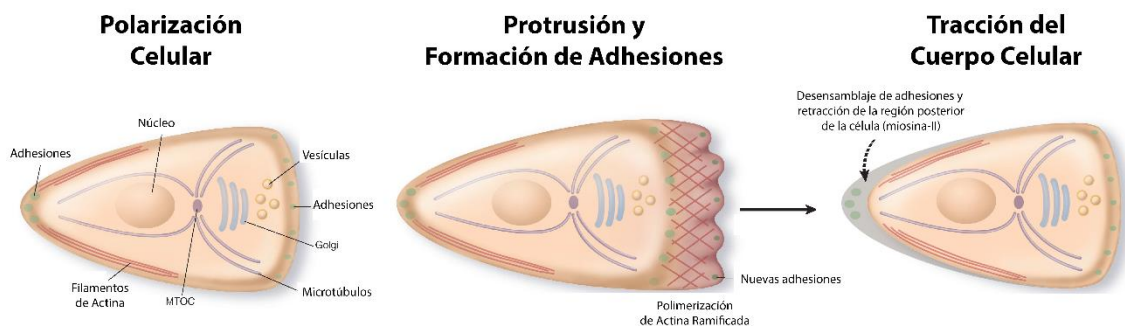


Figura 1. Pasos de la Migración Celular en 2 dimensiones

El establecimiento de polaridad es fundamental para comenzar el proceso migratorio. Muchas proteínas participan en este evento, que se traduce en un tráfico vesicular direccionado hacia el frente de migración, organización de los microtúbulos y la relocalización del aparato de Golgi y centro organizador de microtúbulos (MTOC) frente al núcleo. La migración comienza con la formación de una protrusión, mediante la polimerización ramificada de actina, la cual es estabilizada por la formación de nuevas adhesiones con el sustrato. En la región posterior de la célula, las adhesiones se desensamblan en la medida que la región posterior del cuerpo celular se retrae (adaptado de Ridley y cols., 2003).

En contraste, el registro de células migrando en 3 dimensiones (3D) en diversos modelos de matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*), así como de estudios *in vivo*, ha revelado diversas diferencias con el comportamiento migratorio descrito previamente en 2D, demostrándose que la movilidad basada en lamelipodios es tan solo una de las múltiples estrategias de migración existentes (Petrie & Yamada, 2012). El tipo celular y la naturaleza de la ECM determinarán el modo de migración, que se diferenciará en aspectos como la morfología, la mecánica de la protrusión en el frente de migración y la adhesión a la ECM, parámetros que irán acompañados de la activación de diferentes vías de señalización (Doyle y cols., 2013).

3.2. Protrusiones en el frente de migración

Los distintos tipos de migración en 3D dependen fuertemente de las propiedades biofísicas de la ECM, y pueden distinguirse por la estructura del frente de migración y el grado de adhesión a la ECM (Petrie & Yamada, 2012; Liu y cols., 2015).

El primer paso en la locomoción es la protrusión del frente de migración, que depende principalmente de fuerzas generadas por la polimerización de actina que empujan la membrana plasmática hacia el frente. El tipo de estructura protrusiva rica en actina puede ser de tipo filopodio, lamelipodio o pseudopodio, todos los cuales carecen de organelos membranosos, y se diferencian principalmente por ser estructuras en 1, 2 ó 3 dimensiones, respectivamente. Por su parte, también existen protrusiones independientes de actina, que son impulsados por presiones hidrostáticas, generando estructuras denominadas *blebs* (Tyson y cols., 2014).

Los filopodios están formados por fibras lineales y delgadas de actina, y se asocian a funciones sensoriales y quimiotácticas (Mattila & Lappalainen, 2008). Los lamelipodios corresponden a estructuras laminares ricas en actina ramificada, que en su mayoría son paralelos al plano del sustrato (Wu y cols., 2012). Los pseudopodios son proyecciones 3D ricas en geles de actina, mientras que los *blebs* se forman cuando la membrana plasmática se despega localmente de la actina cortical, y parte del citoplasma protruye producto de la presión hidrostática, que a su vez es promovida por la contracción cortical causada por el motor molecular Miosina-II (Tyson y cols., 2014). Interesantemente, se ha mostrado que tanto *blebs* como pseudópodos ricas en actina actúan de manera cooperativa en la migración de *Dyctiostelium* en respuesta a estímulos quimiotácticos (Tyson y cols., 2014).

El tipo de protrusión generado por la célula migratoria puede ser utilizado para distinguir el tipo de migración, siendo: mesenquimal, ameboide, o una situación intermedia entre ambos tipos.

La migración dependiente de lamelipodio también es conocida como tipo mesenquimal, y es predominante en fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y ciertas células tumorales. Estas células adquieren una forma elongada cuando son cultivadas en 2D, mientras que en 3D, se polarizan, manifestando un frente de migración fácilmente distinguible.

La translocación de células migrando de forma mesenquimática comienza con la formación de estructuras ricas en actina (filopodios y lamelipodios) en el frente de migración. Este proceso está regulado por GTPasas monoméricas pertenecientes a la familia de Rho, particularmente Rac y Cdc42.

La migración del tipo mesenquimático depende fuertemente de las adhesiones con la matriz extracelular (EMC, del inglés *extracellular matrix*) tanto en el frente de migración como con la región posterior de la célula, y las fibras de estrés entre estas adhesiones generan las fuerzas de tracción entre ambos polos (Bear & Haugh, 2014).

Por su parte, la migración de tipo ameboide, debe su nombre al movimiento de un tipo específico de amebas (*Dyctiostelium*), caracterizada por ciclos de expansión y contracción del cuerpo celular, mediada por la localización cortical de actina y miosina (Yumura y cols., 1984). Este tipo de migración está presente también en eucariontes superiores, y se ha descrito en leucocitos y determinados tipos de tumores. Los macrófagos por ejemplo, son células capaces de responder rápidamente a señales quimiotácticas, dado que forman adhesiones débiles con el sustrato y dependen de la formación de podosomas para su tracción (Pixley, 2012).

La migración de tipo ameboide no depende de la degradación de la ECM e involucra adhesiones débiles o inespecíficas con el sustrato, razón por la cual su migración es relativamente rápida ($\sim 2 - 25 \mu\text{m}/\text{min}$) cuando se compara con la de tipo mesenquimática, cuyas velocidades son menores ($\sim 0,1 - 1 \mu\text{m}/\text{min}$), debido al lento recambio de las adhesiones focales durante el proceso de translocación (Paňková y cols., 2010; Fritz-Laylin y cols., 2017).

Estos tipos de migración son mutuamente intercambiables mediante la supresión o activación de vías moleculares determinadas (Paňková y cols., 2010), así como al cambio de las propiedades físicas del sustrato donde se encuentran las células (Figura 2). Ejemplo de ello, es un estudio realizado en varios tipos celulares, donde se mostró que bajo condiciones de alto confinamiento y baja adhesión, las células cambiaron su

patrón migratorio de mesenquimal a ameboide, adquiriendo mayores velocidades producto de esta conversión (Liu y cols., 2015).

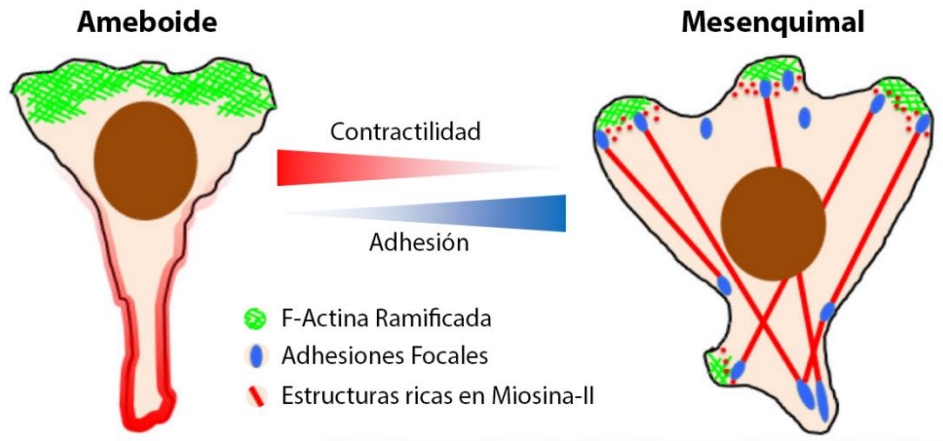


Figura 2. Migración de tipo Ameboide y Mesenquimal

Los distintos modos de migración pueden ser identificadas en base a su grado de adhesión a la ECM y a su contractilidad mediada por Miosina-II. Estos cambios entre comportamiento migratorio ameboide y mesenquimática por lo tanto, pueden ser inducidos al alterar las propiedades de la ECM (adaptado de Bear & Haugh, 2014). La migración de tipo ameboide es significativamente más rápida que la de tipo mesenquimal.

Independiente del tipo de frente de migración que la célula adopte, facilitado por las protrusiones de actina y/o presiones hidrostáticas, una eficiente migración requiere de la tracción del cuerpo celular dependiente de miosina de tipo II. Estas miosinas son a su vez, claves para el establecimiento y mantención de la polaridad, así como de la maduración de las adhesiones durante el proceso migratorio (Conti & Adelstein, 2008; Doyle y cols., 2013).

3.3. Miosina-II: estructura y regulación de su actividad

Las miosinas constituyen una superfamilia de motores moleculares que juegan un rol importante en varios procesos celulares que requieren de fuerza y translocación de elementos celulares. Estas proteínas pueden desplazarse por los filamentos de actina

y producir tensión sobre ellos gracias a la energía proveniente de la hidrólisis del ATP.

La mayoría de las miosinas pertenecen a la clase II, existiendo la Miosina-II muscular y no muscular, aunque la que se denomina como no muscular también se encuentra presente en las células musculares. A lo largo del escrito, cuando se hable de Miosina-II se hará referencia a esta última.

Estructuralmente, las moléculas de Miosina-II son heterohexámeros, compuestos por 3 pares de péptidos (Figura 3): 2 cadenas pesadas de 230 kDa, dos cadenas livianas regulatorias de 20 kDa (RLC, del inglés *regulatory light chain*) y 2 cadenas livianas esenciales de 17 kDa (ELC, del inglés *essential light chain*).

La actividad de este complejo es regulado mediante la fosforilación reversible de la RLC y de la cadena pesada, mientras que la ELC cumple una función estabilizadora de esta última y no existe evidencia de que pueda ser fosforilada reversiblemente (Vicente-Manzanares y cols., 2009). La fosforilación en la Serina19 de la RLC incrementa importantemente su actividad ATPasa en la presencia de actina, al controlar la conformación de la molécula de miosina (Wendt y cols., 2001), sin afectar su afinidad por las moléculas de actina (Sellers y cols., 1982).

Se han reportado múltiples quinasas responsables de fosforilar la RLC en la Ser19, Thr18 o ambos, para su activación. Éstas incluyen: la quinasa de la RLC de miosina (MLCK, del inglés *myosin light chain kinase*, también conocida como MYLK), ROCK (del inglés *Rho-associated, coiled coil-containing kinase*) (Somlyo & Somlyo, 2003), ZIPK (del inglés *zip interacting protein kinase*) (Hosoba y cols.,

2015) y MRCK (del inglés *myotonic dystrophy kinase-related CDC42-binding kinase*) (Tan y cols., 2008).

La regulación de dichas quinasas difiere, donde Ca^{2+} -calmodulina activa MLCK, mientras que la GTPasa monomérica RhoA activa a ROCK (Somlyo & Somlyo, 2003). Cabe destacar que MLCK fosforila específicamente a Miosina-II mientras que ROCK tiene varios sustratos, entre los cuales está la inhibición de PP1 (del inglés *protein phosphatase 1*), parte de un complejo trimérico con actividad fosfatasa, responsable de la desfosforilación de Miosina-II (Matsumura & Hartshorne, 2008). Por lo tanto, la fosforilación de PP1 o la subunidad regulatoria Mypt1 (del inglés *myosin phosphatase-targeting subunit 1*) del complejo trimérico, llevan a la inactivación de la actividad fosfatasa, resultando en niveles elevados de RLC fosforilados y consecuente acumulación de formas activas de Miosina-II (Vereshchagina y cols., 2004).

Sumado a esto, se ha descrito en algunos tipos celulares que MLCK se localiza de manera periférica, mientras que ROCK lo hace de manera más central (Totsukawa y cols., 2004), junto a las fibras de estrés y adhesiones focales maduras, que son más estables en el centro que en la periferia celular. Esto último podría ser una de las causas por las cuales la dinámica del citoesqueleto y de la formación de adhesiones es mayor en la periferia.

Respecto de las fosforilaciones regulatorias en la cadena pesada, se sabe que regulan la actividad de Miosina-II en amebas, pero respecto de su rol en eucariontes superiores no existe consenso ya que varía entre tipo celular e isoforma de miosina (Vicente-Manzanares y cols., 2009).

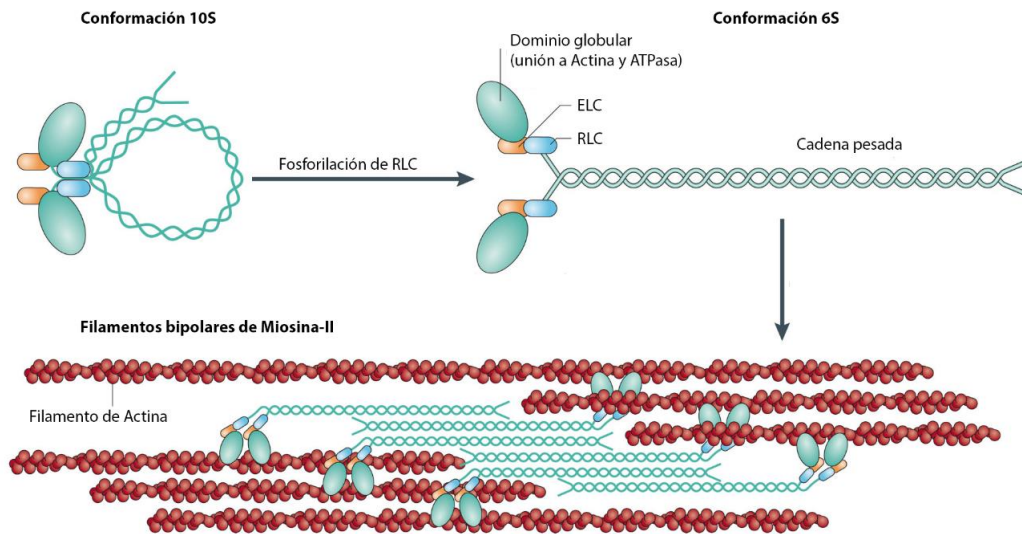


Figura 3. Estructura y dominios de Miosina-II

Las subunidades de Miosina-II dimerizan mediante interacciones de α -hélice entre las cadenas pesadas. El dominio globular contiene el sitio de unión a actina y la actividad enzimática Mg^{2+} -ATPasa, la cadena liviana esencial (ELC) y regulatoria (RLC) son el punto de unión con la cadena pesada. Cuando la RLC está desfosforilada, el dímero de Miosina-II forma una molécula compacta e inactiva (10S, izquierda), que es incapaz de unirse con otros dímeros de miosina. Cuando RLC es fosforilada, la conformación cambia y se vuelve competente para la interacción con otros dímeros (6S, derecha). Los dímeros de Miosina-II se ensamblan en filamentos bipolares (región inferior) mediante interacciones entre sus dominios con estructura helicoidal entre las cadenas pesadas. Estos filamentos se unen a filamentos de actina mediante la interacción con el dominio globular. La actividad ATPasa de este dominio permite el cambio conformacional que mueve los filamentos de actina de manera antiparalela (adaptado de Vicente-Manzanares y cols., 2009).

3.4. Participación de Miosina-II en migración celular, polaridad y adhesión

Para que una célula migre, debe existir un quiebre inicial en su simetría, seguido por la polarización de la maquinaria migratoria, que significa que la composición molecular y la organización subcelular del frente de migración es diferente de la región posterior de la célula, particularmente en cuanto a la estructura del citoesqueleto y los puntos de adhesión con el sustrato (Ridley y cols., 2003; Xu y cols., 2003). Existe evidencia de que la contractilidad de Miosina-II es uno de los

gatillos que inicia esta asimetría, al establecer cuál será la región posterior (Yam y cols., 2007).

En general, los filamentos de Miosina-II se encuentran en la región posterior de la célula migratoria, en filamentos de actina altamente compactos, permitiendo el desensamble de las adhesiones y la tracción del cuerpo celular. A su vez, esta estructura previene la formación de nuevas protrusiones, generando áreas no protrusivas en los costados y la región posterior de la célula migratoria (Vicente-Manzanares y cols., 2009).

En el frente de migración por su parte, podemos encontrar dos estructuras ricas en actina: el lamelipodio y la lamela, donde el lamelipodio está situado anterior a la lamela, aunque a que existen reportes que sugieren que sus territorios se superponen (Tomasello y cols., 2004). La polimerización de actina en el lamelipodio y el flujo retrógrado de F-actina impulsado por Miosina-II en la lamela, son dos procesos fundamentales que generan las fuerzas de tracción que permiten el movimiento de la célula (Tan y cols., 2008).

Respecto al rol de Miosina-II en la adhesión entre la célula migratoria y el sustrato, ésta no es necesaria para la formación ni desensamble de adhesiones en el frente de migración, sin embargo es indispensable para su maduración (Choi y cols., 2008). Las adhesiones maduran a lo largo de delgadas fibras de actina que se originan en la zona de la interfase entre lamela y lamelipodio, y la probabilidad de que una adhesión naciente en el lamelipodio madure depende de la actividad de Miosina-II sobre las fibras de actina a las que las adhesiones están asociadas. Las moléculas de Miosina-II no están físicamente presentes en la adhesión, por lo que influencia su

maduración a la distancia a través de tensión ejercida sobre la misma (Choi y cols., 2008).

En adición a las diferencias en la dinámica de la actina y las adhesiones con el sustrato, la posición del núcleo, el centro organizador de microtúbulos (MTOC) y el aparato de Golgi son características distintivas de la polarización celular, donde el MTOC y el aparato de Golgi se repositionan entre el núcleo y la dirección de la protrusión (Ridley y cols., 2003). Se ha mostrado que este repositionamiento de componentes durante la migración es también dependiente de la actividad de Miosina-II (Gomes y cols., 2005).

Resumiendo, los niveles de actividad de Miosina-II regulan la polarización de las células, definiendo el sitio de formación de las protrusiones, así como el flujo retrógrado y la maduración de las adhesiones de la célula con el sustrato, lo cual podría dar cuenta en parte, de las diferencias en migración entre los diferentes tipos celulares. Como por ejemplo, los linfocitos T, que no exhiben grandes adhesiones (Smith y cols., 2005), reflejando los bajos niveles de activación de Miosina-II en frente de migración, mientras que células más lentas como los fibroblastos contienen adhesiones que tienden a madurar en estructuras elongadas y estables, producto de la activación de Miosina-II en la región anterior de la célula (Paňková y cols., 2010). Por lo tanto, la actividad polarizada de Miosina-II es fundamental, no solo para el establecimiento, sino también para la mantención de la polaridad, y consecuentemente, de propiedades migratorias de la célula en movimiento.

3.5. Segregación espacial de Miosina-II durante la migración celular

La actividad de Miosina-II tiene una importante segregación espacial en células migratorias, donde la Miosina-II periférica controla la dinámica de las protrusiones (activada por MLCK), mientras que en la región central de la célula, modula la maduración de las adhesiones focales (regulado por ROCK) (Totsukawa y cols., 2004). Es más, se ha mostrado que el gradiente anteroposterior de la contractilidad de actomiosina es clave para una migración celular eficiente (Yam y cols., 2007; Chabaud y cols., 2015).

En células dendríticas (DCs) inmaduras, existe un enriquecimiento intermitente de Miosina-IIA en el frente de migración, lo cual irrumpe el gradiente anteroposterior, enlenteciendo la locomoción, a la vez que promueve la captura de antígenos (Chabaud y cols., 2015). Las DCs son células presentadoras de antígenos que muestrean los tejidos del cuerpo e internalizan antígenos extracelulares mediante los procesos de endocitosis, fagocitosis y macropinocitosis (Liu & Roche, 2015). Por lo tanto, el cambio en la distribución subcelular de Miosina-IIA impone una velocidad intermitente que podría facilitar el patrullaje por los tejidos y consecuente captura de antígenos (Figura 4).

La localización de Miosina-IIA en la región posterior de DCs se asocia a locomoción rápida, mientras que en el frente de migración se asocia a migración lenta, en conjunto con un incremento en la captura de antígenos mediante procesos de macropinocitosis y fagocitosis (Chabaud y cols., 2015). Sin embargo, no se sabe si la activación de Miosina-II en estas regiones está regulada por la misma quinasa, o si también existe una segregación espacial de ellas.

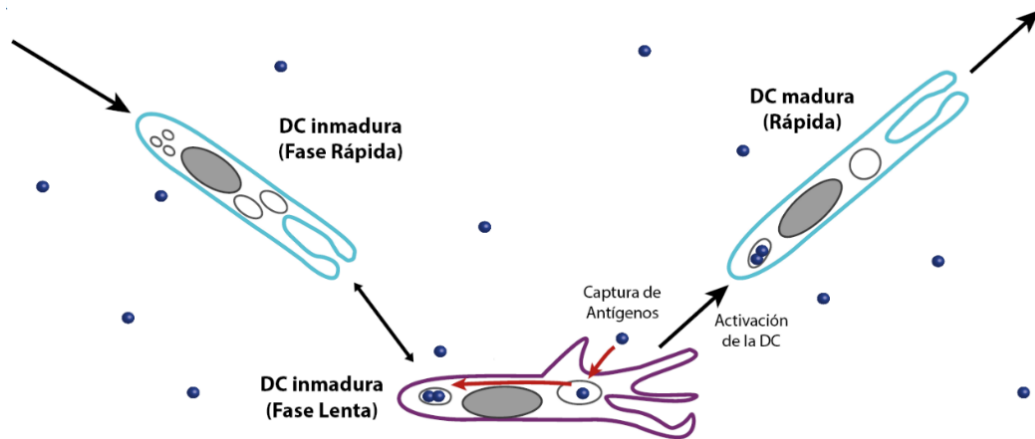


Figura 4. Migración bifásica de células dendríticas

La migración de DCs inmaduras tiene un comportamiento intermitente, al alternar entre 2 fases: una rápida, donde la velocidad es alta y la captura de antígenos despreciable, y una lenta, donde la captura de antígenos es importante y la velocidad es baja. La fase rápida se caracteriza por un enriquecimiento de Miosina-II en la región posterior de la célula, acentuando las asimetrías con el frente de migración. La DC activada tiene una migración acelerada, y se caracteriza por un enriquecimiento de Miosina-II y actina en la región posterior de la célula (imagen adaptada de Chabaud y cols., 2015).

Se ha mostrado a su vez, que la regulación fina en el tiempo y espacio de la actividad de Miosina-II es clave en otros procesos celulares asociados a migración, como la formación de tejidos durante el desarrollo embrionario (Kasza y cols., 2014), la migración de células gliales del epitelio olfatorio (Zheng y cols., 2017) y la extensión y migración del cono de crecimiento en neuronas (Brown & Bridgman, 2003). Por lo tanto, es posible especular que la regulación espaciotemporal de la actividad de Miosina-II es un requisito generalizado para que las células realicen cambios de forma, y por tanto ejerzan su función, de manera eficiente.

En general, las células del sistema inmune son altamente migratorias en respuesta a claves quimiotácticas de distinta índole (Heine, 2008), cumpliendo con ello la función especializada de defender al organismo ante infecciones, así como de cumplir un rol importante durante el desarrollo y de contribuir a la mantención de la

homeostasis de los tejidos. Por lo tanto, estas células deben ser capaces de coordinar múltiples procesos celulares para ejercer correctamente su función, lo que las vuelve un buen modelo para el estudio de migración celular y su regulación fina en el tiempo y espacio.

3.6. Células del sistema inmune

Las células del sistema inmune protegen a los organismos de patógenos invasores y contribuyen a la mantención de la homeostasis. La alteración en las propiedades migratorias de estas células se ha asociado a patologías como inmunodeficiencias (Del Prete y cols., 2004; Bouma y cols., 2009) y enfermedades autoinmunes (Ueda y cols., 2012; Rhee y cols., 2014). Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos de migración de células inmunes es fundamental.

El modelo de estudio *Drosophila melanogaster*, ha jugado un rol importante en la comprensión de los mecanismos moleculares básicos de inmunidad innata, facilitado enormemente por la vasta gama de herramientas disponibles para su manipulación genética y la posibilidad de registrar eventos *in vivo*, e importantemente, a la conservación evolutiva existente entre el sistema inmune innato de vertebrados e invertebrados (revisado en Royet, 2004 y en Kounatidis & Ligoxygakis, 2012; Browne y cols., 2013; Honti y cols., 2014).

Asimismo, muchos de los genes que en mamíferos presentan 2 o más parálogos, en *Drosophila* presentan solo uno, facilitando el diseño experimental y la interpretación de los resultados de condiciones de pérdida de función. Ejemplo de ello es la molécula de Miosina-II, que en mamíferos presenta 3 variantes de cadena pesada (IIA, IIB y IIC), cada una de ellas codificada por un gen diferente (Vicente-

Manzanares y cols., 2009), mientras que en *Drosophila* está codificado únicamente por un gen, *Zipper* (Fiehler & Wolff, 2007). Las funciones de Miosina-IIA y IIB son parcialmente redundantes dependiendo del contexto, siendo intercambiables en la mantención de adhesiones célula-célula, mientras que en migración celular, cumplen roles diferentes y no pueden sustituirse entre sí (Vicente-Manzanares y cols., 2007).

El sistema inmune de *Drosophila* posee componentes humoral y celular, formando en conjunto, una barrera efectiva contra patógenos invasores. La primera consiste en la producción de péptidos antimicrobianos, mientras que la segunda consiste en los hemocitos, que son capaces de fagocitar microbios y cuerpos apoptóticos, de encapsular partículas más grandes como huevos de avispa parásitos, y de activar una cascada de melanización. Cabe destacar a su vez que los hemocitos cumplen un rol crítico en distintos tejidos durante el desarrollo. (Wood & Jacinto, 2007; Honti y cols., 2014).

Se ha descrito en embriones de *Drosophila*, que al bloquear la ocurrencia de eventos de apoptosis, los hemocitos migran de manera más eficiente que los que acumulan carga fagocítica en su interior (Evans y cols., 2013), lo cual se podría homologar al mecanismo de velocidad de migración bifásica que presentan las DCs inmaduras entre fases rápidas de patrullaje y lentas con altas tasas de captación de antígenos (Heine, 2008).

Se mostró que la migración de DCs inmaduras es dependiente de la región subcelular donde la tasa de polimerización de actina es mayor: si es en la región posterior (dependiente de RhoA-mDia1), facilita la migración, y si es en el frente de migración (dependiente de Arp2/3), limita la velocidad a la vez que promueve la captura de

antígenos (Vargas y cols., 2016). Aún más, cuando las DCs son activadas, adquieren una migración rápida y direccionada hacia los nodos linfáticos, y en paralelo, reducen la captura de antígenos (Vargas y cols., 2016). Por tanto, el uso diferencial de maquinarias de nucleación de actina optimiza la función de las DCs.

Sorprendentemente, la polimerización de actina dependiente de Arp2/3 en el frente de migración de DCs inmaduras reduce su movilidad, a la vez que promueve la macropinocitosis, siendo que se había descrito como uno de los elementos promotores de la migración al generar protrusiones en el frente de migración (Petrie & Yamada, 2012; Bear & Haugh, 2014), así como de organizar espacialmente las adhesiones con el sustrato (Wu y cols., 2012). Esto sugiere, por tanto, que el rol de las redes de actina ramificada sería dependiente del tipo celular y de las propiedades de la ECM.

Las DCs capturan antígenos mediante procesos de macropinocitosis, y en caso de ser activadas, migran hacia los nodos linfáticos para activar los linfocitos T y desencadenar una respuesta inmune. Los macrófagos por su parte, son células migratorias que cumplen un rol importante en la fagocitosis de células apoptóticas y patógenos (Pixley, 2012). En estas células también se ha mostrado una regulación diferencial entre los procesos de migración y fagocitosis, pues la inhibición de la migración por el factor MIF (del inglés *migration inhibitory factor*) activa la fagocitosis de partículas exógenas (Onodera y cols., 1997). Sin embargo, también se han reportado reguladores negativos de la quimiotaxis que inhiben la ocurrencia de eventos fagocíticos como Wip1 (Tang y cols., 2017), así como reguladores positivos de ambos procesos en paralelo, como la hormona del crecimiento, que promueve

tanto la migración como la fagocitosis en macrófagos murinos *in vivo* (dos Santos Reis y cols., 2018).

3.7. Fagocitosis y fisiología lisosomal

El proceso de fagocitosis es usado por las células del sistema inmune (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) para capturar y destruir patógenos invasores. El proceso comprende principalmente tres fases fácilmente distinguibles por morfología: la unión a la partícula, la extensión de pseudópodos en torno a ella y finalmente el cierre del fagosoma (Hoppe & Swanson, 2004).

Una de las fuerzas que permiten la internalización de la partícula, es la polimerización localizada de filamentos de actina, sin embargo, se ha descrito también que, la exocitosis de vesículas intracelulares como endosomas y lisosomas están implicadas en las etapas tempranas de formación del fagosoma (Braun & Niedergang, 2006), posiblemente proveyendo el suministro de membrana necesario para la extensión de dichas estructuras.

Otro de los procesos que permite la internalización de partículas extracelulares, es la macropinocitosis, mediante el cual la célula internaliza grandes volúmenes de fluido extracelular, generando una vesícula endocítica de gran tamaño llamada macropinosoma. Se ha descrito que los macrófagos realizan el proceso de macropinocitosis de manera constante, pero que pueden ser fomentados en respuesta a factores de crecimiento o contacto con patógenos (Swanson, 2008; Condon y cols., 2018).

Luego de la formación del fagosoma (o macropinosoma), ocurre un proceso de maduración de la vesícula, que involucra la fusión sucesiva con endosomas tardíos y

lisosomas, lo que culmina en la formación de fagolisosomas, que contiene las enzimas hidrolíticas que permiten la degradación del material fagocitado (Fairn & Grinstein, 2012).

La fusión entre fagosomas y lisosomas es un proceso dependiente de SNARE (del inglés *Soluble NSF Attachment Protein Receptor*), donde existe una componente distinta en cada membrana: *v*-SNARE y *t*-SNARE (membranas vesicular y blanco, respectivamente). Se ha mostrado que en presencia Ca^{2+} , las moléculas de *v*-SNARE y *t*-SNARE en membranas opuestas interactúan para formar en conjunto, un complejo *trans*-SNARE, con lo cual se acercan las membranas entre sí, pese a las fuerzas de repulsión existentes entre ellas. Esto lleva finalmente a la salida de las moléculas de agua del espacio intermembranas, incluyendo las que están coordinadas con los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana. Con esto se desestabilizan localmente las membranas, llevando finalmente a su fusión (Fairn & Grinstein, 2012).

En los lisosomas, se han descrito las proteínas Vamp7 y Vamp8 (del inglés *Vesicle-associated membrane protein 7 y 8*) como las componentes *v*-SNARE, responsables de la formación del complejo. Es más, se ha mostrado previamente que Vamp7 es importante para la capacidad degradativa de los lisosomas en macrófagos de mamíferos (Braun y cols., 2004).

Los lisosomas son organelos ácidos e hidrolíticos presentes en todas las células animales, que han sido históricamente vinculados con la degradación de partículas extracelulares endocitadas o fagocitadas, así como de componentes intracelulares mediante el proceso de autofagia (Xu & Ren, 2015).

Hoy en día se sabe que la función de estos organelos va más allá de la degradación y reciclaje de macromoléculas. Los lisosomas son heterogéneos, dinámicos y responden a requerimientos celulares. Se han vinculado con mecanismos transcripcionales que responden a señales ambientales como los nutrientes (Settembre y cols., 2011; Settembre & Ballabio, 2014). También se han asociado a la reparación de la membrana plasmática, homeostasis y almacenamiento de lípidos, al igual que la eliminación de células apoptóticas, la presentación de antígenos y migración celular, e incluso se han vinculado a la diseminación de virus y progresión de tumores cancerígenos (Braun & Niedergang, 2006; Bretou y cols., 2017; Grimm y cols., 2018, 2017; Hipolito y cols., 2018; Liu & Roche, 2015; Sterea y cols., 2018).

La función de los lisosomas es dependiente tanto de proteínas solubles (enzimas hidrolíticas) como de transmembrana (canales de iones y transportadores). Mutaciones en genes que codifican estas proteínas llevan a defectos en la degradación o transporte, resultando en una función aberrante del organelo y a desórdenes de almacenamiento lisosomal (LSDs, del inglés *lysosomal storage disorders*) (Xu & Ren, 2015; Grimm y cols., 2018; Paola y cols., 2018).

Los canales y transportadores lisosomales median el flujo de iones a través de la membrana de los lisosomas para regular la homeostasis iónica, el potencial de membrana, el exporte de catabolitos, el tráfico de membranas y la detección de nutrientes. La desregulación de canales presentes en el lisosoma son responsables de la patogénesis de muchas LSDs, y posiblemente de desórdenes metabólicos, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Sterea y cols., 2018; Xu & Ren, 2015).

Los lisosomas son también una importante fuente de reserva de iones Ca^{2+} , por lo que los canales iónicos permeables a este ion son claves para las vías de señalización dependiente de calcio. Se ha mostrado que la pérdida de la homeostasis de Ca^{2+} y tráfico de membranas, también han sido importantemente implicados en LSDs (Zhong y cols., 2017).

3.8. Fisiología lisosomal y vínculo con migración celular

Durante el proceso de fagocitosis se generan protrusiones de membrana impulsadas por la polimerización de actina, y existe una importante reorganización del citoesqueleto y de moléculas de adhesión, de manera similar a lo que ocurre en el proceso migratorio (Cougoule y cols., 2004; Huynh y cols., 2007). Por lo tanto, existen reguladores moleculares comunes entre la migración y la fagocitosis, que, en algunos contextos parecieran estar ligados, mientras que en otros parecieran ser antagónicos.

Se ha mostrado que macrófagos de peces cebras deficientes de catepsinas lisosomales, manifiestan rasgos de LSDs humanas, como la acumulación de material lisosomal no degradado. Mediante mecanismos que no se dilucidaron del todo, se vio en estas células un flujo de membranas interrumpido, que se correlacionó con una disminuida capacidad migratoria hacia células apoptóticas para su fagocitosis (Berg y cols., 2016).

Aún más, se ha mostrado en embriones de *Drosophila*, que la acumulación de células apoptóticas no digeridas en macrófagos, impide su migración eficiente *in vivo*. En el mismo trabajo se mostró que al disminuir la carga fagocítica, las células lograron migrar de manera más eficiente (Evans y cols., 2013).

En un contexto de migración *in vitro* en 1 dimensión (1D), la activación de DCs provoca una inhibición de la macropinocitosis, junto con una activación de señalización proveniente de los lisosomas. Estos organelos cambiaron su distribución hacia la región posterior de la célula, hecho que se correlacionó con el enriquecimiento en actina y Miosina-IIA, y consecuente incremento en la velocidad de migración, mostrando con ello un vínculo entre la detección de nutrientes y la migración celular (Bretou y cols., 2017). La señalización sería dependiente de la actividad del canal catiónico TRPML1, responsable de la liberación local de calcio desde los lisosomas, y con ello, promovería cambios de distribución del citoesqueleto (Bretou y cols., 2017). Sin embargo, no se estableció el mecanismo mediante el cual el calcio lisosomal estaría regulando la actividad y distribución de Miosina-IIA. Asimismo, tampoco se discute respecto del rol de los lisosomas en DCs inmaduras, que también ciclan entre fases de migración rápida y lenta.

3.9. Canal catiónico TRPML

Los canales de tipo TRPML (del inglés *Transient Receptor Potential Mucolipin*) pertenecen a una familia de proteínas evolutivamente conservadas que están implicadas en procesos de tráfico endolisosomal, mediando la liberación de calcio desde los lisosomas (Kiselyov y cols., 2012), aunque se ha descrito que también presentan permeabilidad a otros cationes divalentes como el Fe^{2+} y el Zn^{2+} (Kiselyov y cols., 2011). Estos canales regulan diversas funciones lisosomales, como la fusión de vesículas dependiente de calcio durante la regulación del flujo endolisosomal (Dong y cols., 2011; Venkatachalam y cols., 2015), la exocitosis focal de vesículas (Medina y cols., 2011; Samie y cols., 2013; Ahuja y cols., 2016) y la autofagia (Wong y cols., 2012; Venkatachalam y cols., 2013; Wang y cols., 2015; Sukumaran

y cols., 2016). También cumplen un rol importante en procesos de fagocitosis y consecuente procesamiento fagocítico (Venkatachalam y cols., 2008; Samie y cols., 2013; Dayam y cols., 2015; Wong y cols., 2017).

En mamíferos existen 3 parálogos de TRPML, siendo TRPML1 el primer miembro de la familia en ser identificado, dado que las mutaciones en el gen que lo codifica generan una enfermedad autosomal recesiva llamada Mucopolidosis tipo IV, a la cual el canal debe su nombre (Bassi y cols., 2000). Esta patología se caracteriza por la acumulación aberrante de lípidos y sustratos hidrosolubles como mucopolisacáridos y lipoproteínas dentro de los lisosomas en todos los tejidos de los pacientes afectados (Zeevi y cols., 2007). La enfermedad se manifiesta con anormalidades psicomotoras, opacidad corneal, degeneración retinal y neurodegeneración progresiva (Grimm & Cuajungco, 2014; Samanta y cols., 2018).

A nivel celular, los fibroblastos provenientes de pacientes que padecen de MLIV, presentan un incremento de tamaño del compartimiento endolisosomal tardío, interrupción de la autofagia y acumulación de lípidos y glicosaminoglicanos (Paola y cols., 2018).

El genoma de *Drosophila melanogaster* codifica para un solo gen, *trpml* (Venkatachalam y cols., 2008), cuyos fenotipos descritos de pérdida de función incluyen una disminuida fusión de endosomas tardíos y anfisomas con lisosomas, sinapsis alterada, estrés oxidativo, defectos motores, neurodegeneración y acumulación de células apoptóticas (Venkatachalam y cols., 2008; Wong y cols., 2012; Venkatachalam y cols., 2013). Estos fenotipos semejan al de pacientes con Mucopolidosis tipo IV, sugiriendo fuertemente una conservación funcional del canal

entre especies. Se ha mostrado a su vez que la regulación de su actividad, al igual que en mamíferos, es dependiente del pH lisosomal y de la proporción del fosfoinosítido PI(3,5)P₂ (Feng y cols., 2014).

TRPML1 es el miembro más estudiado de una pequeña familia de genes que también incluye TRPML2 y TRPML3 en mamíferos. TRPML1 está expresado de forma ubicua, mientras que TRPML2 se encuentra predominantemente expresado en órganos linfoides y riñones (Samie y cols., 2009).

Interesantemente, los niveles de TRPML2 en macrófagos incrementan dramáticamente en respuesta a la activación de receptores de tipo Toll (TLR), tanto *in vitro* como *in vivo* (Haruta y cols., 2015), y se ha mostrado su relevancia para la liberación de citoquinas y consecuente promoción de la migración de macrófagos *in vitro* (Plesch y cols., 2018). En células dendríticas, los niveles de TRPML1 aumentan luego de su activación, siendo un factor clave para los cambios en su comportamiento migratorio (Bretou y cols., 2017).

Resumiendo, la fisiología lisosomal ha mostrado ser importante para una función apropiada y migración eficiente de células inmunes. Por lo tanto, quisimos ahondar en el proceso migratorio de células del sistema inmune para comprender el nexo existente entre este proceso y la capacidad degradativa de los lisosomas.

3.10. TRPML en migración celular

En células dendríticas, existe un comportamiento migratorio dual, entre fases rápidas y pausadas, caracterizadas por la ausencia o presencia de eventos fagocíticos o de macropinocitosis (Chabaud y cols., 2015; Vargas y cols., 2016), permitiendo establecer un vínculo entre la locomoción de la célula y su capacidad de internalizar

componentes del medio. En macrófagos, también existe evidencia de un vínculo entre ambos procesos, pero no existe un consenso del mecanismo, ya que se ha mostrado una regulación tanto en la misma dirección, como en direcciones opuestas (Onodera y cols., 1997; Tang y cols., 2017; dos Santos Reis y cols., 2018).

Se ha mostrado que Trpml estaría promoviendo la migración rápida de DCs activadas (Bretou y cols., 2017), y que jugaría un rol importante en procesos de fagocitosis y maduración de fagosomas en macrófagos (Venkatachalam y cols., 2008; Samie y cols., 2013; Dayam y cols., 2015; Wong y cols., 2017). Sin embargo, no se comprende del todo cómo este canal estaría involucrado en los eventos de fagocitosis y migración, que son aparentemente antagónicos.

Por lo tanto, considerando los antecedentes presentados, el objetivo del presente trabajo es determinar cómo Trpml regula el proceso de migración celular de manera bifásica: (1) al favorecer la ocurrencia de eventos fagocíticos y consecuente degradación del material fagocitado y, (2) al promover una migración eficiente y direccionada de células inmunes. Para ello, se utilizará el organismo modelo *Drosophila melanogaster*, dadas las herramientas existentes para su manipulación genética y posibilidad de realizar estudios de migración *in vivo*. Particularmente, se estudiarán los macrófagos de estos animales, llamados hemocitos, pues presentan propiedades tanto fagocíticas como migratorias e importantemente, un alto grado de conservación funcional y estructural con células del sistema inmune innato de mamíferos (Browne y cols., 2013).

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

Trpml media la liberación localizada de Ca^{2+} desde los lisosomas, modulando la temporalidad de la migración celular y fagocitosis en hemocitos de *Drosophila melanogaster*.

4.2. Objetivo General

Estudiar la regulación espaciotemporal de Trpml en los procesos de migración y fagocitosis en hemocitos de *Drosophila melanogaster*.

4.3. Objetivos Específicos

- Establecer si Trpml regula la migración y fagocitosis en hemocitos de *Drosophila melanogaster* durante distintos estadios de desarrollo.
- Estudiar la dinámica del citoesqueleto de actina y Miosina-II en función de la actividad de Trpml.
- Determinar si Trpml modula diferencialmente los procesos de migración y fagocitosis mediante la regulación de Miosina-II

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Genética de *Drosophila melanogaster* y manejo de líneas transgénicas

Todos los experimentos fueron realizados en el modelo de la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, dadas las aproximaciones genéticas y moleculares para responder preguntas acerca de la expresión y función de genes, biología celular, biología del desarrollo e inmunología en este caso.

En todos los casos, se respetaron las normas bioéticas para el trabajo y mantención de los animales.

5.1.1. Manejo de animales

A 25°C el ciclo de vida de *D. melanogaster* tarda aproximadamente 10 días, que puede variar dependiendo de las características nutricionales del alimento. La embriogénesis y los primeros dos estadios larvarios demoran un día cada uno; el tercer estadio larvario, dos días; y los estadios pupales de 4 a 5 días. A los dos días de la eclosión, las hembras adultas comienzan a poner huevos fertilizados.

Las líneas transgénicas utilizadas se mantuvieron a 17°C en viales plásticos con medio de cultivo sólido preparado con 50 g/L harina, 100 g/L levadura fresca, 11 g/L agar-agar, 80 g/L azúcar (dextrosa monohidratada), 6 mL/L ácido propiónico y 1,56 g/L metilparabeno (bactericida). Todos los experimentos se realizaron a 25°C, a menos que se indique lo contrario.

5.1.2. Sistema de expresión ectópica Gal4/UAS

El sistema Gal4/UAS es un sistema de expresión derivado de levaduras, que usa el factor de transcripción Gal4 para dirigir la expresión de constructos (secuencia codificante de genes o invertidos repetidos) que se encuentran río abajo de la secuencia activadora UAS (del inglés *Upstream Activating Sequence*) de forma tejido y tiempo específica (Brand y Perrimon, 1993). Para que la expresión sea específica, la expresión de Gal4 se encuentra comandada por un promotor determinado, que permitirá la expresión de secuencias que se encuentra río abajo del UAS, obteniéndose así ganancias o pérdidas de función de nuestro gen de interés (Figura 5).

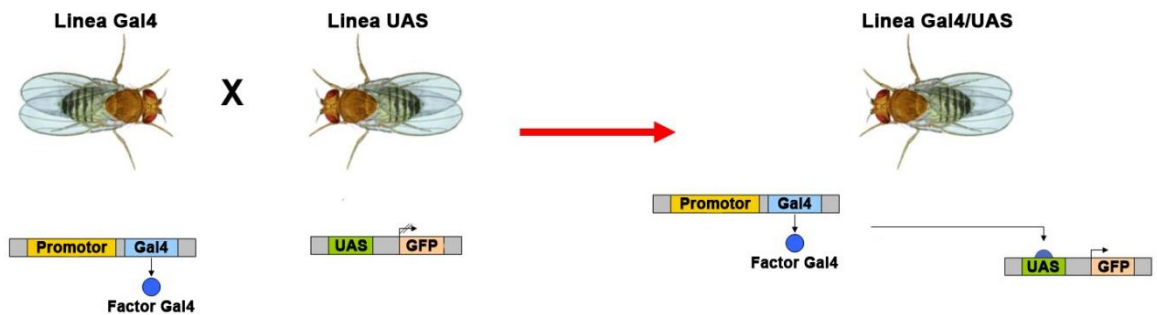


Figura 5. Sistema Gal4/UAS

A la izquierda se muestran dos parentales, uno de ellos tiene en su genoma la secuencia codificante para el factor de transcripción Gal4 río debajo de un promotor específico. El otro parental posee repeticiones UAS río arriba de la secuencia codificante para GFP. Al cruzarse ambos parentales se obtiene en la descendencia ambos componentes, por tanto, Gal4 se expresará en las regiones comandadas por su promotor y se posará sobre las secuencias UAS, activando la expresión de GFP en esta zona.

5.1.3. Nomenclatura de genotipos

D. melanogaster posee 4 pares de cromosomas. Un par sexual (X e Y) y tres somáticos (II, III y IV). Generalmente el cromosoma IV no se detalla debido a su reducido tamaño, a menos que se trabaje con genes presentes en el mismo. Por lo tanto, la nomenclatura se centra en los primeros 3 cromosomas, separados por “;”. Cuando existe más de un componente en el mismo cromosoma, estos se separan mediante el uso de “+”. El sexo no se detalla a menos que sea necesario. Un ejemplo de nomenclatura utilizando el sistema Gal4/UAS se muestra a continuación:

$$w^{1118}; \frac{Cg - Gal4, UAS - GFP}{+}; trpml^1$$

Donde w^{1118} corresponde a la mutación recesiva *white*, que produce moscas de ojos blancos, Cg-Gal4 es el factor de transcripción Gal4 comandado por el *driver Collagen*, y $trpml^1$ corresponde a un alelo mutante del gen *trpml*.

Cuando el genotipo del cromosoma se anota de forma simple, quiere decir que está en homocigosis, de lo contrario, se anota en forma de fracción (como el segundo cromosoma del ejemplo), especificando el genotipo de cada alelo. El signo “+”, se refiere a que ese cromosoma es silvestre y que no contiene modificaciones.

Con el propósito de simplificar la lectura e interpretación, en esta tesis se expresará el genotipo de cromosomas recombinados de la siguiente forma (mismo ejemplo):

$$w^{1118}; \frac{Cg > GFP}{+}; trpml^1$$

Donde se indica con “>” los elementos que están comandados por la expresión de Gal4.

Asimismo, cuando solo existen modificaciones en uno de los cromosomas, se representa con el genotipo simplificado, seguido por el número de cromosoma entre paréntesis.

5.1.4. Genotipos utilizados

Todas las líneas transgénicas utilizadas en la tesis se detallan en la Tabla I.

Tabla I. Líneas de *Drosophila melanogaster* utilizadas

Se detalla genotipo de las líneas transgénicas utilizadas en el trabajo, así como una breve explicación de su utilización y su origen.

Clasificación	Genotipo	Crom.	Comentario	Origen
Cepas Gal4	<i>Hml</i> > Gal4 (<i>Hemolectin</i>)	II	Expresión en Hemocitos larvarios, pupales y adultos	BDSC:30139
	<i>Hml</i> > Gal4 (<i>Hemolectin</i>)	II	Expresión en Hemocitos larvarios, pupales y adultos	BDSC:30141
	<i>Cg</i> > Gal4 (<i>Collagen</i>)	II	Expresión en Cuerpo graso y hemocitos larvarios, pupales y adultos	BDSC:7011
	<i>Tub</i> > Gal4/TM6b (<i>Tubulin</i>)	III	Expresión ubicua en todos los estadios	BDSC:5138
Marcadores fluorescentes	UAS-LifeAct.GFP	II	Marca los filamentos lineales de actina con GFP	BDSC:35544
	UAS-LifeAct.Ruby	II	Marca los filamentos lineales de actina con Ruby	BDSC:35545
	UAS-2xEGFP	II	2 copias de EGFP (constructo bicistrónico)	BDSC:6874
	UAS-Arp3.GFP	II	Marca el complejo Arp2/3 con GFP	BDSC:39723
	Sqh::3xGFP	II	Sqh fusionado a 2 copias de GFP, bajo la expresión de promotor endógeno	Dr. Yohanns Bellaïche
	Sqh::3xGFP	III	Sqh fusionado a 2 copias de GFP, bajo la expresión de promotor endógeno	Dr. Yohanns Bellaïche
	Tub::GFP	II	Tubulina fusionada a GFP, bajo la expresión de promotor endógeno	Dr. Yohanns Bellaïche

	<i>DeCad</i> .GFP, UAS-H2B.RFP/CyO; <i>HmlA</i> -Gal4	II; III	Marcaje del núcleo de hemocitos pupales para su seguimiento manual	Dr. Yohanns Bellaïche
	<i>Hs</i> ::Flp; UAS-LifeActRuby/CyO, <i>Act</i> ::GFP; <i>Act</i> <FRT> Gal4, UAS-CFP/TM6b	X; II; III	Para generar clones que expresen LifeActRuby y CFP	Dr. Yohanns Bellaïche
	<i>Crq</i> > Gal4, UAS-GFP (<i>Croquemort</i>)	III	Expresión de GFP en precursores de hemocitos embrionarios	Dr. Iwan Evans
	<i>Srp</i> > Gal4, UAS-GFP (<i>Serpent</i>)	II	Expresión de GFP en hemocitos embrionarios y precursores	Dr. Iwan Evans
	UAS-Trpml.GCaMP5/TM6b	III	Trpml fusionado a Reportero de Ca ²⁺ en extremo C-terminal	Dr. Kartik Venkatachalam
Modulación genética	<i>w</i> ¹¹¹⁸	X	Alelo mutante del gen <i>white</i>	BDSC:3605
	<i>trpml</i> ¹ /TM6b	III	Alelo mutante nulo de <i>trpml</i>	BDSC:28992
	<i>trpml</i> ² /TM6b	III	Alelo mutante nulo de <i>trpml</i>	BDSC:42230
	UAS- <i>Dcr2</i> (<i>Dicer2</i>)	II	Para acentuar silenciando mediado por RNAi	BDSC:24650
	UAS-Trpml	II	Trpml de <i>Drosophila</i>	BDSC:27594
	TRiP.HMS02818	II	Trpml RNAi	BDSC:44098
	TRiP.JF01466	III	Trpml RNAi	BDSC:31673
	TRiP.JF01239	III	Trpml RNAi	BDSC:31294
	TRiP.GL01524	III	Vamp7 RNAi	BDSC:43543
	TRiP.HMS02962	III	Vha 68-1 RNAi (componente de ATPasa lisosomal)	BDSC:50726
	TRiP.HMS00521	III	Mbs RNAi (componente de fosfatasa)	BDSC:32516
	UAS-Mypt75D ^{F117A}	II	Dominante-negativo Mypt-75D (mutación en sitio catalítico)	BDSC:24099
	UAS-MCOLN1.HA; <i>trpml</i> ¹ /TM6b	II; III	Homólogo humano Trpml fusionado a HA en fondo genético <i>trpml</i> ¹	BDSC:57373
	UAS- <i>trpml</i> .myc, <i>trpml</i> ¹ /TM6b	III	Trpml de <i>Drosophila</i> fusionado a myc en fondo genético <i>trpml</i> ¹	BDSC:57372
	Tub::Gal80 ^{TS}	III	Variante termosensible de Gal80 bajo el promotor de Tubulina	BDSC:7017
	TRiP.HMS00437	III	Sqh RNAi (cadena liviana regulatoria de miosina)	BDSC:32439
UAS- Zip ^{DN} .GFP	II	Dominante-negativo de cadena pesada de miosina (<i>zipper</i>) fusionada a GFP	Dr. Patricio Olguín	

5.2. Biología Molecular

5.2.1. Extracción de ARN

Se extrajo ARN total a partir de larvas completas en estadio III. Para ello, se lavaron minuciosamente 5 larvas y se procedió a homogenizar en 100 μ l de Trizol (Invitrogen, 15596018) en tubos de centrifuga de 1.5 ml sobre hielo. Se centrifugó a 13.670 x g durante 10 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron 20 μ L de cloroformo (Merck, 102445), se agitó vigorosamente mediante inversión durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se centrifugó a 9.500 x g durante 15 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se adicionaron 50 μ L de isopropanol (Merck, 109634) y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se centrifugó a 9.500 x g durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 100 μ L etanol 75% (Merck, 818760) y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el ARN en 10 μ L de agua libre de ARNasas (Invitrogen, AM9932). Se cuantificó la concentración de ARN y se reservó 1 μ g para realizar inmediatamente la reacción de transcripción reversa, mientras que el excedente se almacenó a -20°C hasta posterior uso.

5.2.2. Síntesis de ADN complementario

Se utilizó el kit comercial RT-PCR Improm II (Promega, A3800) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, se realizó una mezcla que contenía 1 μ g de ARN total, 1 μ L partidores al azar y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 5 μ L. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 70°C y luego durante 5 minutos en hielo. En paralelo, se realizó una mezcla de reacción de

transcripción reversa: *Buffer* de reacción 5X (4 μ L), $MgCl^2$ 25 mM (3 μ L), dNTPs 10mM (1 μ L), inhibidor de ARNasa (1 μ L), transcriptasa reversa (1 μ L) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen total de 15 μ L. Se agregaron los 15 μ L de mezcla a los 5 μ L preparados inicialmente (ARN con partidores) y se incubó en termociclador programado con un ciclo de 25°C x 5 min, 42°C x 1 h, 70°C x 15 min y 4°C hasta posterior uso.

5.2.3. qPCR

El cADN obtenido de la reacción de RT-PCR se diluyó 4 veces para la posterior reacción de qPCR con el fin de minimizar los errores experimentales asociados al manejo de volúmenes muy pequeños. Se utilizó el kit Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent, 600828) según las instrucciones del fabricante. En breve, se agregó: ADNc diluido (4 μ l), Mix SYBR Green (10 μ l), partidores (según estandarización previa, Tabla II) y agua libre de nucleasas hasta completar los 20 μ l de reacción. Las amplificaciones y mediciones de fluorescencia de SYBR-GREEN se realizaron en el termociclador StrataGene Mx3000p. El programa para amplificar consistió en un ciclo a 95°C x 10 minutos, seguido de 40 ciclos de reacción (95°C x 15 segundos, 60°C x 15 segundos, 72°C x 15 segundos) y un último ciclo a 72°C x 1 minuto.

Tabla II. Lista de partidores utilizados para ensayos de qPCR

Se detalla el nombre del gen, la secuencia de ambos partidores, la concentración de uso y el tamaño del producto por qPCR.

Gen	Partidor Sentido	Partidor Antisentido	Uso	Producto
<i>trpml</i>	ACGCGAATGTAAGCCGATCT	GGTAGTCGCTCACACACCTC	250 nM	166 pb
<i>vamp7</i>	TACACCTGCGAGAACAACACTG	TGTAGGCCGTAAGTCTGGATAAA	250 nM	119 pb
<i>tubulina</i>	TGTCGCGTGTGAAACACTTC	AGCAGGCGTTTCCAATCTG	250 nM	96 pb

5.3. Biología Celular

5.3.1. Cultivo primario de hemocitos larvarios

Para obtener los cultivos primarios de hemocitos, por cada condición, se seleccionaron 5 larvas en estadio II, que se limpiaron minuciosamente mediante lavados sucesivos con PBS estéril. Luego, se trasladaron las larvas a placas de 35 mm de diámetro con una apertura de 10 mm y fondo de vidrio de grosor 1.5 (MatTek P35GC-1.5-10-C), conteniendo 120 μ l de medio de cultivo Schneider (Gibco 21720-024) para el registro de células vivas, o a cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro en el caso de las células fijadas. Todas las larvas fueron perforadas en la región dorsal con un filamento de tungsteno, permitiendo el drenaje de la hemolinfa (conteniendo hemocitos) durante 1-2 minutos. Luego se retiraron las larvas y se permitió que los hemocitos se adhirieran al vidrio durante 1 hora a 25°C en una cámara húmeda protegida de la luz para posterior tratamiento.

5.2.1.1. Registro de células en cultivo primario

Dependiendo del caso, se registraron las células bajo el microscopio directamente sin tratamiento, o se incubaron con sondas o fármacos. En todos los casos, se cambió el medio de cultivo inicial (luego de 1 hora de cultivo) por el medio conteniendo el reactivo de interés a la concentración indicada en la Tabla III.

En todos los casos, se realizaron los registros a 25°C en un microscopio confocal invertido de disco giratorio (Zeiss), usando un objetivo 100X (inmersión en aceite, apertura numérica 1,4) y cámara sCMOS (Hamamatsu), controlada por el software MetaMorph. Se obtuvieron cortes ópticos de 0,2 µm en intervalos de entre 30 segundos y 10 minutos, según el caso.

Tabla III. Lista de reactivos utilizados en los cultivos primarios de hemocitos

Se detalla el nombre del producto, su función, concentración de uso en cultivo y procedencia.

Reactivo	Función	Uso	Marca
Lysotracker Red DND-99	Marca vesículas acídicas	100 nM	Invitrogen L7528
MLSA 1	Agonista de TRPML	40 µM	Tocris 4746
20-HidroxiEcdisona	Hormona esteroideal para inducir polarización	15 µg/ml	Abcam ab142425
Torin 1	Inhibidor de Tor (inhibe TorC1 y TorC2)	200 nM	Tocris 4247
Rapamicina	Inhibidor de TorC1	1 µM	Sigma R8781

5.3.1.2. Ensayos de Fagocitosis y Procesamiento Fagocítico

Para los ensayos de fagocitosis, luego de la incubación inicial de 1 hora, se cambió el medio Schneider estéril por un medio conteniendo 2×10^7 bacterias (*E. coli* DH5 α) por cubreobjeto (en 150 μ l de Schneider) e incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se realizaron 3 lavados de 1 minuto con PBS frío y se procedió a fijar con 400 μ l de PFA 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó una breve permeabilización con 400 μ l de PBT 0,1% (PBS con 0,1% Triton-X) durante 10 minutos y se lavó con 2 ml de PBS durante 15 minutos.

Se procedió a incubar con una solución de BSA 1% en PBS, complementada con Faloidina-Rodamina (1:200, Invitrogen #R415) y DAPI (1:10.000, Sigma #D9542). Se registraron imágenes de campo amplio y se cuantificó el porcentaje de hemocitos por campo que internalizó bacterias.

Para los ensayos de procesamiento fagocítico, se utilizaron hemocitos *Cg*>LifeActGFP para revelar la ubicación y morfología de los hemocitos, mientras que las bacterias transformadas con el vector pE2-Crimson (Clontech, 632553), que permite la expresión bacteriana de E2 Crimson, una proteína que fluoresce en el espectro del rojo lejano. Luego de la incubación inicial de 1 hora, se cambió el medio por una solución conteniendo LysoTracker y 4×10^6 bacterias fluorescentes/ml en Schneider e inmediatamente se registraron imágenes con intervalos de 5-10 minutos. Se cuantificó el porcentaje de hemocitos por campo que al cabo de 1 hora contenía bacterias en sus vesículas acídicas, así como el movimiento de las vesículas acídicas entre el principio y final del registro.

5.3.1.3. Inducción de polarización de hemocitos

Se desarrolló un método que permite la inducción farmacológica de la polarización de hemocitos para el estudio de redistribución de componentes con alta resolución espaciotemporal (Edwards y cols., 2018)(ver resultados principales en Anexo 1).

Las placas de cultivo se trataron con colágeno tipo IV (Sigma, C6745) previo al cultivo celular, según las instrucciones del fabricante. En breve, se diluyó la solución de colágeno en HBSS y se cubrió la superficie del vidrio de las placas con esta solución, e incubó posteriormente a 37°C durante 2 horas. El exceso de solución fue removido y las placas se mantuvieron con HBSS a 4°C hasta posterior uso.

El cultivo de hemocitos se realizó como descrito en la sección 3.3.1, con la variación de que las larvas se pincharon en 150 µl de medio en una placa no tratada, y se transfirió la solución conteniendo hemocitos a las placas cubiertas con colágeno IV. Se permitió que adhirieran al durante 1 hora y se adicionaron 3 ml de medio Schneider suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino inactivado (Biowest S1810-500) y 1% v/v de antibióticos penicilina/estreptomicina (Gibco 15140-122), con una concentración final de la hormona esteroidea 20-Hidroxiecdisona (Abcam ab142425) de 15 µg/ml.

En todos los casos, se realizaron registros con un objetivo 100X y se registró en intervalos de 5 minutos.

El análisis se realizó según descrito en (Edwards y cols., 2018), tan solo en células que se clasificaron como polarizadas (relación de ejes de elipse ajustada menor a 0,9). En dichas células, se definió como $0^\circ = 360^\circ$ al centro de la lamela extendida (Figura 6A). Se utilizó el ángulo 0° como punto de inicio de la función Radial

Reslice con el software ImageJ para generar los gráficos de distribución de señal según el ángulo. A partir de cada ángulo, se obtuvo el tamaño del radio y se calculó la intensidad de señal dentro del área definido por la expresión de LifeAct.

Para las comparaciones entre la región frontal y posterior, se consideraron 90° en ambos casos, como indicado en la Figura 6B, y se calculó el promedio de señal en ambos casos, para cada célula.

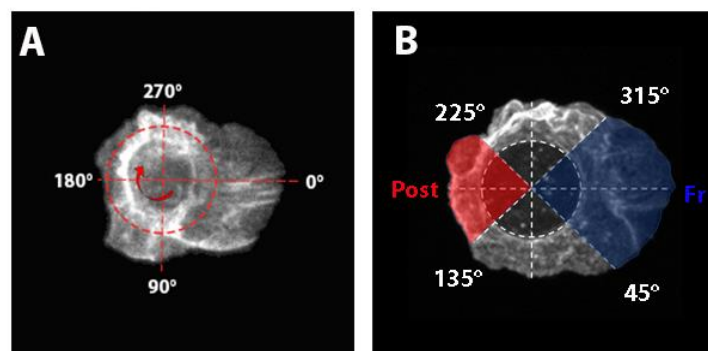


Figura 6. Modelo explicativo para cálculos de distribución de señal en células polarizadas

A) Para la cuantificación de distribución de señal en una célula polarizada, se designó el centro de la lamela extendida como punto de inicio de la función Radial Reslice (ImageJ). **B)** Para comparaciones entre las regiones posterior (Post, 135° - 225°) y frontal (Fr, 315° - 360° + 0° - 45°), se determinó el promedio de intensidad de señal para la comparación interna de cada célula.

5.3.1.4. Microscopía de Fuerzas de Tracción (TFM)

La cuantificación de las fuerzas de tracción que ejerce una célula requiere de 3 pasos:

El plaqueo de las células sobre un sustrato deformable, la medición de la deformación del sustrato, y la estimación numérica de las fuerzas ejercidas por la célula sobre el sustrato.

El sustrato deformable corresponde a geles de poliacrilamida cuya rigidez será dependiente de la concentración del polímero. En este caso, para el cultivo de

hemocitos, se determinó que la rigidez ideal para la deformación visible y reversible del sustrato es de 500 Pa. Por lo que se prepararon geles de poliacrilamida en las proporciones 12% acrilamida/0,1% bis-acrilamida, y se añadió un 10% de *beads* de 0,2 μm de diámetro que fluorescen en el rango 660-680nm (Termo Fisher F8807).

Previo a la preparación del gel, se irradiaron con UV durante 2 minutos, placas de 35 mm con base de vidrio (World Precision Instruments, Inc), luego de lo cual, se trataron con 3-aminopropil-trietoxisilano (APTMS) durante 5 minutos y se enjuagaron con abundante agua destilada. Se dejaron secar por completo previo al uso.

Por otro lado, se prepararon cubreobjetos antiadherentes mediante su inmersión en SigmaCoat durante 3 minutos, seguido de abundantes lavados con agua destilada y posterior secado.

Se sonicaron 167 μl de la mezcla de poliacrilamida/bis-acrilamida conteniendo *beads* fluorescentes, luego de lo cual se añadieron 1,67 μl de persulfato de amonio (PSA, 10%) y 0,2 μl de TEMED para comenzar el proceso de polimerización.

Inmediatamente, se agregó un volumen de 9 μl sobre las placas de 35 mm con base de vidrio previamente tratado con APTMS y se colocó sobre la gota, el cubreobjetos previamente tratado con SigmaCoat. Se invirtieron las placas para promover que los *beads* quedaran en la superficie en contacto con el cubreobjetos, y se permitió la polimerización del gel durante 1 hora en cámara húmeda protegida de la luz. Finalmente, se retiró el cubreobjeto y se llenó la placa con PBS y se dejó a 4°C hasta posterior uso.

El cultivo de hemocitos se realizó como descrito en la sección 3.3.1.4. Las larvas se pincharon en una placa nueva conteniendo medio Schneider suplementado con suero fetal bovino inactivado (10%) y antibióticos (1%), y se transfirió la solución conteniendo hemocitos a la superficie de poliacrilamida con *beads* fluorescentes.

Se permitió que adhirieran durante 15 minutos y se comenzó a registrar los campos conteniendo células con intervalos de 30 segundos. El movimiento de los *beads* contenidos en el gel, es equivalente a la deformación del sustrato, donde la distancia recorrida por cada *bead* permite determinar la fuerza ejercidas por el hemocito en ese punto.

Finalmente, se analizó el desplazamiento de los *beads* en las regiones del gel conteniendo células, según descrito (Martiel y cols., 2015), mediante el uso del software ImageJ.

5.3.1.5. Medición de actividad de reportero Trpml-GCaMP5 *ex vivo*

Se realizaron registros de hemocitos provenientes de animales de genotipo Cg>LifeActRuby; UAS-Trpml.GCaMP5 cada 30 segundos durante 5 minutos, luego de lo cual se cambió por medio de cultivo control (Schneider), complementado con fármacos (Tabla IV) o bacterias. Finalmente se continuó registrando durante 30 minutos en intervalos de 30 segundos.

Se cuantificó la intensidad de fluorescencia del cuerpo celular de cada hemocito (en el canal verde), normalizando todos los datos respecto del tiempo cero.

5.3.2. Migración de hemocitos embrionarios

Se colectaron embriones *Srp* > GFP; *Crq* > GFP (control o cruzado con *trpml* RNAi) cada 2 horas y se mantuvieron a 25°C ó 29°C hasta que alcanzaran el estadio de desarrollo de interés (\pm 1 hora). Aproximadamente 1 hora antes de comenzar a grabar, se decorionaron los embriones mediante un tratamiento con cloro (50% en agua) durante 1 a 2 minutos y se lavaron con abundante agua. Con este tratamiento químico se remueve el corion, mientras que la membrana vitelina queda intacta.

Los embriones se ordenaron sobre un trozo de agar y finalmente se traspasaron a un cubreobjetos rectangular para su observación al microscopio. Dicho cubreobjetos fue previamente tratado con una solución de pegamento diluido en heptano. Una vez los embriones estaban pegados en el cubreobjetos y alineados con la región ventral hacia el cubreobjetos, para prevenir la deshidratación permitiendo a la vez el intercambio gaseoso, se cubrieron con aceite Voltalef 10S (VWR Chemicals 24627.188).

Se realizaron registros en microscopio confocal de disco giratorio con objetivos 20X ó 40X a la misma temperatura de incubación.

5.3.3. Migración de hemocitos pupales

Todos los animales se cultivaron a 25°C hasta la colección de prepupas blancas (0 h \pm 30 min APF, *after pupa formation*), momento a partir del cual se aislaron en cámaras húmedas a 25°C o 29°C hasta el estadio de desarrollo de interés.

La disección y montaje de las pupas se realizó 1 hora antes de comenzar el registro, según descrito (Moreira y cols., 2011). En breve, se adhirió una cinta doble faz de 3-4 cm de largo (3M Scotch Double Sided Tape) a un portaobjetos, pegando en ambos

costados un grupo de 3 y otro de 4 cubreobjetos (18 x 18 mm #1, Menzel-Gläser) previamente pegados entre sí con esmalte de uñas transparente. En el espacio entre los cubreobjetos, se pegó la pupa con la región dorsal hacia arriba, y la región anterior hacia el grupo de 4 cubreobjetos. Mediante el uso de fórceps finos (Dumont #5), se removió el opérculo de la cutícula pupal, permitiendo la inserción de la pinza dentro de la cutícula para su posterior remoción hasta descubrir completamente el *notum* de los animales, hasta la mitad del abdomen. Finalmente, se cubrió homogéneamente toda la superficie de un cubreobjetos rectangular (24 x 40 mm #1.5, Knittel Glass) con Voltalef 10S y se apoyó sobre ambos cubreobjetos, sellando finalmente con esmalte de uñas transparente y se dejó secar hasta comenzar el momento del registro.

5.3.3.1. Velocidad de migración de hemocitos pupales

Se realizaron cruces con la línea *DeCad.GFP, UAS-H2B.RFP/CyO; HmlΔ-Gal4* para marcar genéticamente el núcleo de los hemocitos pupales y facilitar su seguimiento. En todos los casos, se realizaron los análisis en pupas de 15 h APF a 29°C, o su equivalente de 19 h APF a 25°C.

Se registraron imágenes con un objetivo 20X para abarcar el *notum* completo de los animales con intervalos de 90 segundos, durante 30 minutos. Las imágenes fueron analizadas manualmente mediante el plugin *Manual Tracking* disponible en el software ImageJ. Los parámetros de migración se obtuvieron mediante el uso del plugin *Chemotaxis Tool* a partir de los datos obtenidos mediante el uso del primer plugin mencionado.

5.3.3.2. Morfología de hemocitos pupales durante migración

Se hizo uso de la línea *HmlΔ>2xEGFP* para marcar genéticamente el cuerpo celular de los hemocitos pupales y observar su morfología durante su migración. Se seleccionaron pupas de 17 h APF a 29°C, para el registro en el *notum* pupal mediante el uso de un objetivo 40X con intervalos de 1 minuto.

5.3.3.3. Actividad de reportero Trpml-GCaMP5 *in vivo*

Con el fin de inducir una expresión lo suficientemente fuerte como para visualizar la actividad del reportero, se acudió al uso de un *driver* ubicuo cuya expresión se induce de forma tiempo-específica mediante la generación de clones *FLP-out* (Perrimon, 1998). Para ello, se realizaron cruces entre las líneas *Hs::Flp; UAS-LifeActRuby/CyO, act::GFP; Act <FRT> Gal4, UAS-CFP/TM6b* y *UAS-Trpml.GCaMP5/TM6b*, cuya descendencia se creció a 25°C. Se seleccionaron prepupas blancas (0 ± 1 h APF), y al cabo de 3 h se realizó un golpe de calor a 37°C durante 5 minutos, y se cultivaron a 25°C hasta que las pupas alcanzaran las 20 h APF. Se determinó experimentalmente que este periodo presentó una mayor probabilidad de generar los clones en los hemocitos respecto de otros tejidos. En todos los casos se realizaron los registros con un objetivo 40X e intervalos de 1 minuto.

5.3.4. Ensayos de sobrevida y reclutamiento a la herida

Se realizaron punciones con filamentos de tungsteno en la región posterior (lado dorsal) de larvas III o región abdominal (lado ventral) en hembras adultas (1 a 3 días *post-eclosión*). Dicho filamento fue inmerso previo a la punción, en un medio conteniendo bacterias o estéril. Finalmente, los animales pinchados fueron aislados

en tubos independientes y se cuantificó el porcentaje de larvas que llegaron a pupa y eclosionaron, mientras que, en el caso de los adultos, se cuantificó la proporción que sobrevivió 10 días posterior a la punción.

Se determinó la tasa de supervivencia en ambos casos, como la proporción de animales que sobrevivió ante la infección, respecto de la proporción de animales que sobrevivió a la punción estéril.

Por su parte, para evaluar el reclutamiento de hemocitos al sitio de la herida, se utilizaron larvas en estadio III que expresan GFP exclusivamente en los hemocitos (genotipo *HmlΔ>2xEGFP*). En dichas larvas, se generaron punciones estériles en la región posterior-dorsal. Al cabo de 24 horas, se seleccionaron los animales que sobrevivieron, y que el diámetro de melanización en la zona dañada no excediera las 200 μm. Se registraron imágenes de estos animales, y se cuantificó la densidad de hemocitos en la zona aledaña a la herida (2 veces el diámetro de la zona melanizada).

5.4. Análisis de datos

Todos los análisis de imágenes fueron realizados con el software de libre uso ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) y las figuras en el presente trabajo se generaron mediante el uso de Adobe PhotoShop CS6. Los gráficos y análisis estadísticos fueron realizados mediante el uso del programa GraphPad Prism 7.

5.4.1. Distribución de Actina y Miosina

Para evaluar la distribución del citoesqueleto de actina respecto del de miosina, se generó un promedio de perfil radial del hemocito mediante la función de *Radial Reslice* de ImageJ (en 360°, utilizando 10 imágenes por hemocito, que corresponden a 10 minutos de cultivo).

Se generó un perfil de intensidad de señal mediante la función *Plot Profile* (ImageJ). Los valores obtenidos fueron normalizados respecto del valor máximo de intensidad de fluorescencia para cada canal de forma independiente.

Se designó como el 100% del radio, la región donde la señal que corresponde al citoesqueleto de actina se vuelve equivalente al ruido (menor a 0,1), y se graficaron todos los valores de intensidad de fluorescencia relativa, tanto de miosina como de actina. Se seleccionaron los datos donde la intensidad de fluorescencia relativa es igual a 0,5, y se registró la posición relativa respecto del radio (en %). Finalmente se determinó la diferencia porcentual entre el territorio de miosina y actina (al 0,5 de la intensidad de señal de fluorescencia).

5.4.2. Dinámica de citoesqueleto de actina

Para cuantificar la dinámica del citoesqueleto de actina, se registraron células expresando LifeActGFP en distintos fondos genéticos, durante 30 minutos, registrando una imagen por minuto.

Luego se convirtió la imagen a binaria en el software ImageJ para poder desprender las propiedades de la morfología del hemocito en dos dimensiones.

Se determinó los cambios de área celular en el tiempo (respecto del área promedio) como un parámetro indicador de la dinámica de polimerización de actina. Por lo que los valores de desviación estándar (% respecto del promedio) para cada célula, fueron los valores que se compararon entre condiciones.

5.4.3. Velocidad de Flujo Retrógrado

Para determinar la velocidad del flujo retrógrado de actina, se utilizó la marca de SqhGFP en hemocitos cultivados *ex vivo* durante 30 minutos, registrando una imagen por minuto. Se determinó manualmente el centro de la célula y se generó un perfil radial del hemocito mediante la función de *Radial Reslice* de ImageJ, con lo que se obtiene un kimograma por cada ángulo de la célula.

En el kimograma se observa la señal radial en función del tiempo, por lo que la inclinación de las líneas de desplazamiento de Sqh revelan la velocidad del flujo (ver esquema en Figura 15A).

6. RESULTADOS

6.1. Trpml regula la migración y fagocitosis en hemocitos de *Drosophila melanogaster* durante distintos estadios de desarrollo

En primera instancia, quisimos evaluar si el canal Trpml cumple un rol importante en los hemocitos de *Drosophila*, tanto en procesos de fagocitosis, como de migración celular. Conjuntamente, evaluamos el rol fisiológico del canal en los hemocitos en un contexto de respuesta inmune ante infección con bacterias.

6.1.1. La fagocitosis y procesamiento fagocítico son dependientes de Trpml

Para evaluar la capacidad de degradar el material fagocitado de los hemocitos deficientes de *trpml*, se realizaron co-cultivos de hemocitos que expresan LifeActGFP (permite marcar el citoesqueleto de actina en células vivas), con bacterias fluorescentes, y se evaluó la co-distribución de bacterias con las vesículas acídicas (LysoTracker Red) luego de una hora de cultivo. Se obtuvo como resultado una menor co-distribución de marcas en el caso de los hemocitos aislados de animales mutantes *trpml*¹ (1,4% de los hemocitos presentan codistribución de marcas) respecto de los controles (95,6%) (Figura 7A-B), lo que sugiere una disminuida capacidad de procesamiento fagocítico. Es decir, la fusión de fagosomas conteniendo bacterias en su interior con los lisosomas se encuentra alterada, y con ello, la degradación de las bacterias fagocitadas.

Asimismo, para correlacionar el fenotipo de *trpml*¹ con la fusión deficiente de lisosomas con fagosomas, se evaluó el mismo fenómeno en células con pérdida de función de *vamp7* (Figura 7C), obteniéndose también una disminuida co-distribución de señal proveniente de bacterias y vesículas acídicas (20,7%), sugiriendo que en

esta condición también existe una deficiente degradación de bacterias fagocitadas. El hecho de que el fenotipo no sea tan severo como en el caso del mutante *trpml*¹ se debe probablemente al hecho de que la pérdida de función de *vamp7* no es total, dado que corresponde a un silenciamiento mediado por RNAi.

Por su parte, se evaluó en condiciones de doble deficiencia de *trpml* y *vamp7* mediada por RNAi (Figura 7D), y se obtuvo un bajo número de células presentando co-distribución entre bacterias y vesículas acídicas (1,6%), similar al caso del mutante *trpml*¹. Dichos resultados sugieren que tanto Trpml como Vamp7 actúan promoviendo la fusión fagolisosomal y consecuente degradación de bacterias fagocitadas.

Con el fin de determinar si Trpml es requerido para la iniciación de nuevos eventos de fagocitosis, se hicieron co-cultivos de hemocitos con bacterias (*E. coli*) durante 15 minutos y se procedió a fijar y realizar tinciones con Faloidina-TRITC y DAPI, marcando el citoesqueleto de actina y el núcleo de hemocitos junto con las bacterias, respectivamente. Esto permitió cuantificar la proporción de hemocitos conteniendo bacterias en su interior, previo a su degradación.

Se obtuvo que los mutantes nulos presentaron una menor proporción de hemocitos fagocíticos (26% vs. 63% hemocitos conteniendo bacterias/campo), sugiriendo que éstas presentan menor capacidad de fagocitar bacterias respecto de los provenientes de animales controles (Figura 7F).

Cabe destacar que los hemocitos provenientes de animales mutantes nulos *trpml*¹, así como los de trans-heterocigotos *trpml*¹/*trpml*² son incapaces de degradar bacterias,

avalando, por tanto, que los resultados obtenidos no se deben a mutaciones secundarias desconocidas en el cromosoma conteniendo el alelo *trpml*¹ (Figura 8A).

Asimismo, demostramos que el fenotipo de *trpml*¹ es rescatado al expresar el gen *trpml* de *Drosophila* en los hemocitos (Figura 8B), mientras que al expresar el gen ortólogo humano *MCOLN1* (que codifica para la proteína TRPML1) solo genera un rescate parcial (Figura 8C).

Otra observación importante es el movimiento centrípeto que los lisosomas sufren durante el curso del procesamiento fagocítico. En condiciones normales, los lisosomas se encuentran dispersos por el citoplasma, y al cabo de 1 hora de cultivo con bacterias, estas vesículas se encuentran concentrados en el centro de los hemocitos controles. Dicho fenómeno se pierde en las condiciones de pérdida de función de *trpml*, tanto en el mutante *trpml*¹ como en la pérdida de función mediada por RNAi, sin embargo, en la pérdida de función de *vamp7* sola, el movimiento centrípeto de los lisosomas parece estar inalterado (Figura 9).

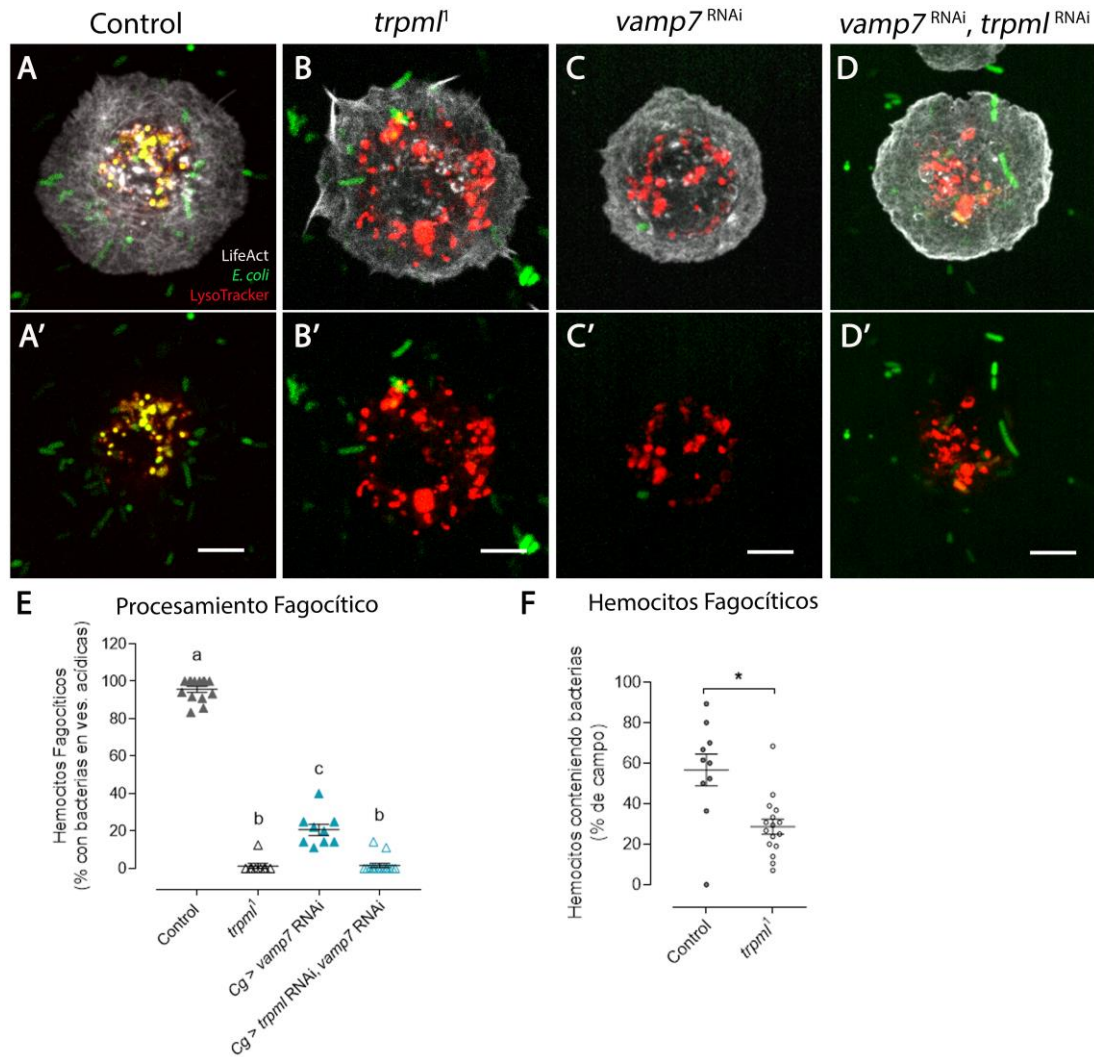


Figura 7. Trpml es requerido para la fagocitosis de bacterias y la degradación fagolisosomal

A-D) Imágenes representativas de hemocitos cultivados con bacterias fluorescentes y LysoTracker Red en condiciones Control (A,A'), *trpml*¹ (B-B'), *Vamp7*^{RNAi} (C-C') y *Vamp7*^{RNAi} + *Trpml*^{RNAi} (D-D'). Barra de tamaño: 5 μ m. **E)** Cuantificación de procesamiento fagocítico como el porcentaje de hemocitos conteniendo bacterias en sus vesículas acídicas luego de 1 hora de cultivo. ANOVA de 1 vía (N \geq 60 hemocitos/condición). Los valores estadísticamente equivalentes están representados con la misma letra. **F)** Proporción de hemocitos fagocíticos cuantificado como porcentaje de hemocitos conteniendo bacterias en su interior. * $p \leq 0,05$. t-test (N \geq 10 imágenes de campo, n \geq 8 hemocitos/campo).

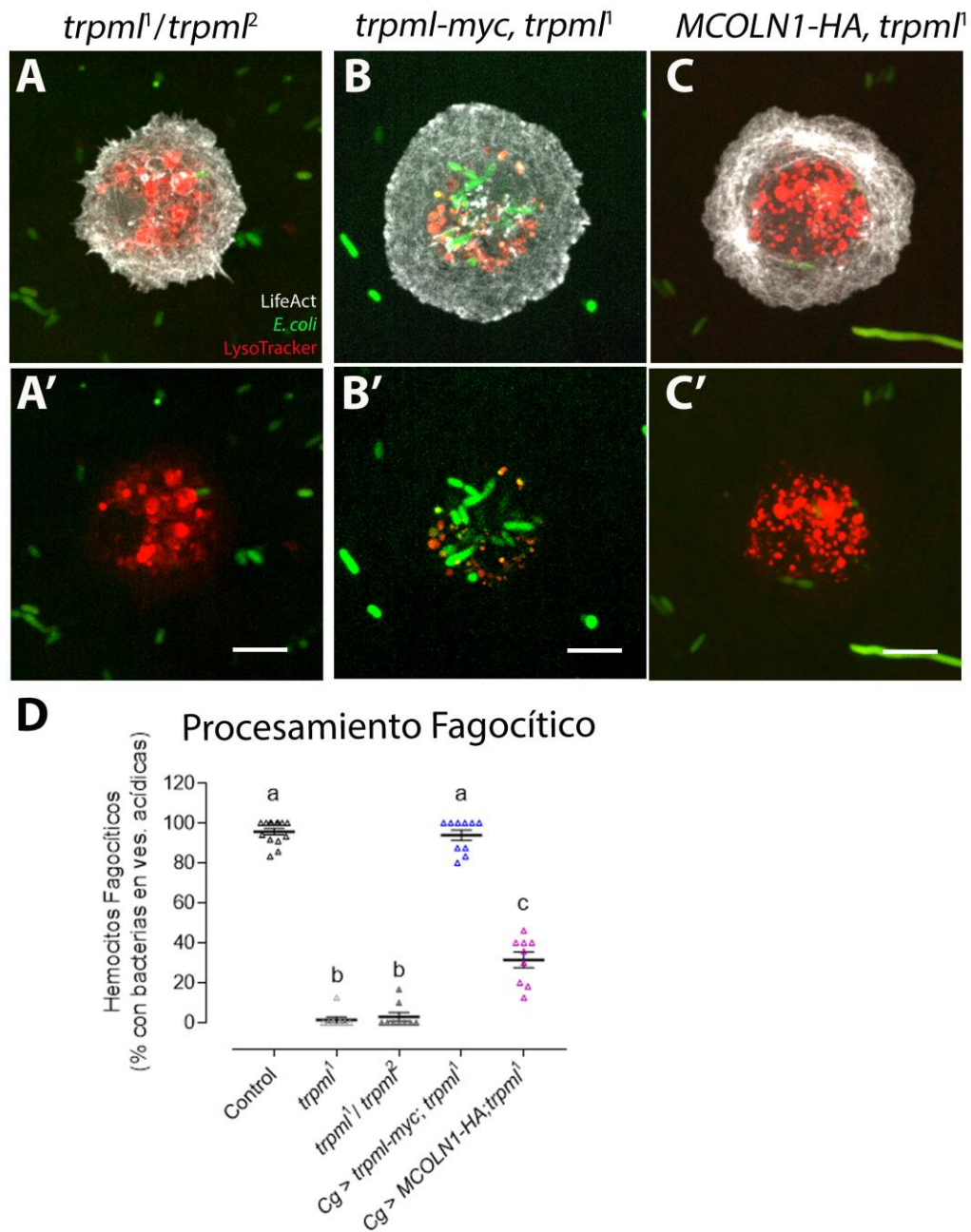


Figura 8. Complementación y rescate genético de fenotipos *trpml*¹ en procesamiento fagocítico

A-C) Imágenes representativas de hemocitos cultivados con bacterias fluorescentes y LysoTracker Red en el trans-heterocigoto *trpml*¹/*trpml*² (A-A'), así como la expresión de los genes *trpml-myc* de *Drosophila* (B-B') y *MCOLN1-HA* humano (C-C') en el fondo genético de *trpml*¹. Barra de tamaño: 5 μ m. **D)** Cuantificación de procesamiento fagocítico como el porcentaje de hemocitos conteniendo bacterias en sus vesículas acídicas luego de 1 hora de cultivo. Los valores representados corresponden a Promedio \pm E.E. ANOVA de 1 vía (N \geq 60 hemocitos/condición). Los valores estadísticamente equivalentes están representados con la misma letra.

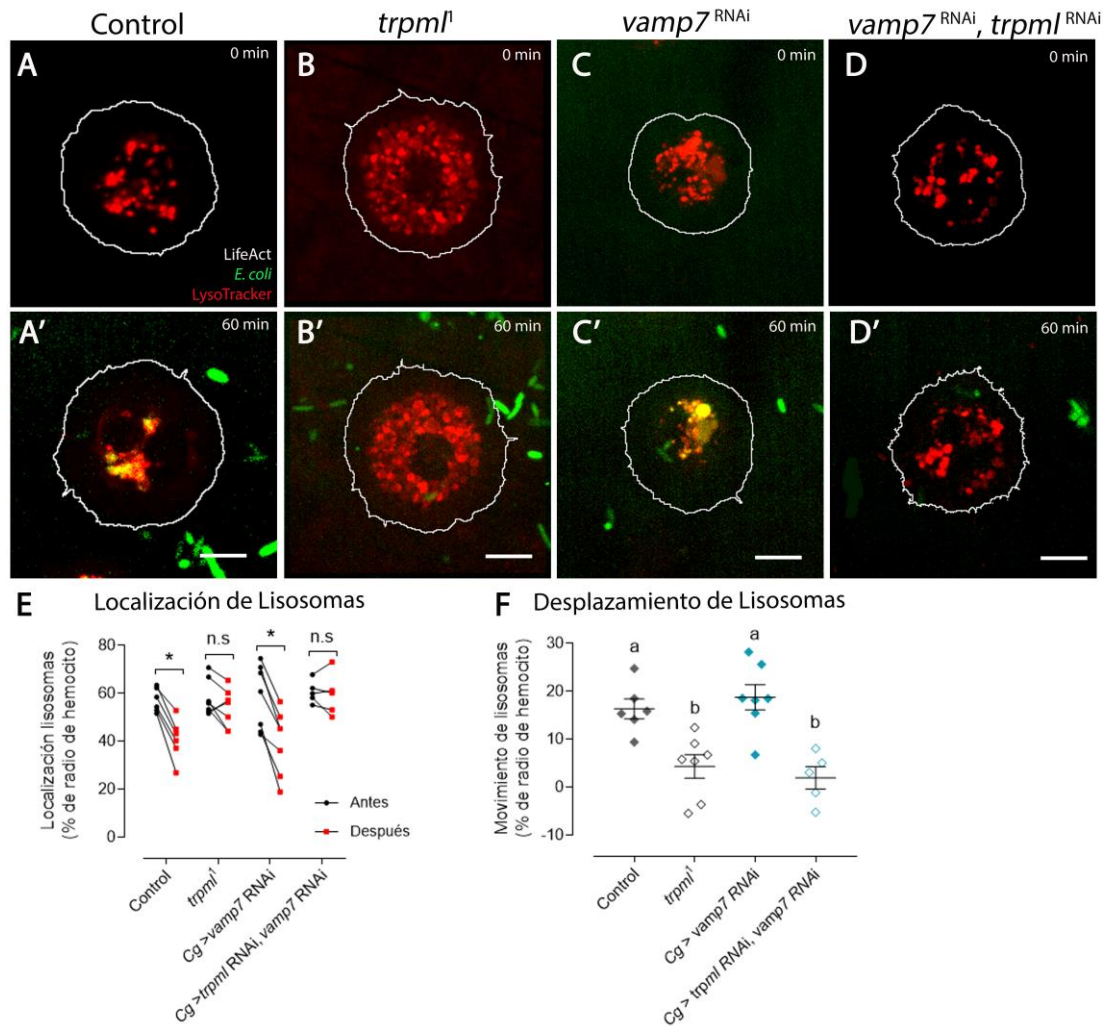


Figura 9. Trpml es requerido para el movimiento centrípeto de lisosomas durante la maduración de fagosomas

A-D) Imágenes representativas de hemocitos cultivados con bacterias fluorescentes y LysoTracker Red en condiciones Control (*A,A'*), *trpml*¹ (*B-B'*), *Vamp7*^{RNAi} (*C-C'*) y *Vamp7*^{RNAi} + *Trpml*^{RNAi} (*D-D'*). Barra de tamaño: 5 μ m. Se muestra imagen en ausencia de bacterias (*A-D*) y luego de 1 hora de cultivo con bacterias (*A'-D'*). **E)** Localización de los lisosomas antes y después del cultivo con bacterias (respecto del radio del hemocito). * $p \leq 0,05$. ANOVA de doble vía ($N \geq 8$ hemocitos/condición). **F)** Desplazamiento de lisosomas, revelando la disminución del movimiento centrípeto en condiciones de pérdida de función de *trpml*. ANOVA de 1 vía ($N \geq 8$ hemocitos/condición). Los valores estadísticamente equivalentes están representados con la misma letra.

6.1.2. Trpml modula la eficiencia de migración de hemocitos embrionarios y pupales

Dado que los resultados presentados sugieren que Trpml participa en procesos de fagocitosis y procesamiento fagocítico, se procedió a evaluar su rol en migración celular. Para ello, se utilizó en primera instancia el estadio embrionario, que permite evaluar migración direccionada de hemocitos.

Se ha demostrado que los hemocitos embrionarios migran por rutas estereotipadas hasta poblar completamente los animales, proceso mediado por los gradientes de factores quimiotácticos del tipo Pvf (ligandos asociados a receptores del tipo PDGF y VEGF) (Figura 10A). En breve, los primeros hemocitos embrionarios se originan en el mesodermo anterior e infiltran la banda germinal extendida, abandonando la cabeza del animal. Posteriormente, la retracción de la banda germinal lleva a estos hemocitos a la región posterior. Luego, tanto los hemocitos en anterior como en posterior migran a lo largo del cordón neural ventral hasta encontrarse y finalmente se dispersan hacia los costados del embrión (revisado en Wood & Jacinto, 2007).

Se realizaron registros de tipo *time-lapse* de embriones con los hemocitos marcados mediante el uso conjunto de los *drivers* de Gal4 *serpent* y *croquemort* (Gold & Brückner, 2015), dirigiendo la expresión de GFP (Figura 10B) o bien, de GFP en conjunto con el RNAi contra *trpml* (Figura 10C,C'). Se observó un leve retraso en la migración de los hemocitos con pérdida de función del canal (Figura 10C), pero los animales eventualmente se equipararon a los controles (Figura 10C'), sugiriendo que existe un retraso en la velocidad de migración.

Los ensayos mostrados corresponden a registros realizados a 29°C, puesto que a 25°C no se observaron diferencias evidentes entre las diferentes condiciones (n=3 embriones/condición). Una posible explicación es que la incubación de los animales a 29°C permite incrementar la actividad transactivadora de Gal4, con lo que aumenta la intensidad del fenómeno de interferencia. Esto conlleva una velocidad de desarrollo aproximadamente 1,3 veces la que ocurre a 25°C, efecto que fue considerado a la hora de los registros y determinación de estadios de desarrollo. También se realizaron ensayos con animales mutantes nulos *trpm1*¹, pero no se observaron diferencias con los animales controles, posiblemente dado por el aporte de los transcritos maternos a la expresión del canal (Anexo 3).

La caracterización de la migración de hemocitos embrionarios fue más bien cualitativa, puesto que un seguimiento inequívoco de los hemocitos para cuantificar su velocidad fue inconducente, dadas las herramientas genéticas utilizadas para su marcaje.

Para poder cuantificar la velocidad de migración de los hemocitos, se realizaron entonces ensayos de migración durante un segundo estadio de desarrollo, la pupa. Se expresó una proteína de localización nuclear fusionada a una fluorescente, en este caso, His2B-RFP dirigido por el *driver* *HmlΔ*-Gal4. Los animales tienen un fondo genético tal que la proteína E-Cadherina queda fusionada a GFP conservando sus niveles de expresión endógenos (Figura 10D), lo cual permite tener una referencia de la profundidad en el tejido para los registros. Esto es de suma importancia para no dañar los animales y también para registrar siempre los hemocitos que migran en la membrana basal conectada al epitelio.

Se ha descrito que entre las 18 y 24 h después de la formación de la pupa (APF, del inglés *after pupae formation*), los hemocitos presentan el mayor grado de movilidad en este tejido (Moreira y cols., 2011), es por ello que se realizaron registros a partir de las 20 h \pm 30 min APF a 25°C, y durante el estadio de desarrollo equivalente a 29°C (15 h \pm 30 min).

En primera instancia se evaluó el efecto de dos RNAi a 25°C y si bien se observaron tendencias a la baja en la velocidad de migración, no se obtuvieron diferencias significativas respecto de animales controles (n=4, datos no mostrados), por lo que se procedió a realizar los ensayos a 29°C, dadas las razones ya descritas para los ensayos de migración en embriones. Se realizó el seguimiento manual de al menos 20 núcleos por animal y se cuantificó su velocidad de migración.

Se obtuvo que tanto el silenciamiento de *trpml*, como el de *vamp7* generaron una disminución significativa en la velocidad de migración de los hemocitos (Figura 10E). Asimismo, se evaluó la velocidad de migración en condiciones de pérdida de función de *vha68-1*, que codifica para una subunidad de la V-ATPasa presente en los lisosomas, responsable por su acidificación, y, por tanto, de su capacidad degradativa (Dow, 1999).

Los resultados muestran que tanto la pérdida de función de *vamp7* como la de *vha68-1* disminuyó la velocidad de migración de hemocitos pupales. Por su parte, la sobreexpresión de *trpml* no generó efectos significativos sobre la velocidad de migración de los hemocitos.

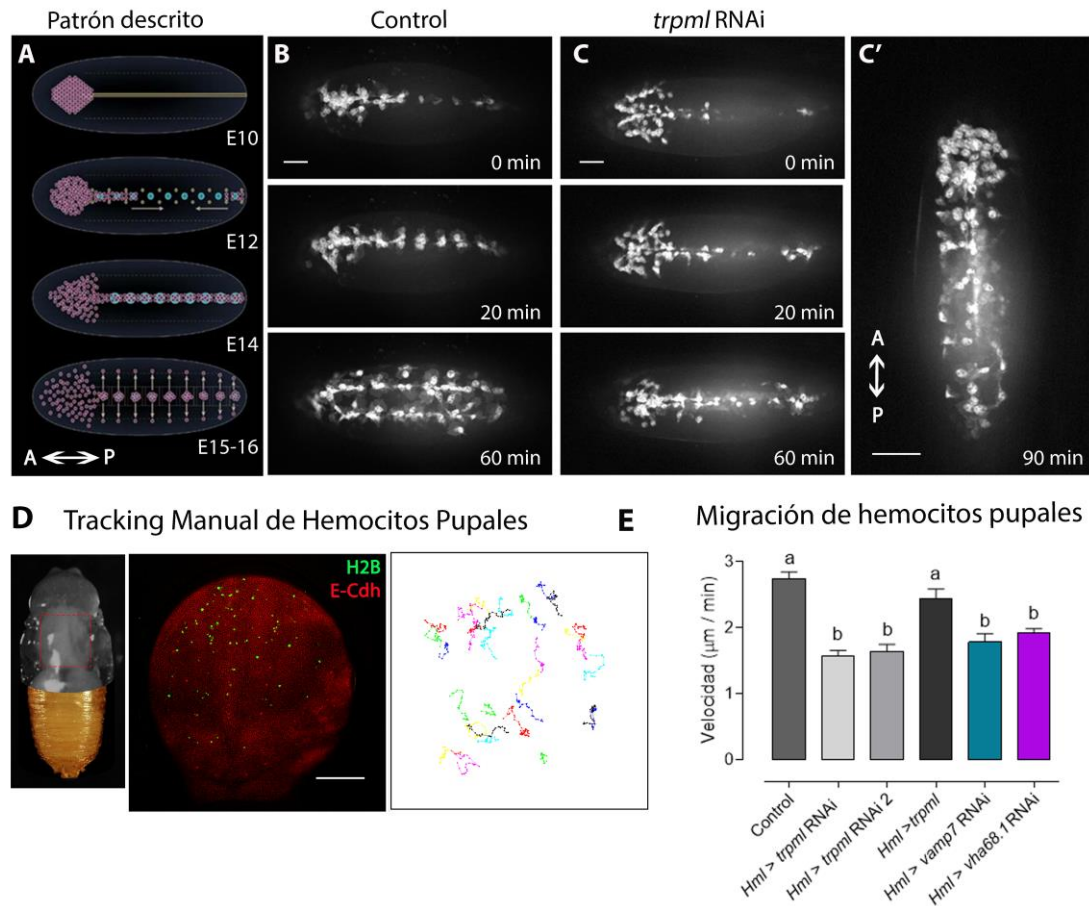


Figura 10. Trpml participa en la migración de hemocitos embrionarios y pupales, así como la sobrevivencia de animales ante infección con bacterias

A) Patrón descrito de migración de hemocitos durante desarrollo embrionario (adaptado de Wood y Jacinto, 2007). El eje anteroposterior está esquematizado. **B)** En animales controles se observa un patrón de migración similar al descrito, pero levemente acelerado dado que los registros se realizaron a 29°C (n=3). **C)** En animales de pérdida de función de *trpml*, se observa un leve retraso en la dispersión de los hemocitos, junto con una baja dispersión de los hemocitos cefálicos (n=3). **C')** Los hemocitos alcanzan finalmente la dispersión esperada, pero con un leve retraso, sugiriendo que la migración está enlentecida. Barra de tamaño: 10 μm. **D)** Imagen representativa de una pupa de 15 h ± 30 min APF después de remoción de cutícula (izquierda), *notum* con epitelio y núcleos de hemocitos marcados fluorescentemente (centro) y *tracks* manuales (derecha). Barra de tamaño: 150 μm. **E)** Velocidad de migración de hemocitos pupales. Datos representados como Promedio ± E.E. ANOVA de 1 vía (N ≥ 3 animales/condición, n ≥ 20 hemocitos/animal). Los valores estadísticamente equivalentes están representados con la misma letra.

6.1.3. La expresión de *trpml* en hemocitos es relevante para la respuesta inmune ante infección bacteriana y reclutamiento al sitio de la herida

Para evaluar si los efectos observados en cuanto a la fagocitosis, procesamiento fagocítico y migración de hemocitos tienen una importancia en la función de estas células a nivel sistémico, se realizaron ensayos de sobrevivencia a infección bacteriana en animales controles, mutantes y con pérdida de función hemocito-específica de *trpml* (*driver HmlΔ-Gal4*). Se pincharon larvas y adultos con una aguja de tungsteno conteniendo bacterias (*E. coli*) y se cuantificó la eclosión (larvas) y sobrevivencia 10 días post-infección (adultos) respecto del pinchazo con medio estéril. Se obtuvo una disminuida tasa de eclosión de larvas con pérdida de función de *trpml*, tanto sistémico como hemocito-específico (Figura 11A).

Para determinar si la función de Trpml es requerida principalmente en los hemocitos, se realizaron ensayos de infección en animales mutantes *trpml*¹ que expresan el canal únicamente en los hemocitos. Sorprendentemente, la expresión de *trpml* fue capaz de revertir la mortalidad en los animales *trpml*¹, sugiriendo un efecto celular autónomo del canal en los hemocitos. Similares resultados se obtuvieron en el caso de la infección de adultos (Figura 11B). Por otra parte, la sola ganancia de función de *trpml*, no generó diferencias significativas en la sobrevivencia de larvas o adultos respecto de animales controles.

En ensayos complementarios, se evaluó el reclutamiento de los hemocitos hacia el sitio del daño (sin bacterias) y se observó que los hemocitos *trpml*¹ fueron reclutados en menor proporción hacia el sitio del daño que controles (Figura 11C-D). Finalmente, se evaluó la pérdida de función de *vamp7* y se mostró también un rol autónomo celular para en la sobrevivencia de adultos infectados con bacterias.

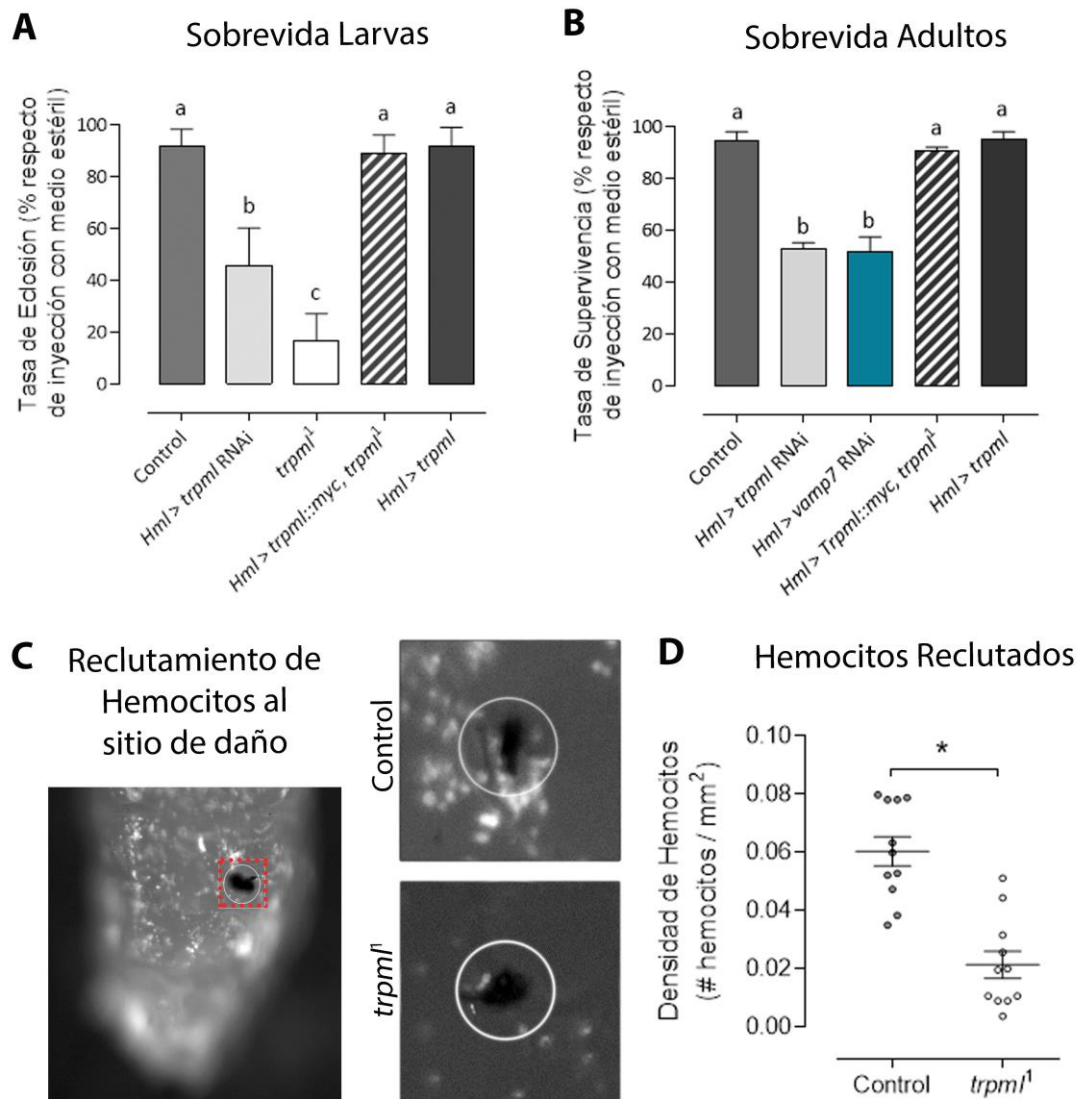


Figura 11. Sobrevida ante infección con bacterias y reclutamiento al sitio del daño

Se pincharon animales en estadio larvario y adulto con filamentos de tungsteno conteniendo bacterias y se evaluó la supervivencia. **A)** Tasa de eclosión de larvas infectadas respecto de pinchazo estéril. **B)** Tasa de supervivencia de hembras adultas 10 días posterior a la infección respecto de pinchazo con medio estéril. En ambos casos, los datos son representados como Promedio \pm E.E. ANOVA de 1 vía ($N \geq 3$ experimentos independientes, $n \geq 20$ animales/experimento). Los valores estadísticamente equivalentes están representados con la misma letra. **C)** Imagen representativa de la región posterior de una larva dañada (1 día post-daño), cuyos hemocitos expresan GFP (izquierda) y acercamiento a la zona de daño en la condición control y *trpm1*⁻¹. **D)** Cuantificación de hemocitos reclutados en la zona de daño. * $p \leq 0,05$. *t*-test ($N = 3$ experimentos independientes, $n \geq 3$ larvas/experimento).

6.2. La dinámica del citoesqueleto de actina y miosina dependen de la actividad de Trpml

Hemos mostrado que Trpml cumple un rol importante en la migración y procesos fagocíticos, así como su rol fisiológico ante una situación de infección. Por tanto, para determinar si este rol depende de mecanismos asociados a la fusión fagolisosomal, quisimos ahondar en el rol de Trpml en la eficiencia de migración de hemocitos. Para ello, evaluamos la importancia del canal en la estructura y dinámica del citoesqueleto, mediante aproximaciones *ex vivo* e *in vivo*.

6.2.1. Trpml modula la morfología de hemocitos migratorios *in vivo*

Se registraron hemocitos pupales expresando GFP citoplasmático, para la observación de su patrón migratorio *in vivo* (Figura 12). Se observó en hemocitos controles una amplia lamela que presentó una activa dinámica de extensión y retracción (Figura 12A), mientras que los hemocitos mutantes *trpml*¹ presentaron escasas protrusiones y generaron estructuras de tipo *blebs* (Figura 12B). Dicho fenotipo es autónomo celular, puesto que se rescató al expresar *trpml* exclusivamente en los hemocitos (Figura 12C).

Se han descrito los factores principales que controlan el tipo de protrusión que genera una célula migratoria: la contractilidad de actomiosina, polimerización de actina, las propiedades del sustrato y las adhesiones célula-célula y célula-sustrato (Friedl & Wolf, 2010). Adicionalmente, la adhesión entre la membrana plasmática y los filamentos de actina cortical juegan un rol clave en la formación de *blebs* (Paluch & Raz, 2013). Por lo tanto, los *blebs* se generan cuando existe una elevada presión intracelular en conjunto con una ruptura de la estructura cortical de actina, o bien una

reducida adhesión entre ésta y la membrana plasmática (Ikenouchi & Aoki, 2017). Por consiguiente, el fenotipo observado en hemocitos *trpml*¹ sugiere que éstos presentan problemas en la estructura y/o contractilidad del citoesqueleto de actina cortical.

Por su parte, en la condición de pérdida de función de *vamp7* (Figura 12D) no se observó formación de *blebs*, y las células fueron capaces de extender y contraer extensas lamelas, sugiriendo que el rol de Vamp7 en la migración de hemocitos no ocurre a través de la modulación de componentes del citoesqueleto que impactan en dichos procesos.

6.2.2. Trpml determina la estructura del citoesqueleto de hemocitos *ex vivo*

Para conocer si Trpml cumple un rol en la distribución de los componentes del citoesqueleto de actina, se procedió a analizar los hemocitos control y deficientes en *trpml ex vivo* (Figura 13), mediante el marcaje de los filamentos de actina (LifeActRuby) y Miosina-II, en particular la fusión GFP con la cadena liviana regulatoria de miosina, cuyo homólogo en *Drosophila* se llama *Spaghetti squash* (Sqh) (Franke y cols., 2005).

En promedio, una célula control presentó una lamela que corresponde a un 30,1% radial, cuyo valor disminuyó significativamente en ambas condiciones de pérdida de función de *trpml* (mutante nulo *trpml*¹ y mediada por RNAi con 13,4% y 15%, respectivamente), mientras que la sola pérdida de función de *vamp7* no generó cambios significativos en la extensión de la lamela (32,4%) (Figura 13F).

El hecho de que solo la pérdida de función de *trpml*, pero no la de *vamp7*, generaron un fenotipo en la estructura de los hemocitos migratorios *in vivo*, así como en la

distribución del citoesqueleto *ex vivo*, sugiere que Trpml modula la contractilidad del citoesqueleto de actomiosina en hemocitos, y que dicho efecto sería independiente de su rol en la fusión calcio-dependiente de los lisosomas con vesículas de otra naturaleza, como los fagosomas.

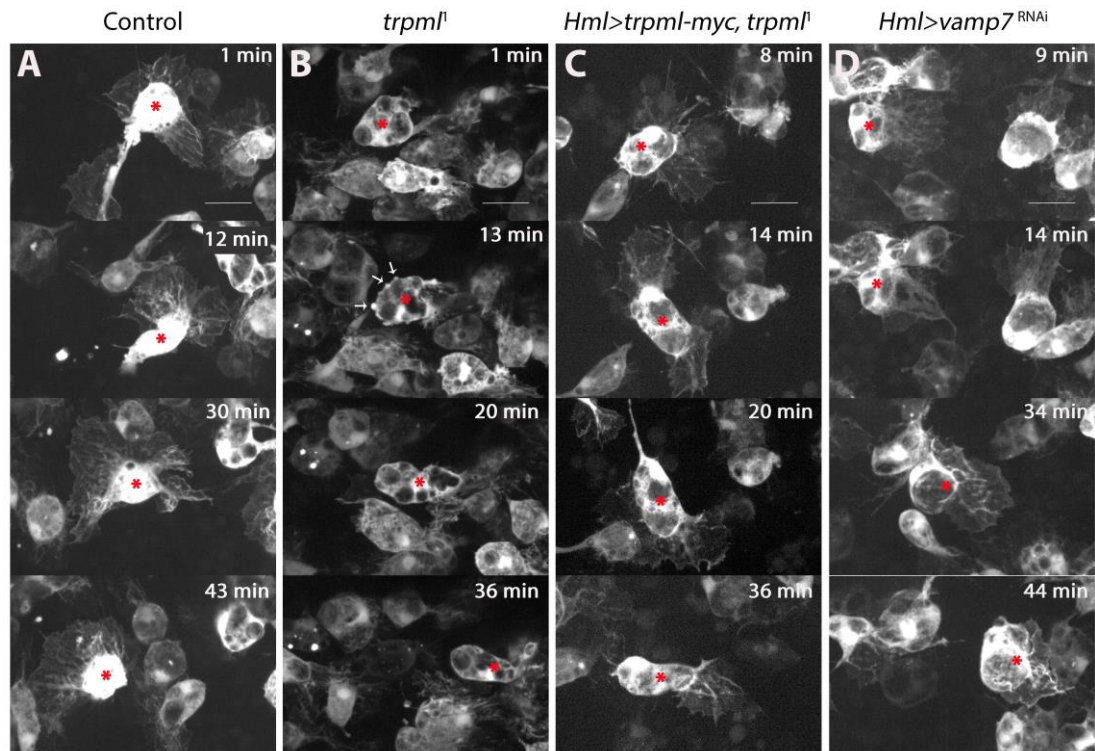


Figura 12. Trpml modula la morfología de hemocitos migratorios *in vivo*

Imágenes representativas de registros *time-lapse* de hemocitos marcados fluorescentemente (pupas 17 ± 30 min APF). Barra de tamaño: $10 \mu\text{m}$. Los videos completos se pueden encontrar en el material suplementario. $N \geq 4$ animales/condición. **A)** Hemocitos controles presentan una extensa y dinámica lamela. **B)** Los hemocitos *trpml*¹ presentan bajo número de protrusiones y generan estructuras del tipo *blebs* (flechas blancas). **C)** Expresión hemocito-específica de *trpml* rescata completamente el fenotipo del mutante *trpml*¹. **D)** Hemocitos con pérdida de función de *vamp7* presentan protrusiones extensas y no generar estructuras de tipo *blebs*.

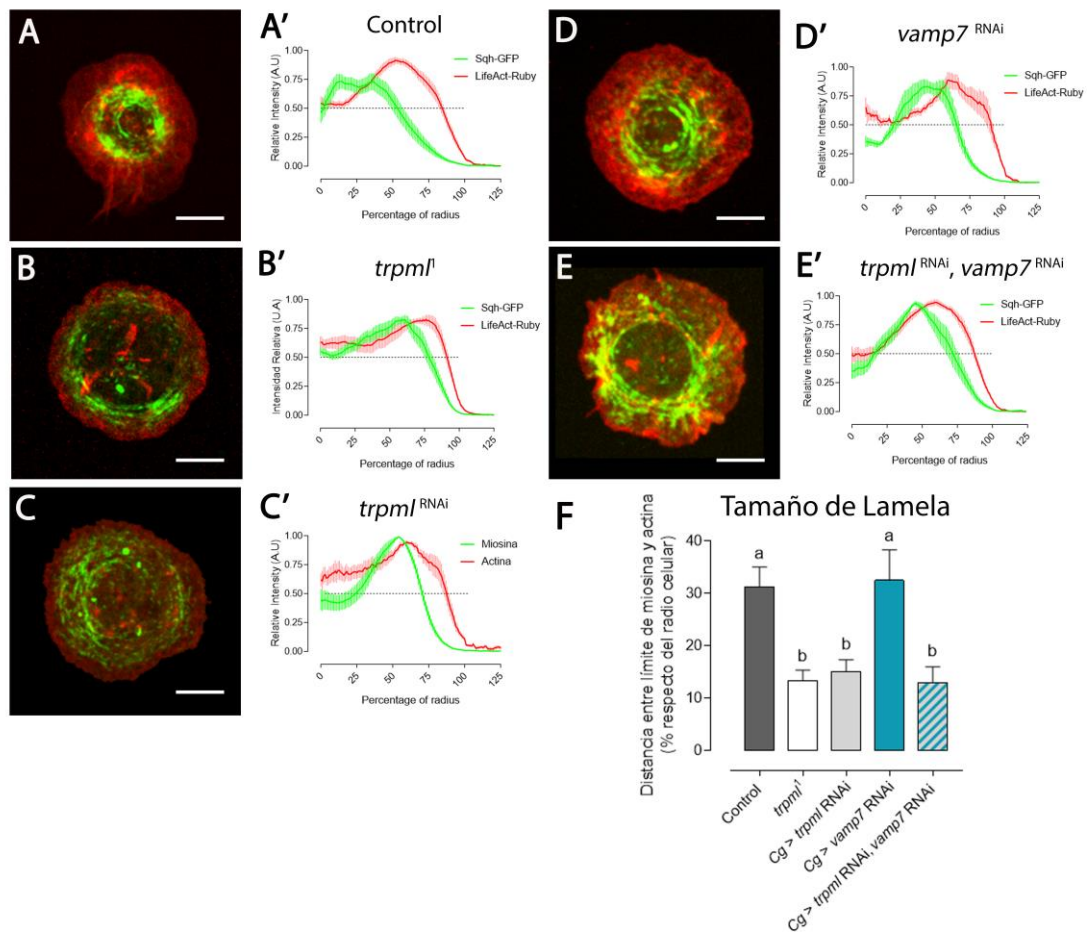


Figura 13. *Trpml* modula la distribución de Miosina-II y extensión de la lamela en hemocitos larvarios

A-E) Imágenes representativas de hemocitos larvarios cultivados *ex vivo*, expresando las proteínas fluorescentes LifeAct-Ruby (actina, rojo) y Sqh-GFP (MRLC, verde) en las condiciones control (A), *trpml*¹ (B), expresando el RNAi contra *trpml* (C), contra *vamp7* (D) y doble RNAi contra *trpml* y *vamp7* (E). **A'-E')** Perfil radial de distribución de LifeAct-Ruby y Sqh-GFP. **F)** Cuantificación de la extensión de la lamela de las condiciones evaluadas: Control (31,1%), *trpml*¹ (13,4%), *trpml*^{RNAi} (15,0%), *vamp7*^{RNAi} (32,4%) y *trpml*^{RNAi}, *vamp7*^{RNAi} (12,9%). Los valores graficados corresponden a la diferencia porcentual entre los límites del territorio de actina y miosina (al 50% de intensidad relativa de señal). Todos los valores graficados corresponden al promedio ± E.E. ANOVA de 1 vía (N ≥ 8 células/condición, 10 imágenes/célula, 360°/imagen). Los valores estadísticamente equivalentes están representados con la misma letra.

6.2.3. Trpml modula la contractilidad del citoesqueleto de actomiosina

Considerando que Trpml modula el patrón migratorio de hemocitos pupales *in vivo*, así como la distribución de actina y Miosina-II en hemocitos larvarios *ex vivo*, se procedió a evaluar la dinámica de ambos componentes del citoesqueleto mediante registros de tipo *time-lapse*.

Se registraron (por separado) células durante 30 minutos, en intervalos de 1 minuto, tanto en condiciones de marcaje del citoesqueleto de actina (LifeAct-GFP) como del de Miosina-II (Sqh-GFP).

Para cuantificar la dinámica de actina y el movimiento de la lamela, se registró el cambio de área en el tiempo y se consideró la desviación estándar de ésta (% respecto del promedio) como un valor indicativo de dinámica (Figura 14A). Los valores obtenidos se compararon entre las diferentes condiciones evaluadas, y se obtuvo que la dinámica del citoesqueleto de actina es significativamente menor en células *trpml*¹ respecto de controles, mientras que no existe una disminución significativa para el caso de hemocitos con pérdida de función de *vamp7* (Figura 14B).

En células controles y deficientes de *vamp7*, el área de la lamela cambia importantemente en el tiempo (ver video en material suplementario), reflejando una alta dinámica de polimerización ramificada de actina. Por su parte, en hemocitos con pérdida de función de *trpml* y de *sqh*, se observó un fenotipo similar, en que la lamela es más bien estática, y se observó la generación de estructuras del tipo *ruffles* dorsales. Cabe destacar que los hemocitos deficientes de Sqh son de un tamaño

significativamente mayor, dado el rol de esta proteína en el proceso de citoquinesis (Murthy & Wadsworth, 2005).

Para corroborar que la actividad de Trpml es instructiva respecto de la dinámica del citoesqueleto de actina, se recurrió al uso del agonista específico que induce la apertura inmediata del canal, MLSA1, el cual ha sido ampliamente usado en células de mamíferos (Samie y cols., 2013; Li y cols., 2016; Bretou y cols., 2017) pero existe un solo reporte de su uso en *Drosophila* (Wong y cols., 2017).

Quisimos demostrar la efectividad del agonista en nuestro sistema, por lo que recurrimos al uso de un reportero de actividad del canal, que consiste en una proteína de fusión, Trpml-GCaMP5, que genera una señal de GFP en presencia de Ca^{2+} local. Por lo que, dada la cercanía entre el reportero y el poro de Trpml, lo más probable es que una señal positiva transitoria se deba a la presencia de Ca^{2+} liberado a través del canal mismo. Cabe destacar que dicho constructo corresponde a una expresión ectópica del canal, sin embargo, esto no debiera alterar la interpretación de los resultados, dado que ya se demostró que la sobreexpresión del canal no generó fenotipo en migración (Figura 10E), ni en respuesta inmune ante infección con patógenos (Figura 11A,B).

Se realizaron registros de tipo *time-lapse* de hemocitos en cultivo, registrando una imagen cada 30 segundos. Se adicionó el agonista o medio control a los 5 minutos de comenzado el registro, y se procedió a cuantificar la intensidad de señal (fluorescencia emitida por GCaMP5 en presencia de Ca^{2+}) normalizando respecto del tiempo cero (Figura 14C), con lo cual demostramos que efectivamente la droga es funcional en las condiciones utilizadas.

Se procedió a evaluar la dinámica del citoesqueleto de actina en respuesta a MLSA1 en las condiciones control, *trpml*¹ y de pérdida de función de *sqh*, al igual que la dinámica de Sqh-GFP en condiciones controles.

Se observó que la inducción farmacológica de la actividad de Trpml generó un incremento de la dinámica de actina tan solo en la condición control (Figura 14B), reforzando nuevamente la idea de que es la actividad de Trpml quien modula de manera positiva la dinámica del citoesqueleto bajo estas condiciones.

En la condición *trpml*¹ no hubo un alza significativa en la dinámica de actina, corroborando la especificidad del agonista.

Por su parte, en la condición de pérdida de función de miosina, los niveles de cambio en el área de la lamela de actina fueron equivalentes a los observados en *trpml*¹. Asimismo, se observó que MLSA1 no indujo un incremento en la dinámica de cambio de área de la lamela, sugiriendo que el efecto de la activación de Trpml sobre el citoesqueleto de actina es dependiente de la presencia y actividad de Miosina-II.

Para cuantificar el flujo retrógrado en la lamela, se generaron kimogramas a partir de *time-lapse* de hemocitos expresando Sqh-GFP (Figura 15A), donde la señal radial fue graficada respecto del tiempo, permitiendo calcular la velocidad de flujo (líneas más horizontales representan una velocidad mayor, mientras que líneas más verticales, una velocidad menor).

El flujo retrógrado del citoesqueleto de actomiosina en hemocitos *trpml*¹ fue significativamente menor que en células controles o con pérdida de función de *vamp7* (Figura 15B,C). Asimismo, se obtuvo una tendencia de aumento en la velocidad del flujo retrógrado al complementar el medio de cultivo de hemocitos

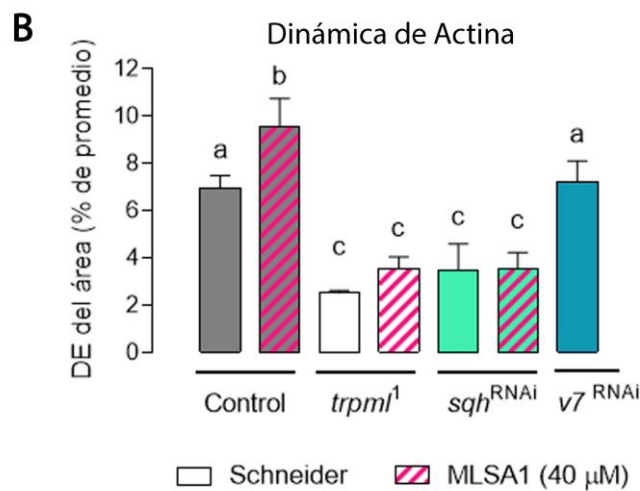
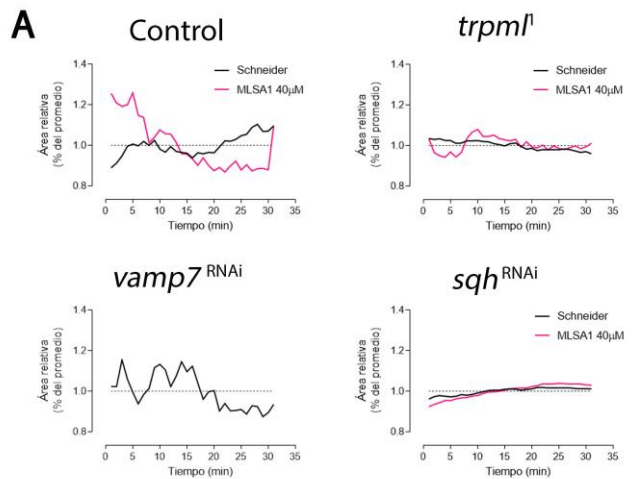
controles con MLSA1. Pese a no tener significancia estadística, esta observación refuerza los resultados previos, que sugieren que la contractilidad del citoesqueleto de actomiosina es dependiente de la actividad del canal.

Dados los resultados presentados, que sugieren que Trpml es necesario para la modulación positiva del citoesqueleto de actomiosina, quisimos determinar las fuerzas que los hemocitos ejercen sobre el sustrato. Para ello, se realizaron ensayos de microscopía de fuerza de tracción (TFM, del inglés *traction force microscopy*), cuyo principio consiste en cultivar las células sobre un sustrato flexible de rigidez conocida, cubierto de *beads* fluorescentes, permitiendo el registro del desplazamiento de cada uno de ellos, y consecuentemente, el cálculo de las fuerzas ejercidas sobre el sustrato (Martiel y cols., 2015).

Obtuvimos que los hemocitos *trpml*¹ ejercieron presiones significativamente menores sobre el sustrato que los controles (3.4 pPa *versus* 8.6 pPa) (Figura 15D). Dichos valores coincidirían con la propuesta de que Trpml está modulando de manera positiva la contractilidad del citoesqueleto de actomiosina.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de complementación y rescate genético para corroborar que los fenotipos observados en la dinámica del citoesqueleto se deben efectivamente a la mutación *trpml*¹ (Figura 16). Se mostró que en hemocitos provenientes de animales trans-heterocigotos *trpml*¹/*trpml*², tanto la dinámica del citoesqueleto de actina como la velocidad del flujo retrógrado de Sqh son equivalentes a los valores para hemocitos provenientes de animales *trpml*¹, demostrando por tanto que los fenotipos observados se deben a la ausencia de *trpml* y no a mutaciones secundarias inespecíficas. Asimismo, se demostró que la

expresión del gen *trpml* de *Drosophila* rescata por completo la dinámica del citoesqueleto, mientras que la expresión del ortólogo humano rescata tan solo de manera parcial, similar a lo observado en ensayos de procesamiento fagocítico (Figura 8).



C Actividad de Trpml en Respuesta a MLSA1

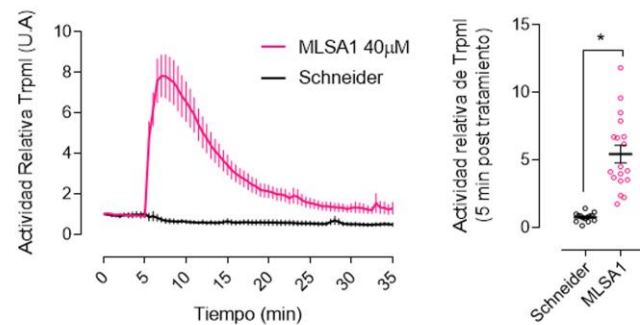


Figura 14. La actividad de Trpml induce la dinámica de la lamela de hemocitos de manera dependiente de Miosina-II

Se realizaron cultivos de hemocitos *ex vivo* en medio de cultivo control (Schneider) o conteniendo un agonista de Trpml (MLSA1). Los hemocitos se registraron durante 30 minutos, obteniendo 1 imagen por minuto. **A)** Gráficos representativos del cambio de área en el tiempo de hemocitos control, *trpm1*¹, expresando el RNAi contra *vamp7* y contra *sqh*. Los videos originales pueden ser encontrados en la sección de material suplementario. **B)** Cuantificación de la desviación estándar del área celular (% respecto del promedio). ANOVA de 1 vía ($N \geq 8$ células/condición). Los valores estadísticamente equivalentes están representados con la misma letra. Los resultados sugieren que Trpml tiene un rol en la modulación de la dinámica del citoesqueleto, mientras que Vamp7 no lo altera de manera significativa. Asimismo, muestran que la activación farmacológica del canal genera un incremento en la dinámica de la lamela, y que dicha inducción es dependiente de la presencia de Miosina-II. **C)** Actividad de Trpml en respuesta a MLSA1 (añadida en minuto 5) medida mediante el uso del reportero de Ca^{2+} Trpml-GCaMP5. Señal de fluorescencia normalizada respecto de tiempo cero **D)** Actividad de Trpml 5 min después de adicionar MLSA1. Los valores graficados corresponden al promedio \pm E.E. * $p < 0,05$. *t*-test ($N \geq 20$ células/condición).

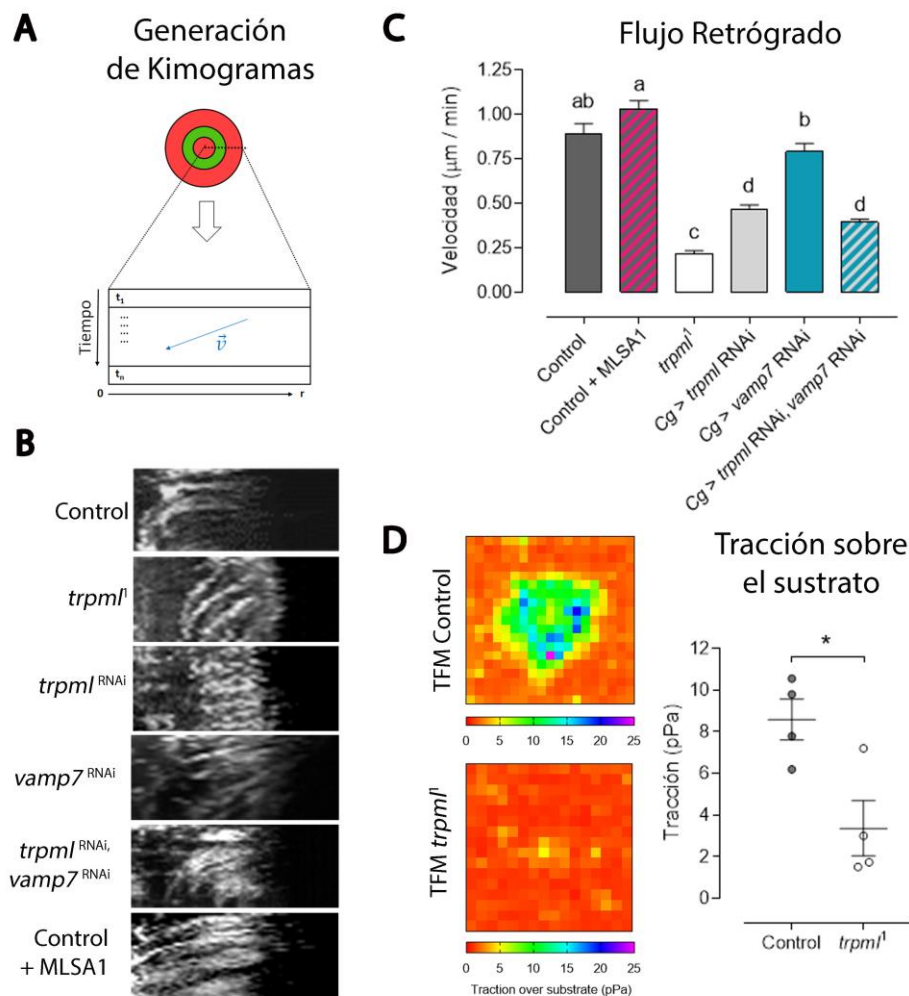


Figura 15. La actividad de Trpml modula el flujo retrógado de miosina y las fuerzas ejercidas sobre el sustrato

Se realizaron cultivos de hemocitos *ex vivo* y registraron durante 30 minutos, obteniendo 1 imagen por minuto. **A)** Esquema explicativo de generación de kimogramas. Se generó un perfil radial de intensidad, que es graficado contra el tiempo, por lo que las líneas diagonales permiten determinar la velocidad del flujo retrógado de miosina. **B)** Kimogramas representativos de hemocitos control, *trpml*¹, expresando el RNAi contra *trpml*, *vamp7* o la combinación de ambos, así como de hemocitos control en presencia del agonista MLSA1 (40 µM). Los videos originales pueden ser encontrados en la sección de material suplementario. **C)** Cuantificación del flujo retrógado de miosina a partir de 3 µm desde el centro de la célula. ANOVA de 1 vía (N ≥ 8 células/condición). Los valores estadísticamente equivalentes están representados con la misma letra. Los resultados muestran que Trpml juega un rol importante en inducir el flujo retrógado de miosina, mientras que Vamp7 no parece tener efecto sobre este parámetro. **D)** Mapas de calor indicando tensiones ejercidas sobre el sustrato por hemocitos control y *trpml*¹. Los resultados muestran una disminución significativa en las tensiones que ejercen células *trpml*¹ (3,4 pPa) respecto de controles (8,6 pPa). * $p < 0,05$. *t*-test (N=4 células/condición). Los videos revelando el desplazamiento de los *beads* fluorescentes se pueden encontrar en la sección de material suplementario.

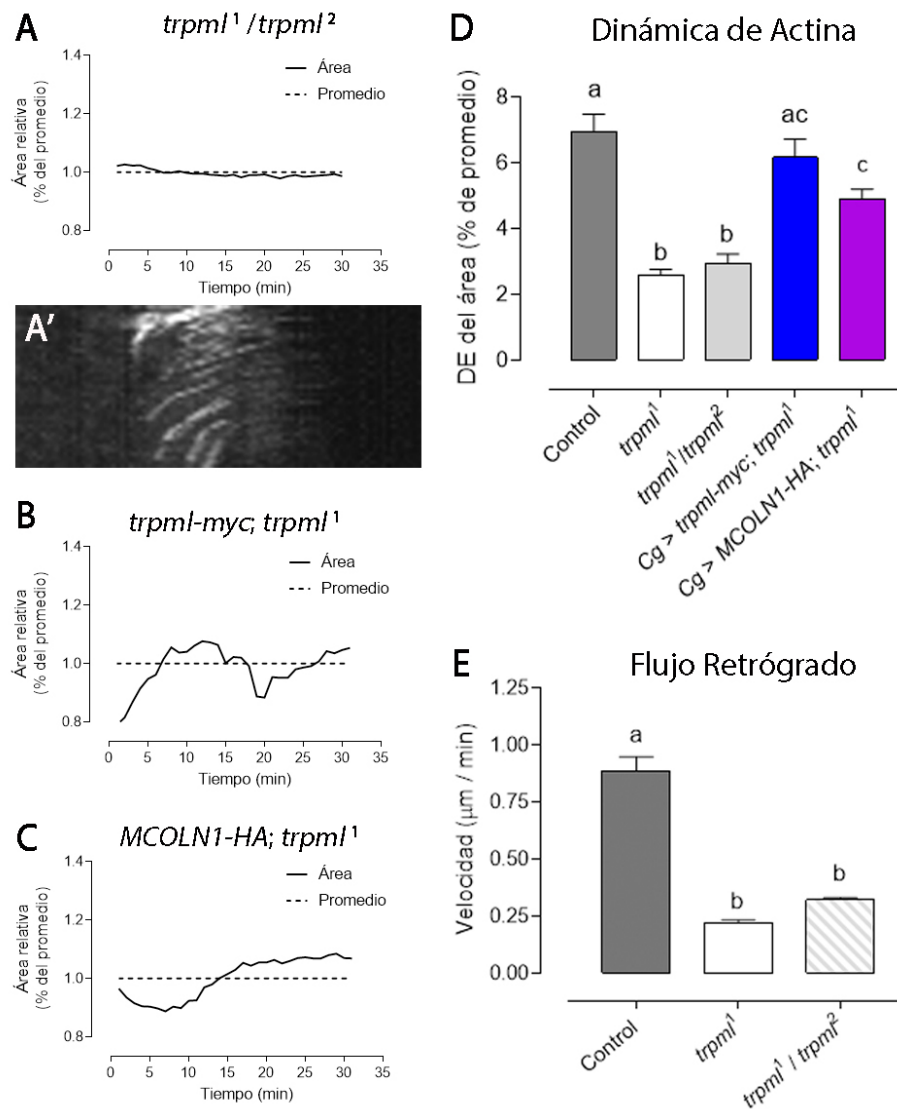


Figura 16. Complementación y rescate genético de fenotipos *trpml¹* en dinámica del citoesqueleto de actina y miosina

Se realizaron cultivos de hemocitos *ex vivo* y se registró durante 30 minutos, obteniendo 1 imagen por minuto. **A-C)** Gráficos representativos del cambio de área en el tiempo de hemocitos *trpml¹/trpml²* (A) expresando el gen *trpml* de *Drosophila* (B) y humano (C) en un fondo genético *trpml¹*. **A')** Kimograma revelando el flujo retrógrado de Sqh en hemocitos *trpml¹/trpml²*. **D)** Cuantificación de la desviación estándar del área celular (% respecto del promedio). **E)** Cuantificación del flujo retrógrado de miosina a partir de 3 μm desde el centro de la célula. Para D y E, los datos mostrados corresponden al Promedio \pm E.E. ANOVA de 1 vía ($N \geq 8$ células/condición). Los valores estadísticamente equivalentes están representados con la misma letra. Los resultados sugieren que el fenotipo de *trpml¹* no se debe a mutaciones secundarias en el cromosoma, y que el gen de *trpml* rescata por completo el fenotipo en el citoesqueleto, mientras que el ortólogo humano, tal solo rescata de forma parcial.

6.2.4. Trpml es importante en la redistribución subcelular del citoesqueleto de actomiosina y lisosomas en hemocitos polarizados

Dado que el estudio de distribución subcelular de Miosina-II y lisosomas *in vivo* presentó dificultades técnicas, y el hecho de que los estudios *ex vivo* se realizaron en células no polarizadas, se intentó evaluar la distribución subcelular de estos componentes en hemocitos migratorios *ex vivo* (ver Anexo 1).

Primero se recurrió al estudio de migración con microcanales (Heuzé y cols., 2011), que fueron desarrollados con el fin de emular el ambiente confinado de los tejidos periféricos (Faure-André y cols., 2008). Dichos canales han permitido dilucidar mecanismos claves que regulan la migración de células dendríticas (Bretou y cols., 2017; Chabaud y cols., 2015; Fernandez y cols., 2011; Heuzé y cols., 2013), de linfocitos T (Jacobelli y cols., 2010) y de líneas celulares cancerígenas (Raab y cols., 2016).

En nuestras manos, no se logró que los hemocitos ingresaran a los microcanales, incluso posterior al tratamiento con la hormona 20-hidroxiecdisona (20E), responsable de la regulación de las transiciones entre etapas de desarrollo en *Drosophila* (Yamanaka y cols., 2013), y que ha sido reportada como gatillo del comportamiento migratorio de hemocitos *in vivo* (Sampson y cols., 2013).

Dado que los hemocitos no lograron ingresar en los canales, especulamos que la falta de migración se debía a la ausencia de confinamiento. Por lo tanto, evaluamos la migración en un contexto de confinamiento en 2D (Le Berre y cols., 2012). Esta configuración permite un fino control del grado de confinamiento y adhesión, y ha sido utilizada exitosamente para el estudio de la migración de líneas celulares de

origen humano, murino y canino, así como de células tumorales (Liu y cols., 2015). Se evaluó el cultivo de hemocitos de *Drosophila* sometidos a distintos grados de confinamiento (altura de 4, 3, 2 y 1.5 μm), todos en condiciones de baja adhesión, parámetro que favorece la migración. Lamentablemente, ninguna de estas condiciones indujo la movilidad de los hemocitos, por lo que evaluamos si la adición de 20E favorecería su desplazamiento. En este último caso, se observó la polarización de los hemocitos.

Este resultado sugiere que la polarización y la migración celular pueden desacoplarse en estas células. Por lo tanto, nos planteamos la idea del uso del evento de polarización como herramienta para el estudio de redistribución subcelular de componentes asociados a este quiebre de simetría.

Desarrollamos un método que permite el estudio de distribución de componentes subcelulares en células polarizadas, uno de los aspectos claves del proceso migratorio (Edwards y cols., 2018). Dicho método consiste en el cultivo no confinado de hemocitos sobre una superficie de colágeno tipo IV, componente principal de la membrana basal en *Drosophila* (Dai y cols., 2017), que fue complementado con la hormona 20E a una concentración final de 15 $\mu\text{g/ml}$, pues a esta concentración se obtuvo un mayor porcentaje de hemocitos polarizados.

Dado que se demostró que Trpml es un importante regulador de la actividad de Miosina-II en hemocitos no polarizados, mediante el uso de este método, evaluamos la importancia del canal en la distribución de vesículas ácidas (donde Trpml se encuentra activo), de Sqh, así como de tubulina con el fin de evaluar si la red de microtúbulos también se ve afectada por la pérdida de función de trpml (Figura 17).

En hemocitos no polarizados, las vesículas ácidas (endosomas tardíos y lisosomas, marcados con LysoTracker Red) se encontraron dispersas por el cuerpo celular, mientras que, al polarizar, en células controles, estas vesículas se relocalizan hacia la región posterior de ellas (opuesta a la extensión de la lamela) (Figura 17A). Sin embargo, en hemocitos *trpml*¹, los lisosomas siguen dispersos sin un reordenamiento evidente (Figura 17B), sugiriendo un rol importante de Trpml en la regulación de la localización subcelular de los lisosomas asociado al quiebre de simetría, al igual que el movimiento centrípeto durante la maduración de fagosomas (Figura 9), y hemos mostrado que un fenómeno de redistribución similar ocurre en hemocitos migratorios *in vivo* (Figura 22A).

Los cambios en distribución de vesículas ácidas parecen correlacionarse con los cambios en la localización de Sqh, que también se dirigió hacia la región posterior de los hemocitos polarizados (Figura 17C). Dicha redistribución es también abolida en hemocitos deficientes de *trpml* (Figura 17D).

Dados los cambios de distribución en los lisosomas, y considerando que el transporte intracelular de estos organelos ocurre a lo largo de las fibras de microtúbulos (Cabukusta & Neefjes, 2018), quisimos evaluar si Trpml también juega un rol importante en la distribución de la red de microtúbulos. Los resultados muestran que, en hemocitos polarizados, tanto controles como *trpml*¹, la red de microtúbulos se distribuye hacia el frente de la célula, junto con la lamela (Figura 17E,F), por lo que el canal no estaría cumpliendo un rol importante en este proceso.

Nuestros resultados sugieren entonces, que Trpml podría estar activando localmente la contractilidad de Miosina-II, de manera que, los cambios en la localización de los lisosomas estarían regulando espacial y temporalmente, la actividad de Miosina-II.

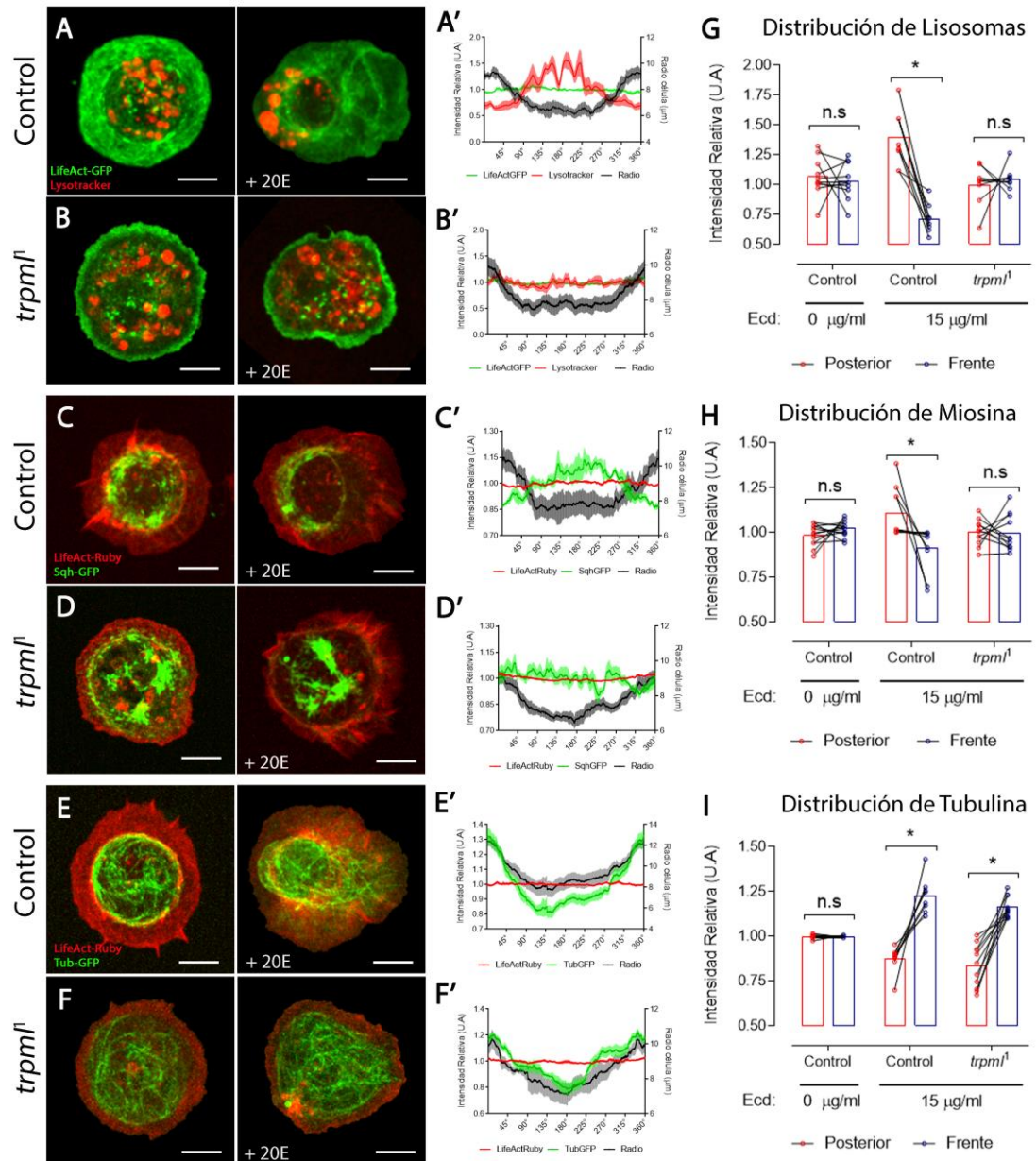


Figura 17. Trpml es importante para la redistribución de lisosomas y nucleación de actina en hemocitos polarizados

A-F) Imágenes representativas de hemocitos cultivados en medio Schneider (izquierda) o suplementado con 15 μg/ml de 20-hidroxiecdisona (derecha). Barra de tamaño: 5μm. **A'-F')** Cuantificación de distribución gráfica en 360° de Lisosomas, Miosina y Tubulina, donde 0° = 360° corresponde al centro de la lamela de un hemocito polarizado. **G-I)** Señal frontal comparada con posterior (90° cada una), revelando distribución asimétrica de Lisosomas, Miosina y Tubulina. La polarización de Lisosomas y Miosina es abolida en hemocitos *trpml¹*. * $p < 0,05$. ANOVA de doble vía ($N \geq 8$ hemocitos/condición).

6.3. Trpml modula diferencialmente los procesos de migración y fagocitosis.

Habiendo mostrado que Trpml cumple un rol importante en los procesos de fagocitosis y migración celular, así como también en la distribución y dinámica del citoesqueleto de actomiosina, quisimos evaluar si estos procesos se encuentran vinculados o no.

6.3.1. El rol de Trpml en migración celular es independiente de la fusión fagolisosomal

Hemos visto que la pérdida de función de *vamp7* disminuye la velocidad de migración, sin alterar la morfología ni extensiones de lamela en hemocitos *in vivo*. Asimismo, vimos que, en esta condición, la estructura y dinámica del citoesqueleto *ex vivo* son equivalentes a hemocitos controles. Lo anterior sugiere que, en esta condición, a diferencia de la pérdida de función de *trpml*, la disminuida velocidad de migración se debe a un mecanismo independiente de la regulación del citoesqueleto de actomiosina.

Sin embargo, quisimos evaluar si el rol de Trpml en la migración de hemocitos se relaciona con la capacidad degradativa de los lisosomas, por lo cual realizamos experimentos de epistasis genética entre *trpml* y *vamp7* (Figura 18A), y se observó que en condiciones de pérdida de función conjunta de ambos genes, la velocidad de migración de los hemocitos disminuyó de manera aditiva respecto de la velocidad de los hemocitos en condiciones de pérdida de función individual de *trpml* o *vamp7*, sugiriendo que en el contexto de migración celular, ambas proteínas cumplen un rol, al menos parcialmente, independiente.

El análisis epistático recién descrito se realizó en condiciones de silenciamiento mediado por RNAi. Por lo tanto, para incrementar el nivel de silenciamiento de ambos genes se realizó la coexpresión de *dicer2* con el RNAi contra *vamp7* y *trpml*.

Dicer es una enzima RNasa III, fundamental para el procesamiento de RNA en siRNA y miRNA, que inducen el silenciamiento de la expresión génica mediante el clivaje de mRNA o el bloqueo de su traducción (Lee y cols., 2004). Por lo tanto, al incrementar los niveles de *dicer2*, estamos acentuando el fenómeno de interferencia y potencialmente el silenciamiento génico.

Tanto para el silenciamiento de *trpml* como el de *vamp7*, la velocidad de migración no disminuyó significativamente respecto de la condición sin *dicer2*, sugiriendo que los niveles de ambos transcritos se encontraron en su máximo nivel de silenciamiento, o bien, que los niveles presentes no fueron suficientes para influir en la migración celular, y, por tanto, un mayor nivel de silenciamiento no presentaría un fenotipo más severo.

Para discriminar entre ambas posibilidades, se realizaron ensayos de PCR cuantitativo (Figura 18B), donde se obtuvo que la coexpresión de *dicer2* con los RNAi respectivos indujo una leve reducción en los niveles de transcrito de *trpml* y *vamp7*, pero estos cambios no fueron significativos. Sin embargo, podemos rescatar que, en la situación de silenciamiento conjunto de ambos genes, los niveles de transcrito fueron equivalentes al silenciamiento de cada gen de manera independiente.

Este resultado refuerza entonces, la observación de mayor reducción de velocidad en la condición de silenciamiento conjunta de *trpml* y *vamp7*, sugiriendo nuevamente

que Trpml estaría participando en la migración celular de manera independiente de su rol en fusión fagolisosomal, aunque no se puede descartar que también tenga un efecto en migración a través del proceso de degradación fagolisosomal.

Por su parte, si suponemos que mayores niveles de expresión del canal se correlacionan con mayores niveles de su actividad, se esperaría incrementar la probabilidad de liberación de Ca^{2+} desde los lisosomas, que promovería la fusión fagolisosomal, y, por tanto, si éste fuera el único mecanismo responsable de promover la migración de hemocitos, se esperaría un rescate parcial en la velocidad de las células (siempre y cuando los niveles de *vamp7* sean suficientes). Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de *trpml* en un contexto de pérdida de función de *vamp7* no rescata la velocidad de migración (Figura 18A), reforzando por tanto la idea de que ambas proteínas actúan en el proceso migratorio mediante mecanismos (al menos parcialmente) independientes, aunque no podemos descartar el hecho de que los niveles de *vamp7* no son suficientes para que el Ca^{2+} liberado a través del canal sean suficientes.

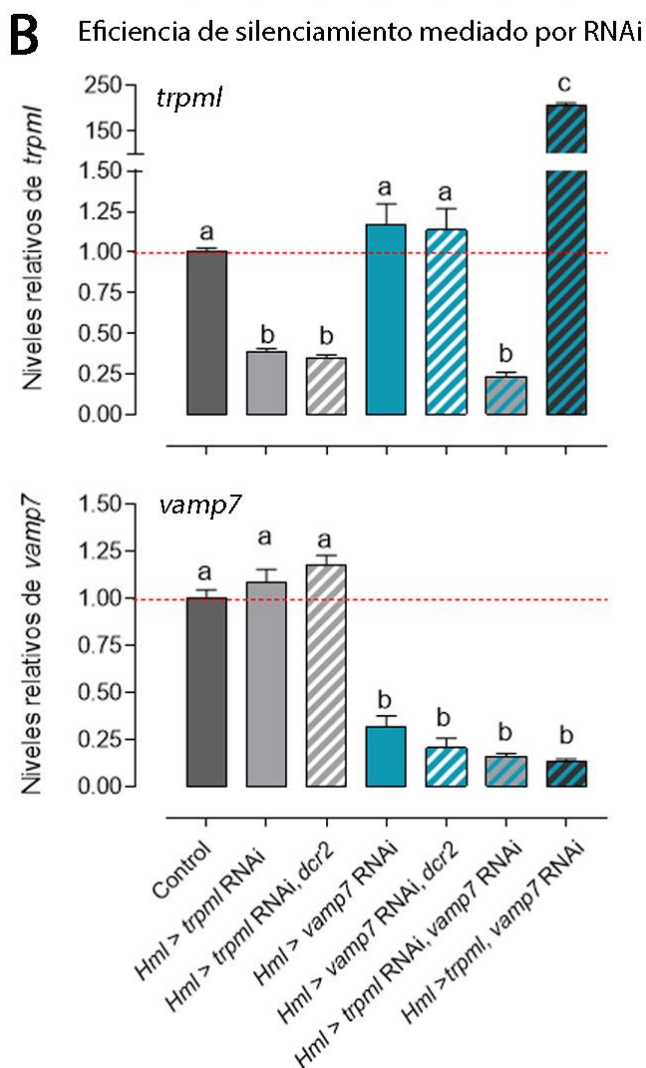
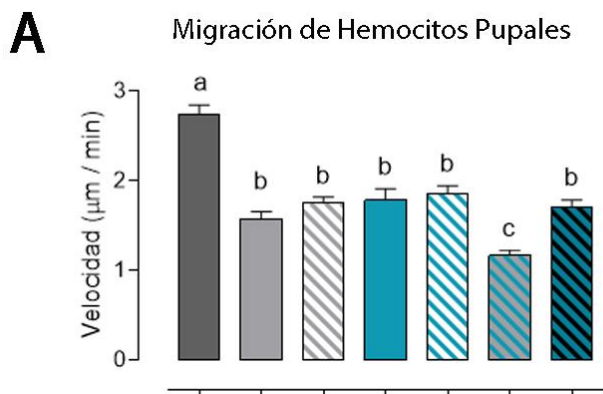


Figura 18. Trpml participa en el proceso de migración celular de manera independiente de Vamp7

A) Se realizaron ensayos de epistasis entre *trpml* y *vamp7*. Se cuantificó la velocidad de migración en hemocitos con doble pérdida de función de *trpml* y *vamp7*, obteniéndose una migración aún más lenta que la pérdida de función de los genes por separado, sugiriendo que ambas proteínas participan en el proceso de migración celular mediante mecanismos (al menos parcialmente) diferentes. La sobreexpresión de *trpml* no rescata la pérdida de función de *vamp7*, reforzando el resultado recién descrito. (N ≥ 3 animales/condición, n ≥ 20 hemocitos/animal). B) Niveles relativos de *trpml* y *vamp7* medido por qPCR revelando la eficiencia de silenciamiento mediado por RNAi. (N=3 experimentos independientes). En todos los casos, los valores graficados corresponden al Promedio ± E.E. ANOVA de 1 vía. Se muestran con la misma letra, todos los valores que son estadísticamente equivalentes entre sí.

6.3.2. Rescate de migración con la ganancia de función de Miosina-II

Dado que la actividad de Trpml sobre la dinámica del citoesqueleto es dependiente de la presencia de Miosina-II, se procedió a evaluar, mediante experimentos de epistasis genética, si la ganancia de función de Miosina-II era capaz de rescatar el fenotipo migratorio generado por la pérdida de función de Trpml.

La fosforilación reversible de la cadena liviana regulatoria de miosina (Sqh en *Drosophila*) es un mecanismo clave para la regulación de la actividad de Miosina-II, y, por consiguiente, de la contractibilidad del citoesqueleto de actomiosina (Vereshchagina y cols., 2004). En este contexto, la enzima trimérica MLCP (del inglés *myosin light chain phosphatase*), compuesta por PP1 β , Mypt75D y Mbs, es responsable de la defosforilación, y, por tanto, de la inactivación de Sqh, donde PP1 β es la proteína con actividad fosfatasa, por lo que la pérdida de función de PP1 β lleva a niveles elevados de Sqh fosforilado (Vereshchagina y cols., 2004).

Se ha reportado que la fosfatasa PP1 está involucrado en diversas funciones celulares, incluyendo metabolismo del glicógeno, contracción muscular y mitosis (Kirchner y cols., 2007; Vereshchagina y cols., 2004; Yang y cols., 2012). Por lo tanto, para generar una condición de ganancia de función de Miosina-II en hemocitos, se recurrió a la modulación de la actividad de una de las subunidades de la fosfatasa, Mypt75D, quien le confiere especificidad por el sustrato Sqh. Particularmente, se utilizó el dominante negativo de Mypt75D (Mypt75D^{F114A}), pues se ha mostrado en *Drosophila* que, al ser incapaz de unirse a PP1 β para activarlo, su expresión resulta en elevados niveles de Sqh fosforilado *in vivo* (Vereshchagina y cols., 2004).

Para determinar si la ganancia de función de Miosina-II rescata el fenotipo de *trpml* en el citoesqueleto de actomiosina, se procedió en primera instancia a evaluar la distribución subcelular de la red actina y Sqh en condiciones de expresión de *mypt75D^{F114A}* (Figura 19A), así como la co-expresión con el RNAi contra *trpml* (Figura 19B). Se obtuvo un rescate importante de la extensión de la lamela en la condición de ganancia de función de miosina en conjunto con la pérdida de función de *trpml* (desde un 13% de extensión radial hasta un 27%, donde el control alcanza un 30,1%) (Figura 19C).

Con el fin de comprobar que dicho rescate en la distribución subcelular de Miosina-II va de la mano con un rescate en su actividad, se realizaron registros de tipo *time-lapse* (intervalos de 1 minuto) y posterior generación de kimogramas para revelar la velocidad del flujo retrógrado del citoesqueleto de actomiosina. Los resultados sugieren nuevamente que la ganancia de función de miosina en un contexto de pérdida de función de *trpml*, es capaz de rescatar la contractilidad de miosina en hemocitos larvarios *ex vivo* (Figura 19D).

Dados los resultados obtenidos *ex vivo*, se procedió a evaluar si la ganancia de función de miosina puede rescatar el fenotipo migratorio de la pérdida de función de *trpml in vivo*. Al igual que los ensayos de migración previamente descritos, se realizaron registros de tipo *time-lapse* del *notum* de pupas expresando una proteína en el núcleo de los hemocitos, permitiendo su seguimiento manual para posterior cuantificación de parámetros migratorios.

Primero que todo, se evaluó el efecto de los niveles de actividad de miosina en la velocidad de migración de hemocitos, tanto su pérdida como su ganancia de función (Figura 19E).

Las condiciones de pérdida de función se generaron mediante 3 métodos diferentes: primero, el uso de un dominante negativo de la cadena pesada de miosina (GFP-Zip^{DN}) (Franke y cols., 2005) bajo el control del *driver* *HmlΔ*-Gal4 solo o en combinación con Tub::Gal80^{TS} (represor de Gal4, variante termosensible), seguido de un *shock* de calor 2 horas APF, lo que permitió la inducción en tiempo específico de GFP-Zip^{DN} y así descartar el efecto del incremento de tamaño celular (producto de una citoquinesis fallida por falta de actividad de miosina) (Murthy & Wadsworth, 2005) sobre la velocidad de migración. La tercera condición de pérdida de función de miosina se logró mediante la expresión de un RNAi contra la cadena liviana reguladora de miosina (*sqh*). En las 3 condiciones evaluadas se obtuvo una disminución en la velocidad de migración, siendo estadísticamente significativa solo en las últimas dos.

Para generar las condiciones de ganancia de función de miosina, se reprimió la desfosforilación de *Sqh* mediante el silenciamiento de una de las subunidades de la enzima trimérica MLCP, *Mbs* (del inglés *myosin binding subunit*), así como la expresión del dominante-negativo de otra de las subunidades, *Mypt75D* (mutante F114A). En ambas condiciones se observó una disminución significativa en la velocidad de migración de hemocitos (Figura 19E).

Finalmente, se evaluó si la ganancia de función de la actividad de Miosina-II es epistática sobre el fenotipo de pérdida de función de *Trpml*. Sorprendentemente, se

observó que la co-expresión del RNAi contra *trpml* con *mypt75D^{F114A}* rescató el fenotipo migratorio de la pérdida de función de *trpml*, alcanzando niveles de velocidad equivalentes al control (Figura 19F). Aún más, al co-expresar *mypt75D^{F114A}* con el RNAi contra *vamp7*, la velocidad de migración fue equivalente a la pérdida de función de *vamp7* por si sola (Figura 19F), reforzando la idea de que Vamp7 regula la migración de hemocitos mediante un mecanismo independiente de la regulación de Miosina-II.

Este resultado sugiere que la actividad de Trpml regula dinámicamente la actividad de Miosina-II, favoreciendo así la migración celular. Es posible especular que, en condiciones de pérdida de función de Trpml, donde los niveles de actividad de miosina se encuentran disminuidos, al favorecer la acumulación de la forma activa de la molécula, existe una compensación de dosis que permite que los niveles de Miosina-II activos alcancen un óptimo, con lo cual, la célula logra migrar de manera eficiente.

Para evaluar si la activación de miosina es capaz de rescatar los fenotipos observados en hemocitos polarizados, evaluamos la redistribución de vesículas ácidas y cadena liviana de miosina en estas condiciones. Observamos que la expresión de *mypt75D^{F114A}* no rescata la polarización de vesículas ácidas en hemocitos *trpml¹*, sugiriendo por tanto que este evento sería regulado de manera independiente de la actividad de miosina (Figura 20A). Asimismo, observamos que la redistribución de Sqh fue rescatada parcialmente (Figura 20C) pese a que los lisosomas se encuentren dispersos por el cuerpo celular de los hemocitos polarizados.

Dichos resultados sugieren que favorecer la acumulación de formas activadas de Sqh promovería la contractilidad de la región posterior de hemocitos polarizados, y es posible especular entonces, que un fenómeno similar ocurre *in vivo*, siendo ésta una posibilidad para explicar la causa del rescate en la velocidad de migración.

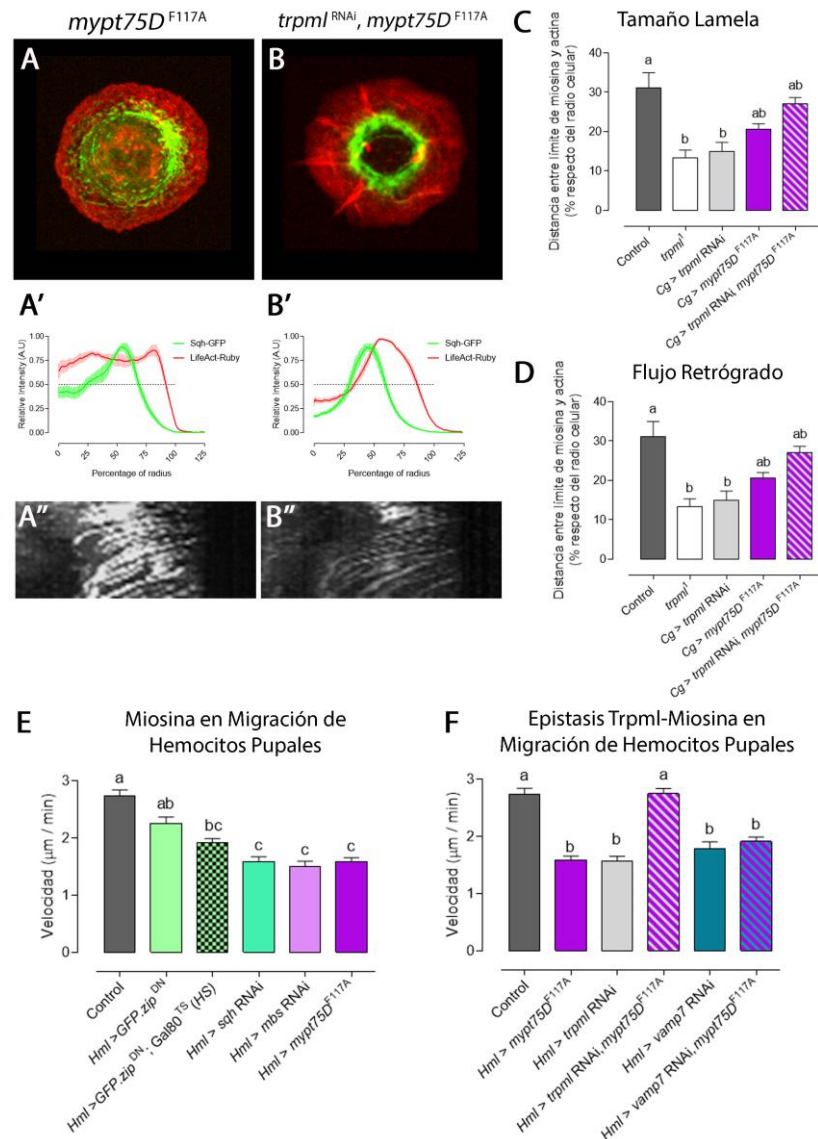


Figura 19. La ganancia de función de Miosina-II es epistática sobre el fenotipo de *trpml* en el citoesqueleto y la migración de hemocitos

A-B) Imágenes representativas de hemocitos expresando LifeAct-Ruby y Sqh-GFP y *mypt75D*^{F117A} (A) o *trpml*^{RNAi} con *mypt75D*^{F117A} (B). **A'-B')** Distribución gráfica de actina y Sqh respect del radio. **A''-B'')** Kimogramas evidenciando el flujo retrógrado de Sqh en el tiempo (30 tiempos, 1 imagen/minuto). **C)** Cuantificación del tamaño de la lamela (N ≥ 8 células/condición, 10 tiempos, 360°/célula). **D)** Cuantificación de la velocidad de flujo retrógrado de Sqh (N ≥ 8 células/condición). **E)** Migración de hemocitos mostrando que tanto la ganancia como pérdida de función de miosina disminuyen la velocidad de manera significativa (N ≥ 3 animales/condición, n < 20 hemocitos/animal). **F)** Migración de hemocitos mostrando que *mypt75D*^{F117A} rescata la pérdida de función de *trpml*, pero no la de *vamp7* (N ≥ 3 animales/condición, n < 20 hemocitos/animal). En todos los casos, los valores graficados corresponden al Promedio ± E.E. ANOVA de 1 vía. Los valores estadísticamente equivalentes entre sí están representados con la misma letra.

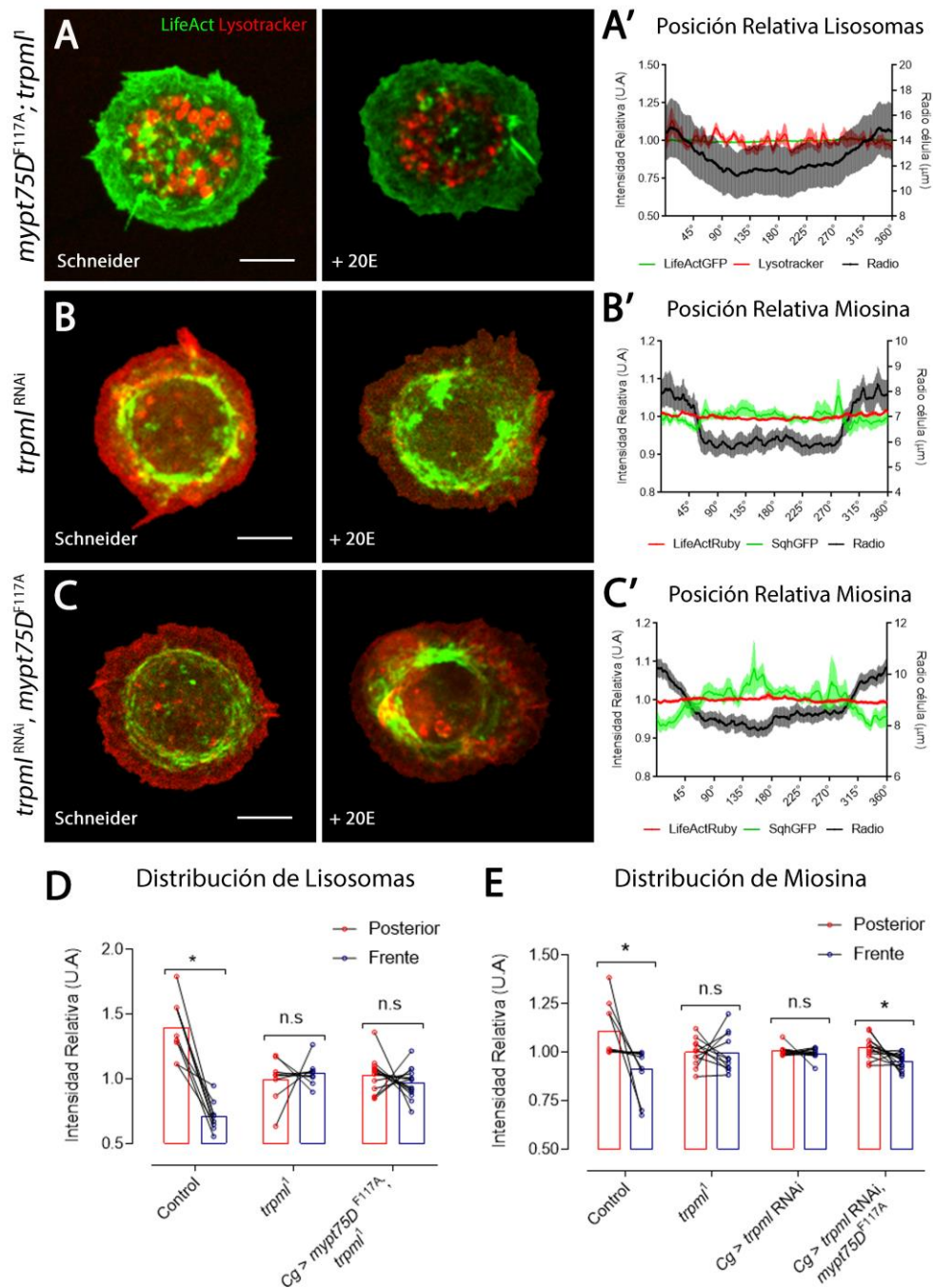


Figura 20. La ganancia de función de miosina no rescata la polarización de lisosomas en hemocitos

A-C) Imágenes representativas de hemocitos cultivados en medio Schneider (izquierda) o complementado con 15µg/ml de 20E para inducir polarización (derecha), en las condiciones: *Mypt75D^{F114A}* en el fondo *trpm1¹* (**A**), *trpm1 RNAi* (**B**) y *trpm1 RNAi* junto con *mypt75D^{F114A}* (**C**). Barra de tamaño: 5µm. **A'-C')** Distribución gráfica en 360° de lisosomas (**A'**) y Sqh (**B'-C'**). **D-E)** Comparación de la abundancia de lisosomas (**D**) y miosina (**E**) entre la región posterior y frontal de hemocitos polarizados. * $p < 0,05$. ANOVA de doble vía ($N \geq 8$ hemocitos/condición). En todos los casos, los valores graficados corresponden al Promedio \pm E.E.

6.3.3. El rol de Trpml en fagocitosis es independiente de la actividad de Miosina-II

Los resultados mostrados a lo largo de este documento sugieren fuertemente que Trpml cumple una función dual, al promover positivamente tanto el proceso de fagocitosis como el de migración celular, y que esto lo estaría haciendo mediante mecanismos al menos parcialmente diferentes. En un contexto de fagocitosis, Trpml facilitaría la fusión fagolisosomal, mientras que, en un contexto de migración celular, induciría la activación localizada de Miosina-II dentro de la célula. Sin embargo, no podemos descartar que el rol de Trpml en procesamiento fagocítico pueda también incidir en el proceso migratorio.

Con el fin de determinar si el rol de Trpml en procesamiento fagocítico es independiente de la regulación de Miosina-II, se evaluó la capacidad del dominante-negativo de Mypt75D de rescatar el fenotipo fagocítico de *trpml*¹ (Figura 21). Se demostró que, en este proceso, la expresión de esta proteína, y por tanto la ganancia de función de miosina, no revierte el fenotipo de *trpml*¹, lo que sugiere que el mecanismo mediante el cual Trpml participa en el procesamiento fagocítico es independiente del que utiliza en procesos migratorios.

Asimismo, se observó que la pérdida de función de *sqh* no genera un fenotipo de disminuida fusión fagolisosomal como *trpml*¹, puesto que pese a haber una leve disminución en la proporción de hemocitos capaces de degradar bacterias (81,6%) respecto de animales controles (95,6%), este valor dista bastante de la proporción de hemocitos *trpml*¹ (1,4%). Asimismo, la ganancia de función de actividad contráctil de miosina (*mypt75D*^{F114A}) tampoco presenta dificultades de procesamiento fagocítico (91,1%).

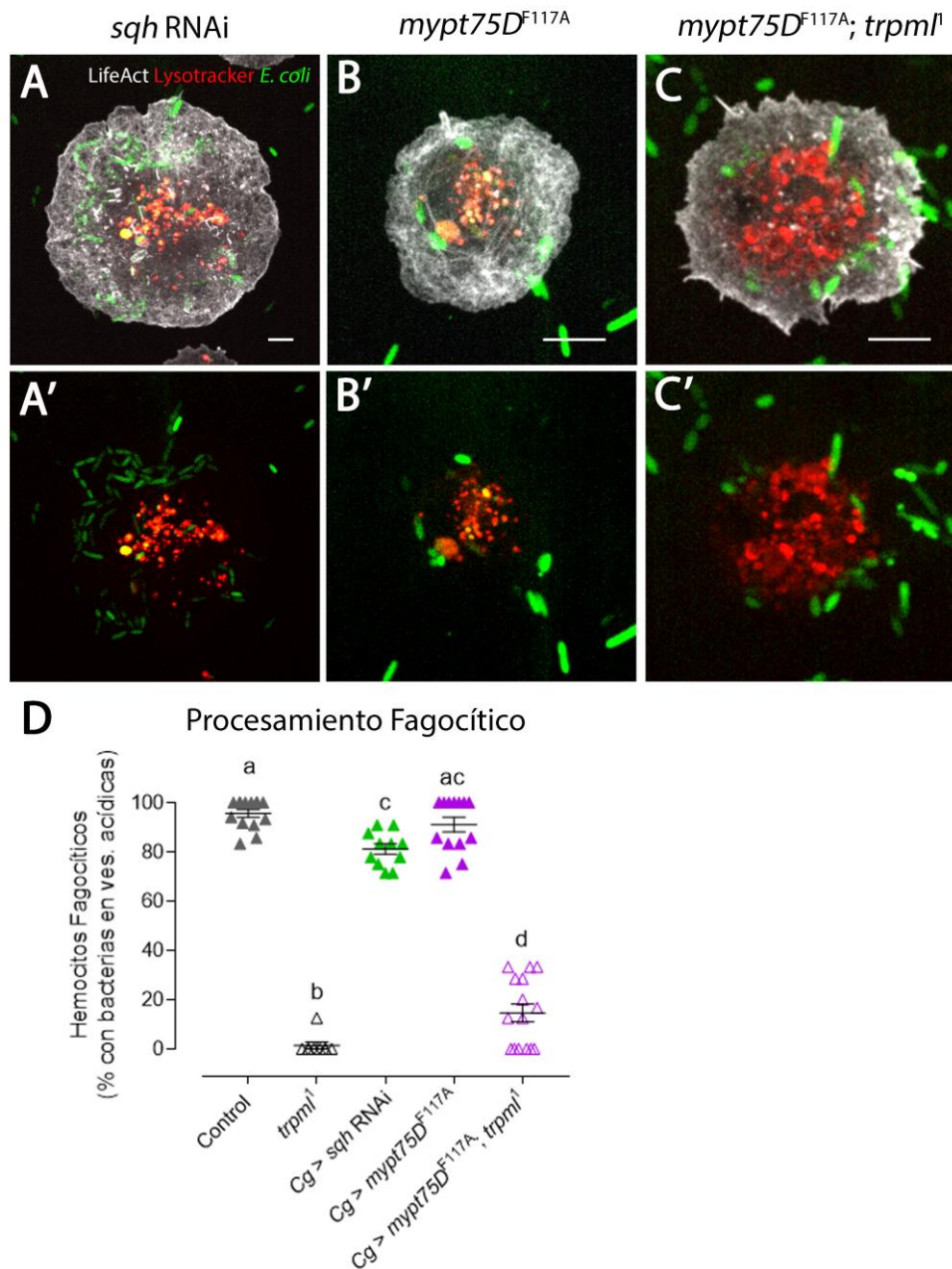


Figura 21. El rol de Trpml en procesamiento fagocítico es independiente de la actividad de Miosina-II

A-C) Imágenes representativas de hemocitos expresando LifeAct-GFP, cultivados con bacterias fluorescentes y LysoTracker Red durante 1 hora, en las condiciones de pérdida de función de miosina (*sqh*^{RNAi}, **A**), ganancia de función de miosina (*mypt75D^{F117A}*, **B**) y ésta última en el fondo *trpml¹* (**C**). Barra de tamaño: 5µm. **D)** Procesamiento fagocítico cuantificado como el porcentaje de hemocitos conteniendo bacterias dentro de sus vesículas acidicas. Los valores graficados corresponden al Promedio ± E.E. ANOVA de 1 vía (N ≥ 60 células/condición). Los valores estadísticamente equivalentes entre sí están representados con la misma letra..

6.3.4. Trpml presenta actividad diferencialmente localizada durante los procesos de migración y fagocitosis

Resumiendo, los resultados mostrados en el presente trabajo permiten generar un modelo para la actividad de Trpml (Figura 22) donde, en un contexto de fagocitosis, el canal es responsable de la liberación local de Ca^{2+} , que facilita la fusión de vesículas dependiente de la previa formación del complejo *trans*-SNARE (siendo Vamp7 el componente v-SNARE, presente en la membrana del lisosoma).

Por otra parte, en un contexto de migración celular, el canal sería responsable de aportar el Ca^{2+} necesario, probablemente para la activación de MLCK (del inglés *myosin light chain kinase*), quinasa responsable de la fosforilación de la cadena liviana de Miosina-II (Sqh). Cuando Squ está fosforilado, se encuentra en su conformación activa, y, por lo tanto, puede ser incorporado durante la polimerización de filamentos de actomiosina.

Pensamos que la actividad de MLCK es responsable de fosforilar a Squ, pues su activación es dependiente de Ca^{2+} -Calmodulina, mientras que la otra quinasa que también fosforila a Squ, ROCK, es activada por RhoA (Somlyo & Somlyo, 2003). Además, debemos considerar que Miosina-II se encuentra segregada espacialmente en células migratorias, pues en la periferia controla la dinámica de las protrusiones, donde es activada por MLCK, mientras que en la región central de la célula modula la maduración de las adhesiones focales y es regulada por ROCK (Totsukawa y cols., 2004). Y dado que los fenotipos en el citoesqueleto asociados a la deficiencia en *trpml*, creemos que MLCK es el candidato es el más probable de ser responsable de los defectos en migración y estructura del citoesqueleto de los hemocitos.

Para reforzar la idea de este modelo, usamos el reportero de actividad del canal (Trpml-GCaMP5) para evidenciar la actividad del canal *in vivo*. Lamentablemente, al expresar el reportero con un *driver* exclusivo de hemocitos, no se logra distinguir la señal del reportero por sobre el ruido que genera la autofluorescencia de los tejidos del animal. Por lo tanto, recurrimos a la generación de clones tipo *FLP-out* (Perrimon, 1998), que permite la generación de clones de manera estocástica, donde cada célula marcada, expresa los componentes de interés bajo el control del *driver* del gen de *tubulina*, de manera que incrementamos el nivel de expresión, tanto del reportero como del marcaje del citoesqueleto de actina con LifeActRuby.

Pudimos observar dos tipos de patrones de actividad del canal, dependiendo del comportamiento del hemocito. Observamos un hemocito migrando de forma persistente en una misma dirección, donde el canal presentó actividad en la región posterior de la célula, representado como pequeñas vesículas con señal débil pero persistente (Figura 23A). También observamos alzas esporádicas y transientes de actividad del canal en hemocitos que no migraron durante el curso del *time-lapse* (Figura 23B), la señal en este caso provenía de estructuras que protruyeron a partir del cuerpo celular, por lo que podrían corresponder a eventos fagocíticos y de fusión fagolisosomal.

Los resultados sugieren que efectivamente, la actividad del canal participa en los procesos de migración celular y degradación fagolisosomal *in vivo*, siendo su actividad regulada finamente en términos espaciales y temporales.

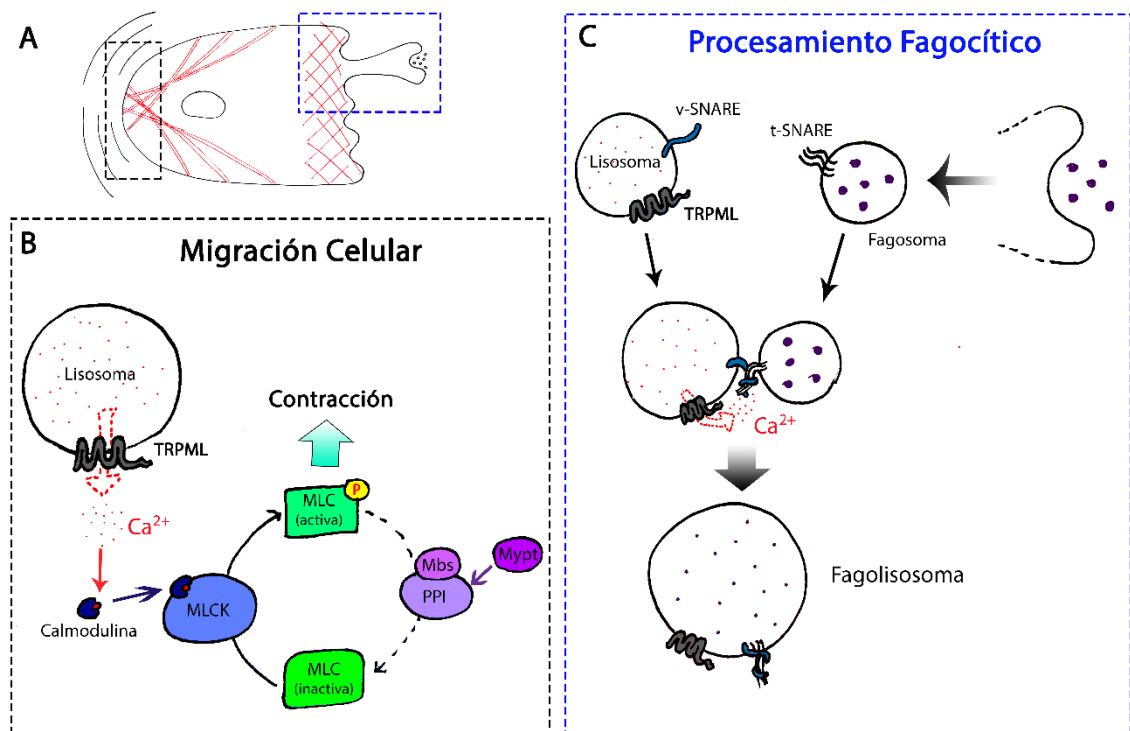


Figura 22. Modelo de mecanismo de actividad dual de Trpml en los procesos de migración celular y fagocitosis

A) Diagrama de un hemocito que migra o fagocita una partícula externa. B) Cuando el hemocito está migrando, los lisosomas se desplazan hacia la región posterior de la célula, liberando iones de Ca^{2+} localmente, que usan a Calmodulina y activa la quinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK), que a su vez fosforila y activa a Sqh (MLC). El balance en sentido opuesto es efectuado por la fosfatasa MLCP, complejo trimérico que comprende $\text{PPI}\beta$, Mbs y Mypt75D. C) Luego de la formación del fagosoma, éste se fusiona con el lisosoma de manera calcio-dependiente (posterior a la formación del complejo *trans*-SNARE). Se genera el fagolisosoma, donde el material fagocitado es degradado por la acción de proteasas lisosomales.

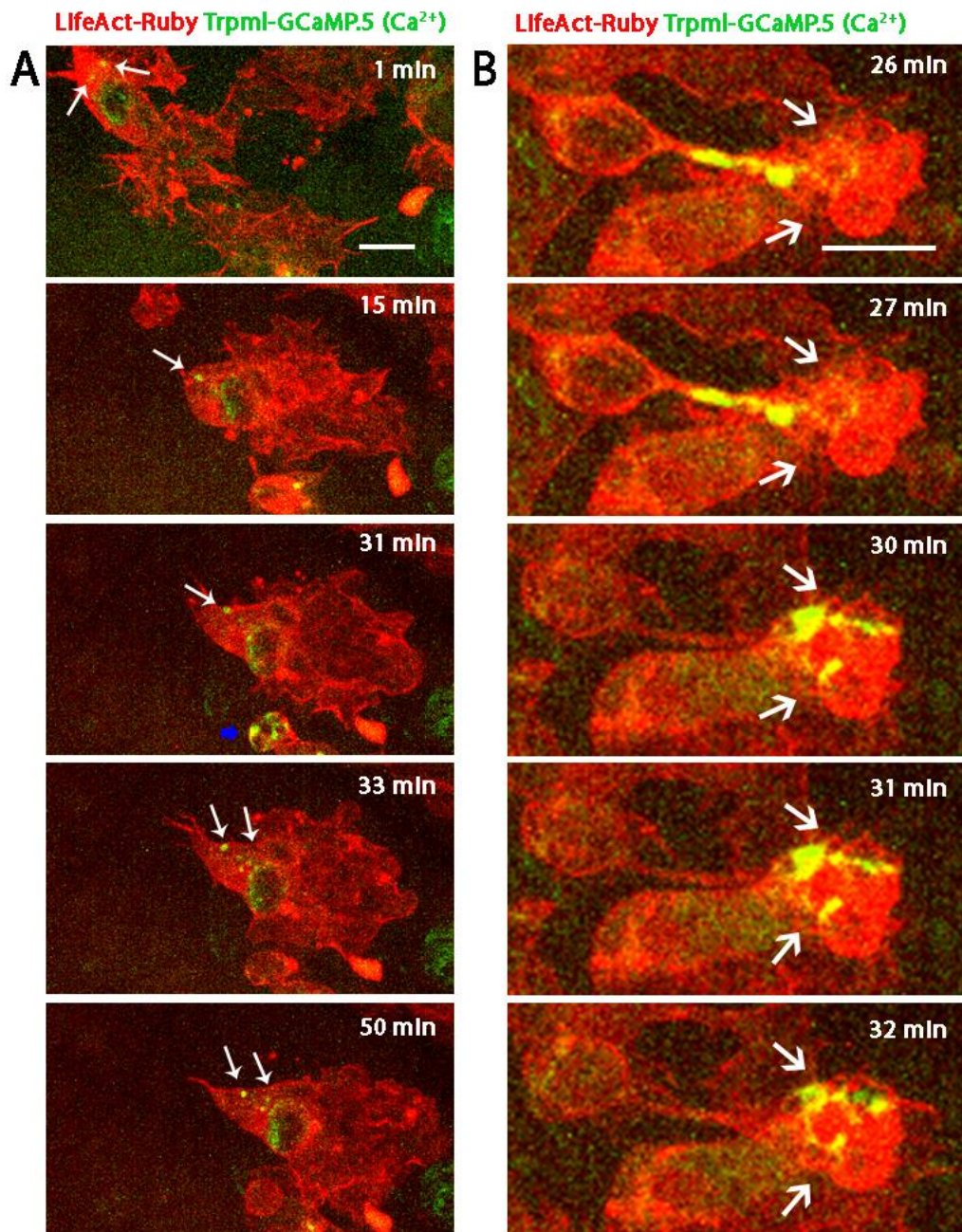


Figura 23. Actividad de Trpml en hemocitos pupales *in vivo*

Imágenes representativas de un registro de tipo *time-lapse* de hemocitos en pupas de 20h APF que expresan LifeAct-Ruby y el reportero de actividad de Trpml para evidenciar su actividad *in vivo*. **A)** Se observa en el hemocito que migra hacia la derecha, conteniendo vesículas con señal positiva en la región posterior (flechas blancas) que perduran en el tiempo, sugiriendo actividad del canal desde los lisosomas en la región posterior de la célula. Asimismo, en una célula vecina, se observan alzas espontáneas de actividad (flecha azul), luego de la ocurrencia de un evento fagocítico. **B)** Hemocito que genera una protrusión (flechas blancas), donde se observan alzas transientes en la actividad de Trpml (observar escala temporal), que posiblemente corresponda a un evento fagocítico. Barra de tamaño: 10 μm . El video original se encuentra en la sección de material suplementario

7. DISCUSIÓN

En la primera parte de esta tesis, se estableció que Trpml cumple un rol importante en hemocitos de *Drosophila*, tanto durante el proceso de fagocitosis y procesamiento fagocítico, como en migración celular y respuesta inmune durante distintas etapas de desarrollo.

En segunda instancia pudimos determinar que Trpml presenta un rol importante en la dinámica y distribución del citoesqueleto de actina y miosina en hemocitos, y que dicho efecto sería independiente de su rol en la fusión fagolisosomal.

Generamos un protocolo donde pudimos observar distribución espacial de componentes subcelulares en hemocitos polarizados (ANEXO 1), y nuestros resultados sugieren que Trpml es importante para la distribución de lisosomas y miosina, no así de la red de microtúbulos.

Por último, pudimos establecer que la actividad de Trpml estaría modulando directamente la actividad de la cadena liviana regulatoria de Miosina-II (Sqh), y propusimos un modelo en que, el calcio liberado a través del canal uniría calmodulina, permitiendo de manera local, la activación de la quinasa de Sqh, y promover así la contractilidad de miosina de manera específica en términos espaciales y temporales.

7.1. Trpml regula la fagocitosis y procesamiento fagocítico en hemocitos de *Drosophila melanogaster*

Se ha mostrado que el proceso de macropinocitosis promueve la señalización del complejo 1 de Tor (TORC1) vía la internalización de macromoléculas y aminoácidos del medio extracelular (Commisso y cols., 2013), por lo que dada la baja

internalización de partículas en hemocitos *trpml*¹, podemos especular que la vía de TORC1 se encuentra disminuida, similar a lo descrito en otros tipos celulares como el cuerpo graso (Wong y cols., 2012). Es más, se ha mostrado en mamíferos que la actividad de TORC1 es dependiente de iones Ca^{2+} provenientes desde los lisosomas (R. J. Li y cols., 2016), revelando la importancia que *Trpml* tiene en la activación del complejo.

Nosotros evaluamos la velocidad de migración y dinámica del citoesqueleto en condiciones de pérdida de actividad del homólogo de TOR en *Drosophila*, dTOR, tanto genética como farmacológica, y observamos que ambos parámetros están disminuidos en estas condiciones (ANEXO 2). Sin embargo, no logramos observar la iniciación de eventos de autofagia en hemocitos, que se ha asociado fuertemente a la ausencia de nutrientes y consecuente disminución de la actividad de TORC1.

Se ha mostrado en células dendríticas que luego de su activación, cesan los eventos de macropinocitosis, y consecuentemente baja la actividad de TORC1, gatillando cambios en la estructura y distribución del citoesqueleto, que llevan finalmente a un aumento en su velocidad de migración (Bretou y cols., 2017). En nuestro caso, nosotros observamos el efecto opuesto. Sin embargo, no podemos descartar que los fenotipos que observamos correspondan a la pérdida de la función del complejo TORC2, que ha sido importantemente vinculado con la regulación del citoesqueleto (Jacinto y cols., 2004).

Además de una disminuida iniciación de eventos de fagocitosis, observamos que la tasa de procesamiento fagocítico también disminuye en condiciones de pérdida de

función de *trpml*, sugiriendo menor fusión entre lisosomas y fagosomas, y, por tanto, una ineficiente degradación fagolisosomal.

El hecho de que tanto la fagocitosis, como el procesamiento fagocítico se encuentren reducidos en *trpml*¹ se puede explicar mediante una fusión vesicular deficiente en ambos casos, o bien, que ambos eventos se encuentren vinculados, pues se ha mostrado recientemente que la eficiencia de iniciación de nuevos eventos de fagocitosis es dependiente de la degradación lisosomal de los patógenos previamente fagocitados (Wong y cols., 2017).

Por su parte, se obtuvo que la pérdida de función de *vamp7* también disminuyó significativamente la capacidad degradativa de lisosomas de hemocitos cultivados con bacterias, al igual que previamente demostrado en células de mamíferos (Braun y cols., 2004). Vamp7 es el componente vesicular del complejo trans-SNARE, clave para la fusión de lisosomas con membranas blanco, que, en este caso, serían las membranas de los fagosomas. Cabe destacar que se ha mostrado que Vamp7 participa en la fusión vesicular en vías en que Trpml también ha sido implicado. Ejemplo de ello es la degradación del morfógeno Wingless en discos imaginales de ala, cuyos niveles se vieron aumentados en condiciones de pérdida de función de *vamp7* (Gao y cols., 2017), al igual que mostrado previamente en tejidos *trpml*¹ (Wong y cols., 2012).

Se ha descrito que la acumulación progresiva de material no digerido lleva a la disfunción lisosomal, junto con un incremento de tamaño del organelo (Xu & Ren, 2015), lo cual podría explicar por qué se observó en hemocitos deficientes de *trpml*, que las vesículas acídicas son evidentemente más grandes. Este fenotipo también se

ha observado en otros tipos celulares (Bretou y cols., 2017; Venkatachalam y cols., 2008; Wong y cols., 2012), por lo que no sería algo exclusivo de células fagocíticas como los macrófagos.

Respecto de la relación entre el tamaño de los lisosomas y la eficiencia de migración celular, existe evidencia contradictoria, pues se ha mostrado en células dendríticas migrando *in vitro*, que no existe una correlación entre el tamaño del lisosoma y la velocidad de migración (Bretou y cols., 2017), mientras que en células de cáncer mamario, los lisosomas de mayor tamaño se correlacionaron con menor pH y tumores altamente metastáticos (Glunde y cols., 2003), y por consiguiente, sus células migran de manera más eficiente.

A su vez, observamos que la expresión en hemocitos del gen *trpml* de *Drosophila* rescata completamente la capacidad de procesamiento fagocítico de hemocitos provenientes de animales *trpml*¹, mientras que la expresión del ortólogo humano *MCOLN1*, tan solo rescata de manera parcial. Esto probablemente se deba a las diferencias existentes en la fisiología lisosomal entre especies, pues el pH promedio de estos organelos en *Drosophila* es de 5,1, mientras que en humanos es de 4,5 (Venkatachalam y cols., 2015), valores que se correlacionan con las condiciones óptimas para la activación del canal, que es a pH 5,2 para Trpml de *Drosophila*, y de 4,6 para TRPML1 humano (Feng y cols., 2014).

Demostramos en este trabajo que Trpml es requerido para el movimiento centrípeto de los lisosomas durante el proceso de maduración de fagosomas, lo cual se condice con la literatura que indica que el movimiento centrípeto de estos organelos es un proceso dependiente de Ca²⁺ (Pu y cols., 2016). Aún más, se ha descrito que el

movimiento retrógrado de lisosomas durante la maduración de autofagosomas es dependiente de los iones de calcio liberados a través del canal TRPML1 (Li y cols., 2016). En este reporte mostramos que, en un contexto de maduración de fagosomas, el movimiento centrípeto es también dependiente de la actividad de Trpml en este tipo celular.

El posicionamiento de los lisosomas tiene directa relación con el pH luminal (Johnson y cols., 2016). Por lo tanto, es posible especular que la pérdida de función de *trpml* podría incrementar el pH lisosomal, dando cuenta de su capacidad degradativa deficiente, y reforzar la observación de la actividad parcial del ortólogo humano *MCOLN1* en un fondo genético *trpml*¹ en *Drosophila*. Sin embargo, no existe evidencia en la literatura indicando que el flujo de calcio impacte en el pH lisosomal. Es más, se demostró en neutrófilos provenientes de un paciente con Mucopolisidosis tipo IV (*MCOLN1*^{-/-}), que el pH lisosomal no se ve afectado respecto de neutrófilos de pacientes controles (Foote y cols., 2017). Existe evidencia en cambio, del efecto opuesto, donde el gradiente de protones puede directamente afectar la concentración de calcio en el lumen del lisosoma (Christensen y cols., 2002).

7.2. Trpml modula la eficiencia de migración de hemocitos durante distintos estadios de desarrollo

Se mostró en este trabajo que Trpml es importante en la eficiencia de migración de hemocitos embrionarios y pupales.

Interesantemente, se observó una acumulación de hemocitos embrionarios deficientes de *trpml* en la región anterior de los animales, sugiriendo que pueden

presentar dificultades para la extravasación de tejidos, proceso que en embriones de *Drosophila* ocurre exclusivamente durante la infiltración de la banda germinal (Siekhaus y cols., 2010), y recientemente se demostró que los hemocitos pupales también realizan este proceso a través de las venas de las alas en respuesta a señales de daño en sitios aledaños a las venas (Thuma y cols., 2018).

Dado que la extravasación de tejidos es un proceso clave en la respuesta inmune de mamíferos, una proyección interesante del trabajo sería ahondar en el rol de Trpml en la extravasación de tejidos, pues es posible especular que este proceso es en parte causal del retraso observado en la dispersión de los hemocitos embrionarios.

Se ha mostrado que la extravasación de vasos sanguíneos es dependiente de la actividad de Miosina-II en linfocitos T activados (Jacobelli y cols., 2013), neutrófilos (Stroka y cols., 2013) y leucocitos en general (Schnoor & Schnoor, 2015), por lo que dados nuestros resultados, podemos especular que Trpml también estaría regulando la actividad de Miosina-II en hemocitos embrionarios, afectando no solo la translocación del cuerpo celular durante la migración, sino que también durante la extravasación de la banda germinal extendida.

Por su parte, debemos considerar que Trpml es un canal catiónico permeable a Ca^{2+} , pero también a Fe^{2+} , Mg^{2+} , entre otros (Bouron y cols., 2015). En este contexto, es sabido que los iones de calcio cumplen un rol importante en el desarrollo embrionario de *Drosophila* (Markova y cols., 2015), así como en vertebrados (Slusarski & Pelegri, 2007). Asimismo, se ha mostrado que el hierro (González-Morales y cols., 2015) y el magnesio (Komiya y cols., 2014), también son relevantes durante las etapas tempranas de desarrollo.

Nosotros observamos una importante contribución de transcritos maternos de *trpml* (ANEXO 3), por lo que es muy probable que el canal cumpla un rol importante durante las etapas tempranas de desarrollo, mediante la liberación controlada de iones Ca^{2+} , Fe^{2+} o Mg^{2+} , ya sea en los mismos hemocitos o en células de otros tejidos embrionarios.

En pupas se observó también que el silenciamiento de *trpml* disminuye significativamente la velocidad de migración de hemocitos. Asimismo, se cuantificó la velocidad de migración de hemocitos con pérdida de función de otros genes implicados en la fisiología lisosomal, donde también se observó una disminución significativa de su velocidad.

El pH ácido de los lisosomas es dependiente de la actividad de la V-ATPasa, que está compuesta, entre otras subunidades, por Vha68-1 (Dow, 1999). Por lo tanto, podemos asumir que en la deficiencia de *vha68-1*, los lisosomas son más alcalinos que el promedio (pH = 5,1) en condiciones normales (Venkatachalam y cols., 2015), lo que permite especular que en esta condición, el canal Trpml es menos activo, pues su óptimo de actividad ocurre a pH luminal de 5,2 (Feng y cols., 2014), y podría ser esta una de las razones por las que la migración de hemocitos es menos eficiente.

En la pérdida de función de *vamp7*, donde la fusión de lisosomas con membranas blanco es deficiente, también observamos una disminuida velocidad de migración. Esto podría significar que la capacidad de degradación de material fagocitado y reciclaje del lisosoma es importante para la migración de hemocitos, o bien, que el hecho de que la maquinaria del flujo de endomembranas se debe encontrar en homeostasis para que la célula pueda migrar eficientemente.

Existe evidencia mostrando que la incapacidad de degradar células apoptóticas altera las capacidades migratorias de hemocitos (Evans y cols., 2013), así como que la regulación del tráfico y fusión de vesículas es crucial para la quimiotaxis de células del sistema inmune (Colvin y cols., 2010), por lo que es posible que ocurra una combinación entre ambas alternativas.

El proceso de migración celular involucra la coordinación de múltiples eventos celulares, que incluye, entre otros, la ocurrencia de una importante redistribución de integrinas desde la región posterior de la célula hacia las adhesiones focales nuevas en el frente de migración, eventos regulados finamente en el tiempo y espacio (Chan y cols., 2011), y se ha visto que esto puede ocurrir mediante macropinocitosis (Gu y cols., 2011). Es más, se ha mostrado que la acumulación de N-Cadherina actúa regulando la temporalidad de formación y maduración de macropinosomas (conversión de Rab5 a Rab7) y consecuentemente, la migración celular colectiva (Wen y cols., 2016).

Los endosomas tardíos y lisosomas juegan un papel importante en la dinámica de adhesiones entre la célula y la matriz extracelular (Schiefermeier y cols., 2014), y consecuentemente en la eficiencia de migración. Asimismo, la proteína lisosomal Lamp1 (del inglés *Lysosomal-associated membrane protein 1*), cuya pérdida de función genera fenotipos del tipo LSD (Eskelinen, 2006), ha sido implicada importantemente en la migración e invasión de células de carcinoma renal (Yao y cols., 2018).

Interesantemente, las integrinas y otros receptores que son destinados a los lisosomas tardíos y lisosomas, son solo degradados en ciertas circunstancias, mientras que en

otras pueden ser recicladas de vuelta a la membrana plasmática para promover migración e invasión celular (Rainero & Norman, 2013).

En ausencia de *trpml* también existe una perturbación del flujo de endomembranas, así como la fusión fagolisosomal ineficiente. De hecho, en líneas celulares de macrófagos de ratón se mostró que la pérdida de *TRPML1* genera la acumulación de moléculas endocitadas y transporte ineficiente de lípidos y moléculas de señalización como el complejo mayor de histocompatibilidad II hacia la membrana (Thompson y cols., 2007).

Trpml es permeable a iones Ca^{2+} , mensajero secundario esencial involucrado en múltiples procesos celulares y subcelulares, incluyendo señalización, tráfico intracelular, contracción de Miosina-II, reorganización del citoesqueleto y migración celular (Minton, 2014; Sáez y cols., 2018; Tsai y cols., 2015; Wei y cols., 2012). En este trabajo mostramos la regulación de dos procesos diferentes, mediante la provisión localizada de este mensajero secundario desde los lisosomas, el cual permitiría la fusión con fagosomas en ciertas condiciones, o bien, activaría quinasas de Sqh en regiones específicas de hemocitos polarizados y migratorios.

Los lisosomas son una importante fuente de Ca^{2+} intracelular, lo cual se debe, en gran parte, a la actividad del intercambiador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (CAX), que exporta protones a la vez que importa iones Ca^{2+} hacia el lumen de los lisosomas. Interesantemente, se ha descrito que CAX es requerido para la migración de células de la cresta neural *in vivo* (Melchionda y cols., 2016), revelando la importancia del calcio lisosomal en la migración de células de diversa naturaleza y origen.

La permeabilidad a iones Ca^{2+} del canal Trpml se encuentra finamente regulada, por lo que sólo ocurre en determinadas condiciones, entre las cuales está la dependencia del gradiente electroquímico y la abundancia del fosfoinosítido de membrana PI(3,5)P2, cuya síntesis es catalizada por la enzima PIKfyve (Dong y cols., 2011; Feng y cols., 2014a), así como también el requerimiento de glicosilaciones específicas en el loop intraluminal (Miedel y cols., 2006). Estos diversos mecanismos de regulación de la actividad de Trpml podrían ser responsables de la ausencia de fenotipo luego de su sobreexpresión en hemocitos, tanto en migración como en la defensa inmune ante infección bacteriana. Por lo tanto, podemos desprender de estos resultados que mayores niveles de expresión del canal, no se asocian a mayores niveles de actividad. Empero, el uso del agonista MLSA1 sí genera un fenotipo en el citoesqueleto, pues induce la apertura inmediata de los canales, promoviendo la liberación de iones Ca^{2+} desde las vesículas que contienen el canal en su membrana, independiente de su gradiente electroquímico, pero que, en *Drosophila*, requiere del fosfoinosítido PI(3,5)P2 en la vecindad del canal (Feng y cols., 2014b).

Tanto Trpml como Vamp7 participan en el proceso de fusión fagolisosomal, proceso que ya se había vinculado previamente con una eficiente migración celular (Berg y cols., 2016; Evans y cols., 2013). Interesantemente, en este trabajo demostramos que el fenotipo migratorio de hemocitos deficientes de *trpml* puede ser rescatado al promover la acumulación de formas activadas de Sqh, mientras que la deficiencia de *vamp7* no es rescatada en dichas condiciones. Considerando que el silenciamiento fue mediado por RNAi, en ambas condiciones existe un remanente de proteína

funcional, por lo tanto, podemos especular que los niveles de *vamp7* son limitantes para una fusión de membranas eficiente.

Las concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} en el citoplasma oscilan entre 50 y 100 nM, que luego de la apertura de un canal permeable a este ion, pueden subir a niveles de entre 10 y 100 μM (Swulius & Waxham, 2008). La fusión de vesículas requiere de aproximadamente 19 μM en la vecindad de las membranas (Szule y cols., 2003). Esta alza localizada de los niveles de Ca^{2+} es transiente (<1 ms), revelado por la inhibición específica generada por el quelante rápido BAPTA, pero no por el quelante EGTA (Burgoyne & Clague, 2003).

Por su parte, la quinasa MLCK, depende de una molécula de calmodulina asociada a 4 iones de Ca^{2+} (Persechini & Cronk, 1999), y se ha descrito que la constante de disociación entre Ca^{2+} y calmodulina es de aproximadamente 10 μM (Swulius & Waxham, 2008). En este caso, la molécula de calmodulina debe estar saturada de Ca^{2+} para unir y activar la quinasa MLCK, por lo que una contractilidad requiere de alzas de Ca^{2+} que abarquen un dominio mayor dentro de la célula en comparación con los microdominios asociados a la fusión de vesicular.

Podemos especular entonces, que los niveles de *trpml* en la condición de silenciamiento, son suficientes para generar los microdominios de Ca^{2+} necesarios para la fusión vesicular y consecuente degradación fagolisosomal, mientras que son insuficientes para la activación sostenida de MLCK. Por su parte, en la deficiencia de *vamp7*, es posible que la fusión fagolisosomal es ineficiente, mientras que los niveles de actividad de MLCK son normales, y, por consiguiente, la migración de los

hemocitos es ineficiente, pero no es posible rescatar el fenotipo al incrementar los niveles de Sqh fosforilados.

7.3. La actividad *Trpml* modula positivamente la contractilidad Miosina-II

La migración celular requiere de la coordinación de dos tipos de organización de actina en el frente de migración: el lamelipodio y la lamela, donde el lamelipodio está situado anterior a la lamela, aunque existen reportes sugiriendo que sus territorios se superponen (Tomasello y cols., 2004). La forma de la lamela es controlada principalmente por los rearrreglos en la organización del citoesqueleto, mientras que los filamentos de actina en el lamelipodio son generados por polimerización en el frente de migración de la célula (Burnette y cols., 2014). En un contexto migratorio, las fuerzas de tracción que permiten el desplazamiento de la célula son la polimerización de actina en el lamelipodio y el flujo retrógrado de F-actina impulsado por Miosina-II en la lamela (Tan y cols., 2008).

En este trabajo, nosotros observamos en hemocitos *trpml*¹ cultivados *ex vivo*, que el área que corresponde a la lamela disminuye significativamente respecto de controles, lo cual fue acompañado de una baja en la velocidad del flujo retrógrado. Esto sugiere entonces, que existe una disminuida actividad de Miosina-II, pues esta molécula, puede afectar el flujo neto de protrusiones celulares, mediante la generación del flujo retrógrado de actina en la lamela que se encuentra conectada al lamelipodio (Vicente-Manzanares y cols., 2009).

En una célula migratoria, las redes de actina en el lamelipodio se convierten en lamela durante la fase de retracción del frente, cuando la Miosina-II se distribuye hacia la actina del lamelipodio y la condensa en arcos paralelos al frente. Estos arcos

de actina se contraen por la actividad de Miosina-II, disminuyendo su longitud en la medida que se alejan del frente. Al acortarse, los arcos de actina tiran de las fibras de estrés dorsales, acercándolas entre sí. La fuerza que el arco de actina ejerce sobre las fibras de estrés dorsales es balanceada por la unión de estas fibras con el sustrato. Esto provoca que el sistema dorsal contráctil se acerque al lado ventral de la célula, generando así una lamela plana (Burnette y cols., 2014, 2011).

La contractilidad de Miosina-II es un importante regulador de la estructura de las redes de actina en la lamela y el lamelipodio, así como la definición de sus territorios. Por lo tanto, la menor actividad de Miosina-II podría ser responsable de la menor extensión de lamela plana observada en hemocitos *trpm1*¹.

En condiciones de pérdida de función de *vamp7*, donde la fusión fagolisosomal es ineficiente, no se observaron diferencias en la estructura de la lamela ni en la velocidad del flujo retrógrado, sugiriendo fuertemente que, en esta condición, la actividad de Miosina-II se encuentra inalterada.

Asimismo, se observó en este trabajo, que la dinámica de cambio de área de la lamela se ve disminuida tanto en hemocitos *trpm1*¹ como con pérdida de función de la cadena liviana de miosina, *sqh*, demostrando entonces, el nexo entre este parámetro y la actividad de Miosina-II. Es más, al inducir la activación farmacológica del canal con su agonista MLSA1, se observó un aumento en la dinámica de la lamela en hemocitos controles, reforzando la idea de que el canal tiene un rol importante en la regulación del citoesqueleto, mientras que al añadir el agonista a hemocitos *trpm1*¹ no se observaron cambios, validando su especificidad. Por su parte, en hemocitos deficientes de *sqh*, no se observaron cambios al añadir el

agonista, lo que sugiere que la actividad de Trpml se encuentra río arriba de la actividad de Miosina-II.

Demostramos también en este trabajo, que hemocitos *trpml*¹ ejercen menores tensiones sobre el sustrato que los controles, lo cual se condice con una menor actividad contráctil de Miosina-II. Sin embargo, no podemos descartar que los hemocitos deficientes de *trpml* presenten problemas de adhesión con el sustrato y que esto también contribuya a las menores tensiones ejercidas sobre él. Por consiguiente, una proyección del trabajo sería evaluar la distribución y densidad en el tiempo de moléculas de adhesión, así como la realización de ensayos funcionales con el fin de determinar si Trpml es requerido para la adhesión de los hemocitos con el sustrato, pues es sabido que los canales de tipo TRP están fuertemente ligados al tráfico de endomembranas, y que esto a su vez es fundamental en la adhesión con la matriz extracelular (Abe & Puertollano, 2011). Asimismo, es posible que Trpml influya en la interacción con el sustrato mediante la regulación de Miosina-II, que ha mostrado ser esencial para la maduración de las adhesiones focales en células migratorias (Choi y cols., 2008).

7.4. Importancia de Miosina-II en la migración celular

Las células migratorias son altamente polarizadas, coordinando la distribución asimétrica de moléculas de señalización, el citoesqueleto y el tráfico de membranas (Watanabe y cols., 2005; Xu y cols., 2003). Los análisis de estructura del citoesqueleto, tamaño de la lamela, velocidad de flujo retrógrado y dinámica de actina, fueron realizados en hemocitos cultivados *ex vivo*, que no se encuentran polarizados.

Por lo tanto, durante el curso de esta tesis, se intentó generar un protocolo que promoviera la migración de hemocitos larvarios *ex vivo*. No fue posible que éstas se desplazaran en las condiciones de confinamiento evaluadas, pese a que se ha mostrado en embriones *in vivo*, que el confinamiento es utilizado por estas células para migrar (Evans & Wood, 2011). Independiente de no haber logrado que los hemocitos migraran *ex vivo*, se observó una respuesta de polarización a la hormona esteroidal 20-hidroxicdisona (20E).

Siendo el quiebre de simetría uno de los eventos claves en el proceso migratorio, se generó un protocolo para estudiar hemocitos polarizados *ex vivo*, permitiendo un alto nivel de resolución espacial y temporal para el estudio de la redistribución de estructuras a nivel subcelular (Edwards y cols., 2018).

Existe abundante evidencia de que la tracción de la región posterior de células migratorias es dependiente de la interacción entre Miosina-II y filamentos de actina, aunque también existen mecanismos que son independientes de la actividad de este motor molecular (Cramer, 2013). Se ha mostrado que existe una mayor contractilidad y acumulación de Miosina-II en la región posterior de keratinocitos (Yam y cols., 2007), de glías presentes en el epitelio olfatorio (Zheng y cols., 2017) y de células dendríticas (Chabaud y cols., 2015), entre otros. La diferente naturaleza de las células que muestran estos patrones revela la conservación funcional de este mecanismo de desplazamiento. Nosotros observamos también que la cadena liviana reguladora de Miosina-II, Sqh, hacia la región posterior de hemocitos polarizados, lo cual valida este método para el estudio de la polarización del citoesqueleto.

Si bien la actina cumple un rol fundamental en el proceso migratorio, la red de microtúbulos es también indispensable, pues permite la mantención del eje de polarización y el tráfico polarizado de membranas, entre otros (Etienne-Manneville, 2013; Watanabe y cols., 2005). Es más, en la mayoría de los tipos celulares, tanto la red de actina como la de microtúbulos son responsables de la generación de protrusiones en el frente de migración, por lo que, la red de microtúbulos se orientaría hacia el frente de migración (Etienne-Manneville, 2013). Esto ha sido observado previamente en hemocitos embrionarios migrando *in vivo* (Davis y cols., 2015), y nuestros resultados muestran que dicho fenómeno se conserva en hemocitos larvarios polarizados *ex vivo*.

Las células migratorias no solo polarizan su citoesqueleto, sino que también se ha descrito una importante distribución asimétrica del tráfico vesicular (Kriebel y cols., 2008; Thapa y cols., 2012). En células tumorales, la fusión de lisosomas con la membrana plasmática en el frente de migración, facilita la invasión mediante la liberación de enzimas hidrolíticas que degradan la matriz extracelular (Pu y cols., 2016), mientras que en células dendríticas, luego de su activación, los lisosomas se desplazan hacia la región posterior, lo que va acompañado con un incremento en su velocidad y persistencia (Bretou y cols., 2017).

Nosotros observamos en hemocitos polarizados *ex vivo* y migratorios *in vivo*, que los lisosomas se desplazan hacia la región posterior, al igual que en el caso de las células dendríticas activadas *in vitro*. Es posible especular entonces, que este sea un mecanismo ancestral característico de células del sistema inmune.

En la pérdida de función de *trpml*, se perdió la relocalización de lisosomas y de Miosina-II, sugiriendo que éstas pueden encontrarse acopladas, mientras que la red de microtúbulos se redistribuye de manera normal, revelando que su regulación es independiente de la actividad del canal.

Con esto, podemos especular que el cambio en la localización subcelular de los lisosomas permite la liberación local de iones calcio, que podrían a su vez promover la contractilidad localizada de Miosina-II, pues está ampliamente descrito que la fosforilación de la cadena liviana de miosina es un proceso realizado por MLCK, una quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina (Scholey y cols., 1980). Por tanto, se promovió la acumulación de formas fosforiladas de Sqh al silenciar componentes del complejo fosfatasa, y se mostró que esta condición es capaz de rescatar los fenotipos de la pérdida de función de *trpml*, tanto en estructura del citoesqueleto *ex vivo*, como en la migración *in vivo*.

Interesantemente se determinó que la ganancia de función de Miosina-II rescata de manera parcial la redistribución de Sqh en hemocitos polarizados deficientes de *trpml*, empero no rescata la redistribución de lisosomas, sugiriendo que este proceso se encuentra río arriba de la relocalización de miosina, mientras que la sola activación de miosina promovería su propia relocalización hacia la región posterior de la célula. Sin embargo, no podemos descartar que el rescate parcial en la polarización de Sqh se haya observado debido a la pérdida de función parcial de *trpml*, que, en esta condición, fue mediada por RNAi.

Existe una vasta literatura demostrando que la actividad de Miosina-II es importante en el proceso de migración celular (Conti & Adelstein, 2008; Devreotes & Horwitz,

2015; Vicente-Manzanares y cols., 2009), pese a la evidencia existente de células con pérdida de función de Miosina-II, que son capaces de adaptarse a fuerzas de tracción reducidas y aun así ser capaces de desplazarse eficientemente (Jorrich y cols., 2013). En el caso de los hemocitos, la pérdida de función de esta molécula disminuye la eficiencia del proceso migratorio *in vivo*.

Se ha reportado que el gradiente de actividad de miosina entre el frente de migración y la región posterior de la célula es clave para la migración, y que la irrupción de dichas diferencias tiene como consecuencia una migración más ineficiente (Chabaud y cols., 2015; Zheng y cols., 2017). Esto podría explicar el por qué obtuvimos una disminuida velocidad de migración de hemocitos con pérdida y con ganancia de función de Miosina-II.

Miosina-II es un regulador dual de protrusiones mediante sus efectos en flujo retrógrado y señalización asociada a adhesiones. Una elevada actividad de Miosina-II resulta en grandes fibras de actina y adhesiones estables, que va acompañado de una baja actividad de Rac y bajo número de protrusiones. Por el contrario, menores niveles de actividad resultan en menor formación de fibras y un incremento en la generación de protrusiones. Dicho cambio en el balance de actividad de Miosina-II podría dar cuenta de los diferentes modos de migración existentes entre tipos celulares (Vicente-Manzanares y cols., 2009).

Nosotros observamos en hemocitos *trpml*¹, donde la actividad de Miosina-II se encuentra reducida, menor generación de protrusiones, hecho que se contradice con el antecedente recién descrito. Esto se puede deber al hecho de que se pierde el

gradiente anteroposterior de actividad de Miosina-II, que es crucial para una migración celular eficiente (Chabaud y cols., 2015; Zheng y cols., 2017).

La actividad de Miosina-II no está solo segregada espacialmente dentro de las células, sino que también es regulada temporalmente. El mecanismo más importante para la regulación de la actividad de Miosina-II está dado por la fosforilación reversible de Sqh (Vereshchagina y cols., 2004). Se ha descrito que pulsos de Ca^{2+} en el frente de migración de células endoteliales gatilla ciclos de contracción de filamentos de actina, al activar la MLCK, y, por consiguiente, Miosina-II de manera localizada (Tsai & Meyer, 2012). Asimismo, se ha mostrado en distintos tipos celulares, que la dinámica de protrusión y retracción coordinada en el tiempo y espacio es dependiente de la activación e inhibición cíclica de la GTPasa monomérica Rho, responsable de la activación de Miosina-II, y que la frecuencia de estos pulsos de contractilidad dependerá de la elasticidad de la matriz extracelular (Graessl y cols., 2017).

En este trabajo, registramos la actividad de Trpml *in vivo*, donde observamos pulsos de liberación de Ca^{2+} desde los lisosomas en la región posterior de hemocitos migratorios. En consecuencia, es posible inferir que la contractilidad de actomiosina en la región posterior de las células estudiadas, está regulada espacial y temporalmente desde los lisosomas *in vivo*, donde la matriz en que las células están inmersas es relativamente heterogénea. Por lo tanto, la liberación localizada de Ca^{2+} desde los lisosomas podría responder a las necesidades de contractilidad de la célula en función de la elasticidad de la ECM.

Por lo tanto, sería interesante liberar iones Ca^{2+} de manera controlada y localizada en hemocitos *in vivo*, y demostrar así, que este evento es clave para promover una migración direccionada. Una forma de lograr esto, sería mediante el uso de Ca^{2+} enjaulado, que permite la liberación de los iones en el sitio y lugar de interés en respuesta a un estímulo con luz ultravioleta (Hitesh K Agarwal y cols., 2016).

Dado que Trpml es un canal permeable no solo a iones Ca^{2+} , sino que también a otros cationes divalentes como Mg^{2+} y Fe^{2+} , Zn^{2+} , entre otros (Bouron y cols., 2015), no podemos descartar que los fenotipos observados se deban en parte a la pérdida de la homeostasis de estos iones.

Se ha descrito que el Mg^{2+} actúa como un inhibidor de la actividad de Miosina-II, al disminuir la tasa de liberación del ADP, afectando por tanto su interacción con moléculas de actina (Swenson y cols., 2014). Sin embargo, en *Drosophila*, la actividad de Sqh es insensible a este ion dentro de los rangos de concentración fisiológicos (Heissler y cols., 2015), por lo tanto es poco probable que este ion sea responsable del fenotipo observado en contractilidad del citoesqueleto, pese a que se ha descrito que el influjo de Mg^{2+} desde el medio extracelular, cumple un rol importante en procesos migratorios en otros tipos celulares (Luongo y cols., 2018; Maier y cols., 2004; Trapani y cols., 2014).

Por su parte, se ha mostrado que el Zn^{2+} tiene efectos negativos sobre el proceso migratorio en células tumorales de distinto origen (Ninsontia y cols., 2016; Rudolf y cols., 2008), mientras que el Fe^{2+} no presenta un rol claramente definido. Consecuentemente, si estos iones son responsables de modular la migración en hemocitos, lo más probable es que sea de forma negativa.

La actividad de Miosina-II está regulada por la fosforilación de la RLC, ya sea por MLCK o ROCK, entre otras quinasas (Somlyo & Somlyo, 2003). ROCK es, a su vez, responsable de la inhibición de Mypt, y, por tanto, promueve la acumulación de formas activadas de Miosina-II (Sadok & Marshall, 2014). La actividad de ROCK es dependiente de Rho, GTPasa monomérica perteneciente a la familia que también contiene a Rac y Cdc42, todas las cuales han sido importantemente implicadas en el proceso de migración celular (Sadok & Marshall, 2014).

Interesantemente, se ha descrito que las GTPasas monoméricas pertenecientes a la familia de Rho son sensibles al estado redox de las células, y que a su vez, son capaces de regular el estado redox de la célula mediante la activación o inhibición de las enzimas que generan y/o convierten las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Hobbs y cols., 2014).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) corresponden a un grupo de compuestos que incluyen el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot), el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otros, todos los cuales presentan una vida media corta y son fuertes oxidantes de una vasta gama de macromoléculas (Myers y cols., 2018). Se ha demostrado ampliamente que las ROS son importantes en la respuesta antimicrobiana en macrófagos (revisado en Slauch, 2011), así como también en la función de los hemocitos (Myers y cols., 2018) y en la regulación de la hematopoyesis en *Drosophila* (Louradoury cols., 2017; Vincent, 2010).

Luego de la encapsulación de microbios por células fagocíticas, ocurre un proceso de alta demanda energética, donde se consume gran cantidad de O_2 , que es convertido

en O_2^- entre otras ROS. Dichos compuestos son incorporados en los fagosomas conteniendo microbios, donde ejercen una fuerte actividad microbicida (Slauch, 2011). Se ha mostrado incluso, que estas ROS cumplen un papel importante en otros procesos celulares, como la regulación de la apoptosis, procesos de quimiotaxis, regulación transcripcional, entre otros (Dupré-Crochet y cols., 2013).

Existe evidencia de que las ROS pueden alterar la probabilidad de apertura de canales permeables a Ca^{2+} (Li y cols., 1998), por lo que sería interesante explorar si este es el caso de Trpml, y que, de alguna manera, esto estaría involucrado en las alzas transientes de actividad observadas con el uso del reportero Trpml-GCaMP5 en hemocitos fagocíticos *in vivo*.

7.5. Trpml regula el procesamiento fagocítico de manera independiente de la actividad de Miosina-II

Una de las fases claves del proceso fagocítico es la extensión de pseudópodos en torno a la partícula a ser fagocitada seguido por el cierre del fagosoma (Hoppe & Swanson, 2004). Existe un consenso para el rol de la polimerización de actina en la extensión de pseudópodos, sin embargo, hay reportes contradictorios respecto de la relevancia de miosina en el proceso de cierre del fagosoma.

Se ha descrito que la fagocitosis mediada por receptor $Fc\gamma R$ es independiente de la actividad de Miosina-II (Olazabal y cols., 2002), mientras que otros autores reportaron que el cierre del fagosoma sí es dependiente de su actividad (Hoppe & Swanson, 2004). Por su parte, la formación de la copa fagocítica dependiente del complemento también requiere de Miosina-II (Olazabal y cols., 2002). Asimismo, se han vinculado otras miosinas con el proceso fagocítico, como es el caso de miosina-

X (Cox y cols., 2002), miosina-IV (Hewage & Altman, 2018) y miosina-I (Barger y cols., 2018).

En macrófagos derivados de médula ósea, se mostró dependencia de Miosina-IIA en la maduración fagolisosomal y consecuente capacidad degradativa (Gomez & Descoteaux, 2017). Esto se contradice aparentemente con nuestros resultados, pues tan solo vimos una leve baja en la tasa de procesamiento fagocítico en la pérdida de función de *sqh*, mientras que la ganancia de función no genera diferencias.

El parámetro cuantificado para evaluar tasa de procesamiento fagocítico fue la proporción de hemocitos capaces de contener al menos 2 vesículas acídicas conteniendo bacterias en su interior, y no el número absoluto de ellas, dadas las dificultades para su cuantificación inequívoca. Sin embargo, las observaciones cualitativas permiten afirmar que las células con ganancia y pérdida de función de Miosina-II presentan una proporción menor de vesículas acídicas conteniendo bacterias, respecto de hemocitos controles. Por lo tanto, no podemos descartar que el proceso sea más ineficiente en dichas condiciones.

Asimismo, vimos que la ganancia de función de Miosina-II es incapaz de rescatar el fenotipo de *trpml*¹ en cuanto a la tasa de procesamiento fagocítico, sugiriendo fuertemente que el rol del canal en este proceso es independiente de la actividad de Miosina-II, lo cual refuerza el modelo propuesto para la actividad de Trpml, que estaría regulando de manera diferencial, los procesos de migración celular y procesamiento fagocítico.

Dados los resultados mostrados en el presente trabajo, es posible proponer un modelo donde la regulación de Miosina-II desde los lisosomas, podría estar contribuyendo

con la segregación espacial y temporal de su actividad, facilitando, por tanto, la polarización de hemocitos durante el proceso migratorio.

Este mecanismo dual sugiere la existencia de una selección positiva a lo largo de la evolución, por una fina coordinación entre los procesos de fagocitosis y migración celular, permitiendo proponer, por tanto, una explicación de la conservación de la expresión de homólogos de *trpml* en el sistema inmune entre especies.

7.6. Proyecciones futuras

En este trabajo se mostró que *Trpml* es importante para la migración de hemocitos en distintos estadios de desarrollo, habiendo una descripción más detallada del estadio pupal. Por lo tanto, sería interesante evaluar en embriones si es que los mecanismos mediante los cuales, *Trpml* regula la migración de hemocitos, son también dependientes de Miosina-II, o bien, si es que existe algún nexo con la degradación fagolisosomal.

Asimismo, dado que los hemocitos en los estadios pupales evaluados tienen un patrón de migración aleatorio, sería interesante realizar ensayos donde se promueva su migración dirigida hacia sitios de daño, donde a su vez se generará una importante carga fagocítica dada la muerte celular masiva producto del daño. De tal manera, se podrían evaluar los parámetros migratorios de hemocitos individuales previo y posterior al proceso de fagocitosis.

Si complementamos los estudios recién descritos con el uso del reportero de actividad de *Trpml in vivo*, podríamos reforzar el modelo que hemos propuesto con los resultados de esta tesis.

Por su parte, sería atractivo poder hacer experimentos con Ca^{2+} enjaulado, que permite la liberación de los iones en el sitio y lugar de interés en respuesta a un estímulo con luz ultravioleta (Hitesh K Agarwal y cols., 2016). Con esta herramienta, podríamos demostrar de manera directa que, al inducir la liberación localizada de Ca^{2+} , promovemos la migración direccionada de estas células, ya sea *in vivo* o *ex vivo*.

Otro resultado interesante producto de esta tesis, es la relevancia de Vamp7 en el proceso de migración celular, que parece ser independiente de la regulación del citoesqueleto. Por lo que ahondar en los mecanismos mediante los cuales, esta molécula adaptadora juega un rol importante en el proceso migratorio sería novedoso.

En humanos, se ha descrito la pérdida de función de *trpml* principalmente en el sistema nervioso, muscular y visual (Venkatachalam y cols., 2008; Venugopal y cols., 2007). En este trabajo mostramos que este canal también cumple un rol importante en células del sistema inmune, por lo que podemos especular que este fenotipo también podría incidir en la severidad del fenotipo de los pacientes con MLIV. Consecuentemente, una proyección interesante de este trabajo sería evaluar qué relevancia tiene el sistema inmune en el fenotipo neurocognitivo de los pacientes con MLIV, mediante ensayos de rescate genético de la expresión de *trpml* en el tejido inmune, y posterior evaluación en sistema nervioso tanto a nivel celular como fisiológico.

8. CONCLUSIONES

1. Trpml promueve el procesamiento fagocítico y es un factor importante en hemocitos para una apropiada respuesta inmune.
2. Trpml regula la localización subcelular de los lisosomas durante la maduración de los fagosomas y la migración de hemocitos.
3. La eficiencia de migración *in vivo* de hemocitos embrionarios y pupales es dependiente de la expresión de *trpml*.
4. La actividad de Trpml, modula la contractilidad del citoesqueleto de actina y miosina en hemocitos.
5. El Ca^{2+} lisosomal es liberado localmente desde los lisosomas en la región posterior de hemocitos migratorios *in vivo*.
6. En hemocitos fagocíticos, Trpml libera Ca^{2+} lisosomal en las estructuras asociadas a la formación fagosomas *in vivo*.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abe, K., Puertollano, R., 2011. Role of TRP Channels in the Regulation of the Endosomal Pathway. *Physiol.* 26, 14–22.

Ahuja, M., Park, S., Shin, D.M., Muallem, S., 2016. TRPML1 as lysosomal fusion guard. *Channels* 6950, 1–3.

Barger, S.R., Reilly, N.S., Shutova, M.S., Li, Q., Maiuri, P., Mooseker, M.S., Flavell, R.A., Svitkina, T., Oakes, P.W., Krendel, M., Gauthier, N., 2018. Membrane-cytoskeleton mechanical feedback mediated by myosin-I controls phagocytic efficiency. *bioRxiv* 433631.

Bassi, M.T., Manzoni, M., Monti, E., Pizzo, M.T., Ballabio, a, Borsani, G., 2000. Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucolipidin-and identification of the two major founder mutations causing mucopolidosis type IV. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1110–1120.

Bear, J.E., Haugh, J.M., 2014. Directed migration of mesenchymal cells: where signaling and the cytoskeleton meet. *Curr Opin Cell Biol* 0, 74–82.

Berg, R.D., Levitte, S., O’Sullivan, M.P., O’Leary, S.M., Cambier, C.J., Cameron, J., Takaki, K.K., Moens, C.B., Tobin, D.M., Keane, J., Ramakrishnan, L., 2016. Lysosomal Disorders Drive Susceptibility to Tuberculosis by Compromising Macrophage Migration. *Cell* 165, 139–152.

Bouma, G., Burns, S.O., Thrasher, A.J., 2009. Wiskott-Aldrich Syndrome: Immunodeficiency resulting from defective cell migration and impaired immunostimulatory activation. *Immunobiology* 214, 778–790.

Bouron, A., Kiselyov, K., Oberwinkler, J., 2015. Permeation, regulation and control of expression of TRP channels by trace metal ions. *Pflugers Arch. Eur J Physiol* 467, 1143–1164.

Braun, V., Fraasier, V., Raposo, G., Hurbain, I., Sibarita, J.-B., Chavrier, P., Galli, T., Niedergang, F., 2004. TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *EMBO J.* 23, 4166–4176.

Braun, V., Niedergang, F., 2006. Linking exocytosis and endocytosis during phagocytosis. *Biol. Cell* 98, 195–201.

Bretou, M., Sáez, P.J., Sanséau, D., Maurin, M., Lankar, D., Chabaud, M., Spanpanato, C., Malbec, O., Barbier, L., Muallem, S., Maiuri, P., Ballabio, A., Helft, J., Piel, M., Vargas, P., Lennon-Duménil, A.-M., 2017. Lysosome signaling controls the migration of dendritic cells. *Sci. Immunol.* 2, eaak9573.

Brown, J., Bridgman, P.C., 2003. Role of myosin II in axon outgrowth. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 421–428.

Browne, N., Heelan, M., Kavanagh, K., 2013. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* 4, 597–603.

- Burgoyne, R.D., Clague, M.J., 2003. Calcium and calmodulin in membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* 1641, 137–143.
- Burnette, D.T., Manley, S., Sengupta, P., Sougrat, R., Davidson, M.W., Kachar, B., Lippincott-Schwartz, J., 2011. A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nat. Cell Biol.* 13, 371–81.
- Burnette, D.T., Shao, L., Ott, C., Pasapera, A.M., Fischer, R.S., Baird, M. a, Der Loughian, C., Delanoe-Ayari, H., Paszek, M.J., Davidson, M.W., Betzig, E., Lippincott-Schwartz, J., 2014. A contractile and counterbalancing adhesion system controls the 3D shape of crawling cells. *J. Cell Biol.* 205, 83–96.
- Cabukusta, B., Neefjes, J., 2018. Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic* 761–769.
- Chabaud, M., Heuzé, M.L., Bretou, M., Vargas, P., Maiuri, P., Solanes, P., Maurin, M., Terriac, E., Le Berre, M., Lankar, D., Piolot, T., Adelstein, R.S., Zhang, Y., Sixt, M., Jacobelli, J., Bénichou, O., Voituriez, R., Piel, M., Lennon-Duménil, A.-M., 2015. Cell migration and antigen capture are antagonistic processes coupled by myosin II in dendritic cells. *Nat Commun* 6, 7526.
- Chan, K.T., Cortesio, C.L., Huttenlocher, A., 2011. Integrins in Cell Migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a005074.
- Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., Horwitz, A.R., 2008. Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* 10, 1039–1050.
- Christensen, K. a, Myers, J.T., Swanson, J. a, 2002. pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J. Cell Sci.* 115, 599–607.
- Colvin, R.A., Means, T.K., Diefenbach, T.J., Moita, L.F., Robert, P., Sever, S., Campanella, G.S. V, Abrazinski, T., Manice, L.A., Moita, C., Andrews, N.W., Wu, D., Hacohen, N., Andrew, D., 2010. Synaptotagmin-mediated vesicle fusion regulates cell migration. *Nat Immunol* 11, 495–502.
- Commisso, C., Davidson, S.M., Soydaner-Azeloglu, R.G., Parker, S.J., Kamphorst, J.J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J.A., Thompson, C.B., Rabinowitz, J.D., Metallo, C.M., Vander Heiden, M.G., Bar-Sagi, D., 2013. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* 497, 633–637.
- Condon, N.D., Heddleston, J.M., Chew, T.-L., Luo, L., McPherson, P.S., Ioannou, M.S., Hodgson, L., Stow, J.L., Wall, A.A., 2018. Macropinosome formation by tent pole ruffling in macrophages. *J. Cell Biol.* 217, jcb.201804137.
- Conti, M.A., Adelstein, R.S., 2008. Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J. Cell Sci.* 121, 404–404.
- Cougoule, C., Wiedemann, A., Lim, J., Caron, E., 2004. Phagocytosis, an alternative model system for the study of cell adhesion. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 679–89.
- Cox, D., Berg, J.S., Cammer, M., Chinegwundoh, J.O., Dale, B.M., Cheney, R.E., Greenberg, S., 2002. Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during

phagocytosis. *Nat. Cell Biol.* 4, 469–477.

Cramer, L.P., 2013. Mechanism of cell rear retraction in migrating cells. *Curr Opin Cell Biol* 25, 591–599.

Dai, J., Ma, M., Feng, Z., Pastor-Pareja, J.C., 2017. Inter-adipocyte Adhesion and Signaling by Collagen IV Intercellular Concentrations in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 27, 2729–2740.e4.

Davis, J.R., Luchici, A., Mosis, F., Thackery, J., Salazar, J.A., Mao, Y., Dunn, G.A., Betz, T., Miodownik, M., Stramer, B.M., 2015. Inter-cellular forces orchestrate contact inhibition of locomotion. *Cell* 161, 361–373.

Dayam, R.M., Saric, A., Shilliday, R.E., Botelho, R.J., 2015. The Phosphoinositide-Gated Lysosomal Ca²⁺ Channel, TRPML1, Is Required for Phagosome Maturation. *Traffic* 16, 1010–1026.

Del Prete, A., Vermi, W., Dander, E., Otero, K., Barberis, L., Luini, W., Bernasconi, S., Sironi, M., Santoro, A., Garlanda, C., Facchetti, F., Wymann, M.P., Vecchi, A., Hirsch, E., Mantovani, A., Sozzani, S., 2004. Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3K γ -deficient mice. *EMBO J.* 23, 3505–3515.

Devreotes, P., Horwitz, A.R., 2015. Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a005959.

Dong, X., Shen, D., Wang, X., Dawson, T., Li, X., Cheng, X., Zhang, Y., Weisman, L.S., Dellinger, M., 2011. PI(3,5)P₂ Controls Membrane Traffic by Direct Activation of Mucopolipin Ca²⁺ Release Channels in the Endolysosome. *Nat Commun* 1, 1–21.

dos Santos Reis, M.D., dos Santos, Y.M.O., de Menezes, C.A., Borbely, K.S.C., Smaniotto, S., 2018. Resident murine macrophage migration and phagocytosis are modulated by growth hormone. *Cell Biol. Int.* 9999, 1–9.

Dow, J.A.T., 1999. The multifunctional *drosophila melanogaster* V-ATPase is encoded by a multigene family. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 75–83.

Doyle, A.D., Petrie, R.J., Kutys, M.L., Yamada, K.M., 2013. Dimensions in Cell Migration. *Curr Opin Cell Biol* 25, 642–649.

Dupré-Crochet, S., Erard, M., NüBe, O., 2013. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *JLB* 94, 657–670.

Edwards, S., Nader, G., Piel, M., 2018. An in vitro method for studying subcellular rearrangements during cell polarization in *Drosophila melanogaster* hemocytes. *Mech. Dev.* 1–10.

Eskelinen, E.L., 2006. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol. Aspects Med.* 27, 495–502.

Etienne-Manneville, S., 2013. Microtubules in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 471–499.

Evans, I., Ghai, P., Urbancic, V., Tan, K., Wood, W., 2013. SCAR/WAVE mediated processing of apoptotic corpses is essential for effective macrophage migration in

Drosophila. *Cell Death Differ.* 709–720.

Evans, I.R., Wood, W., 2011. Understanding in vivo blood cell migration-Drosophila hemocytes lead the way. *Fly (Austin)*. 5, 110–114.

Fairn, G.D., Grinstein, S., 2012. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol.* 33, 397–405.

Faure-André, G., Vargas, P., Yuseff, M., Heuzé, M., Vascotto, F., Boulanger, J., Raposo, G., Bono, M., 2008. Regulation of Dendritic Cell Migration by CD74, the MHC Class II-Associated Invariant Chain. *Science (80)*. 322, 1705–1710.

Feng, X., Huang, Y., Lu, Y., Xiong, J., -On Wong, C., Yang, P., Xia, J., Chen, D., Du, G., Venkatachalam, K., Xia, X., Zhu, M.X., 2014a. *Drosophila* TRPML forms PI(3,5)P₂-activated cation channels in both endolysosomes and plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* 289, 4262–4272.

Feng, X., Xiong, J., Lu, Y., Xia, X., Zhu, M.X., 2014b. Differential mechanisms of action of the mucolipin synthetic agonist, ML-SA1, on insect TRPML and mammalian TRPML1. *Cell Calcium* 56, 446–456.

Fernandez, M.-I., Heuzé, M.L., Martinez-Cingolani, C., Volpe, E., Donnadieu, M.-H., Piel, M., Homey, B., Lennon-Duménil, A.-M., Soumelis, V., 2011. The human cytokine TSLP triggers a cell-autonomous dendritic cell migration in confined environments. *Blood* 118, 3862–9.

Fiehler, R.W., Wolff, T., 2007. *Drosophila* Myosin II, Zipper, is essential for ommatidial rotation. *Dev. Biol.* 310, 348–362. h

Foote, J.R., Behe, P., Frampton, M., Levine, A.P., Segal, A.W., 2017. An exploration of charge compensating ion channels across the phagocytic vacuole of neutrophils. *Front. Pharmacol.* 8, 1–18.

Franke, J.D., Montague, R.A., Kiehart, D.P., 2005. Nonmuscle myosin II generates forces that transmit tension and drive contraction in multiple tissues during dorsal closure. *Curr. Biol.* 15, 2208–2221.

Friedl, P., Wolf, K., 2010. Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* 188, 11–19.

Gao, H., He, F., Lin, X., Wu, Y., 2017. *Drosophila* VAMP7 regulates Wingless intracellular trafficking. *PLoS One* 12, 1–14.

Glunde, K., Guggino, S.E., Solaiyappan, M., Pathak, A.P., Ichikawa, Y., Bhujwala, Z.M., 2003. Extracellular Acidification Alters Lysosomal Trafficking in Human Breast Cancer Cells. *Neoplasia* 5, 533–545.

Gold, K.S., Brückner, K., 2015. Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster*. *Semin. Immunol.* 27, 357–368.

Gomes, E.R., Jani, S., Gundersen, G.G., 2005. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* 121, 451–463.

- Gomez, C.P., Descoteaux, A., 2017. Moesin and myosin IIA modulate phagolysosomal biogenesis in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 1964–1971.
- González-Morales, N., Mendoza-Ortíz, M.Á., Blowes, L.M., Missirlis, F., Riesgo-Escovar, J.R., 2015. Ferritin is required in multiple tissues during drosophila melanogaster development. *PLoS One* 10, 1–20.
- Graessl, M., Koch, J., Calderon, A., Kamps, D., Banerjee, S., Mazel, T., Schulze, N., Jungkurth, J.K., Patwardhan, R., Solouk, D., Hampe, N., Hoffmann, B., Dehmelt, L., Nalbant, P., 2017. An excitable Rho GTPase signaling network generates dynamic subcellular contraction patterns. *J. Cell Biol.* 216, 4271–4285.
- Grimm, C., Bartel, K., Vollmar, A.M., Biel, M., 2018. Endolysosomal Cation Channels and Cancer - A Link with Great Potential. *Pharmaceuticals* 11, 1–8.
- Grimm, C., Butz, E., Chen, C.C., Wahl-Schott, C., Biel, M., 2017. From mucopolipidosis type IV to Ebola: TRPML and two-pore channels at the crossroads of endo-lysosomal trafficking and disease. *Cell Calcium* 67, 148–155.
- Grimm, C., Cuajungco, M.P., 2014. TRPML Channels and Mucopolipidosis Type IV, in: Weiss, N., Koschak, A. (Eds.), *Pathologies of Calcium Channels*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 365–379.
- Gu, Z., Noss, E.H., Hsu, V.W., Brenner, M.B., 2011. Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *J. Cell Biol.* 193, 61–70.
- Guo, Y., Flegel, K., Kumar, J., McKay, D.J., Buttitta, L.A., 2016. Ecdysone signaling induces two phases of cell cycle exit in *Drosophila* cells. *Biol. Open* 5, 1648–1661.
- Haruta, M., Gray, W.M., Sussman, M.R., 2015. Novel role of TRPML2 in the regulation of the innate immune response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 28, 68–75.
- Heissler, S.M., Chinthalapudi, K., Sellers, J.R., 2015. Kinetic characterization of the sole nonmuscle myosin-2 from the model organism *Drosophila melanogaster*. *FASEB J.* 29, 1456–1466.
- Heuzé, M.L., Collin, O., Terriac, E., Piel, M., 2011. Cell Migration in Confinement: A Micro-Channel-Based Assay, in: *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*. pp. 415–434.
- Heuzé, M.L., Vargas, P., Chabaud, M., Le Berre, M., Liu, Y.-J., Collin, O., Solanes, P., Voituriez, R., Piel, M., Lennon-Duménil, A.-M., 2013. Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications. *Immunol. Rev.* 256, 240–54.
- Hewage, N., Altman, D., 2018. A role for myosin VI in retinal pigment epithelium phagocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 504, 759–764.
- Hipolito, V.E.B., Escobar, E.O., Botelho, R.J., 2018. Lysosome remodelling and adaptation during phagocyte activation. *Cell. Microbiol.* 20, e12824.
- Hitesh K Agarwal, Janicek, R., Chi, S.-H., Perry, J.W., Niggli, E., Ellis-Davies, G.C.,

2016. Calcium uncaging with visible light. *J Am Chem Soc* 138, 3687–3693.
- Hobbs, G.A., Zhou, B., Cox, A.D., Campbell, S.L., 2014. Rho GTPases , oxidation , and cell redox control. *Small GTPases* 5, e28579.
- Honti, V., Csordás, G., Kurucz, É., Márkus, R., Andó, I., 2014. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Dev. Comp. Immunol.* 42, 47–56.
- Hoppe, A.D., Swanson, J.A., 2004. Cdc42, Rac1, and Rac2 Display Distinct Patterns of Activation during Phagocytosis □. *Mol. Biol. Cell* 15, 3509–3519.
- Hosoba, K., Komatsu, S., Ikebe, M., Kotani, M., Wenqin, X., Tachibana, T., Hosoya, H., Hamao, K., 2015. Phosphorylation of myosin II regulatory light chain by ZIP kinase is responsible for cleavage furrow ingression during cell division in mammalian cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 459, 686–691.
- Huynh, K.K., Kay, J.G., Stow, J.L., Grinstein, S., 2007. Fusion, fission, and secretion during phagocytosis. *Physiology (Bethesda)*. 22, 366–372.
- Ikenouchi, J., Aoki, K., 2017. Membrane bleb: A seesaw game of two small GTPases. *Small GTPases* 8, 85–89.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüeegg, M.A., Hall, A., Hall, M.N., 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6, 1122–1128.
- Jacobelli, J., Friedman, R.S., Conti, M.A., Piel, M., Sorensen, C.M., Adelstein, R.S., Krummel, M.F., 2010. Confinement-Optimized 3-Dimensional T cell Amoeboid Motility is Modulated via Myosin IIA-Regulated Adhesions. *Nat Immunol* 11, 953–961.
- Jacobelli, J., Matthews, M.E., Chen, S., Krummel, M.F., 2013. Activated T Cell Trans-Endothelial Migration Relies on Myosin-IIA Contractility for Squeezing the Cell Nucleus through Endothelial Cell Barriers. *PLoS One* 8, e75151.
- Johnson, D.E., Ostrowski, P., Jaumouillé, V., Grinstein, S., 2016. The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH. *J. Cell Biol.* 212, 677–692.
- Jorrich, M.H., Shih, W., Yamada, S., 2013. Myosin IIA deficient cells migrate efficiently despite reduced traction forces at cell periphery. *Biol. Open* 2, 368–372.
- Kasza, K.E., Farrell, D.L., Zallen, J.A., 2014. Spatiotemporal control of epithelial remodeling by regulated myosin phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 11732–11737.
- Kirchner, J., Gross, S., Bennett, D., Alphey, L., 2007. Essential, overlapping and redundant roles of the *Drosophila* protein phosphatase 1 α and 1 β genes. *Genetics* 176, 273–281.
- Kiselyov, K., Colletti, G. a, Terwilliger, A., Ketchum, K., Lyons, C.W.P., Quinn, J., Muallem, S., 2011. TRPML: transporters of metals in lysosomes essential for cell survival? *Cell Calcium* 50, 288–94.

- Kiselyov, K.K., Ahuja, M., Rybalchenko, V., Patel, S., Muallem, S., 2012. The intracellular Ca²⁺ channels of membrane traffic. *Channels* 6, 344–351.
- Komiya, Y., Su, L.-T., Chen, H.-C., Habas, R., Runnels, L.W., 2014. Magnesium and Embryonic Development. *MAGnes Res* 27, 1–8.
- Kounatidis, I., Ligoxygakis, P., 2012. Drosophila as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biol.* 2, 120075–120075.
- Kriebel, P.W., Barr, V.A., Rericha, E.C., Zhang, G., Parent, C.A., 2008. Collective cell migration requires vesicular trafficking for chemoattractant delivery at the trailing edge. *J. Cell Biol.* 183, 949–961.
- Le Berre, M., Aubertin, J., Piel, M., 2012. Fine control of nuclear confinement identifies a threshold deformation leading to lamina rupture and induction of specific genes. *Integr. Biol.* 4, 1406.
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., Carthew, R.W., 2004. Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117, 69–81.
- Li, A., Se, J., Heinemann, S.H., Hoshi, T., 1998. Oxidation Regulates Cloned Neuronal Voltage-Dependent Ca²⁺ Channels Expressed in Xenopus Oocytes. *J. Neurosci.* 18, 6740–6747.
- Li, R.J., Xu, J., Fu, C., Zhang, J., Zheng, Y.G., Jia, H., Liu, J.O., Czech, M., 2016. Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin. *Elife* 5, 1–16.
- Li, X., Rydzewski, N., Hider, A., Zhang, X., Yang, J., Wang, W., Gao, Q., Cheng, X., Xu, H., 2016. A molecular mechanism to regulate lysosome motility for lysosome positioning and tubulation. *Nat. Cell Biol.* 18, 404–417.
- Liu, Y., Berre, L., Lautenschlaeger, F., Maiuri, P., Callan-jones, A., Piel, M., 2015. Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. *Cell* 160, 659–672.
- Liu, Z., Roche, P.A., 2015. Macropinocytosis in phagocytes: Regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Front. Physiol.* 6, 1–6.
- Louradour, I., Sharma, A., Morin-poulard, I., Letourneau, M., Vincent, A., Crozatier, M., Vanzo, N., 2017. Reactive oxygen species-dependent Toll / NF- κ B activation in the Drosophila hematopoietic niche confers resistance to wasp parasitism. *Elife* 6, e25496.
- Luongo, F., Pietropaolo, G., Gautier, M., Dhennin-Duthille, I., Ouadid-Ahidouch, H., Wolf, F.I., Trapani, V., 2018. TRPM6 is essential for magnesium uptake and epithelial cell function in the colon. *Nutrients* 10, 1–12.
- Maier, J.A.M., Bernardini, D., Rayssiguier, Y., Mazur, A., 2004. High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour in vitro. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1689, 6–12.
- Markova, O., Sénatore, S., Chardès, C., Lenne, P.F., 2015. Calcium Spikes in Epithelium: Study on Drosophila early embryos. *Sci. Rep.* 5, 1–14.

- Martiel, J.L., Leal, A., Kurzawa, L., Balland, M., Wang, I., Vignaud, T., Tseng, Q., Théry, M., 2015. Measurement of cell traction forces with ImageJ. *Methods Cell Biol.* 125, 269–287.
- Matsumura, F., Hartshorne, D.J., 2008. Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochem Biophys Res Commun* 369, 149–156.
- Mattila, P.K., Lappalainen, P., 2008. Filopodia: Molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 446–454.
- Medina, D.L., Fraldi, A., Bouche, V., Annunziata, F., Mansueto, G., Spampinato, C., Puri, C., Pignata, A., Martina, J.A., Sardiello, M., Palmieri, M., Polishchuk, R., Puertollano, R., Ballabio, A., 2011. Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Dev. Cell* 21, 421–430.
- Melchionda, M., Pittman, J.K., Mayor, R., Patel, S., 2016. Ca²⁺/H⁺ exchange by acidic organelles regulates cell migration in vivo. *J. Cell Biol.* 212, 803–813.
- Miedel, M.T., Weixel, K.M., Bruns, J.R., Traub, L.M., Weisz, O. a, 2006. Posttranslational cleavage and adaptor protein complex-dependent trafficking of mucolin-1. *J. Biol. Chem.* 281, 12751–9.
- Minton, K., 2014. Cell migration: Coordinating calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 152.
- Moreira, C.G.A., Regan, J.C., Zaidman-rémy, A., Jacinto, A., Prag, S., 2011. Drosophila Hemocyte Migration: An In Vivo Assay for Directional Cell Migration, in: Wells, C.M., Parsons, M. (Eds.), *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 249–260.
- Murthy, K., Wadsworth, P., 2005. Myosin-II-dependent localization and dynamics of F-actin during cytokinesis. *Curr. Biol.* 15, 724–731.
- Myers, A.L., Harris, C.M., Choe, K., Brennan, C.A., 2018. Inflammatory production of reactive oxygen species by Drosophila hemocytes activates cellular immune defenses. *Biochem Biophys Res Commun* 505, 726–732.
- Ninsontia, C., Phiboonchaiyanan, P.P., Chanvorachote, P., 2016. Zinc induces epithelial to mesenchymal transition in human lung cancer H460 cells via superoxide anion-dependent mechanism. *Cancer Cell Int.* 16, 1–16.
- Olazabal, I.M., Caron, E., May, R.C., Schilling, K., Knecht, D.A., Machesky, L.M., 2002. Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcγR, phagocytosis. *Curr. Biol.* 12, 1413–1418.
- Onodera, S., Suzuki, K., Matsuno, T., Kaneda, K., Takagi, M., Nishihira, J., 1997. Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. *Immunology* 92, 131–137.
- Paluch, E.K., Raz, E., 2013. The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 582–590.
- Paňková, K., Rösel, D., Novotný, M., Brábek, J., 2010. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell.*

Mol. Life Sci. 67, 63–71.

Paola, S. Di, Scotto-rosato, A., Medina, D.L., 2018. Cell Calcium TRPML1: The Ca(2+) retaker of the lysosome. *Cell Calcium* 69, 112–121.

Perrimon, N., 1998. Creating mosaics in *Drosophila*. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 243–247.

Persechini, A., Cronk, B., 1999. The Relationship between the Free Concentrations of Ca²⁺ and Ca²⁺-Calmodulin in Intact Cells. *J Biol Chem* 274, 6827–6830.

Petrie, R.J., Yamada, K.M., 2012. At the leading edge of three-dimensional cell migration. *J. Cell Sci.* 125, 5917–5926.

Pixley, F.J., 2012. Macrophage migration and its regulation by CSF-1. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 501962.

Plesch, E., Chen, C., Butz, E., Rosato, A.S., Krogsaeter, E.K., Yinan, H., Bartel, K., Keller, M., Robaa, D., Teupser, D., Holdt, L.M., Vollmar, A.M., Sippl, W., Puertollano, R., Medina, D., Biel, M., Wahl-schott, C., Bracher, F., Grimm, C., 2018. Selective agonist of TRPML2 reveals direct role in chemokine release from innate immune cells. *Elife* 7, e39720.

Pu, J., Guardia, C.M., Keren-Kaplan, T., Bonifacino, J.S., 2016. Mechanisms and functions of lysosome positioning. *J. Cell Sci.* 129, 4329–4339.

Raab, M., Gentili, M., De Belly, H., Thiam, H.R., Vargas, P., Jimenez, A.J., Lautenschlaeger, F., Voituriez, R., Lennon-Duménil, A.M., Manel, N., Piel, M., 2016. ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* (80-.). 352, 359–362.

Rainero, E., Norman, J.C., 2013. Late endosomal and lysosomal trafficking during integrin-mediated cell migration and invasion: Cell matrix receptors are trafficked through the late endosomal pathway in a way that dictates how cells migrate. *BioEssays* 35, 523–532.

Rhee, I., Zhong, M.-C., Reizis, B., Cheong, C., Veillette, A., 2014. Control of Dendritic Cell Migration, T Cell-Dependent Immunity, and Autoimmunity by Protein Tyrosine Phosphatase PTPN12 Expressed in Dendritic Cells. *Mol. Cell. Biol.* 34, 888–899.

Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., Horwitz, A.R., 2003. Cell Migration Integrating Signals from front to back. *Science* (80-.). 302, 1704–1709.

Royet, J., 2004. *Drosophila melanogaster* innate immunity: An emerging role for peptidoglycan recognition proteins in bacteria detection. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 537–546.

Rudolf, E., Klvacová, L., John, S., Cervinka, M., 2008. Zinc alters cytoskeletal integrity and migration in colon cancer cells. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 51, 51–57.

Sadok, A., Marshall, C.J., 2014. Rho GTPases. *Small GTPases* 5, 1–7.

- Sáez, P.J., Sáez, J.C., Lennon-Duménil, A.M., Vargas, P., 2018. Role of calcium permeable channels in dendritic cell migration. *Curr. Opin. Immunol.* 52, 74–80.
- Samanta, A., Hughes, T.E.T., Moiseenkova-Bell, V.Y., 2018. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem* 87, 141–165.
- Samie, M., Wang, X., Zhang, X., Goschka, A., Li, X., Cheng, X., Gregg, E., Azar, M., Zhuo, Y., Garrity, A.G., Gao, Q., Slaugenhaupt, S., Pickel, J., Zolov, S.N., Weisman, L.S., Lenk, G.M., Titus, S., Bryant-Genevier, M., Southall, N., Juan, M., Ferrer, M., Xu, H., 2013. A TRP channel in the lysosome regulates large particle phagocytosis via focal exocytosis. *Dev. Cell* 26, 511–24.
- Samie, M.A., Grimm, C., Evans, J.A., Curcio-Morelli, C., Heller, S., Slaugenhaupt, S.A., Cuajungco, M.P., 2009. The tissue-specific expression of TRPML2 (MCOLN-2) gene is influenced by the presence of TRPML1. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 459, 79–91.
- Sampson, C.J., Amin, U., Couso, J.-P., 2013. Activation of *Drosophila* hemocyte motility by the ecdysone hormone. *Biol. Open* 2, 1412–20.
- Schiefermeier, N., Scheffler, J.M., de Araujo, M.E.G., Stasyk, T., Yordanov, T., Ebner, H.L., Offterdinger, M., Munck, S., Hess, M.W., Wickström, S. a, Lange, A., Wunderlich, W., Fässler, R., Teis, D., Huber, L. a, 2014. The late endosomal p14-MP1 (LAMTOR2/3) complex regulates focal adhesion dynamics during cell migration. *J. Cell Biol.* 205, 525–540.
- Schnoor, M., Schnoor, M., 2015. Endothelial Actin-Binding Proteins and Actin Dynamics in Leukocyte Transendothelial Migration. *J Immunol* 194, 3535–3541.
- Scholey, J.M., Taylor, K.A., Kendrick-jones, J., 1980. Regulation of non-muscle myosin assembly by calmodulin-dependent light chain kinase. *Nature*.
- Schott, S., Ambrosini, A., Barbaste, A., Benassayag, C., Gracia, M., Proag, A., Rayer, M., Monier, B., Suzanne, M., 2017. A fluorescent toolkit for spatiotemporal tracking of apoptotic cells in living *Drosophila* tissues. *Development* 144, 3840–3846.
- Sellers, J.R., Eisenberg, E., Adelstein, R.S., 1982. The binding of smooth muscle heavy meromyosin to actin in the presence of ATP. Effect of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 257, 13880–13883.
- Settembre, C., Ballabio, A., 2014. Lysosomal adaptation: How the lysosome responds to external cues. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, 1–16.
- Settembre, C., Polito, V.A., Arencibia, M.G., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D.C., Ballabio, A., 2011. TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. *Science* (80-.). 332, 1429–1433.
- Siekhaus, D., Haesemeyer, M., Moffitt, O., Lehmann, R., 2010. RhoL controls invasion and Rap1 localization during immune cell transmigration in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.* 12, 605–610.
- Slauch, J.M., 2011. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still

an open question. *Mol Microbiol* 80, 580–583.

Slusarski, D.C., Pelegri, F., 2007. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Dev. Biol.* 307, 1–13.

Smith, A., Carrasco, Y.R., Stanley, P., Kieffer, N., Batista, F.D., Hogg, N., 2005. A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J. Cell Biol.* 170, 141–151.

Somlyo, A.P., Somlyo, A. V., 2003. Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol. Rev.* 83, 1325–1358.

Sopko, R., Lin, Y. Bin, Makhijani, K., Alexander, B., 2015. A Systems-Level Interrogation Identifies Regulators of *Drosophila* Blood Cell Number and Survival. *PLOS Genet.* 11, e1005056.

Sterea, A.M., Almasi, S., El Hiani, Y., 2018. The hidden potential of lysosomal ion channels: A new era of oncogenes. *Cell Calcium* 72, 91–103.

Stroka, K.M., Hayenga, H.N., Aranda-espinoza, H., 2013. Human Neutrophil Cytoskeletal Dynamics and Contractility Actively Contribute to Trans-Endothelial Migration. *PLoS One* 8, e61377.

Sukumaran, P., Schaar, A., Sun, Y., Singh, B.B., 2016. Functional role of TRP channels in modulating ER stress and Autophagy. *Cell Calcium* 1–10.

Suraneni, P., Fogelson, B., Rubinstein, B., Noguera, P., Volkmann, N., Hanein, D., Mogilner, A., Li, R., 2015. A mechanism of leading-edge protrusion in the absence of Arp2/3 complex. *Mol. Biol. Cell* 26, 901–912.

Swanson, J.A., 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 639–49.

Swenson, A.M., Trivedi, D. V., Rauscher, A.A., Wang, Y., Takagi, Y., Palmer, B.M., Málnási-Csizmadia, A., Debold, E.P., Yengo, C.M., 2014. Magnesium modulates actin binding and ADP release in myosin motors. *J. Biol. Chem.* 289, 23977–23991.

Swulius, M.T., Waxham, M.N., 2008. Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinases. *Cell Mol Life Sci* 65, 2637–2657.

Szule, J.A., Jarvis, S.E., Hibbert, J.E., Spafford, J.D., Braun, J.E.A., Zamponi, G.W., Wessel, G.M., Coorsen, J.R., 2003. Calcium-triggered Membrane Fusion Proceeds Independently of Specific Presynaptic Proteins. *J Biol Chem* 278, 24251–24254.

Tan, I., Yong, J., Dong, J.M., Lim, L., Leung, T., 2008. A Tripartite Complex Containing MRCK Modulates Lamellar Actomyosin Retrograde Flow. *Cell* 135, 123–136.

Tang, Y., Pan, B., Zhou, X., Xiong, K., Gao, Q., Huang, L., Xia, Y., Shen, M., Yang, S., Liu, H., Tan, T., Ma, J., Xu, X., Mu, Y., Li, K., 2017. Wip1-dependent modulation of macrophage migration and phagocytosis. *Redox Biol.* 13, 665–673.

- Thapa, N., Sun, Y., Schramp, M., Choi, S., Ling, K., Anderson, R.A., 2012. Phosphoinositide Signaling Regulates the Exocyst Complex and Polarized Integrin Trafficking in Directionally Migrating Cells. *Dev Cell* 22, 116–130.
- Thompson, E.G., Schaheen, L., Dang, H., Fares, H., 2007. Lysosomal trafficking functions of mucolipin-1 in murine macrophages. *BMC Cell Biol.* 8, 54.
- Thuma, L., Carter, D., Weavers, H., Martin, P., 2018. Drosophila immune cells extravasate from vessels to wounds using Tre1 GPCR and Rho signaling. *J Cell Biol* 217, 3045–3056.
- Tomasello, M., Kirby, S., Polich, L., Senghas, R.J., Wanner, E., Gleitman, L.R., Morford, J.P., Coppola, M., Kegl, J., Senghas, A., Coppola, M., Degraff, M., Senghas, A., Senghas, A., Coppola, M., Senghas, A., Kita, S., McNeill, D., Talmy, L., Shopen, T., 2004. Two Distinct Actin Networks Drive the Protrusion of. *Science* (80). 305, 1782–1787.
- Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D.J., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Matsumura, F., 2004. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *JCB* 164, 427–439. <https://doi.org/10.1083/jcb.200306172>
- Trapani, V., Arduini, D., Cittadini, A., Wolf, F.I., 2014. From magnesium to magnesium transporters in cancer: TRPM7, a novel signature in tumour development. *Magnes. Res.* 26, 149–155.
- Tsai, F.C., Kuo, G.H., Chang, S.W., Tsai, P.J., 2015. Ca²⁺ signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis. *Biomed Res Int* 2015, 409245.
- Tsai, F.C., Meyer, T., 2012. Ca²⁺ pulses control local cycles of lamellipodia retraction and adhesion along the front of migrating cells. *Curr. Biol.* 22, 837–842.
- Tyson, R.A., Zatulovskiy, E., Kay, R.R., Bretschneider, T., 2014. How blebs and pseudopods cooperate during chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 11703–11708.
- Ueda, Y., Katagiri, K., Tomiyama, T., Yasuda, K., Habiro, K., Katakai, T., Ikehara, S., Matsumoto, M., Kinashi, T., 2012. Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen recognition in the thymus. *Nat. Commun.* 3, 1013–1098.
- Vargas, P., Maiuri, P., Bretou, M., Saéz, P.J., Pierobon, P., Maurin, M., Chabaud, M., Lankar, D., Obino, D., Terriac, E., Raab, M., Thiam, H.R., Brocker, T., Kitchen-Goosen, S.M., Alberts, A.S., Sunareni, P., Xia, S., Li, R., Voituriez, R., Piel, M., Lennon-Duménil, A.M., 2016. Innate control of actin nucleation determines two distinct migration behaviours in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 18, 43–53.
- Venkatachalam, K., Long, a A., Elsaesser, R., Nikolaeva, D., Broadie, K., Montell, C., 2008. Motor deficit in a Drosophila model of mucopolidosis type IV due to defective clearance of apoptotic cells. *Cell* 135, 838–51.
- Venkatachalam, K., Wong, C., Montell, C., 2013. Feast of Famine: Role of TRPML in preventing cellular amino acid starvation. *Autophagy* 9, 98–100.
- Venkatachalam, K., Wong, C.O., Zhu, M.X., 2015. The role of TRPMLs in endolysosomal trafficking and function. *Cell Calcium* 58.

- Venugopal, B., Browning, M.F., Curcio-Morelli, C., Varro, A., Michaud, N., Nanthakumar, N., Walkley, S.U., Pickel, J., Slaughter, S. a, 2007. Neurologic, gastric, and ophthalmologic pathologies in a murine model of mucopolidosis type IV. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 1070–83.
- Vereshchagina, N., Bennett, D., Szoor, B., Kirchner, J., Gross, S., Vissi, E., White-Cooper, H., Alphey, L., 2004. The Essential Role of PP1 in *Drosophila* Is to Regulate Nonmuscle Myosin. *Mol. Biol. Cell* 15, 4395–4405.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., Horwitz, a. R., 2009a. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 778–790.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., Horwitz, A.R., 2009b. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 778–790.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J., Horwitz, a R., 2005. Cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* 118, 4917–9.
- Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L., Choi, C.K., Horwitz, A.F., 2007. Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J. Cell Biol.* 176, 573–580.
- Vijayraghavan, K., Perrimon, N., 2013. *Drosophila* abdominal muscles. *Dev Biol* 383, 275–284.
- Vincent, A., 2010. Neither Too Much Nor Too Little: Reactive Oxygen Species Levels Regulate *Drosophila* Hematopoiesis. *J. Mol. Cell Biol.* 2, 74–75.
- Wang, W., Gao, Q., Yang, M., Zhang, X., Yu, L., Lawas, M., Li, X., Bryant-Geneviev, M., Southall, N.T., Marugan, J., Ferrer, M., Xu, H., 2015. Up-regulation of lysosomal TRPML1 channels is essential for lysosomal adaptation to nutrient starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201419669.
- Watanabe, T., Noritake, J., Kaibuchi, K., 2005. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* 15, 76–83.
- Wei, C., Wang, X., Zheng, M., Cheng, H., 2012. Calcium gradients underlying cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 254–61.
- Wells, C., Parsons, M., 2011. Cell Migration. *Developmental Methods and Protocols.*
- Wen, M.-H., Wang, J.-Y., Chiu, Y.-T., Wang, M.-P., Lee, S.-P., Tai, C.-Y., 2016. N-cadherin regulates cell migration through a Rab5-dependent temporal control of macropinocytosis. *Traffic.*
- Wendt, T., Taylor, D., Trybus, K.M., Taylor, K., 2001. Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2. *PNAS* 98, 4361–4366.
- Wong, C.O., Gregory, S., Hu, H., Chao, Y., Sepúlveda, V.E., He, Y., Li-Kroeger, D., Goldman, W.E., Bellen, H.J., Venkatachalam, K., 2017. Lysosomal Degradation Is

Required for Sustained Phagocytosis of Bacteria by Macrophages. *Cell Host Microbe* 21, 719–730.e6.

Wong, C.O., Li, R., Montell, C., Venkatachalam, K., 2012. *Drosophila* TRPML is required for TORC1 activation. *Curr. Biol.* 22, 1616–1621.

Wood, W., Jacinto, A., 2007. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 542–551.

Wu, C., Asokan, S.B., Berginski, M.E., Haynes, E.M., Sharpless, N.E., Griffith, J.D., Gomez, S.M., Bear, J.E., 2012. Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell* 148, 973–987.

Xu, H., Ren, D., 2015. Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol* 77, 57–80.

Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T., Bourne, H.R., 2003. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* 114, 201–214.

Yam, P.T., Wilson, C.A., Ji, L., Hebert, B., Barnhart, E.L., Dye, N.A., Wiseman, P.W., Danuser, G., Theriot, J.A., 2007. Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *J. Cell Biol.* 178, 1207–1221.

Yamanaka, N., Rewitz, K.F., O'Connor, M.B., 2013. Ecdysone Control of Developmental Transitions: Lessons from *Drosophila* Research. *Annu Rev Entomol* 58, 497–516.

Yang, Y., Primrose, D.A., Leung, A.C., Fitzsimmons, R.B., McDermid, M.C., Missellbrook, A., Haskins, J., Smylie, A.L.S., Hughes, S.C., 2012. The PP1 phosphatase Flapwing regulates the activity of Merlin and Moesin in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 361, 412–426.

Yao, L., Guo, X., Gui, Y., 2018. Acetyl-CoA Synthetase 2 Promotes Cell Migration and Invasion of Renal Cell Carcinoma by Upregulating Lysosomal-Associated Membrane Protein 1 Expression. *Cell. Physiol. Biochem.* 45, 984–992.

Yumura, S., Mori, H., Fukui, Y., 1984. Localization of actin and myosin for the study of ameboid movement in *Dictyostelium* using improved immunofluorescence. *J. Cell Biol.* 99, 894–899.

Zeevi, D. a, Frumkin, A., Bach, G., 2007. TRPML and lysosomal function. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 851–8.

Zheng, C.G., Zhang, F., Bao, X.M., Wu, S.Y., Wang, P., Zhou, J.N., Gao, Y., Teng, H.L., Wang, Y., Huang, Z.H., 2017. Polarized Distribution of Active Myosin II Regulates Directional Migration of Cultured Olfactory Ensheathing Cells. *Sci. Rep.* 7, 1–12.

Zhong, X.Z., Yang, Y., Sun, X., Dong, X.P., 2017. Methods for monitoring Ca²⁺ and ion channels in the lysosome. *Cell Calcium* 64, 20–28.

ANEXO 1. Generación de un protocolo para inducir la polarización de hemocitos *ex vivo*

A continuación, se presentarán las figuras más relevantes de la publicación generada dentro del marco de esta tesis: Edwards SS, Delgado MG, Nader G, Bellaiche Y, Lennon-Duménil AM, Glavic A. “An *in vitro* method for studying subcellular rearrangements during cell polarization in *Drosophila melanogaster* hemocytes”. *Mech Dev.* 2018 Aug 7. pii: S0925-4773(18)30062-5.

Con el fin de realizar estudios con alta resolución temporal y espacial a nivel subcelular en hemocitos migratorios, durante el curso de esta tesis, se intentó desarrollar un método que promoviera el desplazamiento de hemocitos larvarios *ex vivo*. En primera instancia se evaluó en microcanales de PDMS (Figura Anexa 1A), pues dentro de ellos, las células se encuentran confinadas, y se ha descrito en diversos tipos celulares, que esta condición favorece la migración. Lamentablemente nunca logramos que los hemocitos ingresaran dentro de estas estructuras, por lo que procedimos a la utilización de confinamiento en 2 dimensiones, donde 2 cubreobjetos se separan por micropilares de PDMS como lo indica la Figura Anexa 1B.

Se evaluó en distintas condiciones de confinamiento, usando los 4 μm como punto de partida, pues es esta la altura aproximada que alcanza el cuerpo celular en condiciones no confinadas (Figura Anexa 1C).

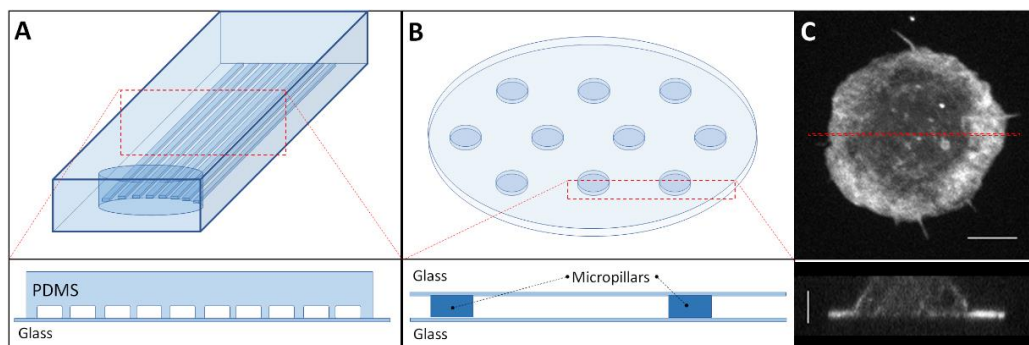


Figura Anexa 1. Montaje experimental para generar confinamiento

Se muestran esquemas representativos de ambas aproximaciones para generar confinamiento en visión superior y lateral: **A)** Confinamiento en 1D: Moldes de PDMS adheridos a vidrio, generando microcanales de dimensiones $5 \times 5 \mu\text{m}$. Las células son sembradas en el agujero cercano al sitio de entrada a los canales. **B)** Confinamiento en 2D: Cubreobjetos modificado con pilares de PDMS separados equitativamente, que se aplica sobre placas de cultivo con base de vidrio. La altura de los micropilares utilizada varió entre $4 \mu\text{m}$ y $1,5 \mu\text{m}$, generando con ello, distintos grados de confinamiento. **C)** Imagen representativa de un hemocito cultivado sin confinamiento (visión superior y lateral). Barra de tamaño: $4 \mu\text{m}$ (tanto XY como XZ).

Se suplementó el medio de cultivo de los hemocitos con la hormona esteroideal 20-hidroxiecdisona, responsable de promover la migración de estas células *in vivo*. (Sampson y cols., 2013). En esta condición tampoco se observó migración de los hemocitos, sin embargo, sí se observó una notoria polarización de las células.

Este resultado indica que la polarización y migración pueden desacoplarse en estas células. Por lo tanto, quisimos utilizar la fase polarizada de los hemocitos para el estudio de la redistribución subcelular de componentes asociados al quiebre de simetría, que es un evento fundamental para que una célula comience a migrar.

Primero determinamos el índice de circularidad (*Roundness Index* con el software ImageJ), que corresponde a la razón entre los ejes mayores perpendiculares entre sí, de la elipse ajustada a la forma del hemocito, y definimos como umbral, un índice menor a 0.9 para considerar a la célula como polarizada.

Posteriormente, evaluamos la respuesta a distintas concentraciones de hormona 20E a utilizar (Figura Anexa 3), donde determinamos que una concentración equivalente a 15 $\mu\text{g/ml}$ nos otorgó la mayor proporción de hemocitos polarizados, por lo que todos los ensayos de polarización posteriores se realizaron con esta concentración de 20E.

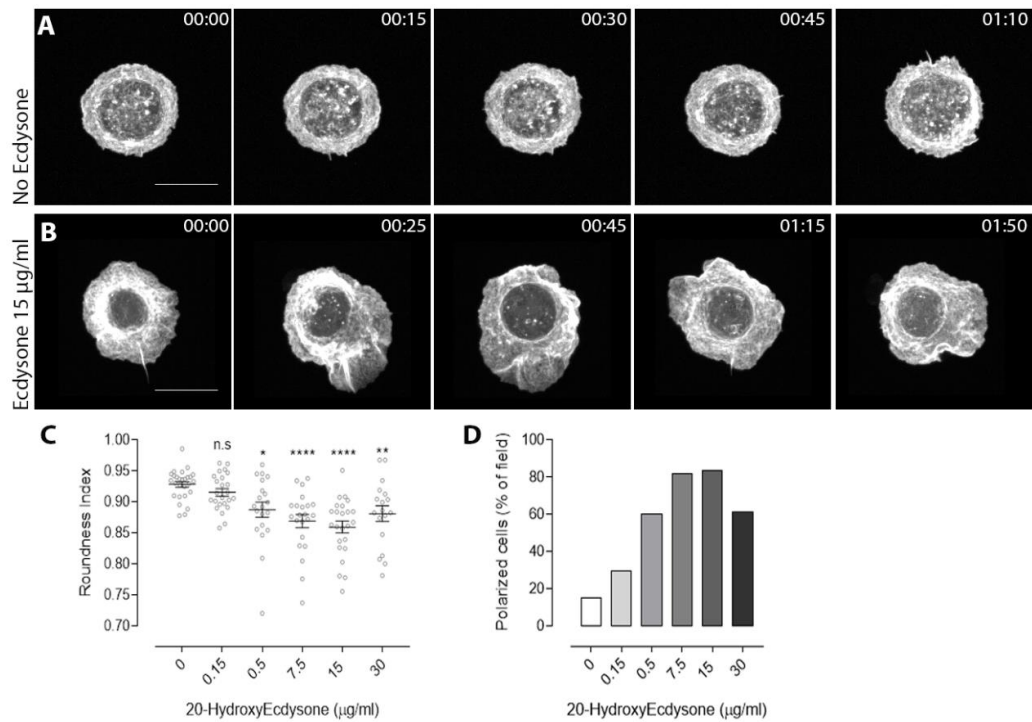


Figura Anexa 2. Polarización de hemocitos en respuesta a Ecdisona sin confinamiento

Cultivo primario de hemocitos expresando LifeActGFP sobre placas con base de vidrio, tratadas con colágeno tipo IV en medio suplementado con 20E. **A)** Imágenes representativas de un hemocito no polarizado (sin 20E) registrado en el tiempo. **B)** Imágenes representativas de un hemocito polarizado (15 $\mu\text{g/ml}$ de 20E), presentando una clara lamela que cambia dinámicamente su dirección en el tiempo. Formato de tiempo es hh:mm. Barra de tamaño: 10 μm . **C)** Polarización de hemocitos en respuesta a distintas concentraciones de 20E (N=3 experimentos independientes/concentración, $n \geq 60$ hemocitos/experimento). El *Roundness Index* (R.I) corresponde a la relación entre el eje mayor y menor de la elipse ajustada a la forma de la célula. Los valores representados corresponden al R.I promedio durante películas de 2 horas (intervalos de 5 minutos). Todas las comparaciones son respecto del control sin hormona. ANOVA de 1 vía. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. **D)** Se muestra la proporción de hemocitos polarizados por concentración (R.I < 0,9), siendo 14,8% (control), 29,2% (150ng/ml), 60,0% (500ng/ml), 81,8% (7,5 $\mu\text{g/ml}$), 83,3% (15 $\mu\text{g/ml}$) y 61,1% (30 $\mu\text{g/ml}$).

Vimos que la respuesta de polarización de hemocitos larvarios cultivados con 15 $\mu\text{g/ml}$ de hormona es equivalente a la de hemocitos extraídos desde pupas jóvenes (2h APF) en ausencia de hormona, sugiriendo que la respuesta de polarización inducida farmacológicamente es equivalente a la que ocurre naturalmente *in vivo* (Figura Anexa 4A)

Demostramos a su vez que este fenómeno es dependiente del receptor de ecdisona, pues la respuesta de polarización desaparece al expresar distintas versiones dominante-negativo de monómeros del receptor heterodimérico (Figura Anexa 4B).

Se ha mostrado que 20E promueve el arresto del ciclo celular y apoptosis (Vijayraghavan & Perrimon, 2014; Sopko y cols., 2015; Guo y cols., 2016). Por lo tanto, evaluamos si los rearrreglos del citoesqueleto correspondían a una respuesta apoptótica a las concentraciones de 20E utilizadas. Para ello, utilizamos uno de los reporteros fluorescentes de actividad caspasa desarrollado por los grupos de Suzanne y Monier (Schott y cols., 2017). En nuestros cultivos, la señal del reportero fue visible en algunos casos a partir de las 2 horas de cultivo (tanto cultivo en medio control como complementado con 20E), mientras que en otros casos, a partir de las 4 horas (Figura Anexa 5A,B). Estos resultados indican que el inicio de la actividad caspasa ocurre al menos luego de 2 horas de cultivo, lo cual valida nuestro método, pues todos los análisis se realizaron en cultivos con una exposición máxima a la hormona de 2 horas.

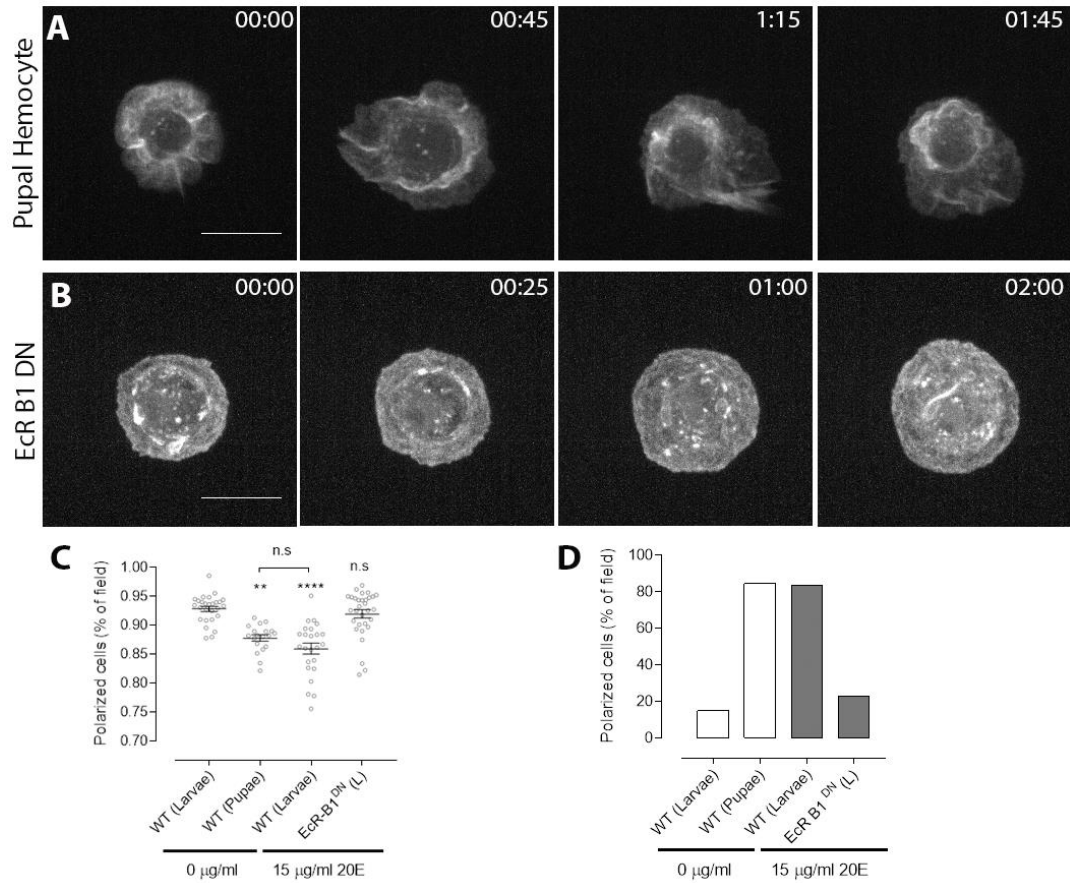


Figura Anexa 3. Polarización de hemocitos pupales y respuesta a Ecdisona

Imágenes representativas de cultivos primarios de hemocitos expresando LifeAct-GFP, cultivados en placas con fondo de vidrio tratadas con colágeno tipo IV, que fueron registradas en el tiempo (hh:mm). **A)** Los hemocitos pupales presentan una lamela clara, que cambia su dirección de polarización de forma dinámica en el tiempo, sin la adición de 20E al medio. **B)** Hemocitos larvarios expresando un dominante negativo del receptor de 20E (EcRB1), cultivados con 15 µg/ml de 20E, pierden la capacidad de polarizar, comportándose como hemocitos larvarios cultivados en ausencia de 20E. Barra de tamaño: 10 µm. **C)** R.I promedio de hemocitos cultivados durante 2h ($n \geq 20$ hemocitos/condición). Las comparaciones son respecto de hemocitos larvarios en ausencia de 20E, excepto cuando se indica comparación específica. ANOVA de 1 vía. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. **D)** Proporción de hemocitos polarizados por concentración (R.I $< 0,9$): 14,8% (larva WT, 0µg/ml), 84,2% (pupa WT, 0µg/ml), 83,3% (larva WT, 15µg/ml) y 22,6% (larva *EcR-B1^{DN}*, 15µg/ml).

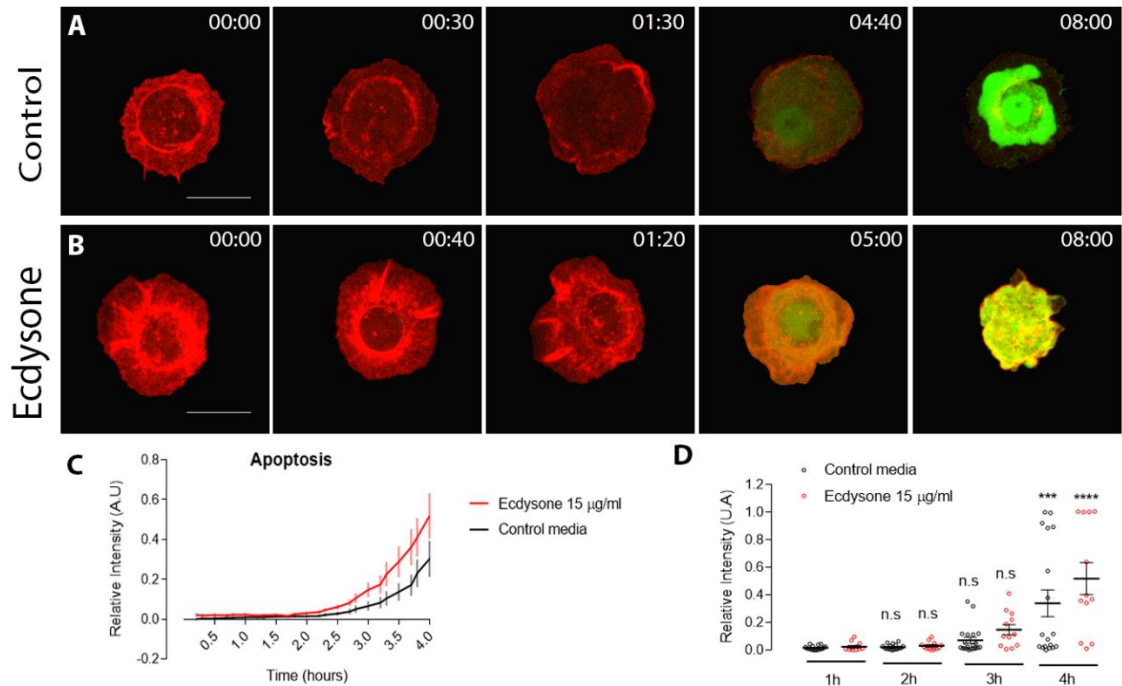


Figura Anexa 4. Actividad caspasa en hemocitos larvarios en respuesta a Ecdisona

Hemocitos primarios expresando LifeAct-Ruby y sensor de actividad caspasa GC_3Ai, cultivados sobre placas de vidrio tratadas con colágeno tipo IV en medio de cultivo control (A) o suplementado con 15 µg/ml de 20E (B). Se muestran imágenes representativas de un video (hh:mm). Barra de tamaño: 10 µm. C) Intensidad relativa de señal en el canal verde (reportero activo) en el tiempo representado como promedio ± E.E, normalizado respecto de la máxima señal obtenida luego de 8h de cultivo (n ≥ 12 hemocitos/condición). D) Actividad caspasa relativa a tiempos específicos de comenzado el registro (1, 2, 3 y 4h), revelando que las diferencias significativas en muerte celular comienzan luego de 4 horas de comenzado el tratamiento. En todas las condiciones, las comparaciones son respecto de 1 hora de cultivo. ANOVA de 1 vía, *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Posteriormente, evaluamos la redistribución de componentes intracelulares luego del quiebre de simetría. Primero nos enfocamos en las vesículas acídicas y el citoesqueleto de actina, que han mostrado previamente una redistribución hacia la región posterior de células dendríticas migrando en 1D (Bretou y cols., 2017). Estas estructuras se marcaron fluorescentemente con LysoTracker Red y LifeAct-GFP, respectivamente. Interesantemente, observamos que las vesículas acídicas se encuentran dispersas por el cuerpo celular en células no polarizadas (Figura Anexa

6A) pero se distribuyen hacia la región posterior, opuesta a la lamela extendida (Figura Anexa 6A') luego del quiebre de simetría.

Se ha descrito ampliamente que la interacción entre Miosina-II y filamentos de actina retraen la parte posterior del cuerpo celular durante la migración de muchos tipos celulares (Cramer, 2013), por tanto, evaluamos la redistribución de este motor molecular, mediante el marcaje del citoesqueleto de actina y miosina con las proteínas de fusión LifeAct-Ruby y Sqh-GFP, respectivamente (Figura Anexa 6B,B'). Encontramos que esta molécula se redistribuye hacia la región posterior en hemocitos polarizados, al igual que previamente observado en DCs migratorias *in vitro* (Bretou y cols., 2017; Chabaud y cols., 2015).

Posteriormente, evaluamos la distribución de la red de microtúbulos mediante el uso del reportero endógeno Tubulina-GFP, que se distribuye de manera homogénea por el cuerpo celular en hemocitos no polarizados (Figura Anexa 6C), y se relocalizó hacia el “frente de migración” en hemocitos polarizados (Figura Anexa 6C'), similar a lo descrito para hemocitos embrionarios migrando *in vivo* (Davis y cols., 2015).

Finalmente evaluamos la distribución del complejo Arp2/3 mediante la expresión ectópica de Arp3-GFP. Esta molécula se vio enriquecida en la periferia de hemocitos no polarizadas (Figura Anexa 6D), pero cambió su distribución hacia la región de la lamela extendida luego del quiebre de simetría del hemocito (Figura Anexa 6D').

Dichas observaciones se correlacionan con modelos clásicos de protrusiones en el frente de migración, donde la polimerización ramificada de actina es nucleada por el complejo Arp2/3 (Wu y cols., 2012; Suraneni y cols., 2015).

En todas las condiciones evaluadas, existe una importante redistribución celular en respuesta a 20E (Figura Anexa 6E-H, E'-H', E''-H''), y dichos cambios de

distribución, se correlacionan con cambios descritos previamente en células migratorias.

En su conjunto, estos resultados refuerzan este método para el estudio de la distribución de organelos y citoesqueleto en hemocitos polarizados, un paso fundamental para la migración celular direccionada.

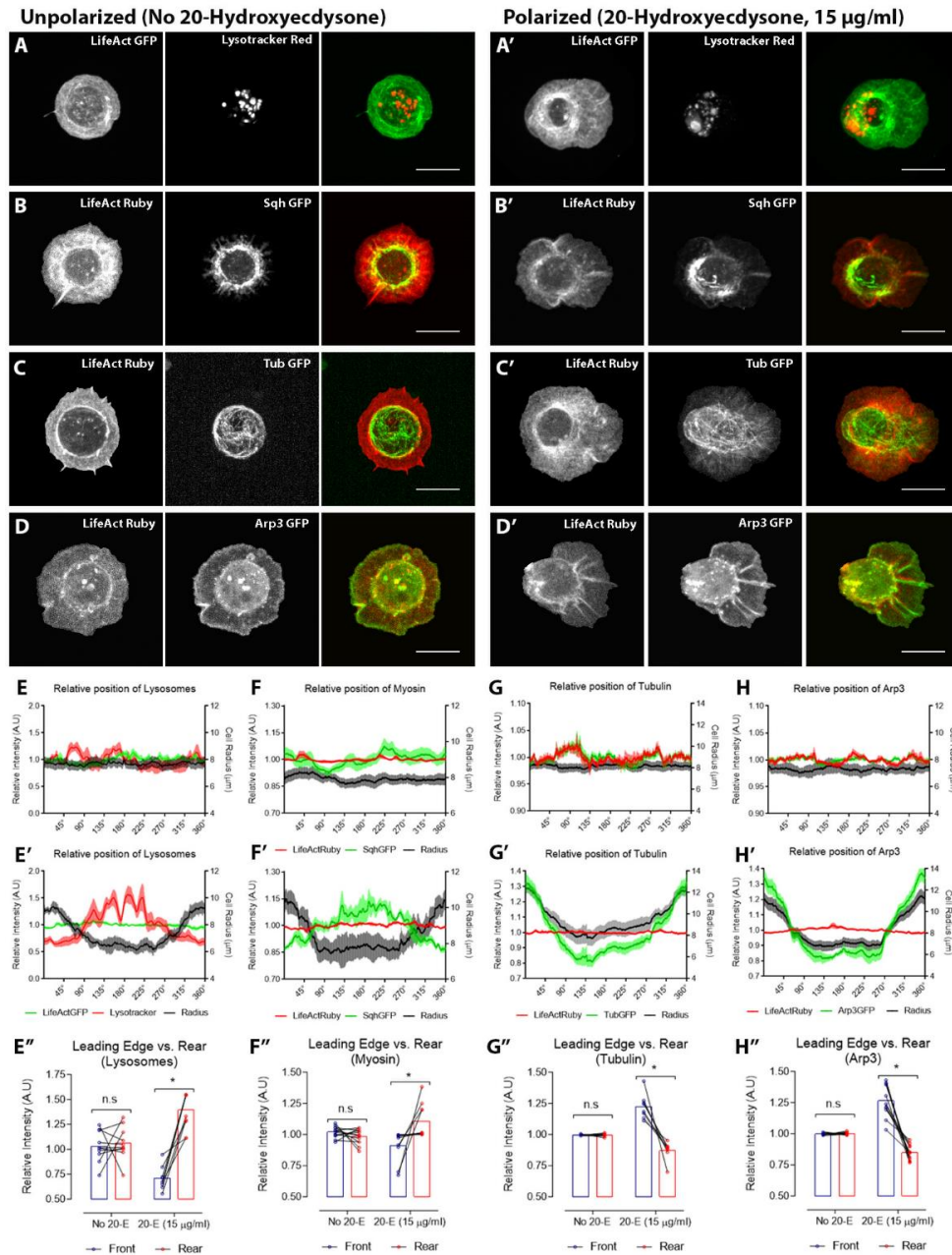


Figura Anexa 5. Rearreglos subcelulares durante la polarización de hemocitos

Cultivo primario de hemocitos larvarios cultivados en placas de vidrio tratadas con colágeno tipo IV. Imágenes representativas de hemocitos cultivados en medio control (**A-D**) o suplementado con 15 µg/ml de 20E (**A'-D'**). Hemocitos expresando LifeAct-GFP y teñidos con LysoTracker Red (**A-A'**), LifeAct-Ruby y Sqh-GFP (**B, B'**), LifeAct-Ruby y Tubulina-GFP (**C, C'**) o LifeAct-Ruby y Arp3-GFP (**D-D'**). Barra de tamaño: 10 µm. **E-H**) Cuantificación de distribución radial de lisosomas (**E**), Miosina-II (**F**), tubulina (**G**) y Arp3 (**H**) en hemocitos no polarizados (**E-H**) y polarizados (**E'-H'**). La distribución va de 0° a 360°, donde 0° corresponde al centro de la lamela extendida y 180° al centro de la región posterior. En células no polarizadas, el 0° se designó de forma aleatoria. **E''-H''**) Distribución de señal del frente (315-360°, 0-45°) comparado con la región posterior (135-225°), mostrando diferencias significativas en células polarizadas. ANOVA de 2 vías, * $p < 0,05$. ($n \geq 12$ hemocitos/condición).

ANEXO 2. Rol de TOR en la dinámica del citoesqueleto y migración de hemocitos

Se ha mostrado en cuerpo graso de *Drosophila*, que la actividad de Trpml es antagonista con la actividad del complejo 1 de TOR (Wong y cols., 2012), se evaluó si esto era cierto también en el caso de los hemocitos.

Demostramos que la inhibición de TORC1, mediante el uso de Rapamicina, o bien, la inhibición de ambos complejos (TORC1 y TORC2) mediante el uso de Torin1, no inducen la apertura del canal (Figura Anexa 6A). Esto podría explicarse en las funciones diferentes que existen entre ambos tipos celulares (Trpml cumple un rol importante en procesos de autofagia en el cuerpo graso, donde la detección de nutrientes es fundamental).

Asimismo, vimos que la pérdida de función de *tor* mediada por RNAi en hemocitos pupales decrece significativamente su velocidad de migración (Figura Anexa 6B). Finalmente demostramos que la inhibición de TOR mediante el uso de Torin1 disminuye significativamente la dinámica de cambio de área de la lamela en hemocitos controles, no así en hemocitos deficientes de *trpml* (Figura Anexa 6C-D).

Los experimentos recién descritos, llevan a una disminuida actividad de TOR, pero no permiten discriminar si el fenómeno corresponde a la pérdida de función de TORC1, TORC2 o ambos.

Cabe destacar que se ha demostrado en cultivo celular (células HEK293), que iones Ca^{2+} liberados a través de los lisosomas, al interactuar con calmodulina, pueden promover la activación de TORC1 (R. J. Li y cols., 2016), por lo que podemos especular que, en este contexto, la actividad de Trpml podría también estar

promoviendo la actividad de TORC1. Asimismo, debemos considerar que el proceso de macropinocitosis promueve la señalización de TORC1 (Commisso y cols., 2013), y que hemocitos *trpml*¹ presentan capacidades fagocíticas reducidas, lo que refuerza la idea de que TORC1 se encuentra disminuido en hemocitos deficientes de *trpml*.

Por su parte, tampoco podemos descartar el efecto sobre TORC2, puesto que este complejo ha sido importantemente vinculado con la regulación del citoesqueleto (Jacinto y cols., 2004).

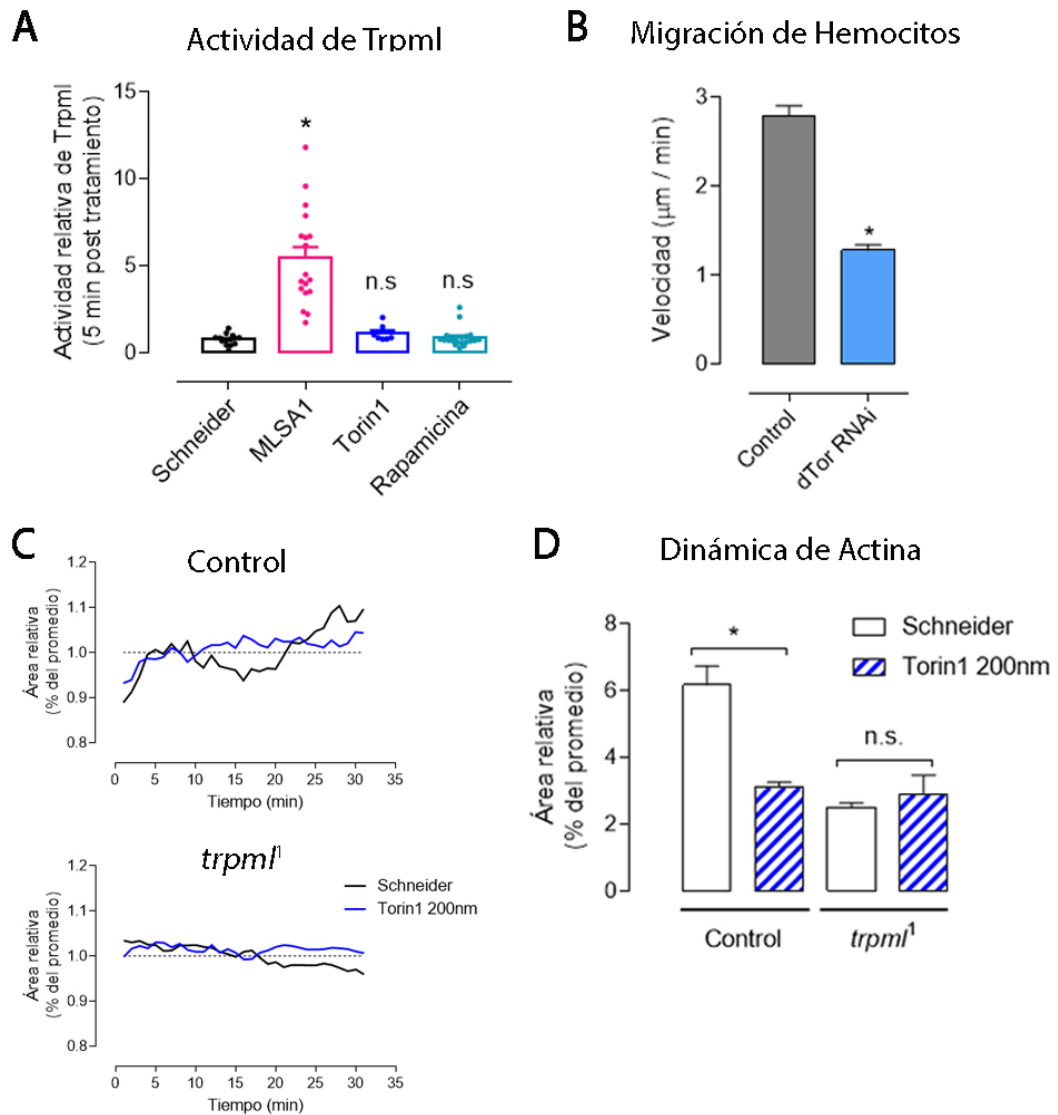


Figura Anexa 6. Los niveles de actividad de dTor inciden en la migración y dinámica del citoesqueleto, pero no en la actividad de Trpml

A) Actividad relativa de Trpml medido mediante el uso del reportero de Ca^{2+} , Trpml-GCaMP.5, en hemocitos cultivados en presencia de inhibidores de TOR (Torin1) y de TORC1 (Rapamicina). A diferencia del agonista MLSA1, los inhibidores de Tor no inciden directamente en la apertura del canal. ANOVA de 1 vía, * $p < 0,05$ respecto del medio control Schneider ($n \geq 15$ hemocitos/condición). **B)** Velocidad de migración de hemocitos pupales con pérdida de función de *tor* mediado por RNAi presenta velocidades de migración significativamente menores que los controles. t-test, * $p < 0,05$ ($N \geq 4$ animales/condición, $n \geq 20$ hemocitos/animal). **C)** Dinámica de cambio de área de la lamela en hemocitos controles (superior) y *trpml*¹ (inferior) cultivados en medio control (Schneider, línea negra) e inhibidor de TOR (Torin1, línea azul). **D)** La dinámica disminuye importantemente al inhibir TOR en hemocitos controles, mientras que en hemocitos *trpml*¹ no hay cambios significativos. ANOVA de 1 vía, * $p < 0,05$ respecto del medio control Schneider ($n \geq 5$ hemocitos/condición).

ANEXO 3. Contribución materna de transcritos *trpml*

Se realizaron ensayos de migración de hemocitos en embriones, en condiciones control, y con pérdida de función de *trpml*, tanto mutante *trpml*¹ como mediada por RNAi en los hemocitos. Para ello se utilizaron embriones expresando GFP exclusivamente en los hemocitos, dirigido por el uso conjunto de los *drivers serpent* y *croquemort*.

Nuestros resultados revelan un retraso en la dispersión de embriones, exclusivamente en la condición de pérdida de función mediada por RNAi (Figura 10), mientras que en animales mutantes no hay un fenotipo aparente (Figura Anexa 7A). Asimismo, al observar los hemocitos de cerca, se puede apreciar que los hemocitos *trpml*¹ despliegan extensas lamelas de manera equivalente a los controles (Figura Anexa 7B), contrario a lo que observamos en hemocitos pupales (Figura 12).

Esto se debe probablemente a la contribución materna de transcritos *trpml*, que suplen las deficiencias en los embriones mutantes. Para evaluar si esta posibilidad es cierta, cuantificamos los niveles relativos de transcrito de *trpml* durante las distintas etapas de desarrollo embrionario mediante qPCR (Figura Anexa 7C). Los resultados indican que existen niveles importantes del transcrito en embriones tempranos (entre 0 y 2 horas posterior a la puesta de embriones, AEL del inglés *after egg laying*), que decrecen con el tiempo de desarrollo, presentando un alza entre las 13 y 15 horas AEL, que se mantiene hasta las 22h AEL. Dichos estadios corresponden justamente al periodo de dispersión de hemocitos evaluado: entre E14 y E16 (Wood & Jacinto, 2007).

Dado el alza observado en el periodo 13-15 h AEL, lo más probable es que el origen de estos transcritos sea embrionario, y no materno, por lo que esta alza no se observaría en embriones *trpml*¹. No se hicieron cuantificaciones en embriones mutantes, puesto la selección de embriones homocigotos mutantes en estadios tempranos es compleja, y con ello, la obtención de material suficiente para la extracción de mRNA. Pero podemos especular que la ausencia de fenotipo en los embriones mutantes se deba a los transcritos remanentes de estadios previos, que fueron traducidos y la proteína sigue presente en estas células pese al decaimiento en los niveles de transcrito. O bien, que dada la ausencia de transcripción en el alelo nulo *trpml*¹, los transcritos maternos permanezcan durante mayor tiempo en los embriones, para compensar la falta de nuevos transcritos de *trpml*.

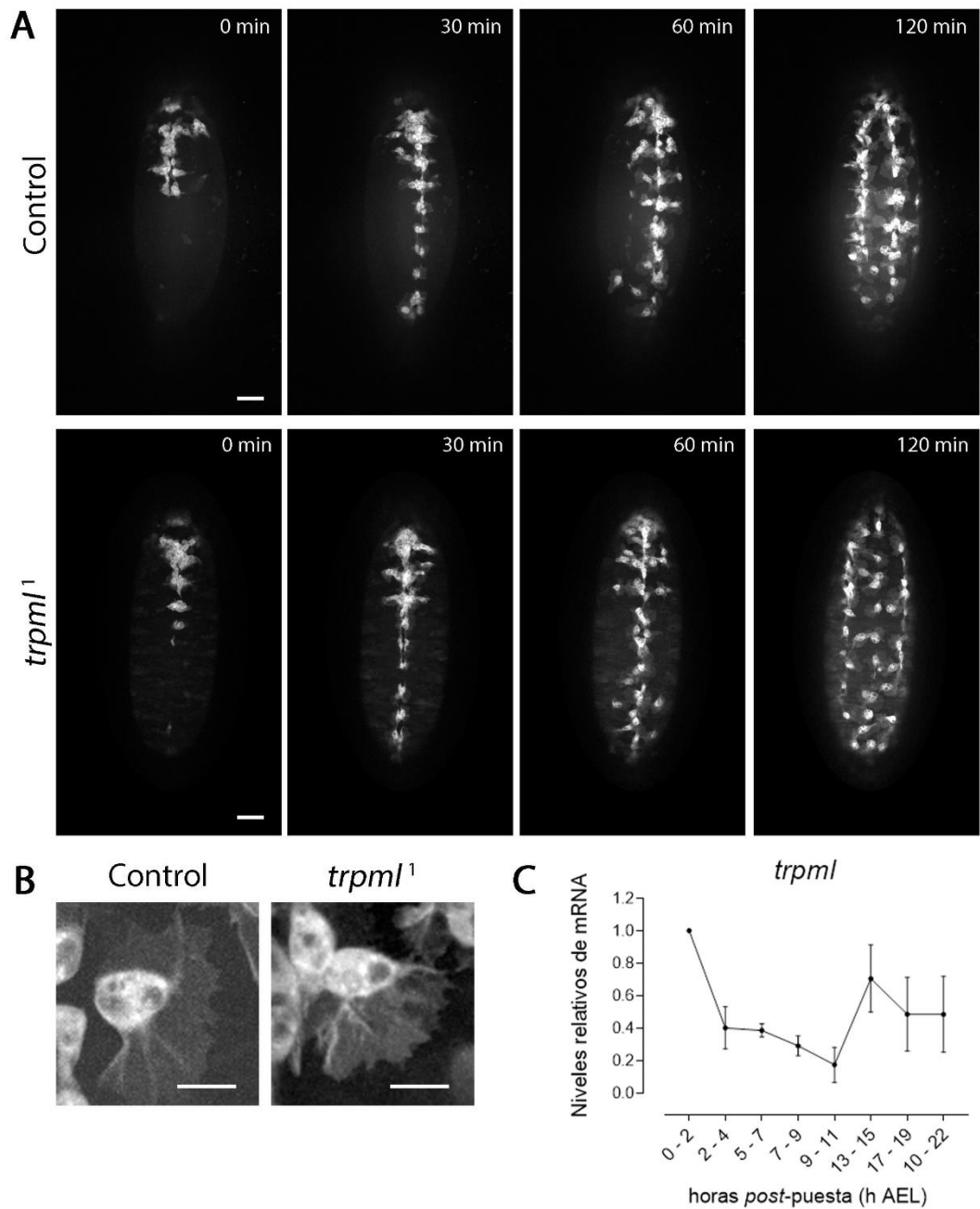


Figura Anexa 7. La contribución de transcritos maternos de *trpml* suprimen el fenotipo en embriones tempranos

A) Imágenes representativas de videos embriones expresando GFP en los hemocitos en condiciones control (arriba) y *trpml*¹ (abajo). En ambas condiciones, los hemocitos tardan un tiempo equivalente en recorrer rutas estereotipadas y dispersarse a lo largo de los embriones ($n \geq 3$ embriones/condición). Videos generados a 29°C. **B)** Imágenes representativas de hemocitos embrionarios revelando amplia extensión de lamela, tanto en condición control como *trpml*¹. Barra de tamaño para A y B: 10 μ m. **C)** Niveles de transcritos de *trpml* en distintos estadios embrionarios medido por qPCR usando *tubulina* como gen de referencia. Los valores están normalizados respecto de embriones de 0-2h posterior a la puesta de huevo (AEL).