



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA PROTEÍNA
Mctp EN NEURONAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE *Danio rerio*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
KARINA DURAN RIOS

TUTORES:
DR. ATAULFO MARTÍNEZ TORRES –INB, UNAM
DR. LUIS ROBERTO RODRÍGUEZ ORTIZ -INB, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. ISABEL C. MÉNDEZ HERNÁNDEZ-INB, UNAM
DRA.YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN- INB, UNAM

Santiago de Querétaro, Querétaro.

Noviembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Karina Durán Ríos, cuyo título es: “**Localización intracelular de la proteína Mctp en neuronas del sistema nervioso central de *Danio rerio***” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. Aurea Orozco Rivas

Secretario (Tutor)

Dr. Ataulfo Martínez Torres

Vocal

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Suplente

Dr. Alfredo Varela Echavarría

Suplente

Dr. Yazmín Macotela Guzmán

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

RESUMEN

Las Mctp (*Multiple C2 Domains and Transmembrane Protein*) son proteínas con 3 dominios C2 y dos segmentos transmembranales, que son capaces de unir iones Ca^{2+} . La similitud en secuencia de las Mctp con otras familias de proteínas de membrana como las Sinaptotagminas, Sinaptotagminas extendidas y Ferlinas, sugiere que su función puede estar relacionada con fusión de membranas, tráfico vesicular y exocitosis. Con el objetivo de elucidar la función de la proteína en la célula, diversos estudios han sido realizados en vertebrados e invertebrados, en los cuales se ha localizado Mctp en retículo endoplásmico y ha sido asociada con la homeostasis presináptica y el tráfico de membranas en diferentes tipos celulares. Para determinar en cuáles organelos se localizan las Mctp en neuronas *in vivo*, en el presente trabajo, se co-electroporaron quimeras fluorescentes de Mctp y marcadores de organelos en el sistema nervioso central de embriones de 24 horas del pez cebra *Danio rerio*, y se siguió la localización de la proteína mediante microscopía confocal. Se encontró que la proteína se localiza en la región perinuclear y en los procesos de las neuronas en cúmulos discretos y bien definidos; el análisis cuantitativo sugiere que estos cúmulos co-localizan con el retículo endoplásmico, endosomas tardíos, endosomas de reciclaje y lisosomas de neuronas en desarrollo. Estos resultados confirman lo observado en otros organismos y sugieren la participación de la proteína en procesos de tráfico vesicular.

ABSTRACT

The MCTP (from Multiple C2 Domains and Transmembrane Protein), are proteins with three C2 domains and two transmembrane regions, that are capable of binding Ca^{2+} ions. The sequence similarity of MCTPs to other transmembrane proteins such as Synaptotagmins, Extended synaptotagmins and Ferlins, has established a wide field of research regarding the function of the protein, relating it to membrane fusion, vesicle trafficking and exocytosis. Several studies have been performed in vertebrates and invertebrates, aiming of elucidating the role of the protein in the cell. Such studies have shown that MCTP is located in the endoplasmic reticulum and that it might participate in presynaptic homeostasis, and membrane trafficking in different cell types. To determine in which organelles Mctp is located in neurons *in vivo*, in the present work, we co-electroporated fluorescent chimeras of Mctp and organelle markers in the central nervous system of 24 hour *Danio rerio* embryos and followed the localization of the protein by confocal microscopy. We observed that the protein is located in the perinuclear region and cell processes with a discrete cluster shape, the quantitative analysis suggests that this clusters co-localized with endoplasmic reticulum, late endosomes, recycling endosomes and lysosomes in developing neurons. These results are consistent with findings that suggest the participation of Mctp in vesicular trafficking processes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sincera y profusamente:

A la UNAM y al Instituto de Neurobiología por permitirme formar parte de esta alma máter como estudiante de la Maestría en Ciencias (Neurobiología) y proveer los recursos e instalaciones con los que se pudo llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Ataulfo Martínez Torres, por aceptarme como parte de su equipo de trabajo, por el aprendizaje personal y académico que me ha brindado, pero lo más importante, por compartir conmigo su motivación y cariño por hacer ciencia.

Al Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz, por su amabilidad, paciencia e instrucción constante; siempre disponible, su apoyo y consejos me motivaron a trabajar duro y tener un pensamiento más independiente.

A la Técnico Académico A. Edith Espino Saldaña, por su paciencia, disponibilidad, colaboración y por compartir conmigo su experiencia en biología molecular, y tener siempre un punto de vista claro y objetivo sobre los proyectos que realizamos.

A la Auxiliar de laboratorio Marina Ramírez Romero por su ayuda diaria con las actividades del laboratorio. A mis amigos y compañeros del Laboratorio D14 y D15.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Becario No. 476439, Proyectos CONACYT A1-S-7659 y A1-S-10450.

Al Departamento de Posgrado: Nuri Aranda López

A la Unidad de Microscopía: ISC. Elsa Nydia Hernández Ríos

A la Unidad de Proteogenómica: M. en C. Adriana González Gallardo

A la Biblioteca: Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela, Lic. Teresita de Jesús Pérez Cruz, Lic. Teresa Soledad Medina Malagón.

DEDICATORIA

A mis padres Silvia y Socorro, por ser mis cómplices en cada uno de los proyectos que emprendo, por su apoyo y escucha en los momentos más difíciles y por todas sus enseñanzas que me han llevado hasta el lugar donde me encuentro hoy. Los quiero con todo mi corazón.

A mis hermanos Enrique y Arturo, por sacarme sonrisas en los momentos más estresantes, por mantener fresca y motivada mi mente con todas sus preguntas y ocurrencias del día a día, por ser mis fieles amigos y estar ahí en cada momento importante de mi vida, los quiero niños.

A mi esposo, Aarón, por motivarme a continuar con el posgrado cuando los ánimos están bajos, por recordarme día a día de lo que he logrado hasta ahora y lo que lograremos juntos, por creer en mis sueños, impulsarlos y hacerlos parte de los tuyos, por tu apoyo incondicional, tu paciencia y tu cariño. Te amo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Dominio C2	2
2.2. Proteínas con dominio C2	3
2.3. Sinaptotagminas	3
2.4. Ferlinas	4
2.5. Sinaptotagminas extendidas	4
2.6. Proteínas MCTP	4
2.7. Pez cebra como modelo	6
2.7.1. Desarrollo temprano	6
2.7.2. El sistema nervioso central en la faríngrula (24hpf-48hpf)	7
2.7.3. Proteínas Mctp en <i>Danio rerio</i>	8
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVOS	12
5.1. Objetivo general	12
5.2. Objetivos particulares	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1. Plásmidos	13
6.2. Obtención y montaje de los embriones	14
6.3. Microinyección y electroporación	14
6.4. Microscopía de epifluorescencia	15
6.5. Fijación de los embriones en PFA 4%	15
6.6. Observación por microscopía confocal	16
6.6.1. Montaje in vivo	16
6.6.2. Montaje de embriones fijados	16
6.6.3. Observación en el microscopio confocal	17
6.7. Análisis de imagen	18
6.7.1. Coeficiente de correlación de Pearson y coeficientes de Manders	18
6.7.2. Método de significancia de Costes	20
6.7.3. Coeficiente de correlación de la intensidad (ICQ) y el método de Li	22
7. RESULTADOS	24

7.1. Estandarización de la técnica de microinyección y electroporación	24
7.2. Expresión de Mctp en SNC	26
7.3. Mctp colocaliza con el marcador de retículo endoplásmico Sec-61	29
7.4. Mctp co-localiza con el marcador de endosomas de reciclaje Rab11	30
7.5. Mctp colocaliza con el marcador de endosomas tardíos Rab7	31
7.6. Mctp colocaliza con el marcador de lisosomas Lamp1	32
7.7. Mctp colocaliza con el marcador Sec61 en médula espinal	33
8. DISCUSIÓN	35
9. CONCLUSIONES	43
10. REFERENCIAS	44
11. LISTA DE FIGURAS	51
12. LISTA DE TABLAS	52
13. LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS	52
14. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	53

1. INTRODUCCIÓN

El dominio C2 está compuesto de aproximadamente 130 aminoácidos y está presente en diversas proteínas responsables de la homeostasis de Ca^{2+} en la célula. Es el segundo dominio fijador de Ca^{2+} más abundante en los vertebrados y fue identificado por primera vez en la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} (PKC) y en otras proteínas solubles involucradas en señalización celular (Coussens *et al.*, 1986; Parker *et al.*, 1986). Sin embargo, estudios posteriores revelaron que este dominio también está presente en proteínas ancladas a membrana fundamentales para la transmisión sináptica como las sinaptotagminas, ferlinas y sinaptotagminas extendidas (E-syts), que se caracterizan por tener varios dominios C2, un segmento transmembranal y fijar el ion Ca^{2+} (Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2014). A este grupo de proteínas ancladas a membrana se ha añadido la familia de las proteínas MCTP (*Multiple C2 domains Transmembrane Protein*) (Shin *et al.*, 2005). Estas proteínas poseen tres dominios C2 y, en contraste con las sinaptotagminas y otras proteínas ancladas a membrana, poseen dos segmentos transmembranales y fijan Ca^{2+} con gran afinidad sin necesidad aparente de fosfolípidos. Estudios previos han revelado la presencia de esta proteína en cerebro, músculo y testículos de rata (Shin *et al.*, 2005), así como en neuronas de *Drosophila melanogaster* (Genç *et al.*, 2017); sin embargo, no se ha logrado definir claramente su función. Sus características estructurales y estudios realizados para el análisis de la función de la proteína sugieren que puede estar participando en procesos de tráfico de vesículas o fusión de membrana, pero aún son requeridos más estudios para caracterizarla.

En el presente trabajo se co-electroporaron quimeras fluorescentes de MCTP, y marcadores de organelos *in vivo* en el sistema nervioso central de embriones de 24 horas de *D. rerio*, y se siguió la localización de la proteína mediante microscopía confocal como uno de los pasos para elucidar su función.

2. ANTECEDENTES

2.1. Dominio C2

El ion Ca^{2+} es una molécula que participa como segundo mensajero en numerosas cascadas de señalización en la célula relacionadas con proliferación, crecimiento, regulación de expresión de genes, liberación de vesículas exocíticas y apoptosis. Todas estas funciones, en las que el ion es participante, están reguladas por una gran variedad de proteínas que tienen regiones especializadas para su reconocimiento, como el dominio EF-Hand y los dominios C2.

El dominio C2 de alrededor de 130 residuos se encuentra en una amplia diversidad de proteínas eucariotas; están compuestos por una estructura tipo “sándwich” con láminas β que contienen *loops* o bucles flexibles capaces de ligar hasta tres iones Ca^{2+} (Figura 1). Existen dos clases dependiendo de su orientación topológica; la clase I tiene la región amino (N) y carboxilo (C) terminal orientados hacia la parte superior del dominio, mientras que en la clase II están orientados hacia la parte inferior (Rizo & Sudhof, 1998).

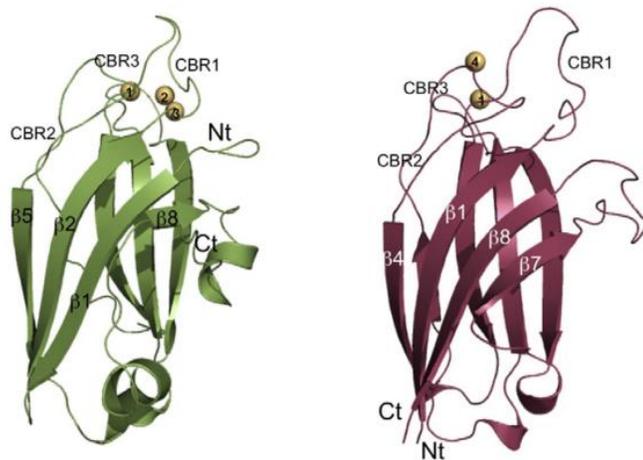


Figura 1. Diagrama de listón del dominio C2. En verde: Clase I, en violeta: Clase II, en amarillo: Ca^{2+} , CBR: Calcium binding region, Ct: C-terminal, Nt: N-terminal. (Corbalan-García & Gómez-Fernández, 2014).

Este dominio fue originalmente identificado como el segundo de cuatro dominios altamente conservados en las distintas isoformas de la proteína cinasa C dependiente de Ca^{2+} (PKC); debido a la desregulación de Ca^{2+} observada en las PKCs que carecen del dominio C2, se propuso a este dominio como el responsable de la regulación del Ca^{2+} en la proteína (Nalefski & Falke, 1996).

El dominio C2 se identificó en la porción citosólica de la sinaptotagmina, un sensor de Ca^{2+} integrado en la membrana de vesículas sinápticas y gránulos secretorios de células endocrinas mediador de la fusión de las vesículas con neurotransmisores en la membrana presináptica (Perin *et al.*, 1990). Otros estudios revelaron que además de la PKC y la sinaptotagmina, existe un gran número de proteínas que tienen el dominio C2 como parte de su estructura lo que lo convierte en el segundo *motif* fijador de Ca^{2+} más común en el genoma de vertebrados, después del dominio *EF Hand* (Shin *et al.*, 2005).

2.2. Proteínas con dominio C2

Las proteínas con dominios C2 pueden ser catalogadas en 2 grupos: uno que engloba proteínas de señalización solubles que contienen un solo dominio C2 (PKC, Ca^{2+} -calmodulina y varias fosfolipasas) y un segundo grupo que incluye proteínas involucradas con tráfico de membrana con al menos dos dominios C2 en su estructura y un pase transmembranal en la región N o C terminal (Wang & Südhof, 2003).

En un estudio realizado por Shin *et al.* (2005) en busca de proteínas con dominios C2 y regiones transmembranales lograron identificarse cuatro clases de proteínas altamente conservadas que cumplen con estas características: las ya conocidas sinaptotagminas y ferlinas; y dos grupos nuevos de proteínas: E-syts, y las MCTP.

Se han realizado diversos estudios para la caracterización funcional de las sinaptotagminas, las ferlinas y las E-syts, sin embargo, se tiene poca información sobre las MCTP.

2.3. Sinaptotagminas

Las sinaptotagminas son una familia de trece proteínas que se encuentran en las terminales sinápticas. Estas proteínas vesiculares poseen una región C-terminal citosólica constituida por dos dominios C2 y un segmento transmembranal en la región N-terminal (Chapman, 2002).

La sinaptotagmina I es el sensor de Ca^{2+} más abundante en las vesículas sinápticas por lo que su participación en la exocitosis mediada por este ion ha sido un campo de considerable interés (Chapman, 2002).

Estudios realizados orientados a conocer la función de estas proteínas, han determinado que están íntimamente involucradas en procesos de exocitosis sináptica y endocrina al participar como un sensor de Ca^{2+} y como un enlace entre las vesículas y la membrana plasmática (Rizo & Südhof, 1998; Südhof, 2002).

2.4. Ferlinas

Las ferlinas contienen de cinco a siete dominios C2 en tándem y están ancladas a la membrana mediante un segmento transmembranal C-terminal. Estas proteínas se encuentran en células eucariotas unicelulares donde las sinaptotagminas están ausentes, lo que sugiere que podrían estar compensando la ausencia de la proteína mediante la participación en procesos de fusión y tráfico de vesículas (Lek *et al.*, 2012; Lek *et al.*, 2010).

2.5. Sinaptotagminas extendidas (E-syts)

Llamadas así por su similitud con las sinaptotagminas, las E-syts son una familia de proteínas que contienen en su estructura un segmento transmembranal en la región N-terminal, una región C-terminal citosólica con tres o cinco dominios C2 y un dominio citosólico adicional involucrado en la fijación de lípidos (Giordano *et al.*, 2013; Min *et al.*, 2007). En el año 2013, Giordano y colaboradores demostraron que las E-syts son proteínas residentes del retículo endoplásmico y que son indispensables para la interacción de este organelo con la membrana y el intercambio de fosfolípidos. Adicionalmente, Kikuma y colaboradores (2017) demostraron que estas proteínas facilitan la liberación de neurotransmisores en la pre-sinapsis y su sobreexpresión lleva a un crecimiento del botón sináptico y resistencia a la depresión tras estimulaciones constantes.

2.6. Proteínas MCTP

Las MCTP son una novedosa familia de proteínas ancladas a endomembranas que están compuestas por tres dominios C2, dos regiones transmembranales, una región N-terminal variable orientada hacia el citosol y una región C-terminal corta (Figura 2); estas

moléculas, unen Ca^{2+} sin participación aparente de fosfolípidos, algo inusual para las proteínas con dominios C2.

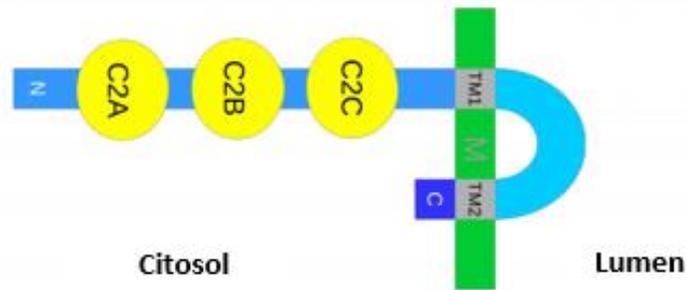


Figura 2. Mapa topológico de la proteína Mctp. Se predice esta organización en base al análisis de hidrofobicidad Kyte-Doolite. En amarillo dominios C2, en azul el cuerpo de la proteína, en verde la membrana vesicular (M) y en gris los segmentos transmembranales (TM). N: segmento N-terminal, C: segmento C-terminal (Téllez-Arreola, en preparación)

Por análisis bioinformático se han identificado dos genes que codifican para esta proteína en vertebrados (*mctp1* y *mctp2*), mientras que en invertebrados como *Caenorhabditis elegans* y *D. melanogaster* solo ha sido identificado un gen (Shin *et al.*, 2005). Adicionalmente estos investigadores reportan la presencia de MCTP1 en músculo cardiaco, músculo esquelético, testículos, riñón y en menor proporción en el cerebro; mientras que MCTP2 se encuentra principalmente en testículos y músculo cardiaco en rata.

Se ha visto en *C. elegans* que los promotores del gen D2092.1 (homólogo a MCTP), dirigen la expresión de un gen reportero fluorescente a las neuronas del nemátodo (Téllez-Arreola, 2014). Cepas mutantes del gen *mctp* del nemátodo desarrollan problemas motores y de ovoposición que son consistentes con cambios en la función neuronal; derivado de los estudios de sensibilidad al fármaco aldicarb, se infiere que las modificaciones ocurren a nivel presináptico (Téllez-Arreola y Martínez Torres, en revisión). En *D. melanogaster* se ha ubicado a la proteína MCTP en botones sinápticos así como en somas y procesos neuronales (Genç *et al.*, 2017). En estudios realizados en rata por Qiu y colaboradores (2015), la proteína MCTP1 fue localizada en el soma y

procesos de neuronas en hipocampo, giro dentado, núcleo habenular medial, amígdala y zonas corticales localizadas; adicionalmente se observó que la proteína está asociada a compartimentos celulares implicados en el sistema endocítico celular.

Las MCTP han sido relacionadas con varios desórdenes neurológicos en humanos. Análisis genómicos mostraron asociación entre el SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) rs17418283 de MCTP1 y el desorden bipolar (Scott *et al.*, 2009), mientras que otro estudio de genotipificación sugiere una relación entre un polimorfismo en el gen MCTP2 y la susceptibilidad a esquizofrenia (Djurovic *et al.*, 2009).

2.7. Pez cebra como modelo

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pequeño pez tropical de agua salobre con fertilización externa, que actualmente está ganando terreno como modelo de investigación en vertebrados. Fue seleccionado, entre otras cosas, por las ventajas que representa: tiempo corto de desarrollo hasta su edad reproductiva (de 2 a 3 meses), produce una alta cantidad de embriones (100 a 200 por cruce), es fácil de observar por microscopía óptica y es transparente durante los primeros días después de la fertilización.

2.7.1. Desarrollo temprano

El desarrollo del pez cebra es bastante rápido, llegando a la madurez reproductiva a los 2 ó 3 meses posteriores a la fertilización; entre generaciones puede haber asincronía en el desarrollo, disminuyendo un poco si los embriones son mantenidos en condiciones ideales de temperatura y población (28°C 5-10 embriones por ml). Pueden distinguirse 8 claros estadios tempranos: cigoto, escisión, blástula, gástrula, segmentación, faríngrula, eclosión y larva (Kimmel *et al.*, 1995). Brevemente en orden temporal, durante las primeras 10 horas post fertilización (hpf) hay una alta tasa de proliferación celular, se definen los ejes antero-posterior y lateral, formación de las capas germinales, condensación de somitas, desarrollo de neuromeras, movimientos autónomos y organogénesis primaria (Kimmel *et al.*, 1995).

2.7.2. El sistema nervioso central en la faríngrula (24hpf-48hpf)

En este período el plan anatómico es claramente distinguible, la notocorda está bien desarrollada y las somitas se condensan a lo largo del eje rostro-caudal. El sistema nervioso central es hueco, con el tubo neural extendiéndose hacia la región anterior, el cerebelo es distinguible del metencéfalo, los primordios de ojo están bien definidos y son distinguibles cinco lóbulos cerebrales (Figura 3B).

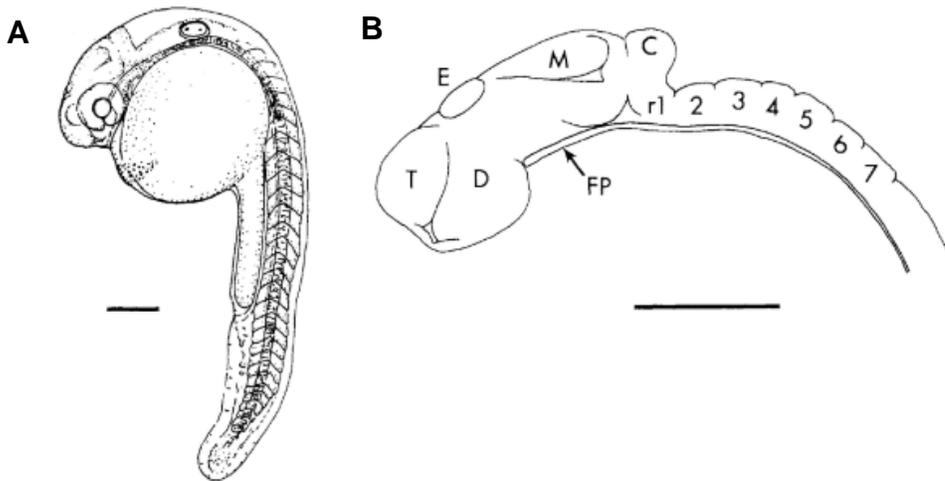


Figura 3. Sistema Nervioso Central en la faríngrula. A) Se distingue claramente la división entre el mesencéfalo y el rombencéfalo (MRB), así como la folia del cerebelo (C), son distinguibles 2 ventrículos. **B)** Lóbulos cerebrales, telencéfalo (T), diencéfalo (D), epífisis (E), mesencéfalo (M), cerebelo (C), rombómeras (r1-7), plato del piso (FP). (Kimmel *et al.*, 1995).

Existe poca información acerca de la migración celular en el SNC de pez cebra y de las poblaciones celulares existentes en cada región. Sin embargo, estudios realizados mediante trazadores neuronales en embriones de 16 a 36 hpf, permitieron identificar la presencia de tractos neuronales conectando la región de motoneuronas primarias a lo largo de la notocorda con regiones específicas del encéfalo en desarrollo (Chitnis' & Kuwada, 1990; Ross *et al.*, 1992). En esta etapa la diferenciación celular comienza a ser más evidente, sin embargo aún hay un 10 % de células con morfología característica de glía radial: somas grandes ~ 10 μm diámetro, cuerpo orientado hacia los ventrículos, bipolares y procesos que conectan la región periventricular basal y apical (Lyons *et al.*, 2003).

Alrededor de las 24 hpf comienzan a observarse contracciones musculares espontáneas en el área del tronco y la cola, que son el resultado de los circuitos reflejos sensorio-motores funcionales de la médula espinal originados por motoneuronas primarias y secundarias en proceso de maduración (Figura 4) (Kuwada *et al.*, 1990; Kuwada *et al.*, 1990; Saint-Amant, 2006), o de respuestas motoras resultado de estimulaciones sensoriales en el área de la cabeza o el cuerpo (Kimmel *et al.*, 1995).

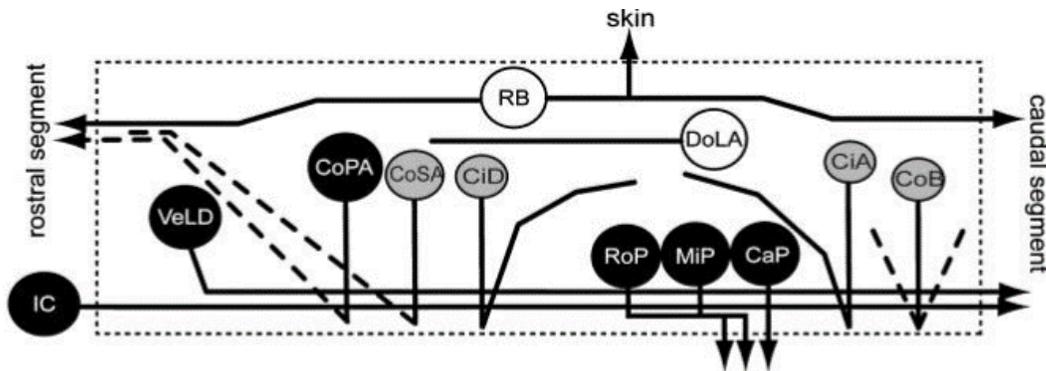


Figura 4. Médula espinal en la faríngrula. Los movimientos motores involuntarios son originados por los circuitos reflejos formados por las motoneuronas y neuronas sensoriales en la médula, sin embargo ya hay respuesta evocada motora debido a la maduración de procesos ascendentes y descendentes, células en blanco permanecen inactivas durante actividad espontánea, negras son activas, grises: activas en algunos casos; RB: Neuronas sensoriales Rohon-Beard; interneuronas, DoLA: dorsolaterales, CoPA: primarias comisurales ascendentes, VeLD: ventral lateral descendente, IC: Axon Caudal ipsilateral, CoSA: secundarias comisurales ascendentes, CiD: circunferencialmente descendentes, CiA: circunferencialmente ascendentes, CoB: comisurales bifurcadas; motoneuronas, CaP: Caudal Primaria, MiP: Medial Primaria, RoP: Rostral Primaria. (Saint-Amant, 2006).

2.7.3. Proteínas Mctp en *D. rerio*

El análisis del genoma de pez cebra, permitió la identificación de cuatro genes que codifican para la proteína en este organismo: *mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a* y *mctp2b* (Espino-Saldaña *et al.*, en preparación); la tetraploidía en esta especie es bien conocida debido a la duplicación del genoma en etapas más tempranas de la evolución (Westerfield, 2000). Los ADNc de cada uno de estos genes fueron obtenidos mediante PCR y posteriormente secuenciados, revelando que tres de los cuatro genes presentan “*splicing*” (corte y empalme) alternativo entre los dominios C2 (Figura 5). Además, se identificó el ARN mensajero de cada uno de los genes mediante RT-PCR desde el estadio embrionario hasta el larvario.

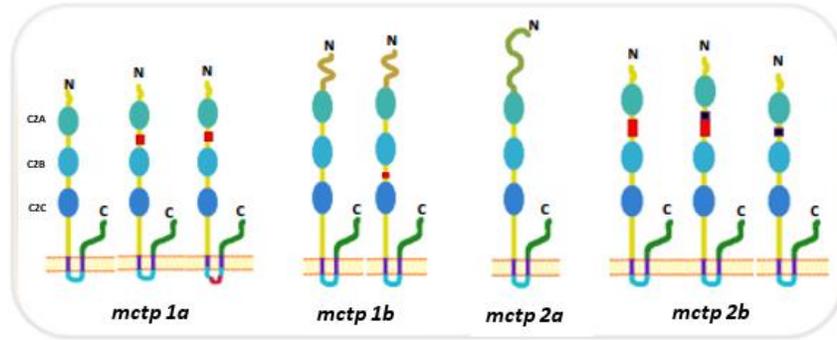


Figura 5. Mctp en *D. rerio*. En la parte inferior cada uno de los genes que codifican para Mctp en el genoma de pez cebra. En azul los tres dominios C2, en morado los segmentos transmembranales y en rojo las regiones modificadas por splicing alternativo (Espino-Saldaña, Tesis doctoral en proceso).

También se analizó la distribución del ARN mensajero de cada gen mediante hibridación *in situ*, lo que indicó una mayor abundancia del mensajero en el sistema nervioso central y sistema muscular en embriones de 24 hpf (Figura 6) (Espino-Saldaña, Tesis de Doctorado en proceso).

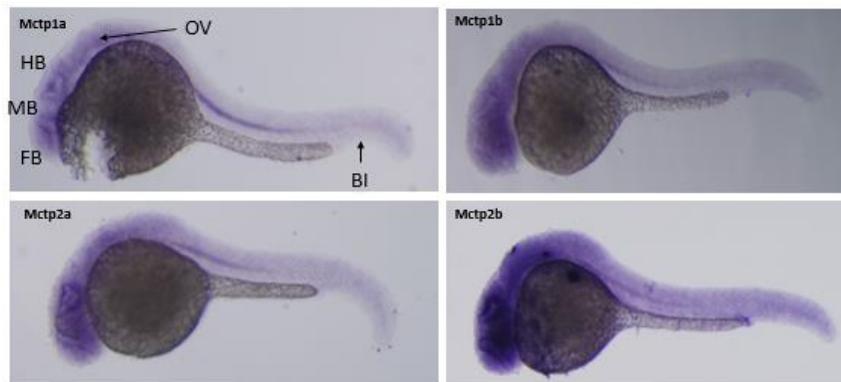


Figura 6. Distribución de ARNm de Mctp. La hibridación *in situ* en embriones de 24hpf muestra expresión de los ARNm de mctp's en sistema nervioso central y sistema muscular. En esquina superior derecha el gen correspondiente. FB: *Forebrain* (prosencefalo), MB: *Midbrain* (Mesencéfalo), HB: *Hindbrain* (Rombencéfalo), isla sanguínea (BI) y vesícula ótica (OV) (Espino-Saldaña, Tesis doctoral en proceso).

La presencia del ARN mensajero de estos genes durante diferentes estadios de desarrollo y la diversidad de proteínas generadas por modificaciones post-transcripcionales, indican una probable participación en un sistema de regulación importante para el desarrollo del organismo. Aunado a esto, la presencia del mensajero

en el sistema nervioso central de embriones de pez cebra abre la puerta al estudio de la localización de la proteína en neuronas y su posible participación en procesos sinápticos.

En otros estudios, se mostró que la supresión de la expresión de Mctp2b por medio de CRISPR/Cas9 induce modificaciones en el desarrollo larvario del pez y consecuentemente su muerte, lo que sugiere la importancia de esta proteína (Espino Saldaña, Tesis de doctorado en proceso). Aunque los mecanismos por los cuales la supresión de la expresión de este gen induce la muerte larvaria aún se desconocen, estos resultados muestran la relevancia de esta proteína en el proceso de maduración de *D. rerio*. Otros estudios realizados en nuestro laboratorio por expresión heteróloga en células HEK293, muestran que las diferentes variantes de la proteína Mctp (1a, 1b, 2a, 2b) de *D. rerio* tienen la misma distribución en la célula (Olivares-Hernández, Tesis de maestría en proceso). Esto indica que pudiesen tener roles similares, aunque no redundantes como se infiere en los resultados obtenidos por CRISPR/Cas9.

Adicionalmente, utilizando una batería de plásmidos marcadores de organelos asociados a proteínas fluorescentes, se encontró que las Mctp están localizadas en endosomas de reciclaje, retículo endoplásmico y endosomas tardíos, pero no en aparato de Golgi o membrana plasmática (Figura 7) (Olivares-Hernández. Tesis de maestría en proceso).

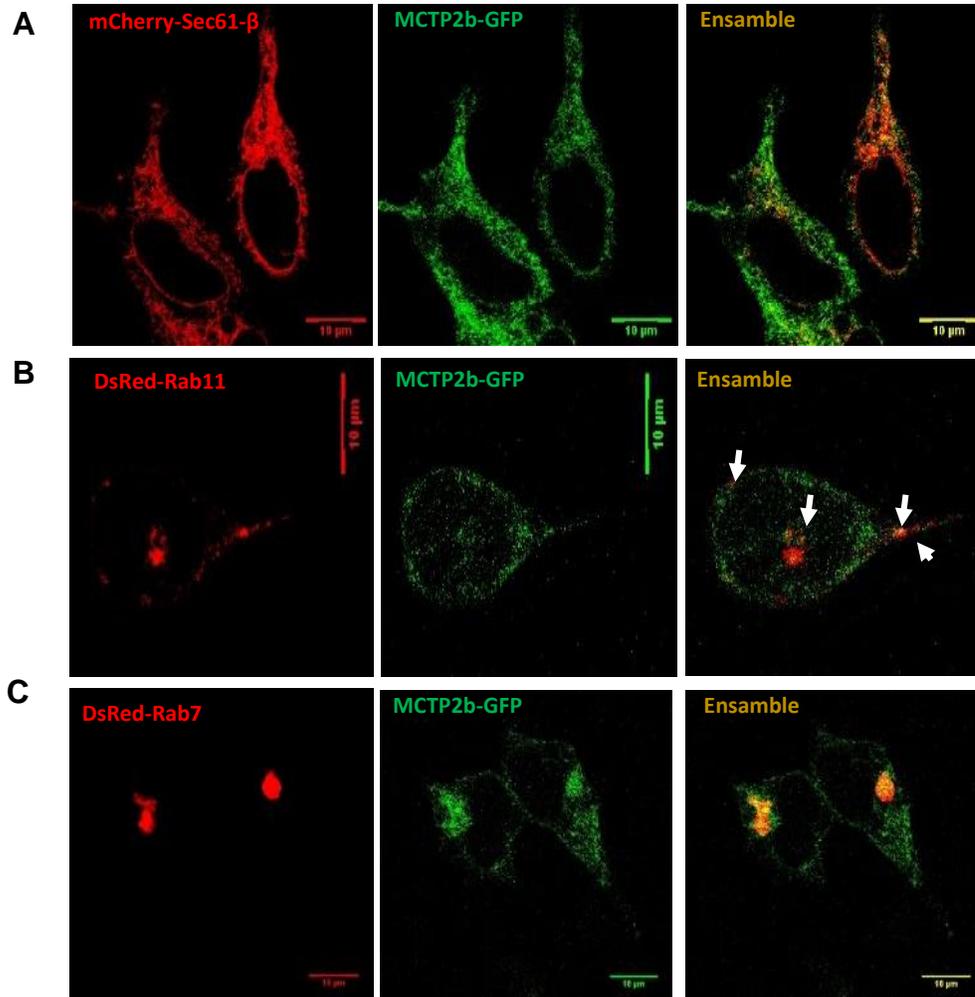


Figura 7. Localización intracelular de Mctp en células HEK. A) Mctp en retículo endoplásmico. **B)** Mctp en endosomas de reciclaje. **C)** Mctp en endosomas tardíos.

Debido a lo anterior y a las características que comparte con otras proteínas como las sinaptotagminas, se ha sugerido que las proteínas Mctp pueden participar en procesos de tráfico de vesículas o fusión de membrana, pero aún se requieren más estudios para caracterizarlas ampliamente y elucidar su función.

3. JUSTIFICACIÓN

En el contexto del marco teórico previo, se sugiere que las proteínas Mctp pueden ser un efector del Ca^{2+} en la célula con un papel importante a nivel del sistema nervioso central, esto con base en la elevada expresión del mRNA de los cuatro genes de la proteína en el primordio de encéfalo y médula espinal de embriones de pez cebra. Las características que comparten con las sinaptotagminas, ferlinas y E-syts indican una posible participación en el tráfico vesicular, fusión de membranas o como mediador de la interacción entre la membrana plasmática y el retículo endoplásmico. Sin embargo, existe poca información sobre la proteína que nos indique cuál es su función. Debido a ello, se propone determinar en qué organelos y dominios de la neurona se localizan las proteínas Mctp, para así contribuir a elucidar su función.

4. HIPÓTESIS

La proteína Mctp se localiza en organelos de la vía endocítica en neuronas del sistema nervioso central de *D. rerio*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la localización intracelular de las proteínas Mctp en neuronas del sistema nervioso central de *D. rerio*.

5.2. Objetivos particulares

- Estandarizar un método de electroporación *in vivo* en pez cebra.
- Expresar Mctp en fusión con las proteínas fluorescentes GFP o mCherry en embriones de *D. rerio*.
- Determinar la localización de la proteína en los diferentes dominios de la neurona.

- Determinar la localización subcelular de *Mctp* en las neuronas del sistema nervioso central de *D. rerio*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Plásmidos

Para la electroporación se utilizaron plásmidos que contienen *mctp2b* fusionado a GFP o mCherry (Figura 8) y plásmidos que codifican para marcadores de organelos (Tabla 1) utilizando como control pCMV-mCherry C1.

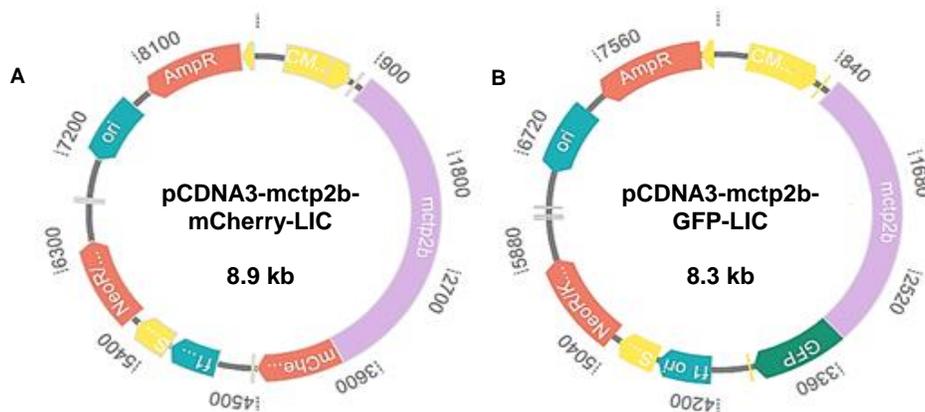


Figura 8. Mapa de plásmidos que codifican *mctp2b* fusionado a reportero fluorescente. **A)** Mapa de *mctp2b* fusionado al reportero fluorescente mCherry bajo promotor CMV. **B)** Mapa de *mctp2b* fusionado a reportero fluorescente GFP bajo promotor CMV. AmpR: Gen de resistencia a ampicilina, Ori: Origen de replicación.

Estos plásmidos se propagaron en bacterias *Escherichia coli* competentes, seguido de su extracción mediante la técnica de lisis alcalina con SDS (Sambrook y Russell, 2001). Los plásmidos fueron disueltos en solución Ringer modificada estéril (180 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 5mM HEPES, 0.017% tricaína, pH 7.2) en concentraciones de 0.7 a 2.0 µg/µl con colorante rojo de fenol 0.03% para visualizar la solución durante la microinyección (Cerdeña, Thomas, Allende, Karlstrom, & Palma, 2006; Kera, Agerwala, & Horne, 2010).

Tabla 1. Plásmidos de marcadores de organelos

Plásmido	Marcador	Organelo	Referencia
mCh-Sec61 β	Secretasa 61	Retículo endoplásmico	Shibata <i>et al.</i> , 2008
DsRed-rab7 WT	Rab7	Endosomas tardíos	Choudhury <i>et al.</i> , 2002
DsRed-rab11	Rab11	Endosomas de reciclaje	Choudhury <i>et al.</i> , 2002
Lamp1-RFP	Lamp1	Lisosoma	Sherer <i>et al.</i> , 2003

6.2. Obtención y montaje de los embriones

Se hicieron cruces de especímenes silvestres de *D. rerio* para la obtención de embriones. Los embriones fueron mantenidos en medio blue-E3 (5.0 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, pH 7.4, 200 μ l azul de metileno 0.05%) y, para facilitar la observación de fluorescencia, los embriones fueron tratados con N-feniltiourea (PTU) 100 μ M a las 6-10 hpf (Kera *et al.*, 2010).

Embriones de 24-28 hpf fueron decorionados con ayuda de pinzas y anestesiados con triclaína 0.017% durante aproximadamente 3 min. Para la fijación, grupos de 10-15 embriones fueron montados en una caja Petri con 500 μ l de agarosa de bajo punto de fusión 1% preparada en solución Ringer modificada. Los embriones fueron montados en posición dorsal en un ángulo de 45° respecto a la base de la placa; una vez solidificada la agarosa, la placa de Petri fue cubierta con solución Ringer (Hoegler & Horne, 2010).

6.3. Microinyección y electroporación

Para la determinación de la localización intracelular de la proteína Mctp se implementó un sistema de electroporación *in vivo* de embriones de pez cebra basado en protocolos previamente descritos (Cerdeña *et al.*, 2006; Hendricks & Jesuthasan, 2007; Hoegler & Horne, 2010; Kera *et al.*, 2010; Teh *et al.*, 2003).

La microinyección del plásmido se realizó con un microinyector adaptado a una picobomba. La punta del capilar fue confeccionada con ayuda de un puller (PUL-100, *World Precision instruments*, Heat = 920, Pull= 180, Trip= 95, Delay= 100). La microinyección se realizó en el tubo neural del embrión en la región correspondiente al prosencéfalo y la médula espinal, hasta observar una distensión del tejido contiguo.

La electroporación se ejecutó dentro de los 10 s subsecuentes con ayuda de dos electrodos de oro (1 mm de grosor, con 1 mm de separación entre cada uno) en las siguientes condiciones: 5-20 V, 1-15 ms, 5 pulsos (Cerdea *et al.*, 2006; Kera *et al.*, 2010). Posteriormente los embriones fueron retirados de la agarosa con ayuda de pinzas y colocados en medio E3 para recuperarse de la anestesia y el procedimiento. El tratamiento con PTU se reanudó a las 12 horas post electroporación (hpe).

Durante la electroporación para la estandarización del método, el electrodo positivo fue colocado en el espacio entre el embrión y la base de la placa para dirigir la expresión de forma lateral. Se microinyectaron concentraciones crecientes de plásmido (0.7-2 µg/µl) y se aplicaron pulsos con diferente voltaje y duración, de acuerdo con las condiciones previamente descritas, hasta establecer las ideales; los experimentos subsecuentes de co-electroporación con marcadores de organelos se realizaron bajo estas condiciones.

6.4. Microscopía de epifluorescencia

Los embriones de 12 hpe, fueron anestesiados con triclaína 0.017% durante aproximadamente 3 min y colocados uno a uno en un portaobjetos de vidrio. Posteriormente los embriones fueron observados con un microscopio invertido marca Olympus CKX41 equipado con una lámpara UV EXFO X-Cite® 120 y filtros para observar fluorescencia en rojo y verde.

Después de la observación los embriones fueron incubados en medio E3 fresco hasta ser utilizados nuevamente.

6.5. Fijación de los embriones en PFA 4%

Los embriones que mostraron fluorescencia fueron anestesiados con triclaína 0.017% y transferidos por grupos a tubos Eppendorf con 2 ml de paraformaldehído 4% (PFA 4%) e incubados en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente los embriones fueron lavados con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM) para remover el remanente de PFA y deshidratados para su almacenamiento de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 2. Lavados post-fijación

Solución	PBS	PBS	PBS:Metanol (3:1)	PBS:Metanol (2:1)	PBS:Metanol (1:1)	Metanol	Metanol
Tiempo	2 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	Almacenamiento

Los embriones fueron almacenados a -20°C en tubos Eppendorf con metanol al 100% hasta su posterior uso (Westerfield M. 2000).

6.6. Observación por microscopía confocal

6.6.1. Montaje *in vivo*

Los embriones con expresión de proteínas fluorescentes fueron anestesiados con triclaína 0.017% y montados sobre un portaobjetos con una capa delgada de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % en posición dorsal o lateral derecha (dependiendo de la región que muestre expresión de la proteína fluorescente). Para cubrir los embriones, se colocó plastilina en las esquinas de un cubreobjetos y se depositó suavemente sobre los embriones montados, presionando para fijarlos en su sitio. Posteriormente, se rellenó el espacio con medio E3 y se sellaron los bordes con barniz (Figura 9).

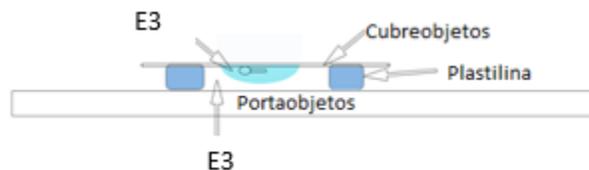


Figura 9. Montaje *in vivo*

6.6.2. Montaje de embriones fijados

Se retiró el metanol en el cual se encuentran almacenados los embriones y se adicionó PBS 1X para rehidratarlos durante 5 min. Posteriormente los embriones fueron transferidos a una placa con glicerol al 70 %. En un portaobjetos los embriones fueron colocados en posición dorsal o lateral derecha y se retiró el exceso de glicerol. Para cubrir los embriones, se colocó plastilina en las esquinas de un cubreobjetos y se depositó

suavemente sobre los embriones montados, presionando para fijarlos en su sitio. Posteriormente, se rellenó el espacio con glicerol al 70% y se sellaron los bordes con barniz (Figura 10).

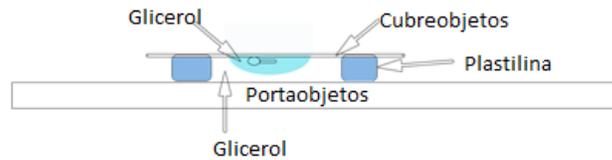


Figura 10. Montaje de embriones fijados

6.6.3. Observación en el microscopio confocal

Los embriones fueron observados bajo el microscopio confocal marca Zeiss, modelo 780 DUO, objetivo LD Plan-Neofluar 40X/0,6 Korr Ph2 M27, bajo los siguientes parámetros de excitación y emisión de los reporteros:

Tabla 3. Parámetros de captura por microscopio confocal

Reportero	Excitación (nm)	Emisión (nm)
GFP	488	507-534
mCherry	546	560-586
DsRed	546	560-586

De cada embrión se seleccionaron células con procesos largos, cuerpos menores a 10 μm , con el cuerpo no orientado a los ventrículos, expresando ambas proteínas fluorescentes (GFP y mCherry/DsRed). Se tomaron 2 tipos de imágenes:

- Panorámicas: 8 bits con medidas 210 μm x 210 μm , calidad 1024 x 1024 pixeles, tamaño de *stack* de 40-70 μm y grosor de corte de \sim 1.4 μm .
- Zoom digital: 8 bits con medidas 210 μm x 210 μm , calidad 1024 x 1024 pixeles, tamaño de *stack* de 10-40 μm y grosor de corte de \sim 1.4 μm .

Velocidad, ganancia y *offset* se mantuvieron constantes durante todas las capturas.

6.7. Análisis de imagen

Los *stacks* obtenidos por cada célula fueron pre-procesados en ImageJ 1.5 para la generación de una proyección en z, remoción del ruido, suavizado, ajuste de brillo y contraste, y corte de regiones de interés.

Las imágenes finales fueron analizadas mediante el plugin *JACoP* (Bolte & Cordelières, 2006). En el análisis con este *plugin*, se incluyen los métodos más frecuentemente utilizados para la cuantificación de la co-localización de dos señales en microscopia de fluorescencia (Dunn *et al.*, 2011): coeficiente de correlación de Pearson, coeficientes de Manders (Manders *et al.*, 1993), coeficiente ICQ del método de Li (Li Q, 2004) y el análisis de significancia de Costes (Costes *et al.*, 2004).

6.7.1. Determinación del coeficiente de correlación de Pearson y coeficientes de Manders

El coeficiente de Pearson (r_p) compara una imagen con otra para determinar los píxeles en donde se encuentran las dos señales, se determina el promedio de intensidad de los voxeles en la imagen para un canal y para el otro (rojo y verde, en este caso), y se resta a cada valor de intensidad rojo o verde por pixel, lo cual lo hace independiente de la intensidad de la señal y da información de similitud entre la distribución de las señales en la imagen.

$$r_p = \frac{\sum(C1i - \bar{C}1) (C2i - \bar{C}2)}{\sqrt{[\sum_i(C1i - \bar{C}1)^2 \cdot \sum_i(C2i - \bar{C}2)^2]}}$$

Donde:

r_p = Coeficiente de Pearson

$C1i$ = Intensidad del canal 1 en el píxel i

$\bar{C}1$ = Intensidad promedio del canal 1

$C2i$ = Intensidad del canal 2 en el píxel i

$\bar{C}2$ = Intensidad promedio del canal 2

Cuando los promedios de intensidad de las señales no son restados a cada uno de los valores de intensidad de los canales, obtenemos lo que se llama coeficiente de solapamiento.

$$r = \frac{\sum_i (C1_i) \cdot (C2_i)}{\sqrt{[\sum_i (C1_i)^2 \sum_i (C2_i)^2]}}$$

El valor de este coeficiente va de 0 a 1, y este coeficiente da valores significativos solo cuando hay co-localización de las señales ya que, si hay un cero en C1 o en C2, el valor de intensidad en cualquiera de los dos canales para ese píxel es descartado de la sumatoria, para ello el valor de intensidad de la señal debe ser mayor a cero.

Este coeficiente no es sensible a la diferencia en intensidad entre las señales de ambos canales, ya que es suficiente con que sea mayor al límite establecido. La desventaja de este método radica en que es altamente sensible a la cantidad de objetos detectados para cada canal ya que, a valores bajos de intensidad, el numerador se hará más pequeño en comparación con el denominador. Para evitar ese efecto, se determinan los coeficientes de solapamiento:

$$k_1 = \frac{\sum_i C1_i \cdot C2_i}{\sum_i C1_i^2}$$

$$k_2 = \frac{\sum_i C1_i \cdot C2_i}{\sum_i C2_i^2}$$

Donde:

$C1_i$ = Intensidad del canal 1 en el píxel i

$C2_i$ = Intensidad del canal 2 en el píxel i

Obtenemos un coeficiente para cada canal, y asignamos el número de objetos por canal, para evitar la influencia de la cantidad de objetos totales. Sin embargo, estos coeficientes son muy sensibles a la intensidad de la señal del canal opuesto.

Para esto, se proponen otros dos coeficientes que son independientes de la intensidad de la señal:

$$M_1 = \frac{\sum_i C1_{i,coloc}}{\sum_i C1_i}$$

Donde $\sum_i C1_{i,coloc} = C1_i$ si $C2_i > 0$ y $\sum_i C1_{i,coloc} = 0$ si $C2_i = 0$, y

$$M_2 = \frac{\sum_i C2_{i,coloc}}{\sum_i C2_i}$$

Estos dos coeficientes son proporcionales a la cantidad de fluorescencia de los objetos que co-localizan en cada componente de la imagen (canales) en referencia a la fluorescencia total en ese componente. Así, los valores de co-localización pueden determinarse incluso si la intensidad de la señal en los dos canales difiere en gran proporción, aunque son muy sensibles al ruido.

Como parte del análisis, se grafican los valores de intensidad (escala de 0 a 255) en un gráfico de dispersión, donde la intensidad de un canal se representa en el eje de las abscisas y la intensidad del otro canal es graficada en el eje de las ordenadas. Si se considera que la señal en ambos canales es proporcional una a la otra, se infiere que la representación de la adquisición de ambas señales sería una línea recta, donde la pendiente representa la relación entre ambos fluorocromos. En caso de co-localización total, la nube de puntos en el gráfico aparecería como una línea inclinada al centro. La dispersión de estos puntos con respecto a una línea ajustada es estimada al calcular el coeficiente de correlación o Coeficiente de Pearson, donde 1 es correlación completamente positiva, 0 no hay correlación y -1 es una correlación negativa.

Este método es muy sensible al ruido y a los límites de detección, el cual es reconocible como una nube de puntos sin forma, cercana al origen de un gráfico. Además, es muy difícil sacar conclusiones de este método, ya que es difícil interpretar los resultados alejados del 1.

6.7.2. Método de significancia de Costes

Este método permite diferenciar entre co-localización real y co-localización debido al azar.

En una imagen, la intensidad de cada píxel tiene dos componentes, aquel debido a la co-localización y aquel debido al azar.

$$I_1 = C + R_1$$
$$I_2 = aC + R_2$$

Donde I_1 y I_2 son las intensidades de los canales 1 y 2, C el componente de colocación real, R_1 y R_2 el componente por azar de los canales 1 y 2, y a el coeficiente de proporción de la colocación entre ambos canales.

Tomando en cuenta estos dos componentes, los coeficientes de Manders quedan de la siguiente manera:

$$M_1 = \frac{\bar{c}}{c + \bar{R}_1} \qquad M_2 = \frac{\alpha \bar{c}}{\alpha c + \bar{R}_2}$$

Antes de evaluar la co-localización con los coeficientes de Manders, se realiza una prueba de significancia para determinar si existe co-localización real. Esto se hace determinando si la probabilidad de que el valor de correlación medido para los dos colores es significativamente mayor que los valores que serían calculados si solo hubiera empalme de la señal debido al azar. Para ello, se toma la imagen original, se descompone de forma aleatoria hasta 200 veces, y se mide la correlación de esta imagen con la original.

Típicamente, las áreas con co-localización están definidas cuando ambos canales están por encima del umbral de su respectivo canal, en otros métodos estos límites son definidos visualmente por el experimentador o mediante la segmentación del histograma de la imagen. En este método se propone el establecimiento automático del límite basado en un criterio estadístico: si se asume que un píxel es la suma de un componente debido a la co-localización y otro debido al azar, entonces hay una gran probabilidad de tener co-localización en píxeles más brillantes. Además, aquellos píxeles que son brillantes tienen una contribución positiva al coeficiente de correlación promedio. Así este método identifica los píxeles con co-localización si las intensidades en ambos canales están por arriba del límite de ambos canales.

En resumen, este método primero determina la probabilidad de que haya co-localización verdadera en alguna región de la imagen ($P > 95\%$ para co-localización). Como segundo paso, los píxeles que co-localizan son identificados utilizando un criterio de significancia estadística basado en el histograma 2D de ambos canales, tomando solo la fracción de cada señal que co-localiza.

6.7.3. Coeficiente de correlación de la intensidad (ICQ) y el método de Li

En este método, se correlacionan las intensidades de ambos canales a lo largo de los ejes x, y y z.

El método de ICQ está basado en el principio estadístico de que, para cualquier set de datos, la suma de las diferencias de los datos con respecto a la media siempre es igual a cero:

$$\sum_N (A_i - a) = 0$$

Donde a es la media de los datos en escala de grises de valor A_i , con número de píxeles igual a N . En nuestro caso tenemos una imagen con dos canales A_i y B_i ; sin embargo, la regla se sigue cumpliendo, por lo que la suma del producto de sus diferencias también tenderá a cero, no es el caso si las dos intensidades son dependientes o si están segregadas:

$$\sum_N (A_i - a) (B_i - b) > 0 \text{ para muestras dependiente}$$

$$\sum_N (A_i - a) (B_i - b) < 0 \text{ para muestras segregadas}$$

Este criterio es utilizado para evaluar una tinción segregada o dependiente, en la práctica insertamos los valores para la señal A y B en la región de interés de la imagen (ROI). Se genera entonces un gráfico de dispersión de los valores crudos de estas intensidades que es utilizado posteriormente para evaluar cualquier limitación obvia de los datos que pueda ser corregida mediante el ajuste del umbral (que sería el valor más bajo de la

distribución), las señales son entonces normalizadas entre valores que van de 0 a 1 y se calculan las medias aritméticas de cada grupo. Después se genera un gráfico de dispersión de $(A_i - a)$ $(B_i - b)$ para cada pixel graficándolo contra cada variable (A y B).

Estos gráficos son considerados como distribución dependiente si el gráfico tiene forma de un reloj de arena cargado a la derecha (valores positivos), y la distribución segregada si es un reloj de arena cargado hacia valores más negativos.

El coeficiente de correlación de la intensidad (ICQ) es un cálculo simple para determinar si los datos están segregados, son dependientes o son aleatorios. La prueba no paramétrica del signo es un buen método para su evaluación pues cuantifica el número de datos positivos y negativos con los que contamos en los productos $(A_i - a)(B_i - b)$. Una relación del número de valores positivos contra el número total de pixeles es una fracción que refleja el grado de dependencia. El cociente de correlación de intensidad (ICQ) se genera restando 0.5 de ese valor (para distribuir los cocientes de -0.5 a 0.5). Con datos aleatorios el ICQ es cercano a 0, una relación dependiente $0 < ICQ \leq +0.5$ y para distribución segregada $0 > ICQ \geq -0.5$.

7. RESULTADOS

7.1. Estandarización de la técnica de microinyección y electroporación

Como primeros pasos para la estandarización, se evaluó el efecto de la electroporación sobre la viabilidad de los embriones. La microinyección del plásmido y la aplicación de voltaje para la electroporación suponen un estrés celular elevado, por lo que fueron considerados como los criterios principales de evaluación. Con este objetivo, se analizó el porcentaje de mortalidad en la aplicación de 5 pulsos de voltaje de 5 a 20 V con 5 ms de duración, fijando la concentración de plásmido pCMV-mCherry C1 en 1400 ng/μl, la mortalidad a diferentes concentraciones de plásmido fijando el voltaje a 10 V 5 ms 5x, utilizando en ambos casos el plásmido control, así como la influencia de la microinyección en embriones no electroporados.

Como puede verse en la Figura 11B, la aplicación de 15 V y 20 V es letal en un 90 %, por lo que no representaron una buena opción, en cambio 5 V y 10 V fueron letales en apenas el 10 %; no se observaron efectos sobre la viabilidad en los embriones que solo fueron microinyectados ni a las concentraciones de plásmido más altas que se probaron (2000 ng/μl) (Figura 11A y 11C).

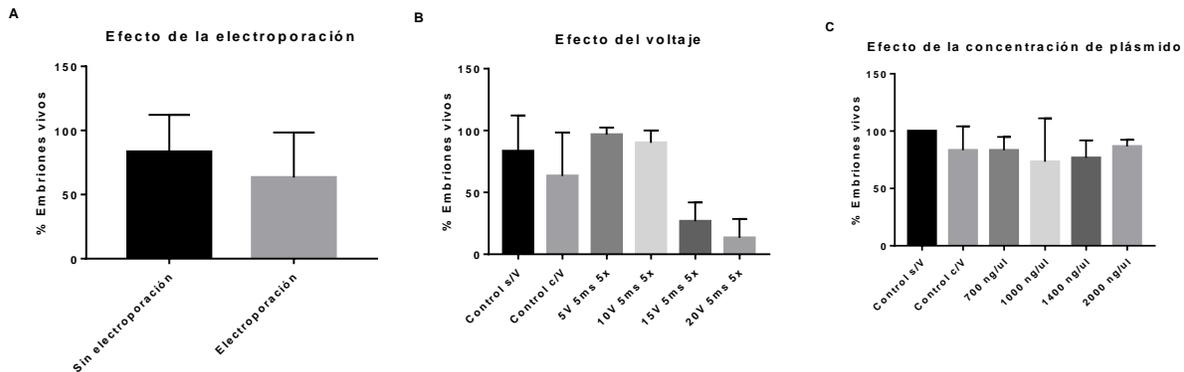


Figura 11. Impacto del procedimiento sobre la viabilidad de los embriones. A) Efecto de la microinyección. B) Efecto del voltaje. C) Efecto de la concentración de DNA. (n=3) Control s/V = control no electroporado, Control c/V= control electroporado.

El voltaje seleccionado para los siguientes experimentos fue 10 V, por tener una letalidad baja y estar cerca de las condiciones reportadas en la literatura (Cerdea *et al.*, 2006). Para hacer una mejor selección de las condiciones, se evaluó el porcentaje de embriones en

los que se observó fluorescencia tras 12 hpe, modificando la duración del pulso y conservando la concentración de plásmido control en 1400 ng/μl (Figura 12A). En este experimento pudimos observar que la mayor expresión con menor letalidad es obtenida a las condiciones 10 V 5 ms 5x, por lo que estas condiciones fueron seleccionadas para realizar la electroporación en experimentos subsiguientes.

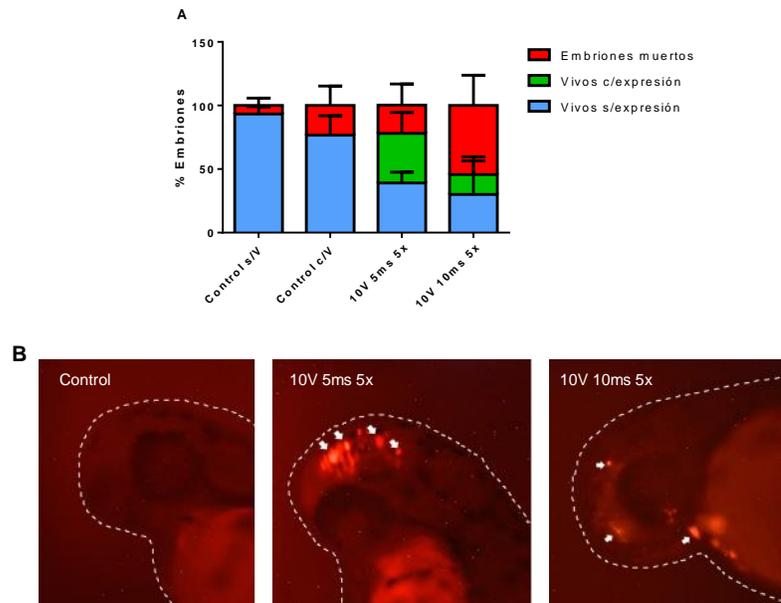


Figura 12. Efecto de la duración del pulso en la expresión de pCMV-mCherry C1. A) Expresión de mCherry con pulsos de 5ms y 10 ms. B) Imágenes de microscopía de epifluorescencia que muestran mCherry (595nm) a 10V 5ms 5x y 10V 10ms 5x. Las flechas blancas indican los puntos fluorescentes.

La electroporación permitió la expresión de la proteína fluorescente mCherry en regiones discretas y localizadas sin embargo, la alta emisión de fluorescencia impedía discernir claramente entre célula y célula dificultando la observación de detalles a nivel intracelular, por lo que se probaron las condiciones de electroporación a 2 concentraciones más de plásmido: 700 ng/μl y 2000 ng/μl, con el objetivo de disminuir la cantidad de células con fluorescencia. Se observó un mayor porcentaje de embriones expresando la proteína a bajas concentraciones de plásmido, por lo que la concentración de trabajo se estableció en 700 ng/μl (Figura 13).

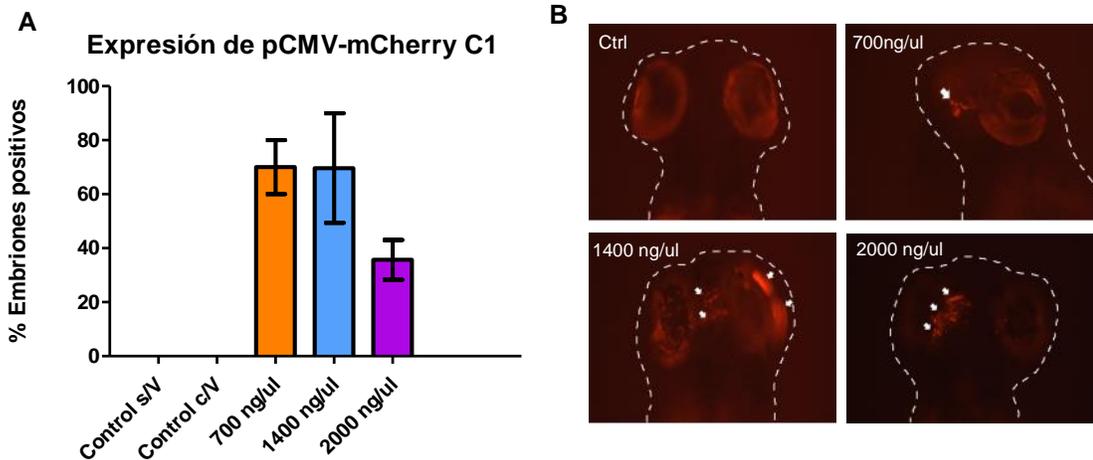


Figura 13. Efecto de la concentración de plásmido en la señal. A) Porcentaje de embriones expresando pCMV-mCherry a diferentes concentraciones de plásmido. B) Imágenes de microscopía de epifluorescencia de embriones electroporados con diferentes concentraciones de plásmido pCMV-mCherry (595 nm) (n=3), las flechas blancas indican los puntos fluorescentes.

7.2. Expresión de Mctp en SNC

Con las condiciones óptimas y la técnica estandarizada, se procedió a co-electroporar el plásmido pCMV-mCherry en conjunto con la quimera de Mctp2b-GFP. La expresión de la proteína Mctp2b resultó ser transitoria, con una alta expresión a 6 hpe y nula a las 24 hpe (Figura 14).

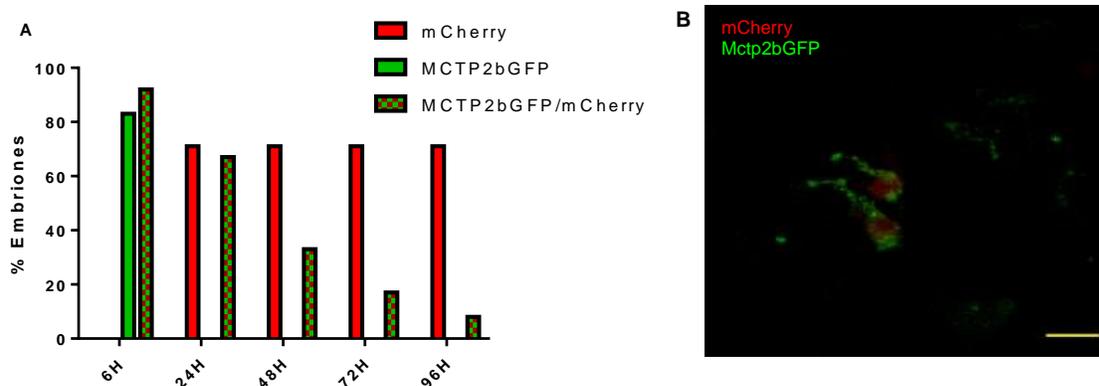


Figura 14. Expresión temporal de Mctp2b-GFP. A) Porcentaje de embriones expresando el control pCMV-mCherry y Mctp2bGFP. B) Imagen por microscopía confocal de un embrión positivo a ambos plásmidos, barra=10µm H: Horas.

Debido a la corta ventana de tiempo para la observación de Mctp, los embriones fueron tratados con PFA 4% y la localización de Mctp2b-GFP fue seguida en embriones vivos y fijados. Los embriones observados a 8 hpe mostraron la proteína Mctp2b-GFP en el soma así como a lo largo de los procesos de las células; esta distribución no cambia tras el tratamiento de los embriones con PFA 4% (Figura 15).

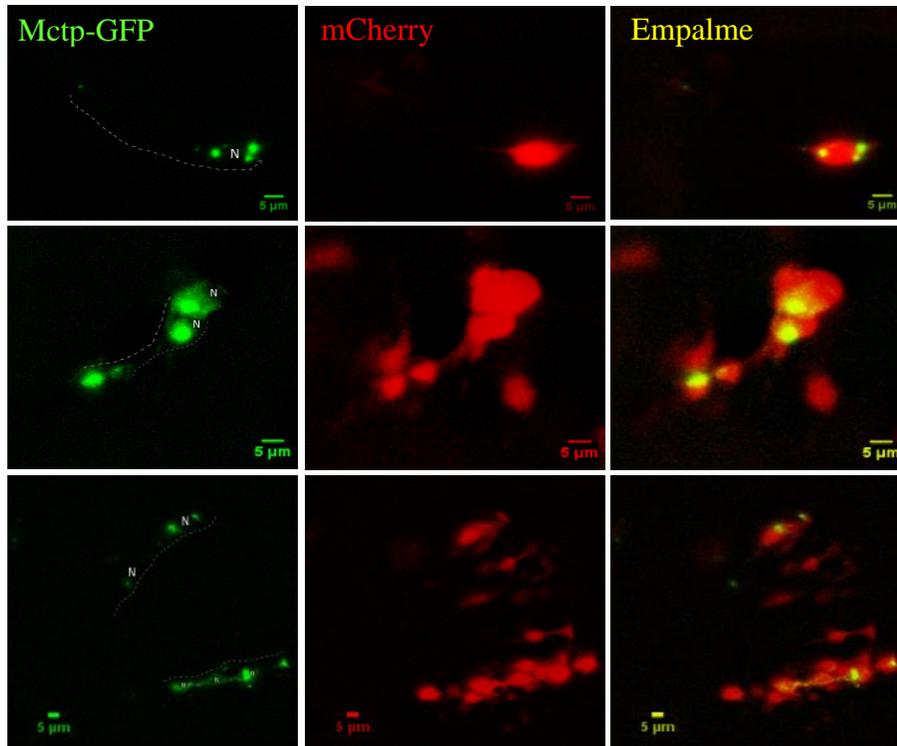


Figura 15. Mctp2b-GFP en neuronas. Mctp2b-GFP se localiza en el cuerpo celular así como en los procesos de la neurona, en verde: Mctp-GFP, en rojo: mCherry (n=8).

La localización de Mctp2b-GFP fue en forma de “cúmulos” en la región perinuclear y en las zonas más distales de las proyecciones de la célula (Figura 16).

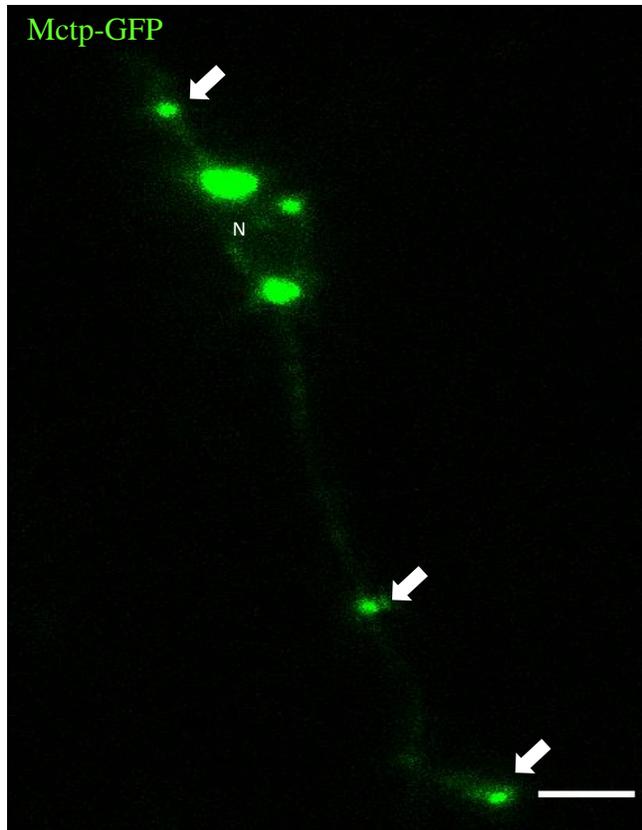


Figura 16. Mctp se localiza en cúmulos. La expresión de Mctp2b-GFP se observa en la región perinuclear de la célula, con algunos cúmulos discretos en las regiones distales de los procesos celulares (n=16), barra = 5 μ m.

7.3. Mctp co-localiza con el marcador de retículo endoplásmico Sec-61 β

Para determinar la localización de la proteína en diversos organelos, primero fue co-electroporado el plásmido *mctp2b*-GFP con el marcador de retículo endoplásmico mCh-Sec61 β . Los resultados muestran co-localización en la región perinuclear así como en los procesos de la célula (Figura 17).

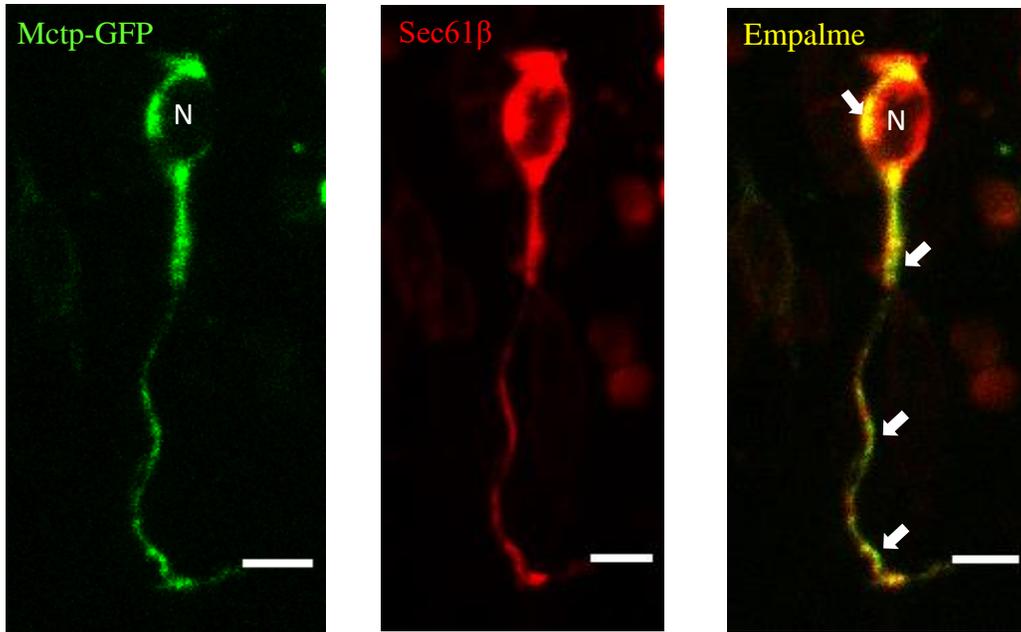


Figura 17. Co-localización de Mctp con Sec61-mCherry. **A)** En verde la proteína Mctp2b-GFP en neuronas de embriones de 12 hpe. **B)** En rojo el marcador de retículo endoplásmico Sec-61. **C)** Empalme de las señales de Mctp2b-GFP y Sec61-mCherry, se observa co-localización de la señal en la región perinuclear y las proyecciones de la neurona (n=11), barra= 5 μ m.

La distribución de Mctp2b-GFP en el cuerpo de la neurona corresponde al observado en los ensayos de electroporación individual: señal intensa en la región perinuclear y en regiones distales; visualmente, estos cúmulos co-localizan con la señal del marcador de retículo endoplásmico Sec61 β (Figura 17).

La mediana de los datos para el análisis cuantitativo por coeficiente de Pearson para la co-localización Mctp-Sec61 ($r_p = 0.752$) muestra una correlación parcial de las señales, siendo esto confirmado por los coeficientes de Manders, que tienen valores de 0.879 para Mctp y 0.741 para Sec61, el análisis de significancia mediante el método de Costes, arroja una $p < 0.0001$. Adicionalmente, se analizó la imagen por el método de Li y se obtuvo un

ICQ de 0.3056 lo cual confirma la co-localización de las señales (Figura Suplementaria 1).

7.4. Mctp co-localiza con el marcador de endosomas de reciclaje Rab11

Para continuar con la hipótesis de que Mctp2b se localiza en organelos de la vía endocítica, se realizó la co-electroporación de *mctp2b*-GFP con el marcador de endosomas de reciclaje DsRed-Rab11 (Figura18).

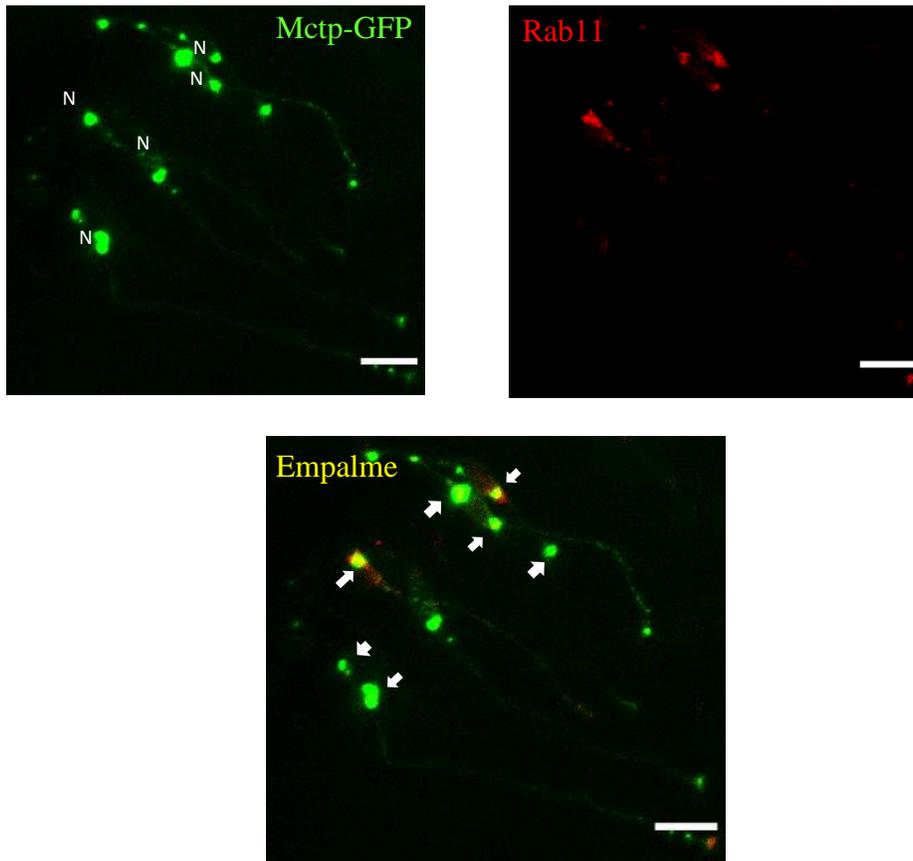


Figura 18. Co-localización de Mctp2b-GFP con DsRed-Rab11. **A)** En verde la proteína Mctp2b-GFP en neuronas de embriones de 12 hpe. **B)** En rojo el marcador de endosomas de reciclaje Rab11. **C)** Empalme de las señales de Mctp2b-GFP y DsRed-Rab11, (n=9), barra= 4µm.

Similar a las observaciones previas, Mctp2b-GFP se encontró en cúmulos en distintas regiones celulares, pero solo algunos de estos cúmulos co-localizan con la señal de DsRed-Rab11, la cual tuvo una distribución parcialmente similar a Mctp2b-GFP (Figura 18).

La mediana de los datos para el análisis cuantitativo por coeficiente de Pearson para la co-localización Mctp-Rab11 no muestra una correlación significativa ($r_p = 0.429$), sin embargo los coeficientes de Manders tienen valores de 0.308 para Mctp y 0.74 para Rab11 lo cual indica que solo un 30 % de Mctp está contenido en endosomas de reciclaje, pero un 70 % de los esos endosomas contienen Mctp. El análisis de significancia mediante el método de Costes arroja una $p < 0.001$ y se obtuvo un ICQ de 0.043 (Figura Suplementaria 2).

7.5. Mctp co-localiza con el marcador de endosomas tardíos Rab7

La co-electroporación de *mctp2b*-GFP con el marcador de endosomas tardíos DsRed-Rab7 mostró la co-localización parcial de ambas proteínas (Figura19). Los puntos de co-localización corresponden, en su mayoría a regiones circundantes al núcleo y son menos abundantes que en retículo endoplásmico y endosomas tempranos.

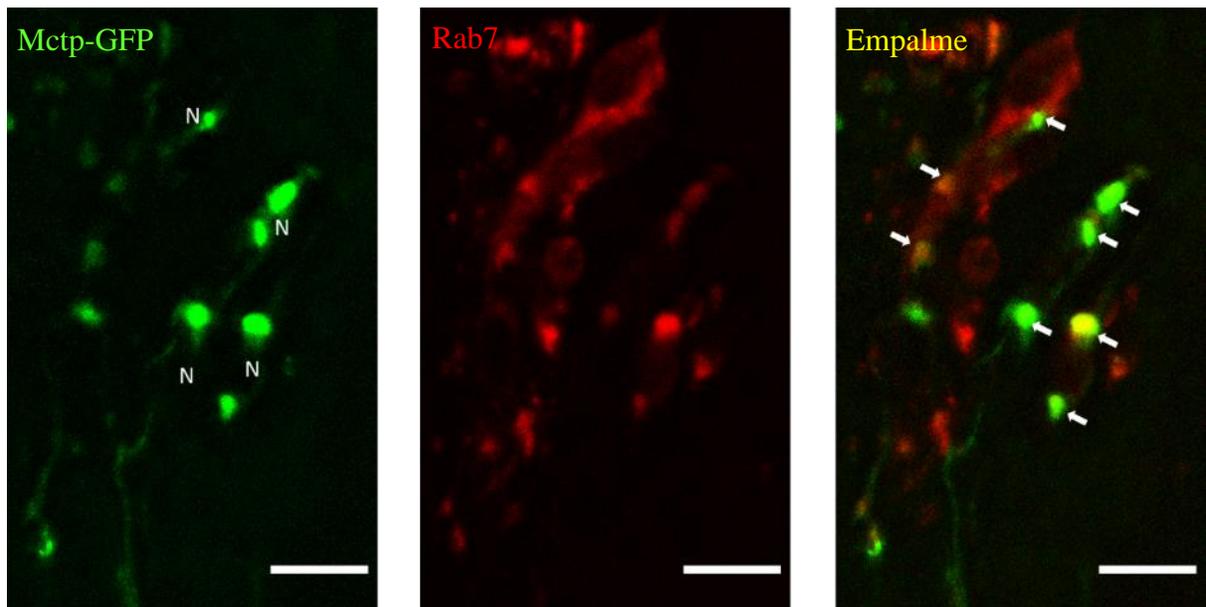


Figura 19. Co-electroporación de Mctp2b-GFP con DsRed-Rab7 WT. A) En verde la proteína Mctp2b-GFP en neuronas de embriones de 12 hpe. B) En rojo el marcador de endosomas tardíos Rab7. C) Empalme de las señales de Mctp2b-GFP y DsRed-Rab7. (n=9), barra= 5 μ m.

La mediana de los datos para el análisis cuantitativo por coeficiente de Pearson para la colocalización Mctp-Rab7 no muestra una correlación significativa ($r_p = 0.516$), los coeficientes de Manders tienen valores de 0.565 para Mctp y 0.584 para Rab7, ICQ de

0.1984 y finalmente el análisis de significancia mediante el método de Costes, arroja una $p < 0.001$ (Figura Suplementaria 3).

7.6. Mctp co-localiza con el marcador de lisosomas Lamp1

Las imágenes obtenidas después de la co-electroporación de *mctp2b*-GFP con el marcador de lisosomas Lamp1-RFP, mostraron regiones de co-localización en la región perinuclear, de manera interesante, la colocalización se acentúa en las regiones distales de la célula a lo largo del proceso y en la región más distal que pareciera ser una terminal sináptica (Figura 20).

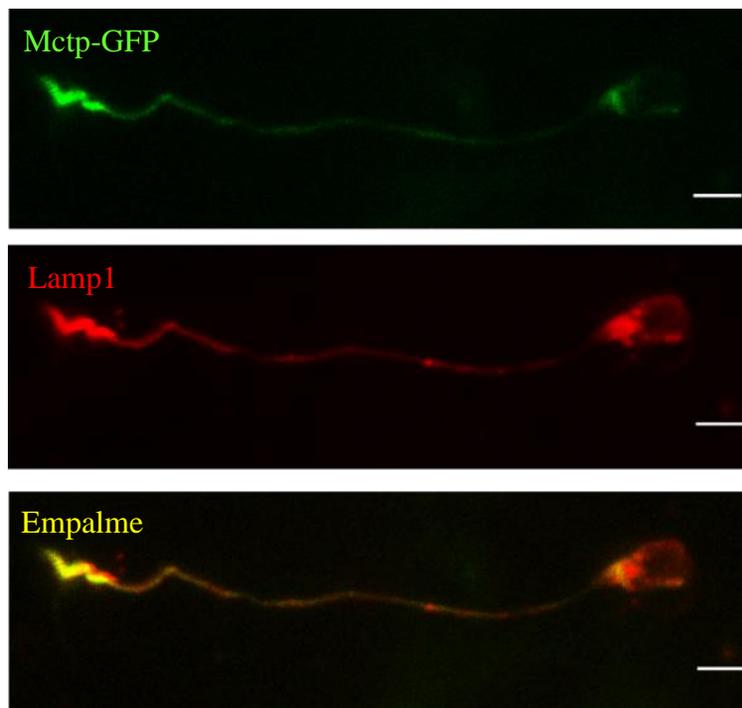


Figura 20. Co-electroporación de Mctp con Lamp1. **A)** En verde la proteína Mctp2b-GFP en neuronas de embriones de 12 hpe. **B)** En rojo el marcador de lisosoma Lamp1. **C)** Empalme de las señales de Mctp2b-GFP y Lamp1-RFP (n=7), barra= 5 μ m.

El coeficiente de Pearson, $r_p = 0.441$, no muestra una relación significativa entre las señales sin embargo, alrededor del 70 % de Mctp2b-GFP co-localiza con lisosomas de acuerdo con los coeficientes de Manders (Mctp=0.711, Lamp1= 0.498). El análisis cuantitativo por el método de Li confirmó la co-localización de las señales con un valor

de 0.164, con un p valor menor a 0.0001 según la significancia de Costes (Figura Suplementaria 4).

7.7. Mctp co-localiza con el marcador Sec61 β en médula espinal

Debido a que el promotor utilizado para dirigir la expresión de la proteína Mctp y los marcadores de organelos es ubiquo y no específico para neuronas, surgió la inquietud de electroporar en la médula espinal, donde las neuronas son maduras y hay una menor población de glía radial a las 24 y 48 hpf. El protocolo de electroporación se mantuvo sin modificaciones, pero la zona de microinyección fue la médula espinal para dirigir la expresión hacia las regiones más caudales del embrión. Se capturaron imágenes panorámicas de la zona, así como de células aisladas en la médula espinal; el análisis visual mostró el éxito de la electroporación en esa región (Figura 21AB) y la co-localización del marcador de retículo endoplásmico con Mctp2b-GFP (Figura 21C).

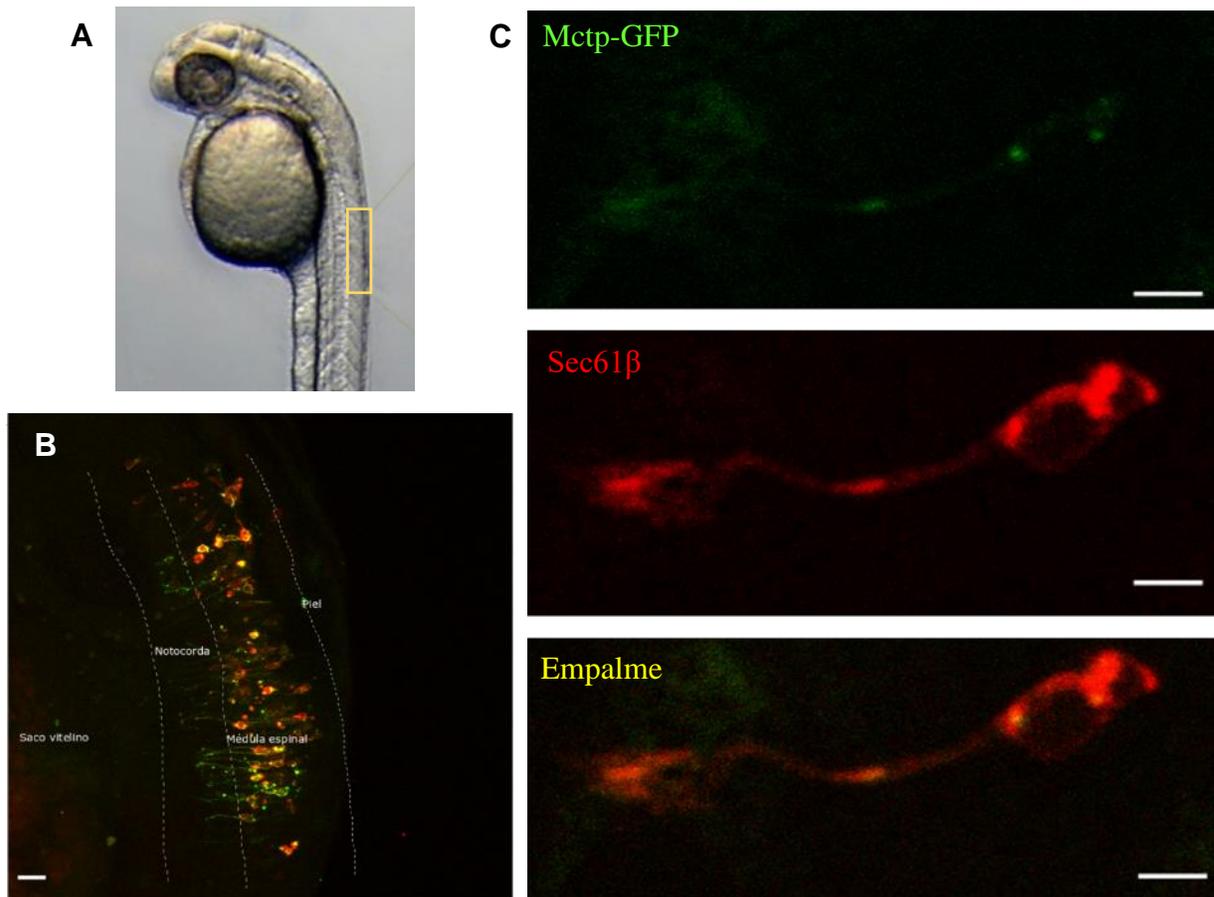


Figura 21. Mctp co-localiza con Sec61 β en médula espinal. **A)** Imagen representativa de un embrión microinyectado, en amarillo se muestra la zona de electroporación y toma de imagen. **B)** Imagen de microscopía confocal de la zona electroporada, en rojo: Sec61, en verde: Mctp. **C)** Célula medular aislada tomada por microscopía confocal expresando Mctp en verde y Sec61 en rojo (n =7), barra= 5 μ m.

El flujo de trabajo para el análisis de las imágenes fue el mismo aplicado a los grupos anteriores. El análisis de correlación de Pearson arrojó una mediana de 0.704 entre los dos canales, un 87.9% de Mctp2b-GFP co-localiza con Sec61 β y un 76.6% del marcador de retículo co-localiza con la proteína, según los coeficientes de Manders (Mctp= 0.879, Sec61= 0.766). El coeficiente de correlación de intensidades de Li (ICQ), tiene un valor de 0.3646 confirmando la co-localización de las señales (Figura Suplementaria 5), esto coincide con las observaciones en células del encéfalo en desarrollo electroporadas bajo las mismas condiciones (Ver Sección 7.3).

8. DISCUSIÓN

El problema abordado en este trabajo fue la localización intracelular de la proteína Mctp2b en neuronas de *D. rerio in vivo*. Para ello, se utilizaron plásmidos recombinantes que portan genes que codifican proteínas fluorescentes en fusión con marcadores de organelos y se observó su expresión por microscopía confocal de fluorescencia. El primer paso para lograr la expresión de las proteínas fluorescentes fue estandarizar la técnica de electroporación en embriones de pez cebra.

La electroporación *in vivo* es una técnica que ha caído en desuso los últimos años debido a la aparición de nuevas técnicas moleculares que permiten la expresión temporal o permanente de proteínas de interés en diversos modelos experimentales. Para el pez cebra, sin embargo, por su transparencia y desarrollo externo, esta técnica presenta diversas ventajas ya que se puede manipular la expresión de una proteína en órganos o sistemas particulares de forma específica y en cualquier estadio de desarrollo (Cerdea *et al.*, 2006).

La técnica consiste en la aplicación de pulsos eléctricos tras la inyección de ácidos nucleicos (morfolinos, plásmidos, ARNi); el campo eléctrico aplicado induce la formación de poros temporales en la membrana plasmática de la célula, así como la atracción de moléculas cargadas hacia alguno de los electrodos, lo cual permite la entrada del material a la célula. Aunque la cantidad de material que entra a la célula no es controlada por el experimentador y la expresión de mezclas con múltiples plásmidos no siempre es eficiente, esta técnica permite obtener células claramente distinguibles, lo cual es útil cuando se necesitan ver efectos a nivel subcelular en un sistema completo (Cerdea *et al.*, 2006; Hendricks & Jesuthasan, 2007).

Tras experimentos de variación de intensidad de voltaje, número de pulsos y duración por pulso, se estandarizó la técnica a 5 pulsos de 10 V con 5 ms de duración, la disminución de la concentración de plásmido inyectada a la menor reportada por la literatura (700 ng/ μ l) no logró aumentar el número de células aisladas debido a la difusión del plásmido a lo largo del tubo neural; sin embargo los niveles de expresión son excelentes y consistentes entre cada experimento.

El patrón y nivel de expresión de Mctp2b indicado por las hibridaciones *in situ*, así como la co-localización con las otras tres proteínas Mctp en células HEK293, la convirtieron en nuestro objeto de estudio, con miras a determinar su función en las células del SNC.

Logramos expresar la proteína en células del telencéfalo y diencéfalo. La expresión es compartimentalizada y discreta, lo esperado para una proteína transmembranal, y se observa principalmente en regiones contiguas al núcleo, zonas muy puntuales a lo largo de los procesos y sus regiones distales, que bien podrían corresponder a zonas activas; estos resultados coinciden con lo observado por Genç y colaboradores en el año 2017 en neuronas motoras de *D. melanogaster*.

En el análisis cuantitativo, fueron considerados tres algoritmos distintos debido a que cada uno aporta información distinta y ninguno refleja totalmente la co-localización real de la proteína Mctp con marcadores de organelos debido a las limitaciones propias de la técnica de microscopía utilizada, especialmente la resolución y el ruido de fondo. El análisis de Pearson es usualmente el primer paso para el análisis de co-localización, sin embargo, es difícil de interpretar en valores lejanos al 1 o al 0, ya que solo indica exclusión o correlación, pero es difícil y poco común la interpretación de valores intermedios. Por ello los coeficientes de Manders son mayormente utilizados para representar la fracción de cada canal que sobrelapa con el otro, siendo este interpretado más comúnmente como el porcentaje de señal que presenta co-localización, en nuestro caso para dos canales: canal rojo y canal verde. El coeficiente ICQ arrojado por la prueba de Li, es un confirmatorio de la co-localización cuando tiene valores superiores a cero.

Para comprobar la hipótesis de la localización de Mctp en organelos de la vía endocítica, el retículo endoplásmico fue el primer paso, ya que descartamos aparato de Golgi y membrana plasmática de los ensayos debido a la ausencia de localización en células HEK293, experimento tamiz para nuestro estudio (Olivares Hernández, en preparación). El retículo endoplásmico es un organelo membranoso continuo donde se sintetizan lípidos y esteroides, ocurre la síntesis y modificación postraduccional de diversas proteínas, así como la regulación de los niveles de Ca^{2+} y la liberación de ácido

araquidónico. En neuronas además permite la conexión del soma con las dendritas (sistema somatodendrítico) y el axón (Ramírez & Couve, 2010). De acuerdo a los resultados obtenidos, Mctp2b se localiza en este organelo en una fracción de 0.88, además puede observarse que tiene casi la misma distribución espacial, sin embargo, la señal es menos abundante, situación que no afecta los datos cuantitativos de co-localización puesto que son independientes de la intensidad de la señal.

No fue sorprendente, sin embargo, observar una localización más dispersa en el caso de los lisosomas y endosomas tardíos con un 0.58 y un 0.50 respectivamente, aunque los endosomas de reciclaje presentan una mayor proporción de Mctp2b con un 0.74. (Tabla 4) La señal observada para estos organelos es muy similar, puntual y muy discreta, y fueron observados tanto en la región perinuclear y algunos otros a lo largo de los procesos celulares.

Tabla 4. Análisis cuantitativo de co-localización. Mediana y rango de los datos obtenidos por el análisis cuantitativo de co-localización

	Coeficiente de Pearson		Manders 1		Manders 2		ICQ	
	Mediana	Límites	Mediana	Límites	Mediana	Límites	Mediana	Límites
Sec61	0.75	0.32-0.89	0.88	0.68-0.99	0.74	0.40-0.97	0.30	0.03-0.45
Sec61-sc	0.70	0.43-0.78	0.88	0.41-0.98	0.77	0.47-0.91	0.36	0.12-0.45
Rab7	0.52	0.38-0.86	0.56	0.40-0.91	0.58	0.29-0.82	0.19	0.026-0.49
Rab11	0.43	0.10-0.47	0.31	0.02-0.52	0.74	0.45-0.89	0.04	-0.01-0.36
Lamp-1	0.44	0.17-0.76	0.71	0.35-0.93	0.50	0.09-0.96	0.16	0.12-0.41

Nota: Todos los datos fueron obtenidos con una $p < 0.001$ de acuerdo con el análisis de aleatorización de Costes.

Los experimentos de co-localización de Mctp2b y Sec61 β también se realizaron en la médula espinal, donde se ha descrito una baja población de glía radial, y la población de neuronas maduras es distinguible de otros tipos celulares por su disposición anatómica según lo reportado en trabajos previos (Chitnis' & Kuwadai, 1990; Kuwada *et al.*, 1990; Lyons *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 1992; Saint-Amant, 2006). Los resultados mostraron que ambas proteínas se expresan en células con morfología característica de neuronas: somas pequeños orientados hacia la región dorsal, procesos finos y alargados, y en el caso de las neuronas tipo RB, procesos con orientación antero-posterior. La distribución de Mctp2b en estas neuronas reprodujo lo observado en neuronas del telencéfalo y diencefalo, adicionalmente, los valores de co-localización de Mctp2b con el marcador de

Retículo endoplásmico Sec61 β son igualmente elevados, confirmando la localización de la proteína en este organelo.

Cabe destacar que la proporción del traslape del canal verde-canal rojo y el canal rojo-canal verde dista mucho de ser igual; en retículo endoplásmico las proporciones son de 0.8 aproximadamente, para ambos casos, esto nos indica que alrededor de un 88% de Mctp2b está en retículo y que solo el 74 % del retículo tiene Mctp2b por lo que podemos inferir que una fracción mayor de retículo endoplásmico tiene esta proteína pero también hay zonas en las que no se encuentra. El porcentaje de señal de Mctp2b que no co-localiza, sugiere la presencia de la proteína en otros organelos, esto fue consistente en los experimentos realizados en la médula espinal (Tabla 4, Figura 22).

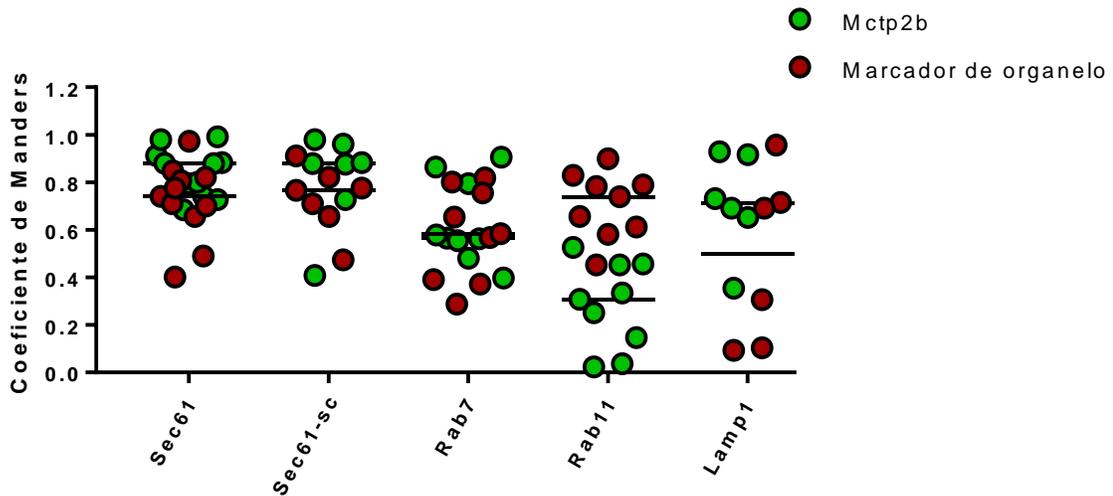


Figura 22. Coeficiente de Manders. Valores de Coeficiente de Manders para los diferentes grupos, en verde el coeficiente de Manders para Mctp, en rojo para el marcador de organelo, Sec61: Marcador de retículo endoplásmico, Sec61-sc: Marcador de retículo endoplásmico inyectado en la médula espinal, Rab7: Marcador de endosomas tardíos, Rab11: Marcador de endosomas de reciclaje, Lamp1: Marcador de lisosomas; barras negras representan la mediana de los datos.

En cuanto a endosomas tardíos, podemos observar valores por debajo de lo observado en retículo endoplásmico, el 58 % contienen Mctp2b y alrededor de un 56 % de Mctp2b está presente en esos organelos. Algo similar fue observado en lisosomas, con solo un 50% de organelos co-localizando con la proteína. Esto contrasta con lo observado en Rab11, donde la diferencia en co-localización es más notoria ya que un 74 % de los endosomas de reciclaje contienen a la proteína; esto sugiere que la proteína se encuentra

distribuída a lo largo de los organelos pertenecientes a la vía de tráfico vesicular pero que podría estar cumpliendo un papel más importante en la vía de reciclaje.

Los datos presentados anteriormente confirman lo observado en *D. melanogaster*, rata y células HEK293: Mctp se localiza en organelos de la vía endocítica, lo que nos lleva a la incógnita de su funcionalidad. Los dominios presentes en su estructura han relacionado a las proteínas MCTP con otras proteínas transmembranales cuyas funciones son ya bien conocidas.

Las ferlinas ya han sido involucradas con diversos procesos relacionados con la fusión de membranas en placenta, músculo, testículos y SNC, especialmente durante procesos de migración, reparación, y exocitosis (Bernatchez *et al.*, 2009; Doherty *et al.*, 2008; Lek *et al.*, 2012); las sinaptotagminas extendidas con interacciones Retículo Endoplásmico-Membrana plasmática (Giordano *et al.*, 2013) y las sinaptotagminas con procesos de fusión de vesículas con la membrana plasmática en una dinámica dependiente de calcio (Geppert *et al.*, 1994).

La diversidad de estas proteínas, aunado a los efectos de la delección del gen en el fenotipo del pez cebra y *C. elegans*, nos llevan a pensar más en una función importante en la neurotransmisión e incluso en el desarrollo.

Durante la endocitosis las moléculas son llevadas a los endosomas tempranos donde ocurre una segregación bastante eficiente, estas moléculas puede tener como destino la vía de degradación cuyo destino final es el lisosoma o la vía de reciclaje (Gruenberg, 2001), Nuestros resultados mostraron que Mctp2b se localiza en organelos de ambas vías.

Los endosomas marcados con Rab11, que forman parte de la vía endocítica de reciclaje, al igual que otros endosomas están en contacto bidireccional con la Red Trans-Golgi (*Trans-Golgi Network, TGN*), involucrada en renovar lípidos de membrana, mantener la composición, cargas y tamaño de la membrana plasmática estables y hacer la repartición de cargos en los diferentes acarreadores (Guo *et al.*, 2014). También se ha descrito a los endosomas, lisosomas y endolisosomas como organelos exocíticos por donde pueden

ser transportadas proteínas directamente desde el retículo endoplásmico o a través de los complejos intermedios Retículo Endoplásmico -Golgi, los ERGICs (*Endoplasmic Reticulum-Golgi intermediate complexes*) hacia la membrana plasmática (Bowen *et al.*, 2017). Este mecanismo de transporte de proteínas es conocido como *Golgi by-pass*, y consiste básicamente en un tráfico de proteínas independiente de este organelo.

Algunos trabajos en neuronas han demostrado que la comunicación entre el retículo endoplásmico, los ERGICs y los endosomas, constituyen una vía de transporte de proteínas a lo largo del sistema somatodendrítico que se extiende hasta las regiones terminales de este tipo celular, como lo son las dendritas, donde el aparato de Golgi no está presente y sin embargo, hay una gran cantidad de proteínas recién sintetizadas que son transportadas de forma inmediata a la membrana plasmática. Evidencia adicional sugiere la existencia de un organelo mixto, en el que diversas proteínas marcadoras de endosomas y lisosomas están presentes, que podría ser el organelo encargado del transporte en estas regiones distales de la célula (Bowen *et al.*, 2017; González *et al.*, 2018; Grieve & Rabouille, 2011). Adicionalmente, se ha reportado que los endosomas son capaces de interactuar con los ERGICs, lo que da pie a una vía exocítica poco descrita cuyas proteínas de interacción de membrana no han sido identificadas (Bowen *et al.*, 2017; Grieve & Rabouille, 2011) y en la cual Mctp podría ser participante de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de co-localización, permitiendo la fusión de membranas entre los endosomas, los ERGICs y el retículo.

De acuerdo a Hanus y colaboradores en el año 2014, durante el desarrollo y tras un incremento agudo de actividad sináptica, en retículo endoplásmico se activa una red de transporte en la zona activa que permite la compartimentalización de las membranas orquestando la exocitosis. La presencia de Mctp2b en retículo endoplásmico a lo largo de toda la red somatodendrítica (como muestran las electroporaciones con Sec61 β) y su presencia en zonas activas en *D. melanogaster* (Genç *et al.*, 2017), indican que Mctp podría formar parte de este mecanismo, ya que las proteínas participantes no han sido identificadas y es muy activo durante el desarrollo, durante el cual, según nuestros resultados de hibridaciones *in situ* (Espino Saldaña, en preparación), existen picos de

expresión del ARNm de Mctp a diversos estadios. Curiosamente Mctp se observa principalmente en el sistema nervioso en desarrollo, la isla sanguínea y la vesícula ótica, regiones en las cuales hay una alta tasa de migración celular y liberación de moléculas atrayentes y factores de crecimiento al medio extracelular.

Existe evidencia de la participación de Mctp en procesos de regulación de la exocitosis realizados en *Arabidopsis*. En ellos se propone a esta proteína como fundamental para el control de la liberación de *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* al medio extracelular, en su ausencia la maduración de las yemas germinales se acelera, truncando el desarrollo y dando una planta más pequeña; el papel que juega Mctp en este mecanismo no ha sido definido para la vía endocítica sin embargo se enfatiza su ausencia en la membrana plasmática y su presencia en endosomas (Liu *et al.*, 2018).

En trabajos realizados en *D. melanogaster* por Genç y colaboradores (2017) se encontró que la tasa de liberación basal de vesículas exocíticas en neuronas es menor en mutantes del gen *mctp*, además MCTP fue localizada en retículo endoplásmico y zonas activas de motoneuronas; aunque no co-localiza con marcadores de zonas activas (BRP, *Bruchpilot protein*) sí se observa cercana a ellos, esto fue confirmado al observar sinaptotagmina contigua a MCTP en la membrana plasmática.

Estos resultados sugieren la participación de Mctp en procesos de fusión de membrana y, posiblemente, relacionados con la disponibilidad de RRP (*Readily Releasable Pool*) mediante una vía rápida para recuperación de membrana y envío de receptores, que se activa a bajos niveles de Ca^{2+} , independiente de Golgi, necesaria para la plasticidad presináptica; sin embargo, podría también estar relacionada con procesos de fusión de membrana más allá del aparato de Golgi, como ha sido observado en las ferlinas (Bernatchez *et al.*, 2009; Doherty *et al.*, 2008; Lek *et al.*, 2012b).

La presencia de Mctp en la periferia de la membrana plasmática sugiere también su participación en interacciones retículo-membrana plasmática, como ha sido observado previamente para las sinaptotagminas extendidas (Giordano *et al.*, 2013), aunque en estudios previos ha sido reportado que las MCTP no interaccionan con lípidos de

membrana (Shin *et al.*, 2005), poseen una secuencia consenso ubicada en otras proteínas responsable de la interacción con fosfolípidos (Guerrero-Valero *et al.*, 2009).

Estos resultados parecen contradictorios entre sí, pero no en neuronas, donde el recambio de membranas es constante y las vías endocítica y exocítica se interconectan en lo que se conoce como el Ciclo de la Vesícula Sináptica: después de la exocitosis, las vesículas son recuperadas de tres formas: 1) Las mismas vesículas son acidificadas y rellenas con neurotransmisor listas para volver al RRP (*"kiss and stay"*), 2) las vesículas se rellenan y son utilizadas inmediatamente (*"kiss and run"*) y 3) las vesículas se endocitan y entran a la ruta endosomal, donde son recicladas y enviadas nuevamente al RRP (*"Recycling"*) (Südhof, 2004). Resultará interesante determinar si las Mctps están involucradas en estos procesos basados en su localización y efecto de los mutantes de *C. elegans* y *D. melanogaster*.

Las evidencias de localización intracelular de Mctp tienen sin embargo ciertas limitantes, ya que las vías no convencionales de secreción (*Unconventional Secretion Pathways, USP*) se ven activadas también en procesos de estrés celular, principalmente debido a plegamiento incorrecto de proteínas (*Unfolded Protein Response, UPR*), situación muy común durante ensayos de sobreexpresión de proteínas debido a la saturación de las secretasas del retículo y los mecanismos de transporte de proteínas, que causan por lo tanto, no solo la activación de una USP, si no la incorrecta localización de la proteína en la célula (Kim *et al.*, 2018; Rabouille, 2017); no obstante, estos experimentos de localización celular de proteínas fluorescentes han sido utilizados en diversos estudios (Chen & Whiteheart, 1999; Redpath *et al.*, 2016).

Fue reportado ya previamente que Mctp no interacciona con los principales componentes de la membrana plasmática, como son fosfatidilserina, fosfatidilcolina y fosfoinositolbifosfato, lo cual correlaciona con su ausencia en la membrana plasmática; sin embargo, no se realizó ningún estudio con fosfolípidos de membranas internas de la célula como son los de endosomas y el retículo endoplásmico (Shin *et al.*, 2005). Estos estudios de interacción con fosfolípidos de membranas internas serán importantes para determinar el rol que juegan las Mctp en la célula.

9. CONCLUSIONES

- Se estableció un método eficiente de electroporación de larvas de *D. rerio* para la expresión de proteínas fluorescentes en neuronas *in vivo*.
- En neuronas, la proteína Mctp2b se localiza en organelos de la vía endocítica, como son: retículo endoplásmico, endosomas tardíos, endosomas de reciclaje y lisosomas.
- Los resultados sugieren una posible participación de Mctp2b en procesos de tráfico vesicular en neuronas del sistema nervioso central de *D. rerio*.

10. REFERENCIAS

- Bernatchez, P. N., Sharma, A., Kodaman, P., & Sessa, W. C. (2009). Myoferlin is critical for endocytosis in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*.
- Bolte, S., & Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*.
- Bowen, A. B., Bourke, A. M., Hiester, B. G., Hanus, C., & Kennedy, M. J. (2017). Golgi-independent secretory trafficking through recycling endosomes in neuronal dendrites and spines. *ELife*, 6.
- Cerda, G. A., Thomas, J. E., Allende, M. L., Karlstrom, R. O., & Palma, V. (2006). Electroporation of DNA, RNA, and morpholinos into zebrafish embryos. *Methods*, 39(3), 207–211.
- Chapman, E. R. (2002). Synaptotagmin: A Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(7), 498–508.
- Chen, D., & Whiteheart, S. W. (1999). Intracellular localization of SNAP-23 to endosomal compartments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255(2), 340–346.
- Chitnis', A. B., & Kuwadai, J. Y. (1990). Axonogenesis in the Brain of Zebrafish Embryos. *The Journal of Neuroscience* (Vol. 10).
- Choudhury, A., Dominguez, M., Puri, V., Sharma, D. K., Narita, K., Wheatley, C. L., ... Pagano, R. E. (2002). Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(12), 1541–1550.

- Corbalan-Garcia, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2014). Signaling through C2 domains: More than one lipid target ☆. *BBA - Biomembranes*, 1838, 1536–1547.
- Costes, S. V., Daelemans, D., Cho, E. H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., & Lockett, S. (2004). Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells. *Biophysical Journal*, 86(6), 3993–4003.
- Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D., ... Ullrich, A. (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science*.
- Djurovic, S., Le Hellard, S., Kähler, A. K., Jönsson, E. G., Agartz, I., Steen, V. M., ... Andreassen, O. A. (2009). Association of MCTP2 gene variants with schizophrenia in three independent samples of Scandinavian origin (SCOPE). *Psychiatry Research*, 168(3), 256–258.
- Doherty, K. R., Demonbreun, A. R., Wallace, G. Q., Cave, A., Posey, A. D., Heretis, K., ... McNally, E. M. (2008). The endocytic recycling protein EHD2 interacts with myoferlin to regulate myoblast fusion. *Journal of Biological Chemistry*.
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300, 723–742.
- Genç, Ö., Dickman, D. K., Ma, W., Tong, A., Fetter, R. D., & Davis, G. W. (2017). MCTP is an ER-resident calcium sensor that stabilizes synaptic transmission and homeostatic plasticity. *ELife*, 6.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., & Südhof, T. C. (1994). Synaptotagmin I: A major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79(4), 717–727.

Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-Hagren, O., Colombo, S. F., Pirruccello, M., Milosevic, I., ... De Camilli, P. (2013). PI(4,5)P₂-Dependent and Ca²⁺-Regulated ER-PM Interactions Mediated by the Extended Synaptotagmins.

González, C., Cornejo, V. H., & Couve, A. (2018). Golgi bypass for local delivery of axonal proteins, fact or fiction? *Current Opinion in Cell Biology*.

Grieve, A. G., & Rabouille, C. (2011). Golgi bypass: skirting around the heart of classical secretion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), a005298.

Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(10), 721–730.

Guerrero-Valero, M., Ferrer-Orta, C., Querol-Audí, J., Marin-Vicente, C., Fita, I., Gó Mez-Fernández, J. C., ... Corbalán-García, S. (n.d.). *Structural and mechanistic insights into the association of PKC-C2 domain to PtdIns(4,5)P₂*.

Guo, Y., Sirkis, D. W., & Schekman, R. (2014). Protein Sorting at the trans-Golgi Network. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 30, 169–206.

Hanus, C., Kochen, L., tom Dieck, S., Racine, V., Sibarita, J.-B., Schuman, E. M., & Ehlers, M. D. (2014). Synaptic Control of Secretory Trafficking in Dendrites. *Cell Reports*, 7(6), 1771–1778.

Hendricks, M., & Jesuthasan, S. (2007). Electroporation-based methods for in vivo, whole mount and primary culture analysis of zebrafish brain development. *Neural Development*, 2(1), 6.

Hoegler, K. J., & Horne, J. H. (2010). Targeting the zebrafish optic tectum using in vivo electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 5(7).

Kera, S. a, Agerwala, S. M., & Horne, J. H. (2010). The temporal resolution of in vivo

electroporation in zebrafish: a method for time-resolved loss of function. *Zebrafish*, 7(1), 97–108.

Kikuma, K., Li, X., Kim, D., Sutter, D., & Dickman, D. K. (n.d.). Extended Synaptotagmin Localizes to Presynaptic ER and Promotes Neurotransmission and Synaptic Growth in *Drosophila*.

Kim, J., Gee, Y., & Lee, M. G. (2018). Unconventional protein secretion-new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). *Stages of Embryonic Development of the Zebrafish*.

Kuwada, J. Y., Bernhardt, R. R., & Chitnis, A. B. (1990). *Pathfinding by Identified Growth Cones in the Spinal Cord of Zebrafish Embryos. The Journal of Neuroscience*.

Kuwada, J. Y., Bernhardt, R. R., & Nguyen, N. (1990). Development of spinal neurons and tracts in the zebrafish embryo. *The Journal of Comparative Neurology*, 302(3), 617–628.

Lek, A., Evesson, F. J., Sutton, R. B., North, K. N., & Cooper, S. T. (2012a). Ferlins: Regulators of Vesicle Fusion for Auditory Neurotransmission, Receptor Trafficking and Membrane Repair. *Traffic*.

Lek, A., Evesson, F. J., Sutton, R. B., North, K. N., & Cooper, S. T. (2012b). Ferlins: Regulators of Vesicle Fusion for Auditory Neurotransmission, Receptor Trafficking and Membrane Repair. *Traffic*, 13(2), 185–194.

Lek, A., Lek, M., North, K. N., & Cooper, S. T. (2010). Phylogenetic analysis of ferlin genes reveals ancient eukaryotic origins. *BMC Evolutionary Biology*.

- Li, Q. (2004). A Syntaxin 1, G α , and N-Type Calcium Channel Complex at a Presynaptic Nerve Terminal: Analysis by Quantitative Immunocolocalization. *Journal of Neuroscience*.
- Liu, L., Li, C., Song, S., Teo, Z. W. N., Shen, L., Wang, Y., ... Yu, H. (2018). FTIP-Dependent STM Trafficking Regulates Shoot Meristem Development in Arabidopsis. *Cell Reports*, 23(6), 1879–1890.
- Lyons, D. A., Guy, A. T., & Clarke, J. D. W. (2003). Monitoring neural progenitor fate through multiple rounds of division in an intact vertebrate brain. *Development (Cambridge, England)*, 130(15), 3427–3436.
- MANDERS, E. M. M., VERBEEK, F. J., & ATEN, J. A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*.
- Min, S.-W., Chang, W.-P., & Südhof, T. C. (2007). E-Syts, a family of membranous Ca²⁺-sensor proteins with multiple C2 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(10), 3823–3828.
- Nalefski, E. A., & Falke, J. J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Science*, 5(12), 2375–2390.
- Parker, P. J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., ... Ullrich, A. (1986). The complete primary structure of protein kinase C - The major phorbol ester receptor. *Science*.
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R., & Südhof, T. C. (1990). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*.

- Qiu, L., Yu, H., & Liang, F. (2015). Multiple C2 domains transmembrane protein 1 is expressed in CNS neurons and possibly regulates cellular vesicle retrieval and oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, 135(3), 492–507.
- Rabouille, C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion.
- Ramírez, O. A., & Couve, A. S. (2010). The endoplasmic reticulum and protein trafficking in dendrites and axons.
- Redpath, G. M. I., Sophocleous, R. A., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., & Cooper, S. T. (2016). Ferlins Show Tissue-Specific Expression and Segregate as Plasma Membrane/Late Endosomal or Trans-Golgi/Recycling Ferlins. *Traffic*, 17(3),
- Rizo, J., & Sudhof, T. C. (1998). Rizo, J., & Sudhof, T. C. (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.15879>C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*.
- Ross, L. S., Parrett, T., & Easter, S. S. (1992). *Axonogenesis and Morphogenesis in the Embryonic Zebrafish Brain. The Journal of Neuroscience* (Vol. 72).
- Saint-Amant, L. (2006). *Development of Motor Networks in Zebrafish Embryos. ZEBRAFISH* (Vol. 3).
- Scott, L. J., Muglia, P., Kong, X. Q., Guan, W., Flickinger, M., Upmanyu, R., ... Boehnke, M. (2009). Genome-wide association and meta-analysis of bipolar disorder in individuals of European ancestry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Sherer, N. M., Lehmann, M. J., Jimenez-Soto, L. F., Ingmundson, A., Horner, S. M., Cicchetti, G., ... Mothes, W. (2003). Visualization of retroviral replication in living

cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic*.

Shibata, Y., Voss, C., Rist, J. M., Hu, J., Rapoport, T. A., Prinz, W. A., & Voeltz, G. K. (2008). The reticulon and Dp1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*.

Shin, O. H., Hau, W., Wang, Y., & Südhof, T. C. (2005). Evolutionarily conserved multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions (MCTPs) and unusual Ca²⁺ binding properties. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1641–1651.

Südhof, T. C. (2002). Synaptotagmins: why so many? *The Journal of Biological Chemistry*.

Südhof, T. C. (2004). THE SYNAPTIC VESICLE CYCLE. *Annu. Rev. Neurosci*, 27, 509–556.

Teh, C., Chong, S. W., & Korzh, V. (2003). DNA delivery into anterior neural tube of zebrafish embryos by electroporation. *BioTechniques*, 35(5), 950–954.

Wang, Y., & Südhof, T. C. (2003). Genomic definition of RIM proteins: Evolutionary amplification of a family of synaptic regulatory proteins. *Genomics*.

Westerfield, M. (2000). The Zebrafish Book. *Eugene*.

11. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de listón del dominio C2	2
Figura 2. Mapa topológico de la proteína Mctp	5
Figura 3. Sistema Nervioso Central en la farínula	7
Figura 4. Médula espinal en la farínula	8
Figura 5. Mctp en <i>D. rerio</i>	9
Figura 6. Distribución de ARNm de Mctp	9
Figura 7. Localización intracelular de Mctp en células HEK	11
Figura 8. Mapa de plásmidos que codifican mctp2b fusionado a reportero fluorescente	13
Figura 9. Montaje <i>in vivo</i>	16
Figura 10. Montaje de embriones fijados	17
Figura 11. Impacto del procedimiento sobre la viabilidad de los embriones	24
Figura 12. Efecto de la duración del pulso en la expresión de pCMV-mCherry C1	25
Figura 13. Efecto de la concentración de plásmido en la señal	26
Figura 14. Expresión temporal de Mctp2b-GFP	26
Figura 15. Mctp2b-GFP en neuronas	27
Figura 16. Mctp se localiza en cúmulos	28
Figura 17. Co-expresión de Mctp con Sec61 β -mCherry	29
Figura 18. Coelectroporación de Mctp2b-GFP con DsRed-Rab11	30
Figura 19. Co-electroporación de Mctp2b-GFP con DsRed-Rab7 WT	31
Figura 20. Co-electroporación de Mctp con Lamp1	32
Figura 21. Mctp co-localiza con Sec61 β en médula espinal	33
Figura 22. Coeficiente de Manders	38

12. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos de marcadores de organelos	14
Tabla 2. Lavados post-fijación	16
Tabla 3. Parámetros de captura por microscopio confocal	17
Tabla 4. Análisis cuantitativo de colocalización.	37

13. LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura Suplementaria 1. Co-localización con Retículo endoplásmico.	53
Figura Suplementaria 2. Co-localización con endosomas de reciclaje	54
Figura Suplementaria 3. Co-localización con endosomas tardíos	55
Figura Suplementaria 4. Co-localización con lisosomas	56
Figura Suplementaria 5. Co-localización con Retículo endoplásmico en medula espinal.	57

14. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

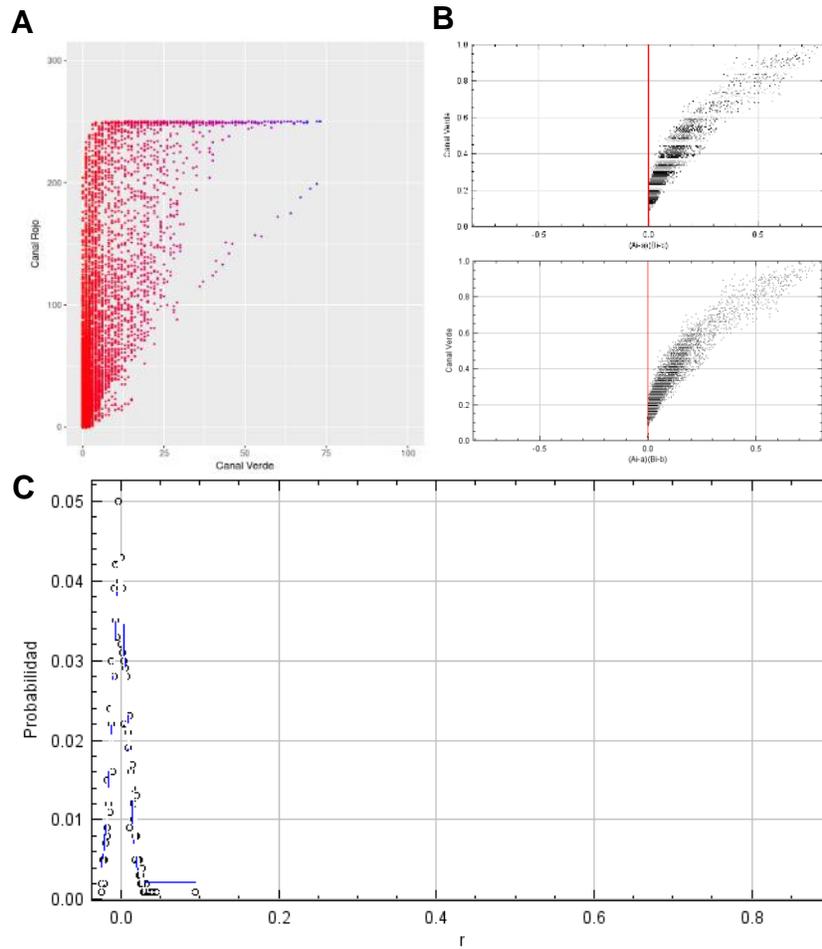


Figura Suplementaria 1. Colocalización de Mctp2b con Retículo endoplásmico. Imagen representativa del análisis cuantitativo. A) Diagrama de intensidades. B) Diagrama de Li, arriba: canal verde, abajo: canal rojo. C) Aleatorización de Costes (Curva de aleatorización, la línea roja representa el coeficiente de correlación original).

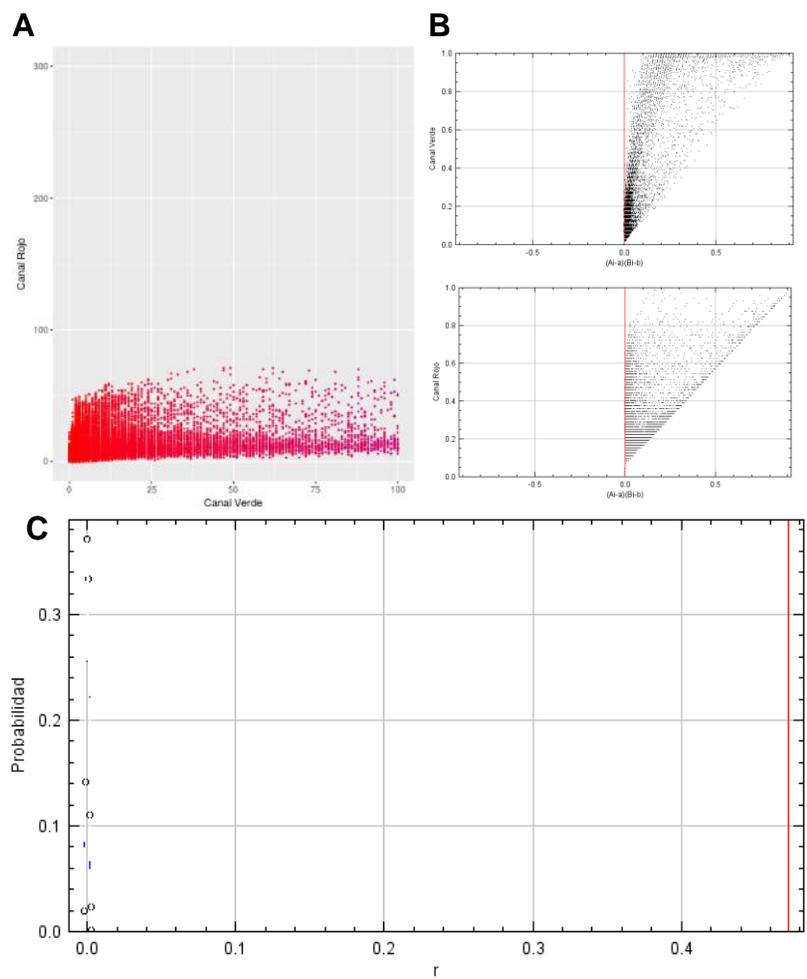


Figura Suplementaria 2. Colocalización de Mcp2b con endosomas de reciclaje. Imagen representativa del análisis cuantitativo. A) Diagrama de intensidades. B) Diagrama de Li, arriba: canal verde, abajo: canal rojo. C) Aleatorización de Costes (Curva de aleatorización, la línea roja representa el coeficiente de correlación original).

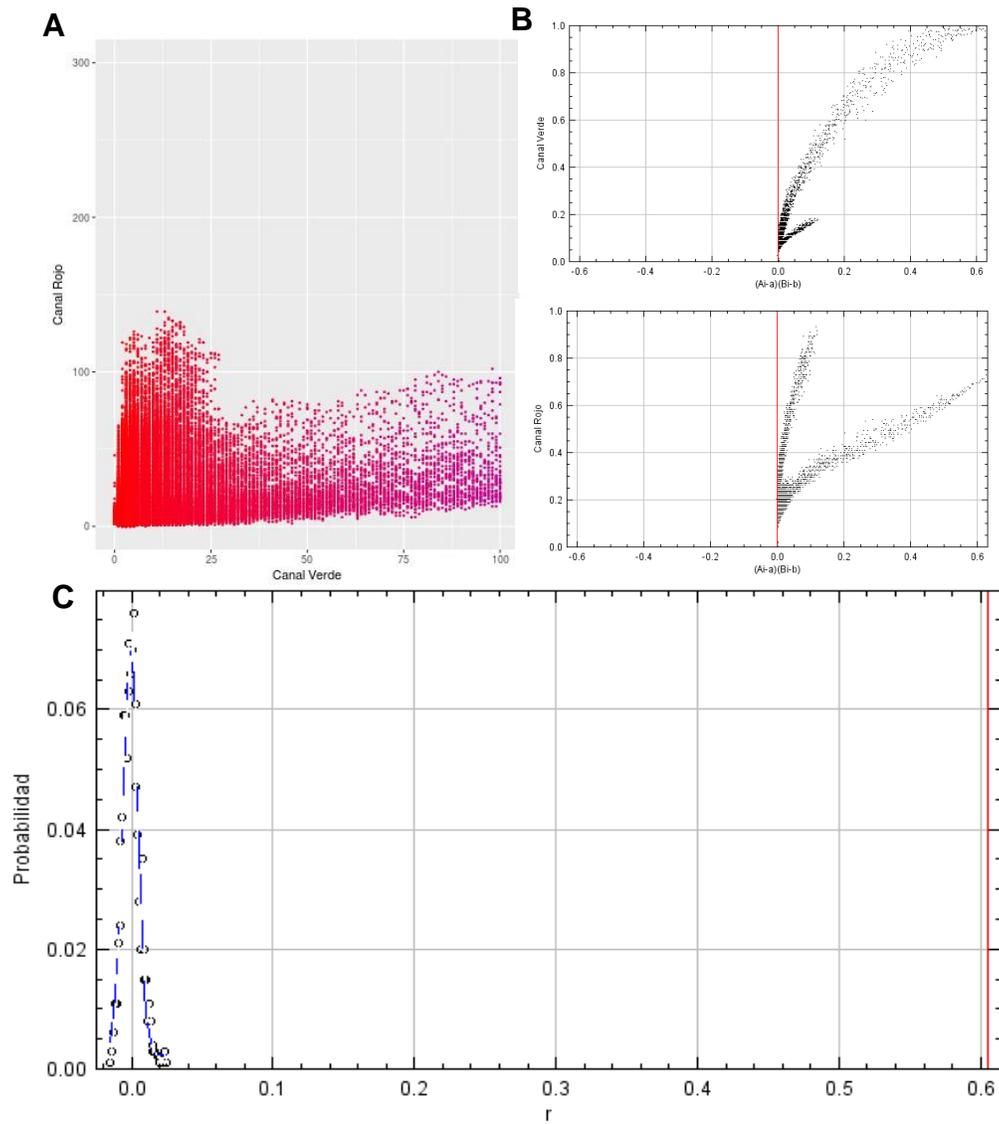


Figura Suplementaria 3. Colocalización de Mcp2b con endosomas tardíos. Imagen representativa del análisis cuantitativo. A) Diagrama de intensidades. B) Diagrama de Li, arriba: canal verde, abajo: canal rojo. C) Aleatorización de Costes (Curva de aleatorización, la línea roja representa el coeficiente de correlación original).

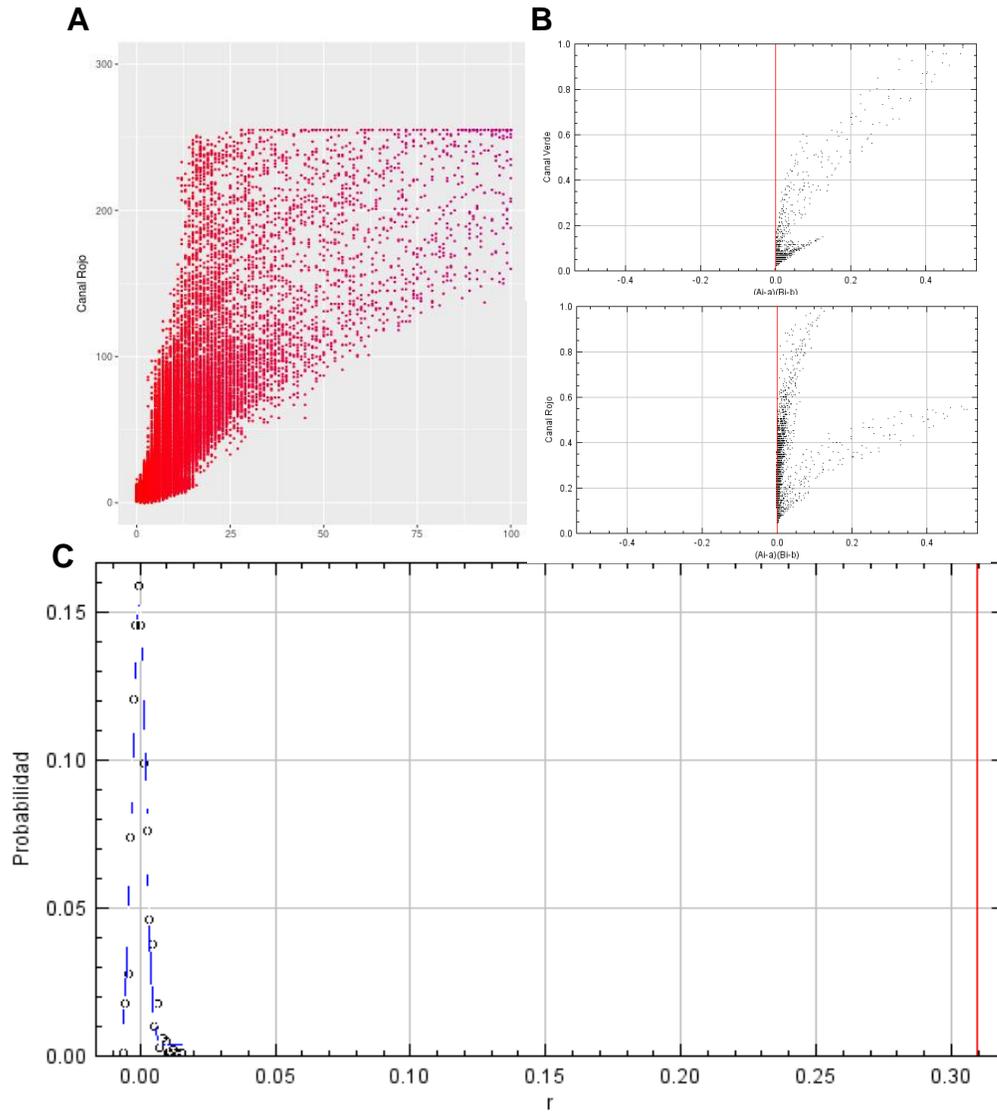


Figura Suplementaria 4. Colocalización de Mctp2b con lisosomas. Imagen representativa del análisis cuantitativo. A) Diagrama de intensidades. B) Diagrama de Li, arriba: canal verde, abajo: canal rojo. C) Aleatorización de Costes (Curva de aleatorización, la línea roja representa el coeficiente de correlación original).

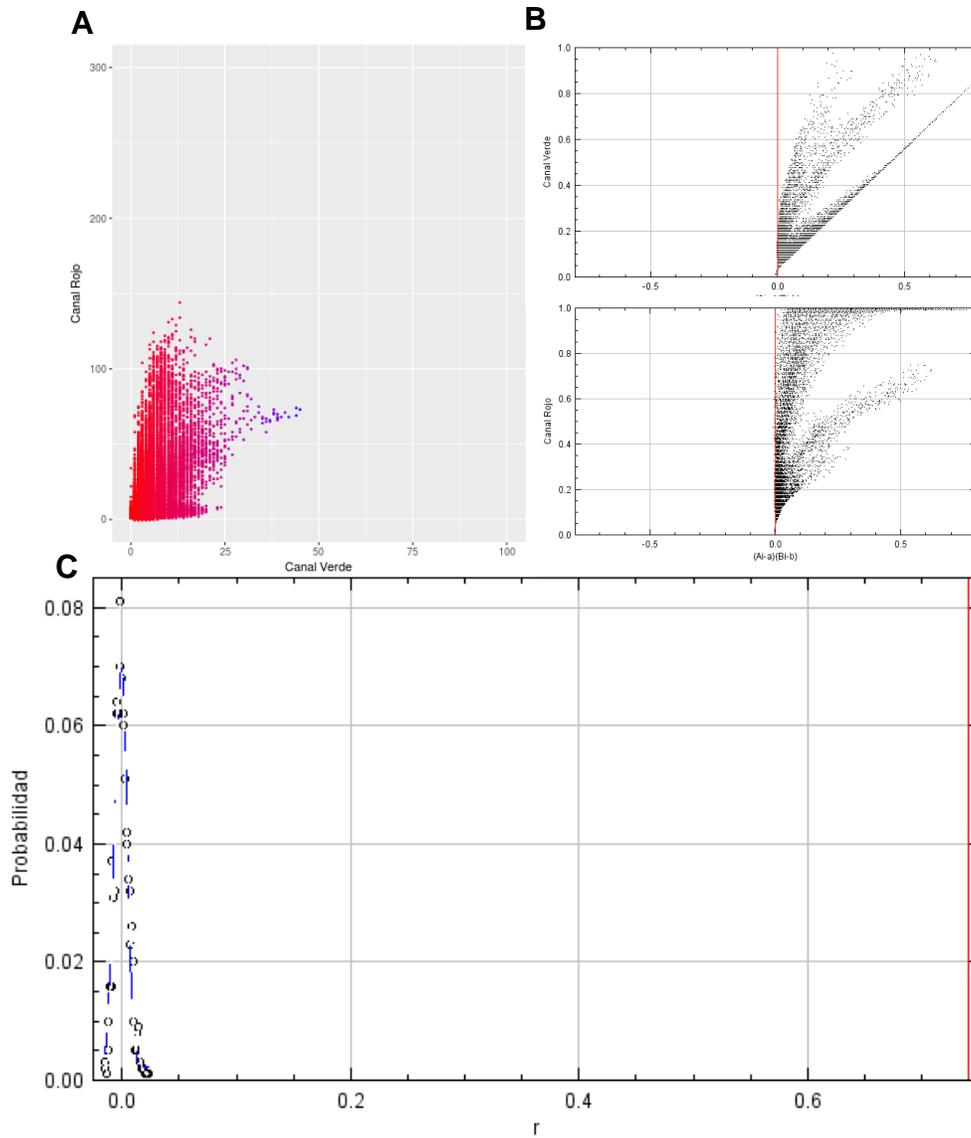


Figura Suplementaria 5. Colocalización con Retículo endoplásmico en medula espinal. Imagen representativa del análisis cuantitativo. A) Diagrama de intensidad. B) Diagrama de Li, arriba: canal verde, abajo: canal rojo. C) Aleatorización de Costes (Curva de aleatorización, la línea roja representa el coeficiente de correlación original).