



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

**“Localización de la proteína Mctp expresada heterológamente  
en células HEK-293”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**PRESENTA:**

EDUARDO OLIVARES HERNÁNDEZ

**Tutores:**

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz

Instituto de Neurobiología

**Miembros del Comité Tutor:**

Dr. Francisco Vázquez Cuevas

Dra. Teresa Edith Garay Rojas

Instituto de Neurobiología



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología.

### **Tutores:**

Dr. Ataulfo Martínez Torres y Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz.

### **Comité tutor:**

Dr. Francisco Vázquez Cuevas y Dra. Teresa Edith Garay Rojas.

### **Jurado del examen:**

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo, Dr. Ataulfo Martínez Torres, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Francisco Cuevas Vázquez y Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez.

### **Personal del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular (D15):**

M. en C. Ángeles Edith Espino Saldaña (técnico académico), Dra. Stéphanie Colette Thebault y Sra. Marina Ramírez Romero (Auxiliar de laboratorio).

### **Unidad de microscopía:**

Elsa Nydia Hernández Rios y Ma. Lourdes Palma Tirado.

### **Unidad de proteogenómica:**

Dra. Anaid Antaramian, M. en C. Adriana Gonzáles Gallardo y Dr. Michael Jeziorski.

### **Unidad de enseñanza:**

M. en C. Leonor Casanova Rico.

### **Biblioteca:**

Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela.

### **Videoconferencia:**

Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala

### **El presente proyecto fue financiado por:**

Fondos para la investigación de CONACYT: A1-S-7659

### **Beca CONACYT, Beca de movilidad en el extranjero (CONACYT) y apoyo PAEP 2018**

Becario No. 634192

### **A mi familia:**

Lourdes Hernández, Eduardo Olivares M., Jhoselyn Berenice, Victor Reyes, Victor Eduardo Reyes y Karen Elideth Valladares.

### **Compañeros del laboratorio y del instituto:**

¡Todos!

## TABLA DE CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>4</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....</b>	<b>8</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>Objetivo general:.....</b>	<b>13</b>
<b>Objetivos particulares: .....</b>	<b>13</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
<b>REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....</b>	<b>13</b>
<b>PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS .....</b>	<b>16</b>
<b>CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....</b>	<b>16</b>
<b>TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE CHOQUE TÉRMICO .....</b>	<b>17</b>
<b>EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO POR LISIS ALCALINA .....</b>	<b>18</b>
<b>REACCIÓN DE DIGESTIÓN DEL ADN PLASMÍDICO CON ENZIMAS DE     RESTRICCIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>TRANSFECCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS EN CÉLULAS HEK-293 .....</b>	<b>19</b>
<b>OBTENCIÓN DE IMÁGENES POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE     FLUORESCENCIA.....</b>	<b>19</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>51</b>

## ABREVIATURAS

<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion Calcio
<b>cDNA</b>	Acido desoxirribonucleico complementario
<b>dCTP</b>	Trifosfato de desoxicitidina
<b>dGTP</b>	Trifosfato de desoxiguanosina
<b>DMEM</b>	Dulbecco Modificado por Eagle
<b>DTT</b>	DL-Dithiothreitol
<b>E-Syts</b>	Extended Synaptotagmins
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>HEK-293</b>	Human embryonic kidney-293
<b>LIC</b>	Ligation Independent Cloning
<b>Mctp</b>	Multiple C2 Domain and Transmembrane Region Protein of Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ). Pez zebra.
<b>MCTP</b>	Multiple C2 Domain and Transmembrane Region Protein
<b>N-terminal</b>	Amino-terminal
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcription polymerase chain reaction
<b>SNARE</b>	Soluble NSF Attachment Receptor

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Topología de las proteínas que presentan dominios C2 y regiones transmembranales	9
2	Mapa funcional del plásmido DsRed-Rab7	20
3	Mapa funcional del plásmido construido: MCTP2B-mCherry	20
4	Mapa funcional de los plásmidos que portan <i>mctp2b</i> fusionado con GFP o mCherry	21
5	Representación hipotética de la proteína codificada por los plásmidos construidos	22
6	Expresión de las proteínas Mctp1a-GFP, Mctp1b-mCherry, Mctp2b-GFP y Mctp2a-mCherry, en células HEK-293.	22
7	Expresión de las proteínas Mctp2b-GFP y Mctp2b-mCherry	24
8	Expresión de las proteínas Mctp2b-mCherry y Mctp1a-GFP	25
9	Expresión de las proteínas Mctp2b-GFP y Mctp1b-mCherry	27
10	Expresión de las proteínas Mctp2b-GFP y Mctp2A-mCherry	28
11	Expresión de las proteínas Mctp1b-mCherry y Mctp2a-GFP	29
12	Expresión de las proteínas Mctp2a-mCherry y Mctp1a-GFP	31
13	Expresión de las proteínas Mctp1a-GFP y Mctp1b-mCherry	32
14	Gráfica de los coeficientes Pearson de las distintas cotransfecciones de los plásmidos construidos	34
15	Expresión de las proteínas mCherrySec61 $\beta$ y Mctp2b-GFP	35
16	Expresión de las proteínas DsRed-Rab11 y Mctp2b-GFP	37
17	Expresión de las proteínas DsRed-Rab7 y Mctp2b-GFP	38
18	Expresión de las proteínas LampI-RFP y Mctp2b-GFP	40
19	Expresión de las proteínas pECFP-MEM y Mctp2b-GFP	42

## RESUMEN

MCTP (*Multiple C2 Domain and Transmembrane Region Protein*) es una proteína ampliamente conservada en vertebrados e invertebrados. Se caracteriza por presentar tres dominios C2 de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y dos regiones transmembranales. Debido a ello, se considera que MCTP es una proteína sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  cuyas características son similares a otras proteínas como las sinaptotagminas, E-Syts y ferlinas, involucradas en procesos de transmisión sináptica. Se ha reportado la presencia de MCTP en cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón y músculo de rata. Estudios en nuestro laboratorio demostraron que el genoma de pez cebra presenta cuatro genes *mctp* (*mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a*, *mctp2b*), los cuales se expresan en el cerebro y corazón de peces adultos y en estados tempranos de su desarrollo. Se ha reportado la presencia de la proteína MCTP en membrana del retículo endoplasmático de motoneuronas de *D. melanogaster* y su posible participación en la estabilización homeostática de la neurotransmisión. Sin embargo, la localización intracelular de la proteína no se conoce a detalle. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la localización intracelular de la proteína Mctp de pez cebra expresada heterológicamente en células HEK-293. Para este propósito se construyeron plásmidos que contienen cada uno de los cuatro genes de Mctp de pez cebra fusionados con las proteínas fluorescentes mCherry y GFP. Estos plásmidos fueron transfectados a células HEK-293 junto con plásmidos que codifican a proteínas marcadoras de organelos como: retículo endoplásmico, endosomas tardíos, endosomas de reciclaje, lisosomas y membrana celular. Veinticuatro horas postransfección se identificó la localización intracelular de las proteínas por microscopia confocal de fluorescencia. Nuestros resultados indican que la proteína Mctp2b de pez cebra se encuentra localizada en el retículo endoplasmático, endosomas tardíos, endosomas de reciclaje y lisosomas de células HEK-293.

## ABSTRACT

MCTP (*Multiple C2 Domain and Transmembrane Region Protein*) is a protein widely conserved in vertebrates and invertebrates. It possesses three C2 domains for Ca<sup>2+</sup> binding and two transmembrane regions. MCTP is considered a calcium sensor such as synaptotagmins, E-Syts, and ferlins which are involved in synaptic transmission. The expression of MCTP has been reported in brain, heart, kidney, liver, lung and rat muscle. Studies in our laboratory showed that the zebrafish genome has four *mctp* genes (*mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a*, *mctp2b*), which are expressed in the brain and heart of adult fish and in early stages of their development. The presence of the MCTP protein in the membrane of the endoplasmic reticulum of motoneurons of *D. melanogaster* and its possible participation in the homeostatic stabilization of neurotransmission has been reported. However, the intracellular localization of the protein is not known in detail. Therefore, the objective of the present work was to determine the intracellular localization of the zebrafish Mctp protein expressed heterologously in HEK-293 cells. For this purpose, plasmids containing each of the four zebrafish Mctp genes fused with fluorescent proteins mCherry or GFP were constructed. These plasmids were transfected into HEK-293 cells together with plasmids encoding organelle marker proteins such as endoplasmic reticulum, late endosomes, recycling endosomes, lysosomes and cell membrane. Twenty-four hours post-transfection; the intracellular localization of the constructed proteins was identified by confocal fluorescence microscopy. Our results indicate that the zebrafish Mctp2b protein is located in the endoplasmic reticulum, late endosomes, recycling endosomes and lysosomes of HEK-293 cells.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La homeostasis del ion  $\text{Ca}^{2+}$  es un elemento central en las funciones celulares; este catión participa en diferentes vías de señalización intracelular y es usado por la célula para diversos procesos como el desarrollo, la liberación de neurotransmisores, la contracción muscular, el metabolismo, la autofagia y la muerte celular (Kaufman y Malhotra, 2014). La regulación de la concentración intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  es modulada por una amplia variedad de proteínas cuya propiedad es funcionar como tampones debido a su baja afinidad y a una gran capacidad de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (Görlach et al. 2006). Dentro de estas moléculas destacan las proteínas censoras de  $\text{Ca}^{2+}$ , las cuales presentan en su estructura módulos funcionales denominados dominios. Estos dominios confieren a las proteínas la propiedad de reaccionar ante cambios en las concentraciones de este ion. El dominio sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  más ampliamente distribuido en la naturaleza es el “dominio mano EF” (EF-hand) presente en calmodulina y parvalbúmina (Denessiouk et al. 2014). En contraste, el “dominio C2”, es el segundo dominio de mayor distribución y lo podemos encontrar en proteínas como la proteína cinasa C (PKC) y sinaptotagminas, entre muchas otras (Kochubey et al. 2011).

En organismos eucarióticos el dominio C2 se encuentra muy conservado tanto en vertebrados como en invertebrados (Shin et al. 2005). Este dominio está conformado por láminas  $\beta$  cuya longitud puede variar entre los 130 y 140 residuos de aminoácidos. Además, se ha descrito la interacción de estos dominios con distintos ligandos y sustratos como inositol, fosfolípidos, polifosfatos y particularmente su notable propiedad de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2014). Las proteínas que en su estructura incluyen dominios C2 están involucradas en diferentes procesos celulares como el tráfico de proteínas de membrana, la generación de segundos mensajeros, la señalización dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y la neurotransmisión (Cho y Stahelin, 2006).

Se considera que las proteínas con una sola copia del dominio C2 en su estructura, carecen de segmentos de residuos hidrofóbicos y están involucradas en procesos de señalización. En contraste, las proteínas con múltiples dominios C2 y segmentos de residuos

hidrofóbicos se encuentran ancladas a membranas celulares y están involucradas en el tráfico de membranas y fusión de vesículas (Martens y McMahon, 2008).

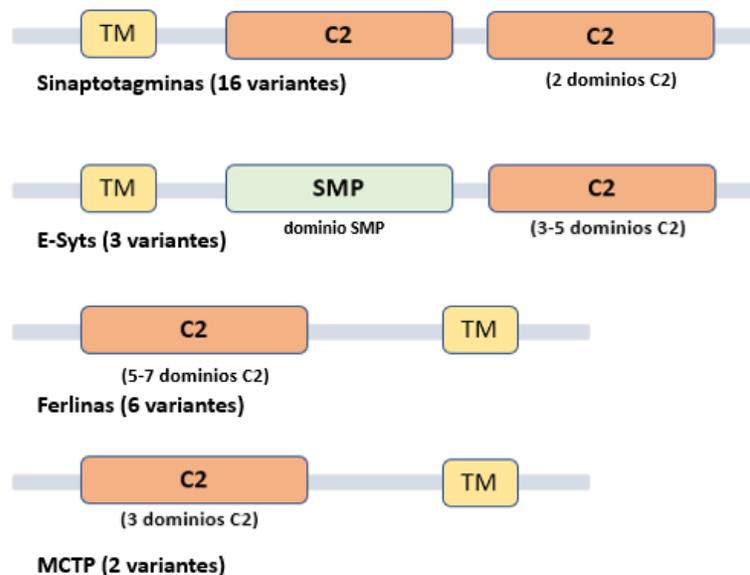
Existen por lo menos veinticinco familias de proteínas que presentan dominios C2 en su estructura, entre ellas destacan cuatro familias que se encuentran en neuronas y cuyas estructuras proteicas contienen múltiples dominios C2 y regiones transmembranales (Corbálan-García, 2014; Shin et al. 2005). Estas cuatro familias son: sinaptotagminas, ferlinas, sinaptotagminas extendidas y MCTP. Las proteínas sinaptotagminas se caracterizan por presentar dos dominios C2 citoplasmáticos y una región transmembranal en el extremo N-terminal. En esta familia destaca la sinaptotagmina-I cuya participación en la sinapsis neuronal es objeto de intensa investigación. Esta proteína se encuentra anclada a vesículas exocíticas mediante una región transmembranal y sus dominios C2 interactúan con fosfolípidos de membrana como el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, así como con proteínas del complejo SNARE en respuesta al aumento de las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Tang et al. 2006). Esta interacción facilita la fusión entre la membrana de la vesícula exocítica con la membrana plasmática, lo que eventualmente permite la liberación de los neurotransmisores al espacio sináptico (Sutton et al. 1995; Ubach et al. 1998).

Las proteínas ferlinas presentan de tres a cinco dominios C2 y una sola región transmembranal. Sus dominios C2 también interactúan con fosfolípidos de membrana, con proteínas del complejo SNARE (Pangrsic et al. 2012) y están involucradas en procesos de exocitosis de neurotransmisores, fusión y fisión de endomembranas y en la modulación de señales de  $Ca^{2+}$  (Lalani et al. 2013; Lek et al. 2012; Min et al. 2007).

El tercer tipo de proteínas con dominios C2 y regiones transmembranales son las sinaptotagminas extendidas (E-Syts) cuya estructura proteica presenta una sola región transmembranal. Se denominan así, porque su estructura es similar a la de las sinaptotagminas, pero con dos o cinco dominios C2 (Reinisch y De Camilli, 2016). Estas proteínas están implicadas en la formación de sitios de contacto entre retículo endoplásmico y membrana plasmática en respuesta a señalización por  $Ca^{2+}$  a través de sus dominios C2; y participan en el transporte de fosfolípidos desde el retículo endoplasmático a la membrana plasmática debido a su dominio SMP (Sang-Won et al. 2006).

La cuarta familia de proteínas con múltiples dominios C2 y regiones transmembranales son las MCTP (*Multiple C2 domain and transmembrane region protein*). Estas proteínas están muy conservadas evolutivamente y se pueden encontrar en vertebrados e invertebrados. Su estructura proteica está conformada por tres dominios C2 y una o dos regiones transmembranales. A diferencia de las sinaptotagminas, E-Syts y ferlinas, las proteínas MCTP tienen la capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, se ha reportado que no tienen afinidad a fosfolípidos de membrana (Shin et al. 2005). Estas características las convierten en proteínas con propiedades únicas, pero su función y localización intracelular todavía no se conoce a detalle.

En la figura 1, se muestran los modelos estructurales de las cuatro familias de proteínas con múltiples dominios C2 y regiones transmembranales.



**Figura 1.** Topología de las proteínas que presentan dominios C2 y regiones transmembranales (TM).

Dominio SMP.

Análisis bioinformáticos realizados por Shin et al. (2005) mostraron que invertebrados como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* presentan un solo gen *mctp* que codifica para distintas variantes de la proteína. En contraste vertebrados como roedores y humanos presentan dos genes *mctp* que codifican para distintas isoformas. Este mismo grupo de investigación reportó la presencia de la proteína MCTP1 en diferentes tejidos de rata como en el músculo esquelético, músculo cardíaco y en una menor proporción

en el cerebro y riñón; a diferencia de la proteína MCTP2 que fue reportada solamente en músculo cardíaco y testículo.

Otras contribuciones también señalan la presencia de MCTP en neuronas de vertebrados e invertebrados. Se ha visto que dos promotores independientes del gen D2092.1 (homólogo de *mctp2*) de *C. elegans*, dirigen la expresión de un gen reportero en las neuronas de este nemátodo (Téllez-Arreola, tesis de maestría, 2014). Asimismo, Qiu et al. (2015) reportaron que MCTP1 se encuentra asociada a vesículas sinápticas de neuronas del hipocampo de ratas y demuestran la presencia del ARNm que codifica a MCTP1 en neuronas del sistema nervioso central (SNC). Específicamente en el hipocampo, giro dentado, núcleo habenular medial, amígdala y en áreas corticales cerebrales y cerebelares. Además, observaron la presencia de MCTP1 en las terminales de los axones presinápticos y colocalización de la proteína con proteínas marcadoras del retículo endoplasmático y endosomas de células PC12. En contraste, Genç et al. (2017) reportaron la localización de la proteína MCTP en el retículo endoplasmático de motoneuronas de *D. melanogaster* y concluyeron que es una proteína necesaria para la adecuada liberación de neurotransmisores, proponiendo que MCTP participa de forma relevante en la homeostasis presináptica.

Estudios previos en nuestro laboratorio revelaron que las mutantes con delección del gen *mctp-1* en *C. elegans* manifestaron alteraciones en la tasa de ovoposición, anatomía y en la coordinación motora. Las mutantes también presentaron resistencia parcial a levamisole (agonista del receptor a nicotina), lo que sugiere que tal efecto se debe a defectos en la postsinapsis (Téllez-Arreola et al. en revisión). Otros estudios también sugieren que MCTP se encuentra en subdominios específicos del retículo endoplasmático en donde MCTP participa en la biogénesis de las gotas lipídicas debido a que la reducción en la expresión de esta proteína reduce significativamente el diámetro de estos orgánulos (Joshi et al. 2018).

Diferentes estudios señalan que defectos en la proteína MCTP está vinculados con enfermedades neuropsiquiátricas. Análisis metagenómicos mostraron asociación entre el polimorfismo de nucleótido simple (SNP) rs17418283 de *mctp1* con la manifestación de desorden bipolar (Scott et al. 2009). También se ha sugerido relación entre SNP's específicos del gen *mctp2* y susceptibilidad a esquizofrenia (Djurovic et al. 2009). Verma et al. (2008) señalan que puede existir algún vínculo entre los genes de la región cromosómica 15q25-26,

en donde se encuentra incluido *mctp2*, con trastornos de depresión. Finalmente, también hay reportes en los que relacionan defectos en las proteínas MCTP2 de humano con enfermedades congénitas cardíacas como la coartación aórtica (CoA) y el síndrome del corazón izquierdo hipoplásico (SCIH) los cuales han sido observados en individuos con deleciones en la región cromosómica 15q26 (Lalani et al. 2013). También se demostró que la supresión de la expresión de gen de *mctp2* en la rana *Xenopus laevis* conlleva al estrechamiento de la aorta (Lalani et al. 2013).

### **MCTP EN *Danio rerio* (PEZ CEBRA)**

Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que el pez cebra presenta cuatro distintos genes de *mctp* (*mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a* y *mctp2b*) los cuales codifican para distintas isoformas. Mediante RT-PCR se determinó que los ARNm que codifican para los cuatro genes se encuentran presentes desde los estados embrionarios del pez hasta la edad adulta. Los cDNA obtenidos fueron clonados, secuenciados y analizados. Conjuntamente, se determinó que tres de los cuatro genes identificados presentan eventos de *splicing* alternativo en las regiones localizadas entre los dominios C2, lo que sugiere que todas las isoformas encontradas podrían ser funcionales. Asimismo, se realizaron hibridaciones *in situ* y se determinó que los ARNm codificados por los cuatro genes *mctp* se expresan de manera diferencial en el sistema nervioso y sistema muscular del pez a las 24 horas post fertilización (Espino-Saldaña, tesis doctoral en proceso).

Estas aproximaciones son relevantes porque no hay reportes previos sobre la proteína Mctp de pez cebra. En consecuencia, en el laboratorio se han planteado estudios adicionales enfocados en determinar la localización intracelular de la proteína con el objetivo de contribuir al desciframiento de sus propiedades funcionales.

### **JUSTIFICACIÓN**

Se sabe que la localización intracelular de las proteínas brinda información relevante sobre el entorno en el que éstas operan, así como los distintos tipos de interacciones moleculares y procesos fisiológicos en las que pueden estar involucradas (Guo et al., 2016; Scott et al., 2005). Por lo tanto, y debido a que la función y localización intracelular de las

proteínas MCTP no se conoce a detalle, en el presente trabajo se planteó que la fusión de las proteínas Mctp de pez cebra a proteínas fluorescentes y su expresión en células HEK-293 brindaría información relevante sobre la localización intracelular, lo que contribuiría al desciframiento de las propiedades funcionales de las MCTP.

## **HIPÓTESIS**

La identificación de los organelos en los cuales se expresan las proteínas Mctp de pez cebra fusionadas a proteínas fluorescentes en células HEK-293 permitirá hacer inferencias sobre su función.

## **OBJETIVOS**

Objetivo general:

Determinar la localización intracelular de las proteínas Mctp de pez cebra en los distintos organelos de las células HEK-293.

Objetivos particulares:

- Construir plásmidos que contengan los genes *mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a* y *mctp2b* de pez cebra fusionados con secuencias que codifican a las proteínas fluorescentes GFP o mCherry.
- Co-transfectar los plásmidos construidos junto con plásmidos que codifican a proteínas marcadoras de organelos para determinar por microscopia confocal la localización intracelular de las proteínas Mctp.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Las secuencias codificantes de los genes *mctp* que se utilizaron en el presente estudio fueron previamente clonadas en el vector pGEM-TEasy, y eventualmente secuenciadas (Espino-Saldaña, tesis doctoral en proceso). Mediante la técnica de PCR se amplificaron cada una de las secuencias codificantes de los genes *mctp* utilizando los oligonucleótidos descritos

en la Tabla 1, los cuales contienen las secuencias homólogas a los vectores de clonación pcDNA3-GFP-LIC y pcDNA3-mCherry-LIC, especialmente diseñados para la clonación independiente de ligasa LIC. La reacción de amplificación de las secuencias codificantes de los genes *mctp* se llevaron a cabo en el termociclador Selectcycler usando la enzima *High Fidelity Pol* (Jena Bioscience). El protocolo de la reacción se estableció de acuerdo con los parámetros recomendados por el productor (Tabla 2).

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la reacción de PCR.** Para la amplificación de gene se utilizaron dos oligonucleótidos: foward (FD) y reverse (RS)

Gene	Secuencia de oligonucleótidos (5' - 3')	Producto amplificado (pb)
<i>mctp1a</i>	FD: TACTTCCAATCCAATGCCACCATGTTAGCACTCTCGCTTTCCTCC	2139
	RS: CTCCCCTACCAATGCCTCCTGGGTTATTTTTCTTCTCTT	
<i>mctp1b</i>	FD: TACTTCCAATCCAATGCCACCATGGAAGCGAGTATGGACGTGGAT	2586
	RS: CTCCCCTACCAATGCCTCCAGGGTTGTTCTCCGTTTTTT	
<i>mctp2a</i>	FD: TACTTCCAATCCAATGCCACCATGGACCCAAGGAAGAAAATGTGG	2781
	RS: CTCCCCTACCAATGCCGCGCCCGGTTTTCTTCTTCCACCGG	
<i>mctp2b</i>	FD: TACTTCCAATCCAATGCCACCATGCGAGGCTTTTTTCTTTTTAAG	2193
	RS: CTCCCCTACCAATGCCTGGTGAGGATCTTCTTTTTCTGTA	

**Tabla 2. Componentes usados para la reacción de PCR**

Componente	Volumen (µl)
10x High Fidelity Buffer	5
dNTP's 200 µM	1
Primers FD y RS 0.2 µM	4 c/u
DNA (100ng/µl)	2
Enzima ( <i>High Fidelity Pol</i> )	0.3
Agua	33.7
<b>Volumen final</b>	<b>50</b>

En correspondencia con las recomendaciones del fabricante, se establecieron protocolos para la amplificación de cada uno de los cuatro genes *mctp* que se muestran a continuación:

---

<i>mctp1a</i>			
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	2 minutos	1 ciclo
<b>Desnaturalización</b>	95°C	20 segundos	30 ciclos
<b>Alineamiento de primers</b>	48 °C	30 segundos	30 ciclos
<b>Elongación</b>	68°C	2.5 minutos	30 ciclos
<b>Elongación final</b>	68°C	2.5 minutos	1 ciclo

---

<i>mctp1b</i>			
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	2 minutos	1 ciclo
<b>Desnaturalización</b>	95°C	20 segundos	30 ciclos
<b>Alineamiento de primers</b>	53 °C	30 segundos	30 ciclos
<b>Elongación</b>	68°C	3 minutos	30 ciclos
<b>Elongación final</b>	68°C	3 minutos	1 ciclo

---

<i>mctp2a</i>			
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	2 minutos	1 ciclo
<b>Desnaturalización</b>	95°C	20 segundos	30 ciclos
<b>Alineamiento de primers</b>	53°C	30 segundos	30 ciclos
<b>Elongación</b>	68°C	3 minutos	30 ciclos
<b>Elongación final</b>	68°C	3 minutos	1 ciclo

---

<i>mctp2b</i>			
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	2 minutos	1 ciclo
<b>Desnaturalización</b>	95°C	20 segundos	30 ciclos
<b>Alineamiento de primers</b>	48 °C	30 segundos	30 ciclos
<b>Elongación</b>	68°C	2.5 minutos	30 ciclos
<b>Elongación final</b>	68°C	2.5 minutos	1 ciclo

## PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Los productos amplificados fueron analizados en gel de agarosa al 0.7%. Se utilizó un marcador de peso molecular con el fin de corroborar los tamaños correctos de cada uno de los fragmentos. Cada producto de PCR se purificó de acuerdo con el protocolo de purificación QIAquick GEL(QIAGEN). Las bandas de agarosa que contenían los fragmentos amplificados fueron cortadas, pesadas y colocadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml. De acuerdo con el peso de cada banda se agregaron tres volúmenes de buffer QG, se colocaron los tubos en agitación a 700 rpm durante 10 minutos a 50°C hasta disolver completamente la agarosa en el buffer; posteriormente se agregó un volumen de isopropanol y se mezcló cuidadosamente por inversión. Se transfirió la solución de cada tubo a las columnas del kit y se centrifugaron a 13000 rpm durante un minuto. El líquido obtenido de la centrifugación fue desechado. Se agregaron 750 µl de buffer PE para lavar la columna y se centrifugó a la misma velocidad. Se repitió el último paso. La columna se trasladó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Finalmente, se agregaron 50 µl de Buffer EB y se centrifugó a 13000 rpm por un minuto. En la solución obtenida por centrifugación se obtuvo el ADN amplificado por PCR, el cual fue cuantificado y almacenado a -20°C.

## CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR (MÉTODO LIC)

La clonación de los productos de PCR se llevó a cabo por el método LIC (*Ligation Independent Cloning*) (Charalampos, 1990), para ello se siguieron las recomendaciones del fabricante como se describe a continuación:

1.- Los vectores, pcDNA3-GFP-LIC y pcDNA3-mCherry-LIC, fueron linealizados e incubados a 37°C mediante la siguiente reacción:

Componente	Volumen ( $\mu$ l)
pCDNA3-GFP-LIC o pCDNA3-mCherry-LIC (100ng/ $\mu$ l)	1.5
Buffer 10xG	2
Enzima SspI	0.5
Volumen final	20

2.- Posteriormente, los vectores linealizados y los productos de PCR se trataron con la enzima *T4 DNA Polymerase* (ThermoFisher) para generar extremos complementarios entre los vectores y los productos de PCR purificados. Para ello se realizaron las siguientes reacciones:

Componente	Volumen ( $\mu$ l)	Componente	Volumen ( $\mu$ l)
Vector linealizado	10	Producto de PCR	5
T4 Buffer	2	T4 Buffer	2
dGTP 25mM	2	dCTP 25mM	2
DTT 100mM	1	DTT 100mM	1
<i>T4 DNA Polymerase</i>	0.2	<i>T4 DNA Polymerase</i>	0.2
Agua	4.8	Agua	9.8
Volumen final	20	Volumen final	20

Ambas mezclas se incubaron durante 40 minutos a 22°C, seguido de una segunda incubación de 20 minutos a 75°C para desactivar la enzima.

3.- La alineación del vector con los productos de PCR fue realizada mezclando las soluciones obtenidas del tratamiento con la enzima *T4 DNA Polymerase*: 3  $\mu$ l de vector con 3  $\mu$ l del producto de PCR, en un volumen final de 20  $\mu$ l. Esta mezcla se dejó incubar una hora a temperatura ambiente y se procedió a la transformación de células competentes.

#### TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE CHOQUE TÉRMICO

Para la transformación de bacterias se usaron tubos Eppendorf de 1.5 ml en donde se mezclaron 10  $\mu$ l de la mezcla de ligación y 100  $\mu$ l de bacterias *Escherichia coli* (XL1 blue) competentes para transformación. La mezcla se incubó en hielo por 30 minutos, seguido de un choque térmico a 42°C por 90 segundos, y una incubación de 2 minutos en hielo. Se

agregaron 800 µl de medio LB y se incubó a 37°C a 180 rpm, durante una hora para su cultivo. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado un minuto a 12000 rpm, el precipitado se resuspendió en 100 µl de medio LB y finalmente la mezcla fue sembrada en cajas Petri con LB agar-ampicilina (50 µg/ml). Se incubaron por 16 h y se seleccionaron las colonias obtenidas para su propagación en tubos con 4 ml de medio líquido LB con ampicilina. Se incubaron las bacterias por 16 h a 37°C en agitación a 160 rpm y se procedió a realizar la extracción del ADN plasmídico.

#### EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO POR LISIS ALCALINA

La extracción del ADN plasmídico de los cultivos de 16 h de incubación a 37°C, se realizó con el kit de extracción GeneJET (Fermentas). Se colocaron 1.5 ml de cada cultivo en tubos Eppendorf, la solución se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos. El sobrenadante se desechó y se agregaron en 250 µl de *Resuspension Solution*. Cada tubo se colocó en vortex hasta disolver completamente el precipitado. Se agregaron 250 µl de *Lysis Solution* y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces hasta obtener una solución transparente. A continuación, se agregaron 350 µl de *Neutralization Solution* y se mezcló inmediatamente por inversión. La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm, el sobrenadante fue transferido a las columnas GeneJET por pipeteo. Se centrifugó un minuto a 12000 rpm. El precipitado fue desechado y se colocó la columna nuevamente en el tubo. Se agregaron 500 µl de *Wash Solution* a la columna y se centrifugó por 60 segundos, se desechó el sobrenadante repitiéndose el paso anterior. La columna se trasladó a un nuevo tubo de 1.5 ml y se agregaron 50 µl de *Elution Buffer*. Se dejó incubar por 2 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12000 rpm para obtener la solución que contiene el ADN plasmídico.

#### REACCIÓN DE DIGESTIÓN DEL ADN PLASMÍDICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para comprobar las clonas que fueron positivas, se realizaron dos digestiones con diferentes enzimas de restricción para cada uno de los plásmidos. En la primera digestión se seleccionaron enzimas de restricción que cortan una sola vez el plásmido con la finalidad de

linealizarlo y obtener una banda de ADN en gel de agarosa para observar su tamaño total. En la segunda digestión se seleccionaron enzimas de restricción que cortan dos o más veces el plásmido con la finalidad de obtener más de una banda de ADN en el gel de agarosa y confirmar la presencia del ADN clonado en el vector (véase figura 2 y figura 3).

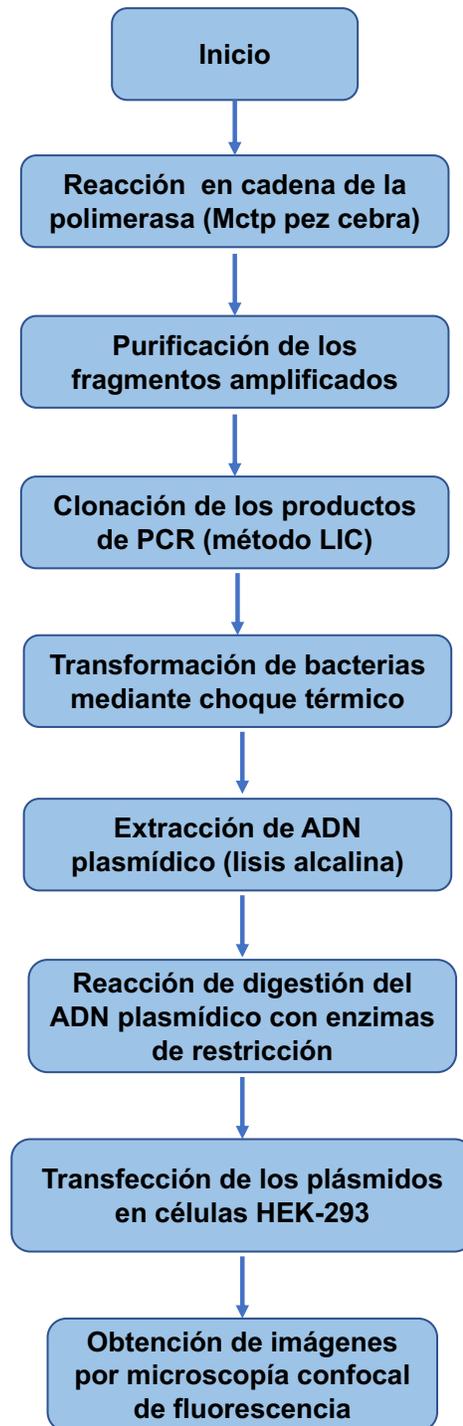
#### TRANSFECCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS EN CÉLULAS HEK-293

Las transfecciones se realizaron en células HEK-293 en cultivo (2 días *in vitro*). Se utilizó Lipofectamine PLUS™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se siguieron las recomendaciones del fabricante. Para cada plásmido, la transfección se realizó de la siguiente forma: en tubos eppendorf de 1.5 ml se mezclaron 50 µl de medio DMEM con 2 µl de Lipofectamine. En un segundo tubo se mezclaron 50 µl de medio DMEM junto con una concentración final de 1.2 µg por cada plásmido. En el caso de las cotransfecciones se agregaron 0.6 µg de cada uno. Ambas mezclas se dejaron incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las dos soluciones se mezclaron y se dejaron incubar por 20 minutos a temperatura ambiente. La solución final (100 µl) se agregó al cultivo celular y se dejó incubar por 36 h a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%.

#### OBTENCIÓN DE IMÁGENES POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

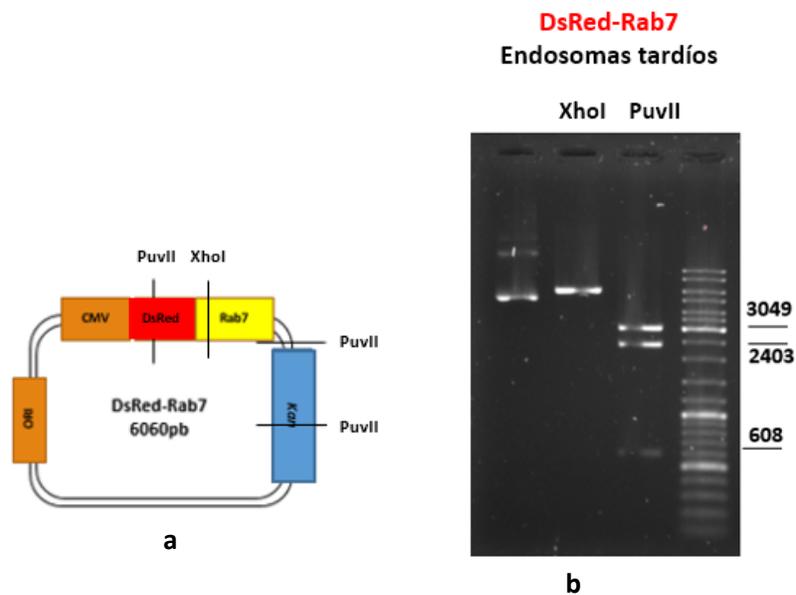
Las células fueron observadas 48h después de la transfección por microscopía confocal de fluorescencia con el microscopio Zeiss 510 LSM; longitud de onda de 561 nm para excitar mCherry y 480 nm para excitar GFP. La captura de imágenes en el eje Z se realizó a cada 0.2 µm, obteniendo en promedio cincuenta imágenes por célula, que representan en conjunto n=1. Cada una de las imágenes del conjunto n=1 fueron analizadas y procesadas con el software ImageJ. Asimismo, los coeficientes de colocalización Manders y Pearson se obtuvieron con el mismo programa. Los coeficientes de colocalización mostrados son el resultado de promediar los coeficientes de colocalización obtenidos de cada una de las imágenes obtenidas de cinco células distintas (n=5).

## DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS

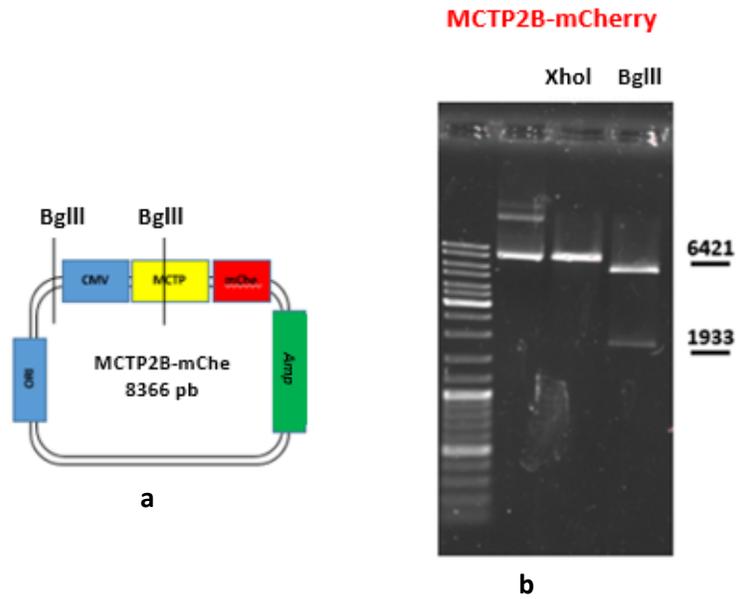


## RESULTADOS

Con el método de ligación LIC se construyeron seis plásmidos (tabla 3) que contienen las secuencias codificantes de los cuatro *mctp* de pez cebra fusionados en su extremo carboxilo terminal a las secuencias que codifican para GFP o mCherry (figura 4). Asimismo, los plásmidos fueron caracterizados con enzimas de restricción (figura 2 y 3) y se enviaron a secuenciar. Una vez corroborada su identidad, fueron transfectados en células HEK- 293 para observar su expresión mediante microscopía confocal de fluorescencia.



**Figura 2.** (a) Mapa funcional del plásmido DsRed-Rab7; **ORI:** Origen de replicación; **CMV:** Promotor citomegalovirus; **Kan:** Gen de resistencia a kanamicina. (b) Gel de agarosa mostrando los productos de la restricción con los tamaños predichos.



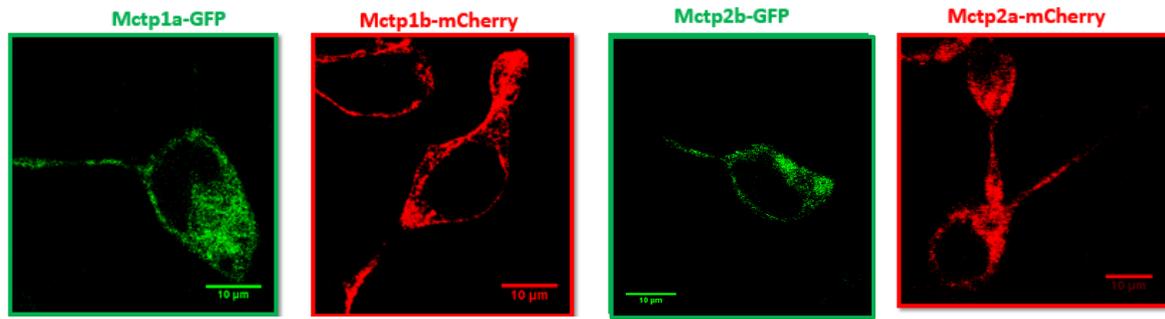
**Figura 3. (a)** Mapa funcional del plásmido construido: MCTP2B-mCherry; **ORI:** Origen de replicación; **CMV:** Promotor citomegalovirus; **Amp:** Gen de resistencia a ampicilina. **(b)** Gel de agarosa mostrando los productos de la restricción con los tamaños predichos.

**Tabla 3. Plásmidos construidos mediante el método de ligación LIC**

Plásmido construido	Proteína codificada
<i>pCDNA3-mctp1a-GFP-LIC</i>	Mctp1a-GFP
<i>pCDNA3-mctp1b-mCherry-LIC</i>	Mctp1b-mCherry
<i>pCDNA3-mctp2a-GFP-LIC</i>	Mctp2a-GFP
<i>pCDNA3-mctp2a-mCherry-LIC</i>	Mctp2a-mCherry
<i>pCDNA3-mctp2b -GFP-LIC</i>	Mctp2b-GFP
<i>pCDNA3-mctp2b-mCherry-LIC</i>	Mctp2b-mCherry

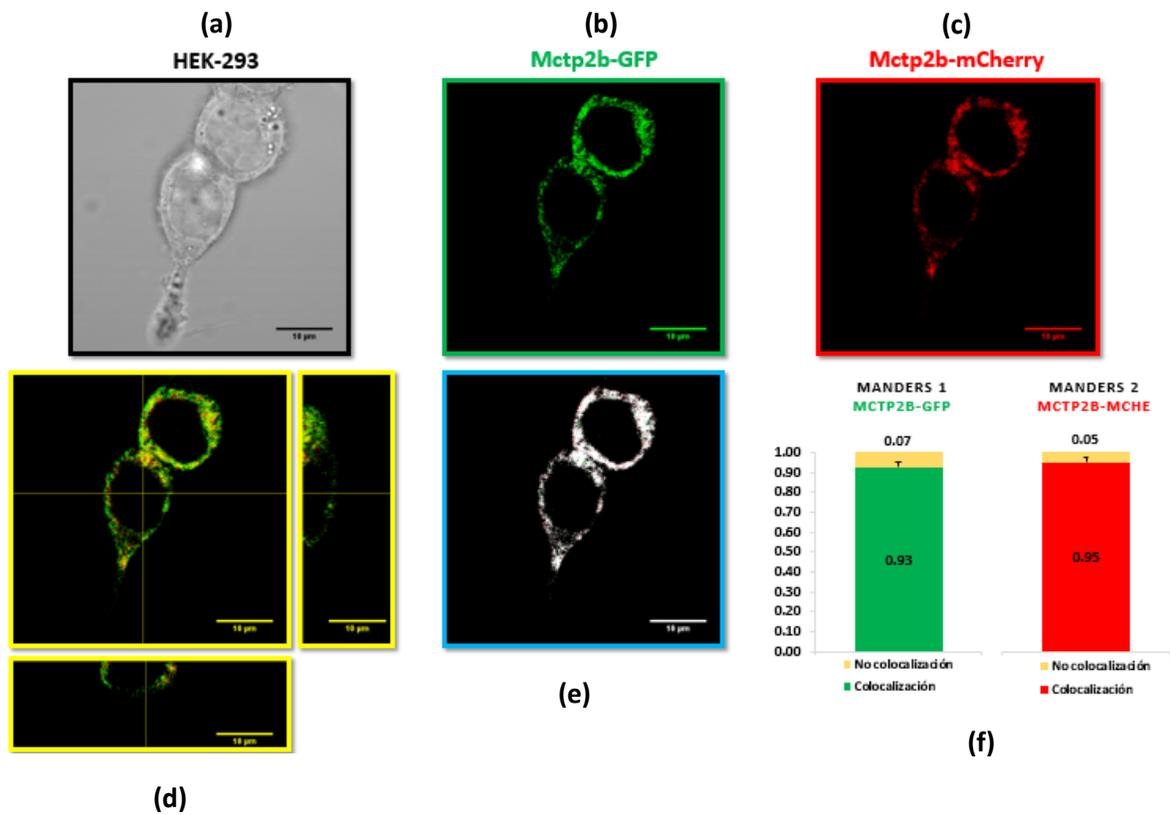


El primer paso para evaluar la distribución intracelular de las proteínas quiméricas fue realizar las transfecciones de los plásmidos construidos. Mediante microscopía confocal de fluorescencia se observó que las cuatro variedades de proteínas Mctp de pez cebra presentan una amplia distribución intracelular en vesículas en células HEK-293 (figura 6).



**Figura 6. Expresión de las proteínas Mctp1a-GFP, Mctp1b-mCherry, Mctp2b-GFP y Mctp2a-mCherry, en células HEK-293.**

Con la finalidad de obtener un parámetro control sobre la distribución y colocalización de la proteína Mctp de pez cebra, se realizó la cotransfección entre los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp2b-GFP y Mctp2b-mCherry. En las figuras 7b y 7c se observa la expresión de las proteínas, y en las figuras 7d y 7e las imágenes de su colocalización. Además, se determinaron los promedios de los coeficientes de colocalización Manders ( $n=5$ ), en los que  $M1=0.93$  (Mctp2b-GFP) y  $M2=0.95$  (Mctp2b-mCherry) (figura 7f). Estos coeficientes indican que las señales emitidas por la fluorescencia de las proteínas se superponen casi en su totalidad. La distribución longitudinal de la fluorescencia emitida de ambas proteínas (figura 7g) es casi idéntica, lo que sugiere que las dos proteínas presentan la misma distribución y localización intracelular.

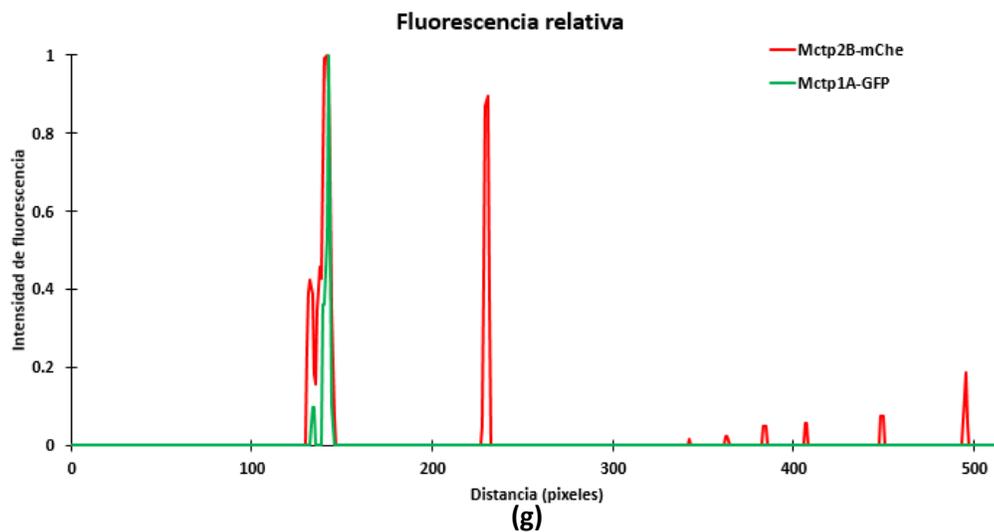
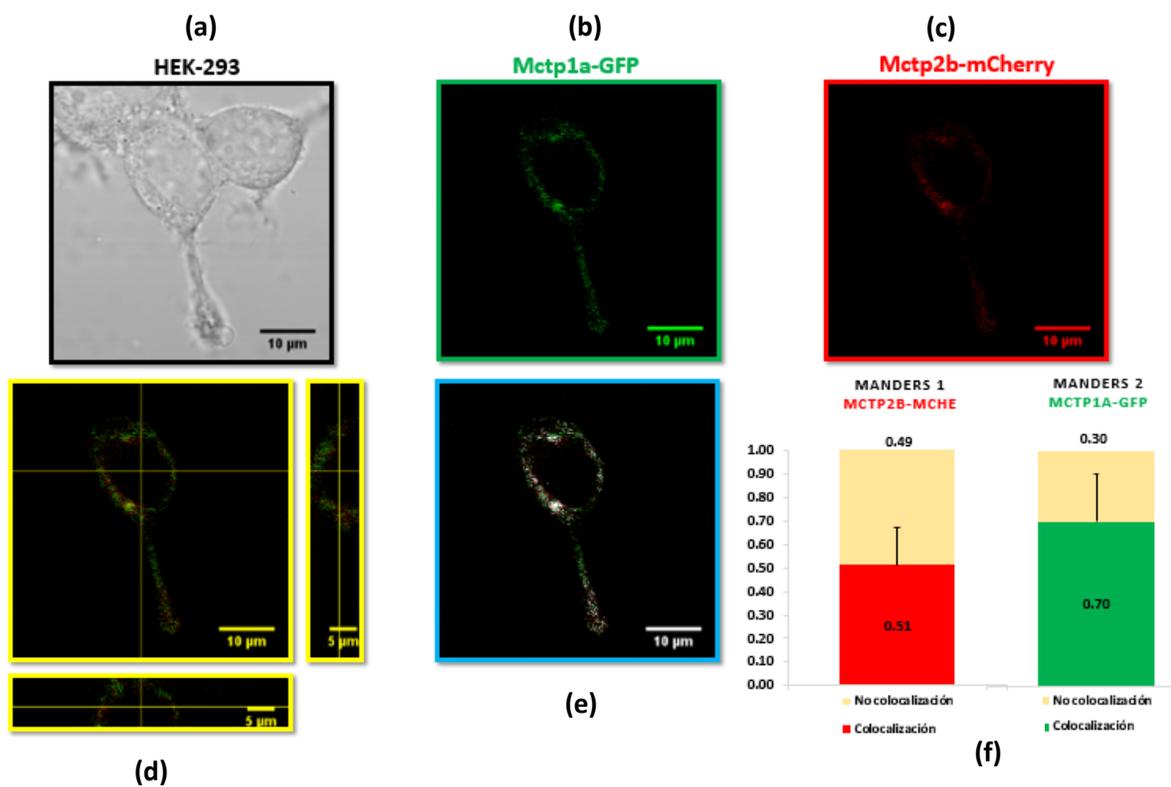


**Figura 7.** (a) Imagen a campo claro de célula HEK-293 transfectada con los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp2b-GFP y Mctp2b-mCherry. (b y c) Expresión de las proteínas Mctp2b-GFP y Mctp2b-mCherry

(respectivamente). **(d y e)** Colocalización de las proteínas Mctp2b-mCherry/Mctp2b-GFP en células HEK-293 a las 36 horas post transfección (*in vivo*). **(f)** Promedios de los coeficientes de colocalización Manders:  $M1=0.93$  y  $M2=0.95$ . **(g)** Distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (obtenida del eje “X” trazado por la línea color amarillo en 7 (d)).  $N=5$ .

Una vez confirmado que las proteínas Mctp2b-GFP y Mctp2b-mChe mostraron la misma localización intracelular, el siguiente paso fue determinar si las distintas variantes de Mctp de pez cebra: Mctp1a, Mctp1b, Mctp2a y Mctp2b presentaban la misma localización intracelular. Para ello se realizaron combinaciones de cotransfección entre los plásmidos construidos.

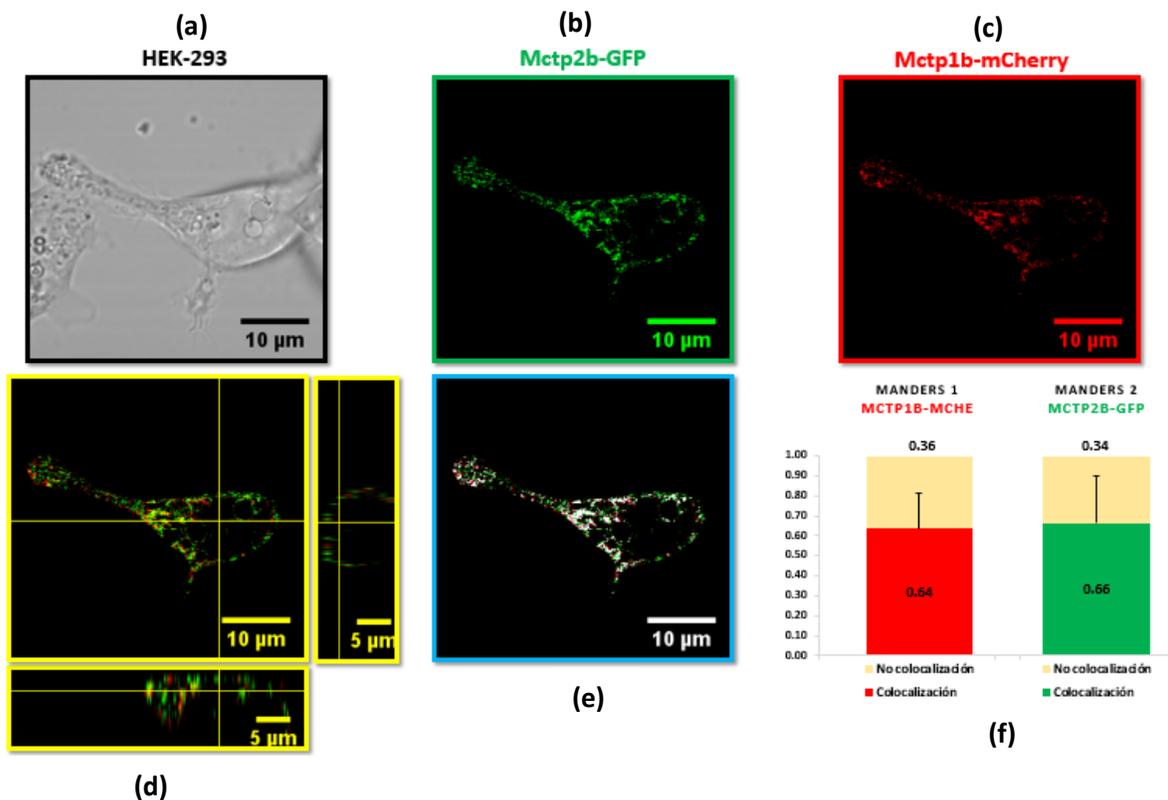
La primera cotransfección realizada fue entre los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp1a-GFP y Mctp2b-mCherry. De esta transfección se obtuvieron imágenes correspondientes a la expresión y colocalización de las proteínas (figuras 8b y 8c; figuras 8d y 8e, respectivamente). Los promedios obtenidos de los distintos coeficientes de colocalización Manders de estas proteínas fueron:  $M1=0.51$  (Mctp2b-mCherry) y  $M2=0.70$  (Mctp1a-GFP) (figura 8f). Los cuales indican que las señales emitidas por la fluorescencia de las proteínas se superponen espacialmente pero no en su totalidad. Además, en la distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (figura 8g) se observa que las señales se sobreponen en sitios específicos, pero no en toda la distribución longitudinal. Estos resultados sugieren que las proteínas presentan distribuciones intracelulares similares, pero no iguales.

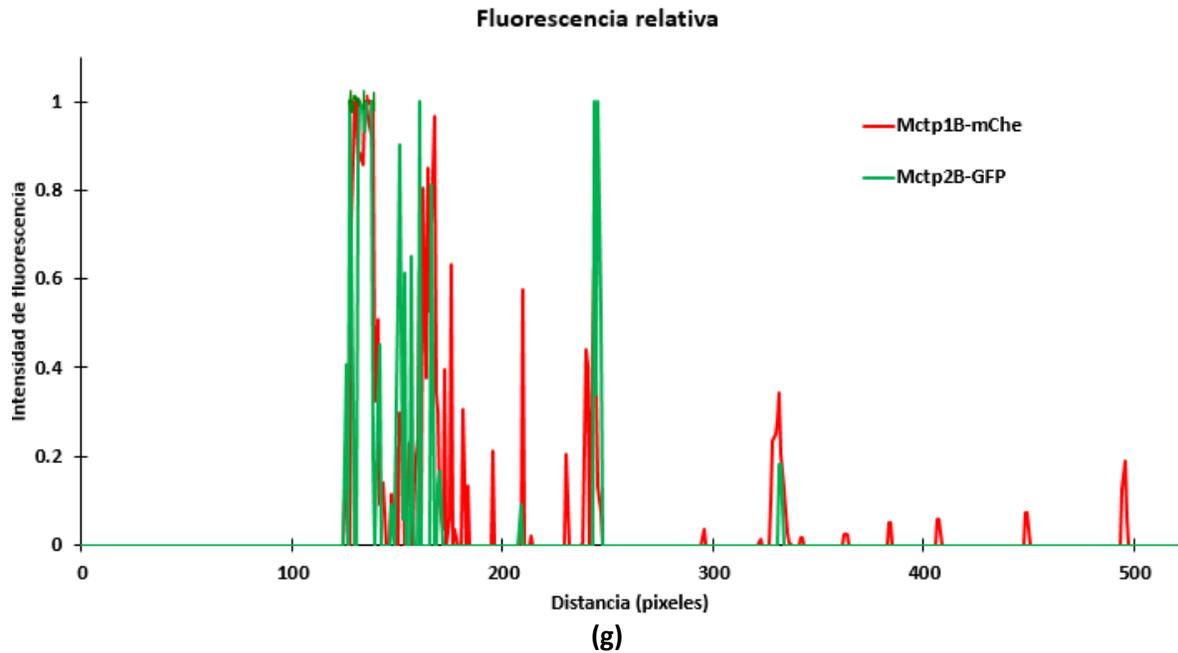


**Figura 8.** (a) Imagen a campo claro de célula HEK-293 transfectada con los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp1a-GFP y Mctp2b-mCherry. (b y c) Expresión de las proteínas Mctp1a-GFP y Mctp2b-mCherry (respectivamente). Colocalización de las proteínas Mctp1a-GFP/Mctp2b-mCherry en células HEK-293 a las 36 horas post transfección (*in vivo*). (f) Promedios de los coeficientes de colocalización Manders: M1=0.51 y

M2=0.70. (g) Distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (obtenida del eje “X” trazado por la línea color amarillo en 8 (d)). N=5.

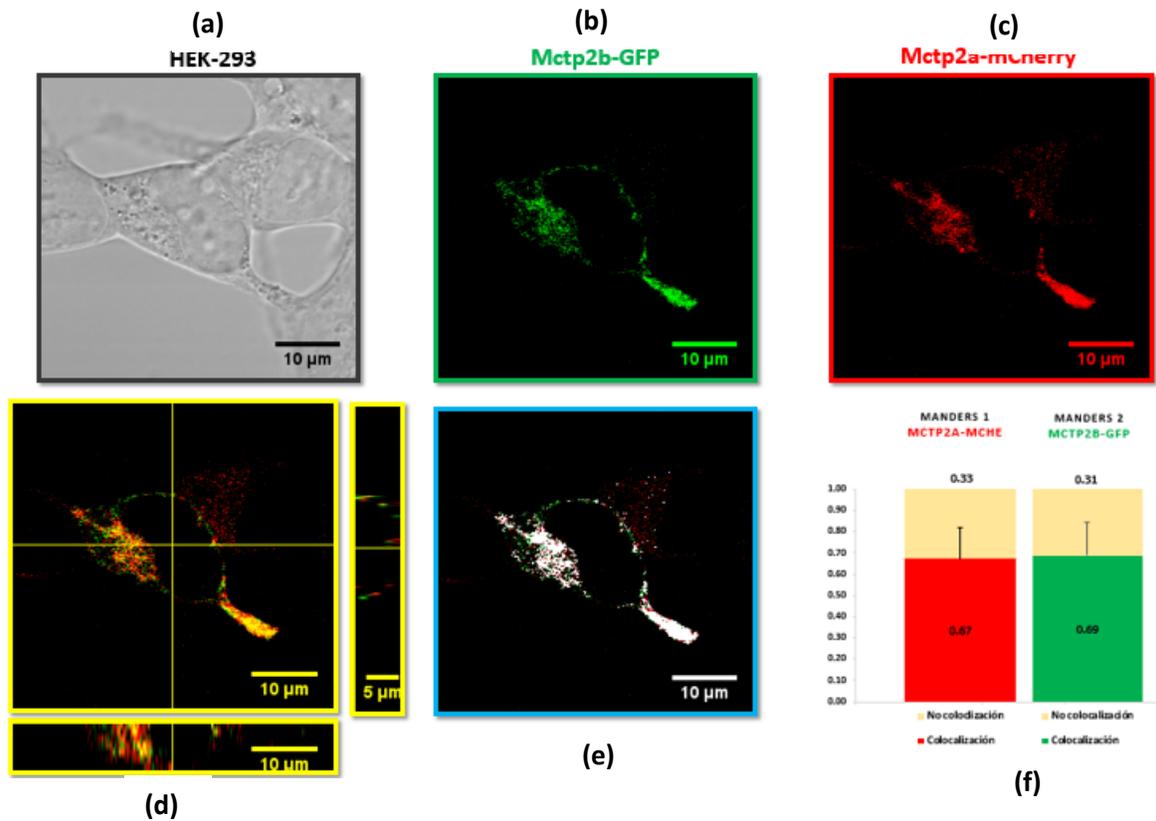
La distribución intracelular de las proteínas Mctp2b-GFP y Mctp1b-mCherry está representada en las figuras 9(b) y 9(c). Su colocalización se puede observar en las figuras 9(d) y 9(e). En la figura 9(f) se señala el promedio obtenido de los distintos coeficientes de colocalización Manders obtenidos, cuyo valor es de M1=0.64(Mctp1b-mCherry) y M2=0.66(Mctp2b-GFP). Estos coeficientes indican que la fluorescencia emitida por las proteínas no se sobrepone completamente. Además, la distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (figura 9g) muestra que no hay una completa sobreposición de señales, lo que sugiere que las proteínas se distribuyen de manera similar pero no totalmente igual.





**Figura 9.** (a) Imagen a campo claro de célula HEK-293 transfectada con los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp1b-mCherry y Mctp2b-GFP. (b y c) Expresión de las proteínas Mctp1b-mCherry y Mctp2b-GFP (respectivamente). Colocalización de las proteínas Mctp1b-mCherry/Mctp2b-GFP en células HEK-293 a las 36 horas post transfección (*in vivo*). (f) Promedios de los coeficientes de colocalización Manders:  $M1=0.64$  y  $M2=0.66$ . (g) Distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (obtenida del eje “X” trazado por la línea color amarillo en 9 (d)).  $N=5$ .

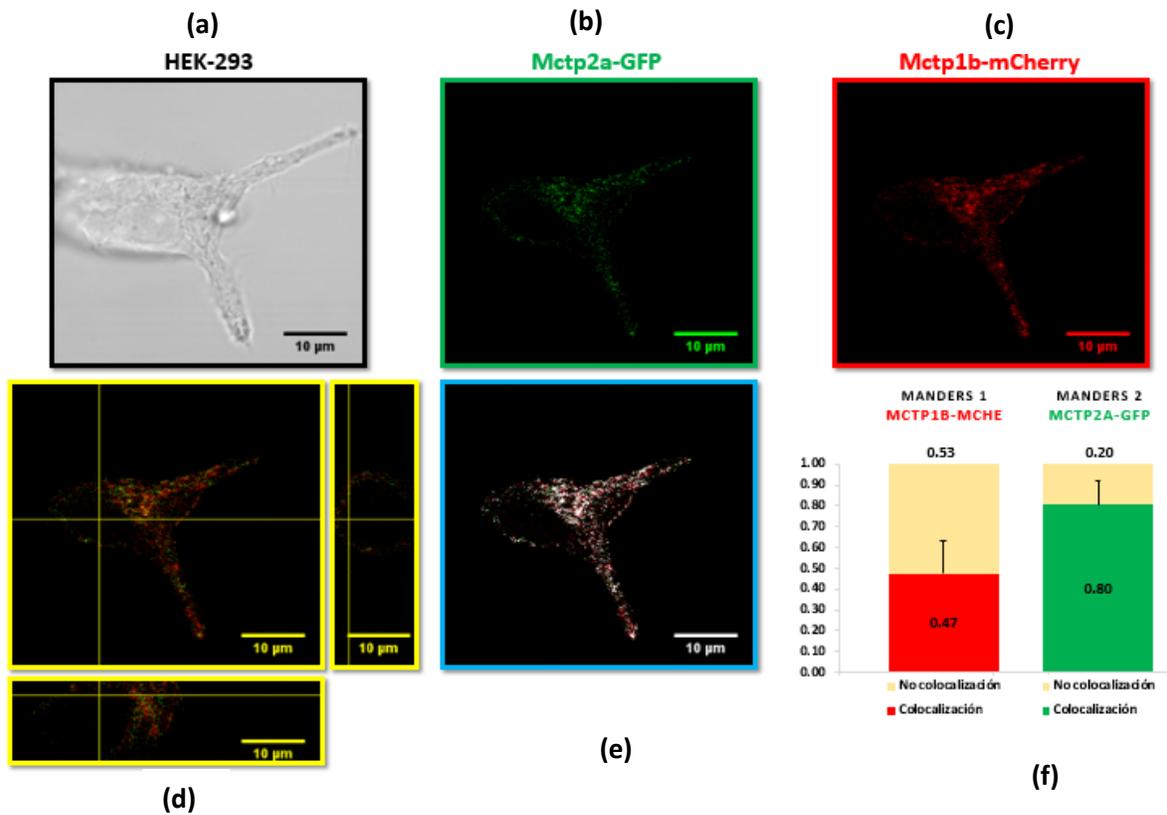
Las figuras 10(b) y 10(c) corresponden a la expresión de las proteínas Mctp2b-GFP y Mctp2a-mCherry. Estas proteínas presentan localizaciones intracelulares similares (figuras 10d y 10e). Los promedios obtenidos de los distintos coeficientes de colocalización Manders fueron de  $M1=0.67$  (Mctp2a-mCherry) y  $M2=0.69$  (Mctp2a-mCherry). En conjunto, estas observaciones indican que hay regiones en que las proteínas presentan distribuciones intracelulares similares, pero no iguales. Esto también se observa en la distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de las proteínas, representado en la figura 10(g).

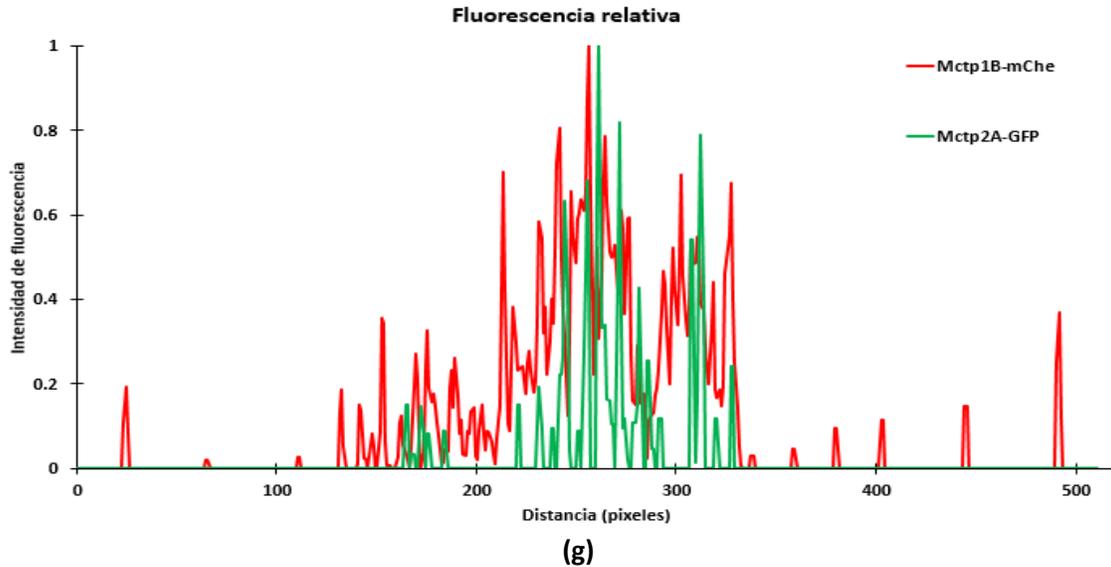


**Figura 10.** (a) Imagen en campo claro de célula HEK-293 transfectada con los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp2b-GFP y Mctp2a-mCherry. (b y c) Expresión de las proteínas Mctp2b-GFP y Mctp2a-mCherry (respectivamente). Colocalización de las proteínas Mctp2b-GFP/Mctp2a-mCherry en células HEK-293 a las 36

horas post transfección (*in vivo*). **(f)** Promedios de los coeficientes de colocación Manders:  $M1=0.67$  y  $M2=0.69$ . **(g)** Distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (obtenida del eje “X” trazado por la línea color amarillo en 10 (d)).  $N=5$ .

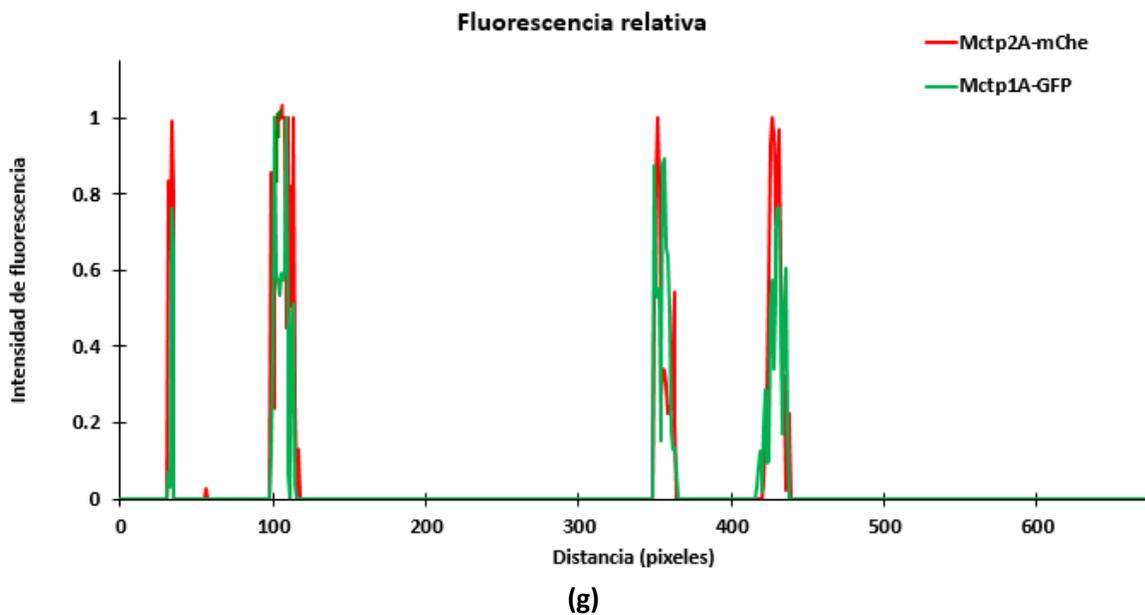
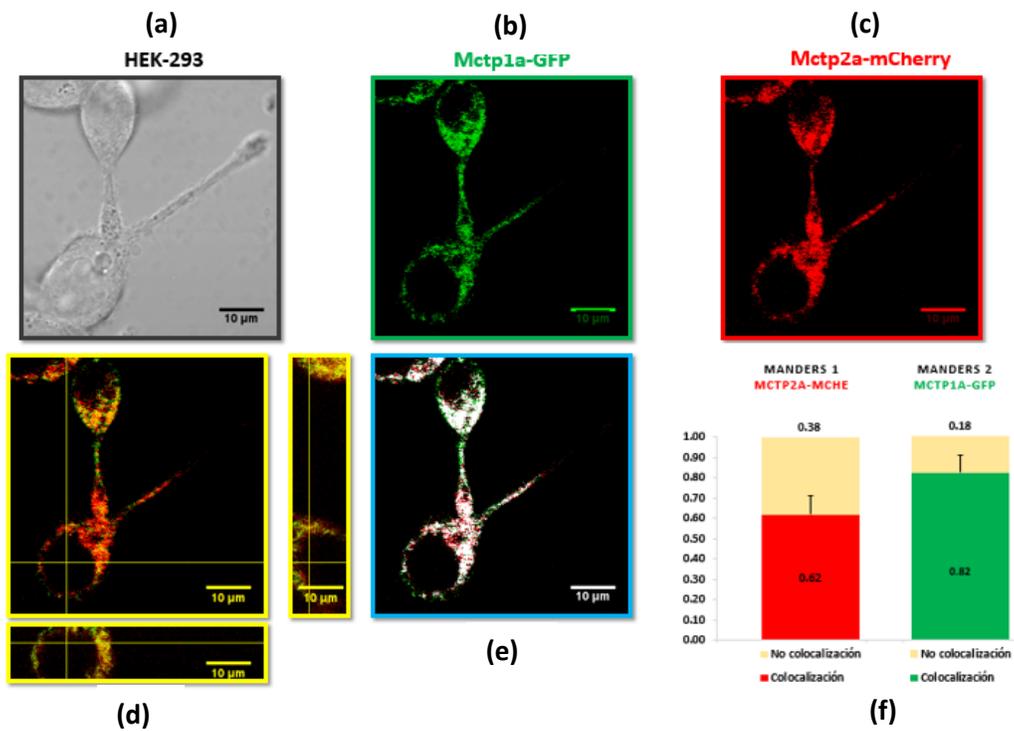
En las figuras 11(b) y 11(c) está representada la distribución intracelular de las proteínas Mctp2a-GFP y Mctp1b-mCherry. Estas proteínas presentan regiones de colocación intracelular (figuras 11d y 11e), sin embargo, los promedios de los coeficientes de colocación Manders obtenidos fueron de  $M1=0.47$ (Mctp1b-mCherry) y  $M2=0.80$ (Mctp2a-GFP). Además, las diferencias en la distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (figura 11g) sugieren que las proteínas presentan patrones de distribución similares, pero no iguales.





**Figura 11.** (a) Imagen en campo claro de célula HEK-293 transfectada con los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp1b-mCherry y Mctp2a-GFP. (b y c) Expresión de las proteínas Mctp1b-mCherry y Mctp2a-GFP (respectivamente). Colocalización de las proteínas Mctp1b-mCherry/Mctp2a-GFP en células HEK-293 a las 36 horas post transfección (*in vivo*). (f) Promedios de los coeficientes de colocalización Manders:  $M1=0.67$  y  $M2=0.69$ . (g) Distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (obtenida del eje “X” trazado por la línea color amarillo en 11 (d)).  $N=5$ .

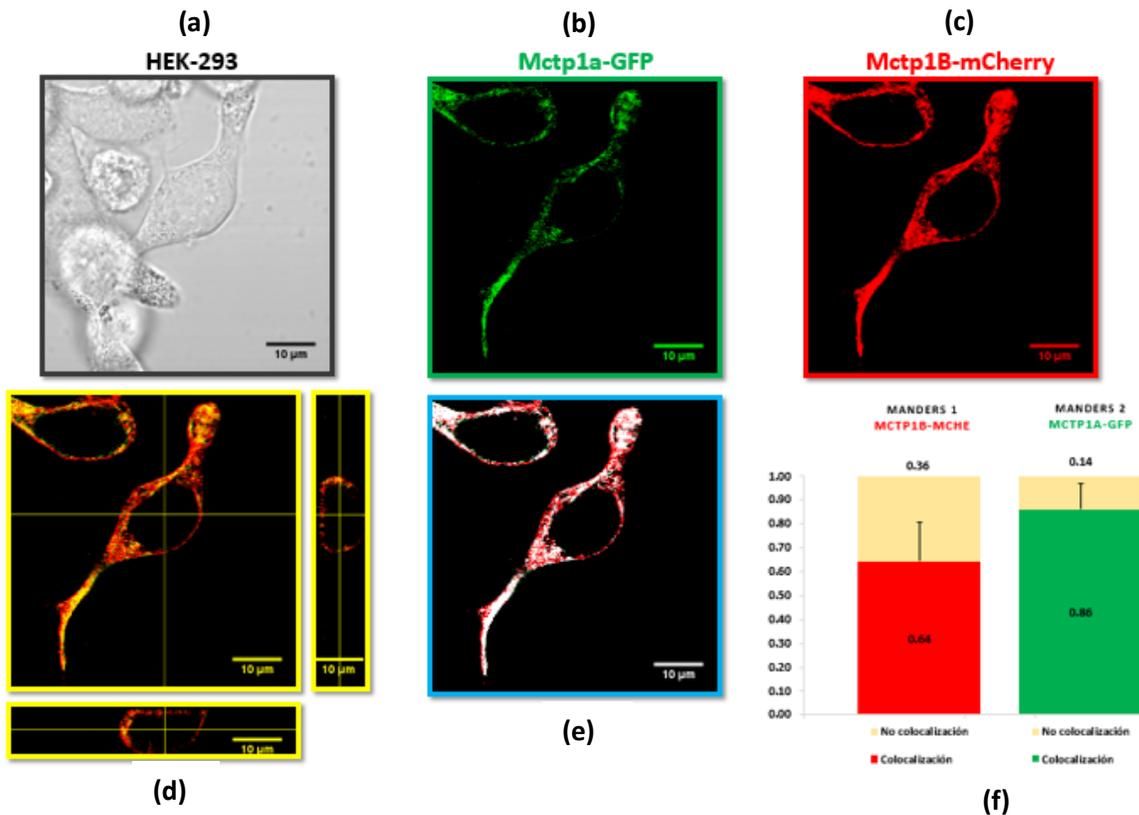
La expresión de las proteínas Mctp1a-GFP y Mctp2a-mCherry se observa en las figuras 12b y 12c. En las figuras 12d y 12e se representa la colocalización de sus señales de expresión en color amarillo. Los promedios de los coeficientes de colocalización Manders de ambas proteínas fueron de  $M1=0.62$ (Mctp2a-mCherry) y  $M2=0.82$ (Mctp1a-GFP) (figura 12f). Además, la distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de las proteínas está graficada en la figura 12g. Estos resultados sugieren que las proteínas Mctp1a-GFP y Mctp2a-mCherry presentan patrones de distribución similares, pero no iguales.

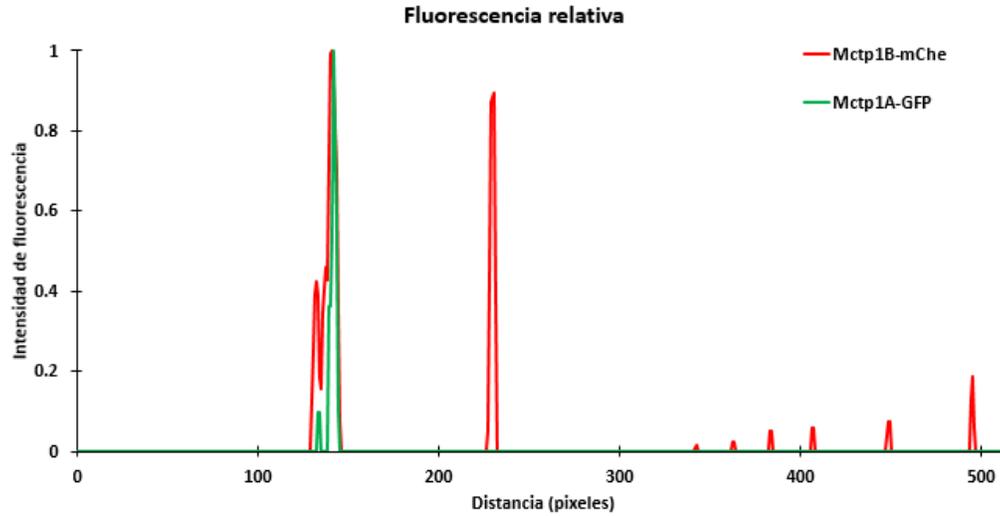


**Figura 12.** (a) Imagen en campo claro de célula HEK-293 transfectada con los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp2a-mCherry y Mctp1a-GFP. (b y c) Expresión de las proteínas Mctp2a-mCherry y Mctp1a-GFP (respectivamente). Colocalización de las proteínas Mctp2a-mCherry/Mctp1a-GFP en células HEK-293 a las 36 horas post transfección (*in vivo*). (f) Promedios de los coeficientes de colocalización Manders: M1=0.62 y

M2=0.82. (g) Distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (obtenida del eje “X” trazado por la línea color amarillo en 12 (d)). N=5.

Las figuras 13 (b) y 13(c) corresponden a la expresión de las proteínas Mctp1a-GFP y Mctp1b-mCherry. Dichas proteínas presentan localizaciones intracelulares similares, pero no iguales (figuras 13d y 13e). El promedio del análisis de colocalización Manders de las proteínas fue de M1=0.64 (Mctp1b-mCherry) y M2= 0.86 (Mctp1a-GFP) (figura 13f). Esto sugiere que se distribuyen de manera similar, pero hay regiones intracelulares en las que se distribuyen de manera distinta, como se observa en la distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de las proteínas representado en la figura 10(g).





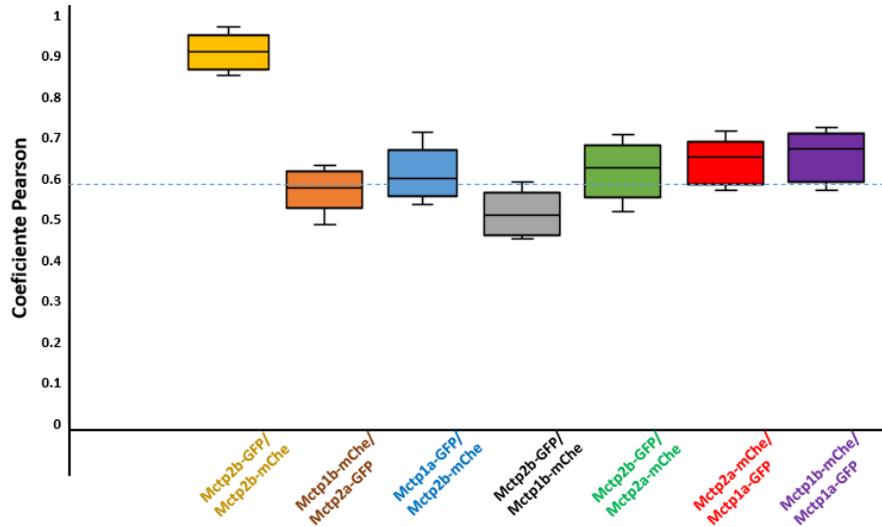
(g)

**Figura 13.** (a) Imagen en campo claro de célula HEK-293 transfectada con los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp1b-mCherry y Mctp1a-GFP. (b y c) Expresión de las proteínas Mctp1b-mCherry y Mctp1a-GFP (respectivamente). Colocalización de las proteínas Mctp1b-mCherry/Mctp1a-GFP en células HEK-293 a las 36 horas post transfección (*in vivo*). (f) Promedios de los coeficientes de colocalización Manders: M1=0.64 y M2=0.86. (g) Distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (obtenida del eje “X” trazado por la línea color amarillo en 13 (d). N=5.

Los resultados anteriores indican que las distintas proteínas Mctp de pez cebra (Mctp1a, Mctp1b, Mctp2a y Mctp2b) presentan distribuciones intracelulares similares, pero no iguales, por esta razón se calcularon, promediaron y graficaron los coeficientes Pearson de las distintas cotransfecciones realizadas:

**Tabla 4. Coeficientes Pearson de las distintas cotransfecciones entre los plásmidos construidos**

Cotransfecciones (plásmidos construidos)	Coefficiente Pearson (promedio)
<i>pCDNA3-mctp2b-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp2b -GFP-LIC</i>	0.9
<i>pCDNA3-mctp2b-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp1a-GFP-LIC</i>	0.61
<i>pCDNA3-mctp1b-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp2b -GFP-LIC</i>	0.53
<i>pCDNA3-mctp2a-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp2b -GFP-LIC</i>	0.64
<i>pCDNA3-mctp1b-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp2a-GFP-LIC</i>	0.59
<i>pCDNA3-mctp2a-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp1a-GFP-LIC</i>	0.67
<i>pCDNA3-mctp1b-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp1a-GFP-LIC</i>	0.69

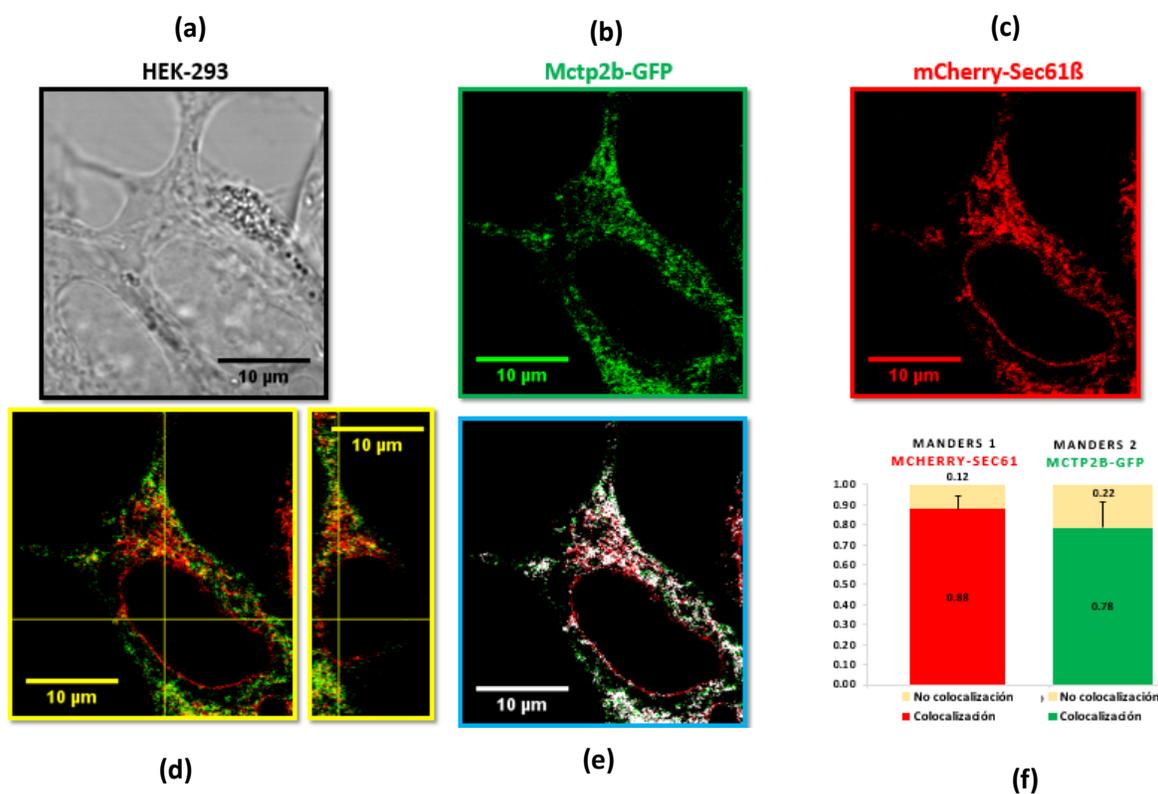


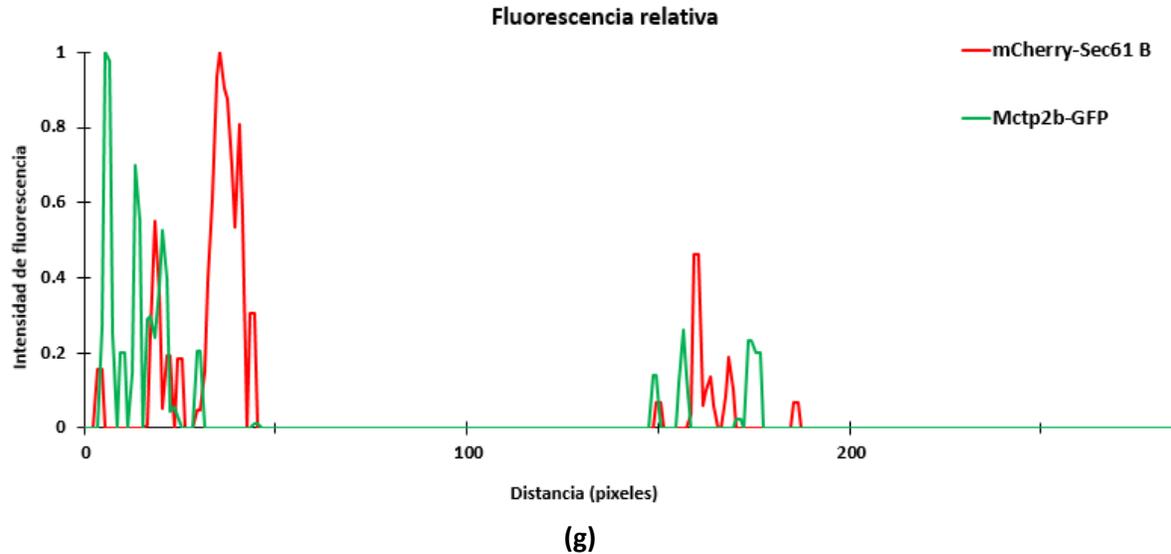
**Figura 14.** Gráfica de los coeficientes Pearson de las distintas cotransfecciones de los plásmidos construidos.

La tabla 4 y la figura 14 muestran que la colocalización con el mayor coeficiente Pearson obtenido es el de las proteínas Mctp2b-GFP y Mctp2b-mCherry (0.9), cuyo resultado indica que ésta es casi completa y por lo tanto idéntica. El resto de las cotransfecciones presentan coeficientes de colocalización Pearson por debajo a 0.7 (Tabla 4). La diferencia de colocalización Pearson con respecto a la obtenida de la cotransfección considerada como control en el presente trabajo (Mctp2b-GFP y Mctp2b-mCherry) es de por lo menos 0.2. Por lo tanto, el conjunto de los análisis anteriores indica que hay diferencias en las distribuciones intracelulares de las distintas Mctp de pez cebra: Mctp1a, Mctp1b, Mctp2a y Mctp2b.

Una vez determinado que las proteínas Mctp de pez cebra presentaron distribuciones intracelulares distintas, la siguiente etapa del proyecto fue realizar los análisis de colocalización con las proteínas marcadoras de organelos. Para el avance del proyecto se seleccionó la versión de Mctp2b (pez cebra) fusionada tanto con GFP como con mCherry para los análisis sucesivos. En efecto, queda pendiente realizar análisis adicionales con el resto de las proteínas Mctp de pez cebra (Mctp1a, Mctp1b y Mctp2a) para corroborar si estas proteínas se encuentran distribuidas y localizadas en los mismos organelos en que Mctp2b de pez cebra se localiza.

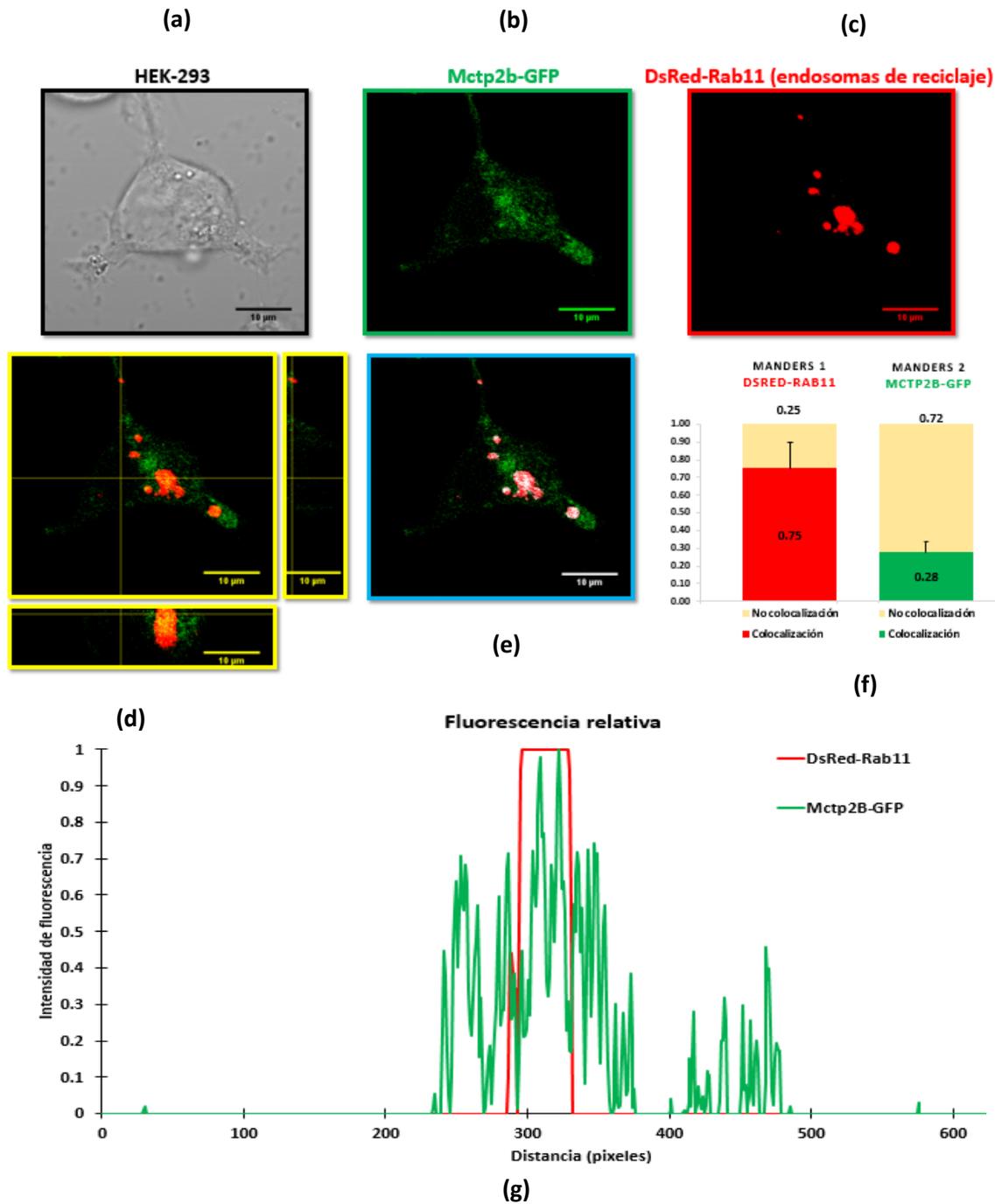
En esta etapa del proyecto, el primer paso fue realizar cotransfecciones entre el plásmido que codifica a la proteína Mctp2b-GFP y el plásmido mCh-Sec61 $\beta$  que codifica a una proteína marcadora de retículo endoplasmático. El resultado de la cotransfección se puede observar en las figuras 15(b) y 15(c), en donde ambas proteínas presentan distribución intracelular muy similar y colocalización entre ellas (15d y 15e). La distribución longitudinal de la fluorescencia de ambas proteínas también fue determinada (figura 15g) y los promedios de los coeficientes de colocalización Manders obtenidos fueron de M1=0.88 (mCh-Sec61 $\beta$ ) y M2=0.78 (Mctp2b-GFP). Estas observaciones indican que la proteína marcadora de retículo endoplasmático colocaliza con la proteína Mctp2b-GFP, pero no completamente. El resultado de este análisis reveló que hay un remanente en la distribución total de la proteína Mctp2b-GFP que no colocaliza con mCherry-Sec61 $\beta$ , lo que sugirió que Mctp2b-GFP podía estar localizada en otros organelos además del retículo endoplasmático, por lo que se decidió realizar cotransfecciones adicionales con marcadores moleculares que señalizan organelos específicos como endosomas de reciclaje, endosomas tardíos, lisosomas y membrana plasmática.





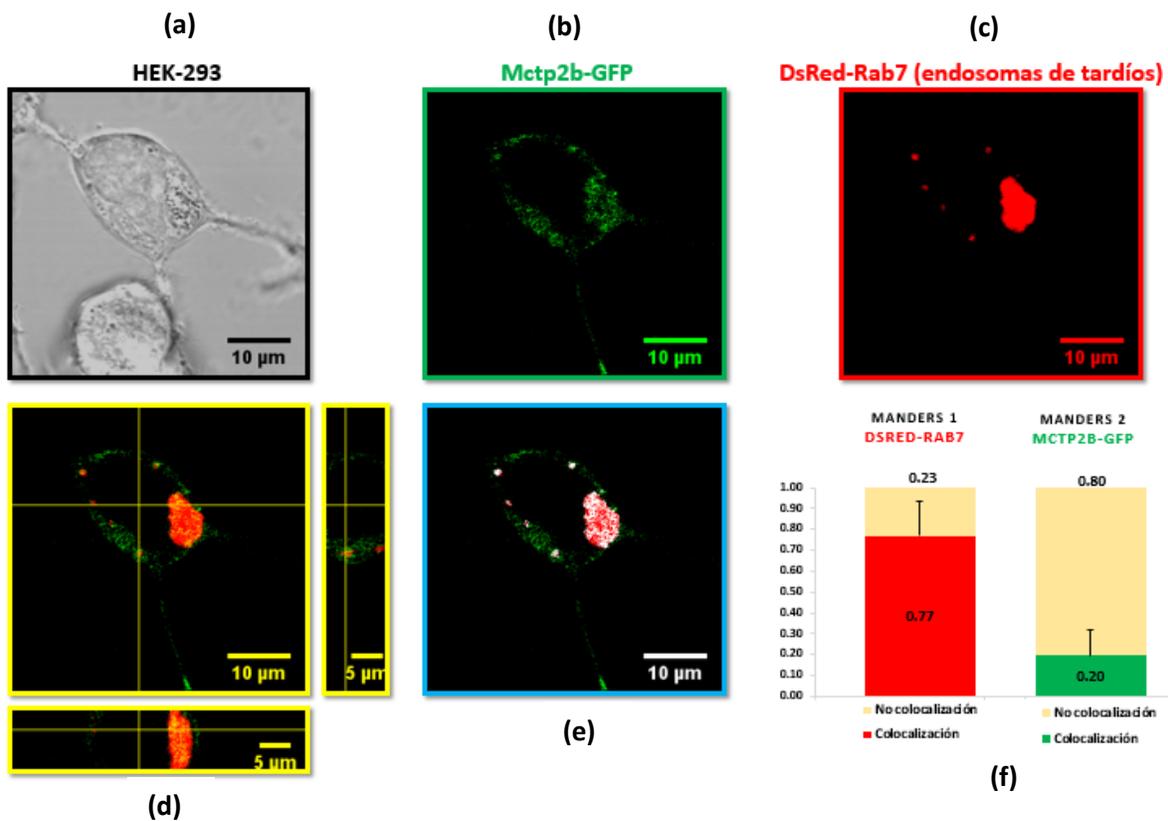
**Figura 15.** (a) Imagen en campo claro de célula HEK-293 transfectada con los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp2b-GFP y mChe-Sec61-1 $\beta$ . (b y c) Expresión de las proteínas Mctp2b-GFP y mChe-Sec61-1 $\beta$  (respectivamente). Colocalización de las proteínas Mctp2b-GFP/mChe-Sec61-1 $\beta$  en células HEK-293 a las 36 horas post transfección (*in vivo*). (f) Promedios de los coeficientes de colocalización Manders: M1=0.88 y M2=0.78. (g) Distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (obtenida del eje “X” trazado por la línea color amarillo en 15 (d). N=5).

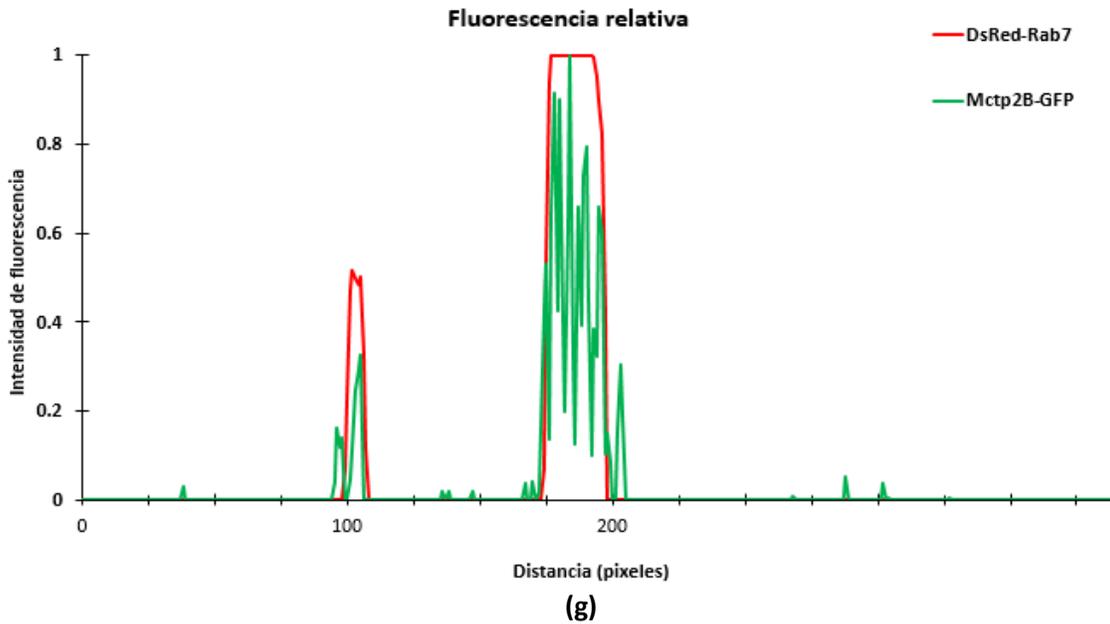
En las figuras 17(b) y 17(c) se observa la distribución intracelular de los endosomas de reciclaje señalizados por la proteína DsRed-Rab11 en color rojo y la distribución de la proteína Mctp2b-GFP en color verde. En las figuras 17(d) y 17(e) las señales de colocalización entre las proteínas DsRed-Rab11 y Mctp2b-GFP pueden ser distinguidas en color amarillo y blanco, respectivamente. En la distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (17g) se observan sitios en los que ambas señales se empalmaron. Los promedios de los coeficientes de colocalización Manders fueron de M1=0.75 (DsRed-Rab11) y M2=0.28 (Mctp2b-GFP). Estos resultados sugieren que Mctp2b-GFP se encuentra localizada en endosomas de reciclaje. Observaciones que concuerdan con lo reportado por Qiu et al. (2015).



**Figura 17.** (a) Imagen en campo claro de célula HEK-293 transfectada con los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp2b-GFP y DsRed-Rab11. (b y c) Expresión de las proteínas Mctp2b-GFP y DsRed-Rab11 (respectivamente). Colocalización de las proteínas Mctp2b-GFP/DsRed-Rab11 en células HEK-293 a las 36 horas post transfección (*in vivo*). (f) Promedios de los coeficientes de colocalización Manders: M1=0.75 y M2=0.28. (g) Distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (obtenida del eje “X” trazado por la línea color amarillo en 17 (d). N=5.

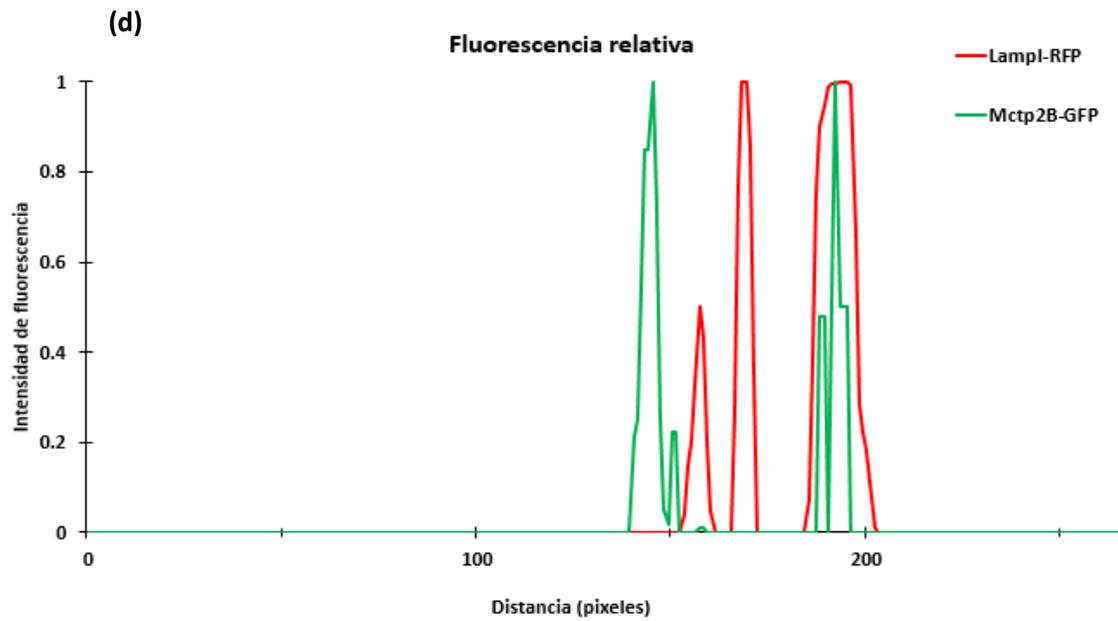
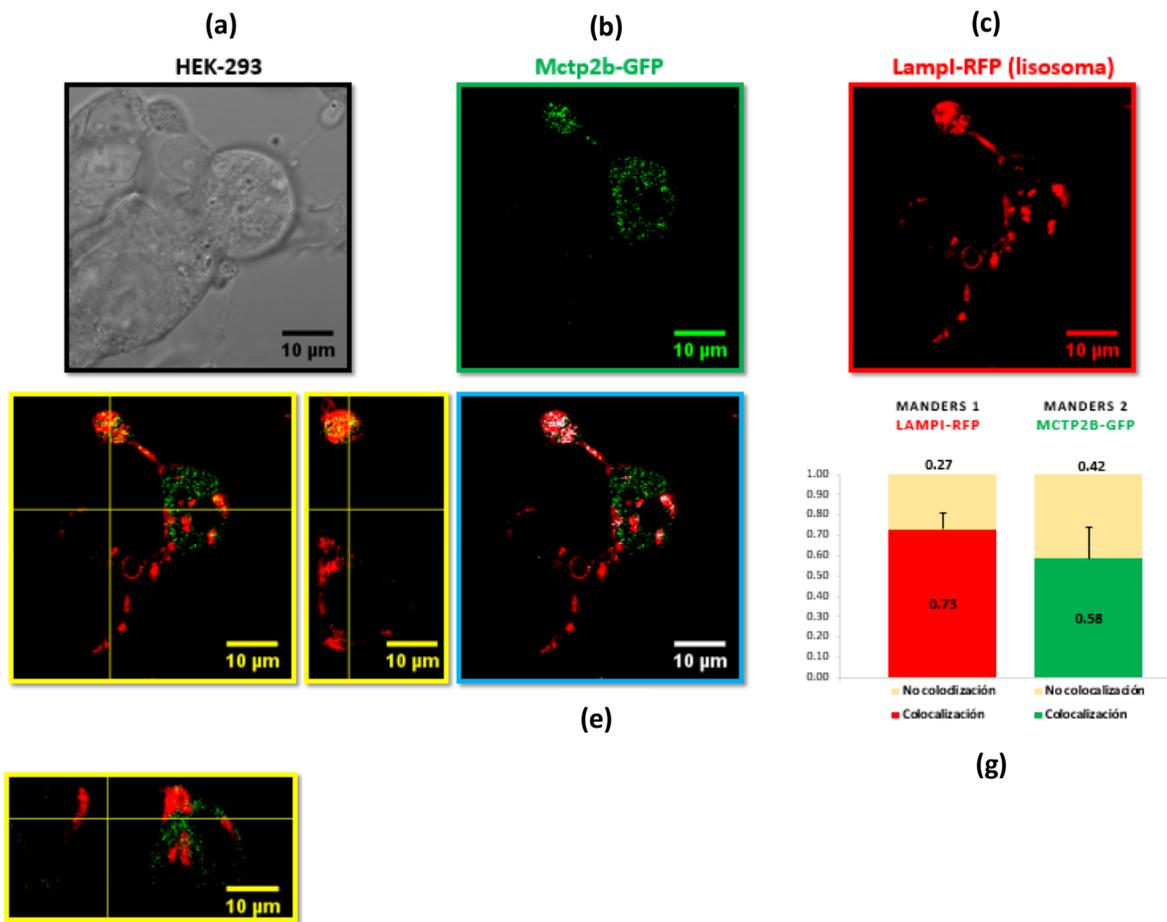
También se evaluó la presencia de Mctp2b-GFP en endosomas tardíos. Para lo cual se transfectó el plásmido que expresa la proteína marcadora DsRed-Rab7 junto con el plásmido que expresa a Mctp2b-GFP. En las figuras 18(b) y 18(c) se observa la expresión y distribución de ambas proteínas. En las figuras 18(d) y 18(e) la colocalización entre dichas proteínas se identifica por los colores amarillo y blanco, respectivamente. Asimismo, en ciertos sitios de la distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de las proteínas (18g) se observan empalme de señales. Finalmente, el resultado de los promedios de los coeficientes de colocalización Manders para ambas proteínas fue de  $M1=0.77$  y  $M2=0.20$ . Estas observaciones sugieren que Mctp2b-GFP también se encuentra localizada en endosomas tardíos. Observaciones que no han sido reportadas con anterioridad.





**Figura 18.** (a) Imagen en campo claro de célula HEK-293 transfectada con los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp2b-GFP y DsRed-Rab7. (b y c) Expresión de las proteínas Mctp2b-GFP y DsRed-Rab7 (respectivamente). Colocalización de las proteínas Mctp2b-GFP/DsRed-Rab7 en células HEK-293 a las 36 horas post transfección (*in vivo*). (f) Promedios de los coeficientes de colocalización Manders:  $M1=0.77$  y  $M2=0.20$ . (g) Distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (obtenida del eje “X” trazado por la línea color amarillo en 18 (d).  $N=5$ ).

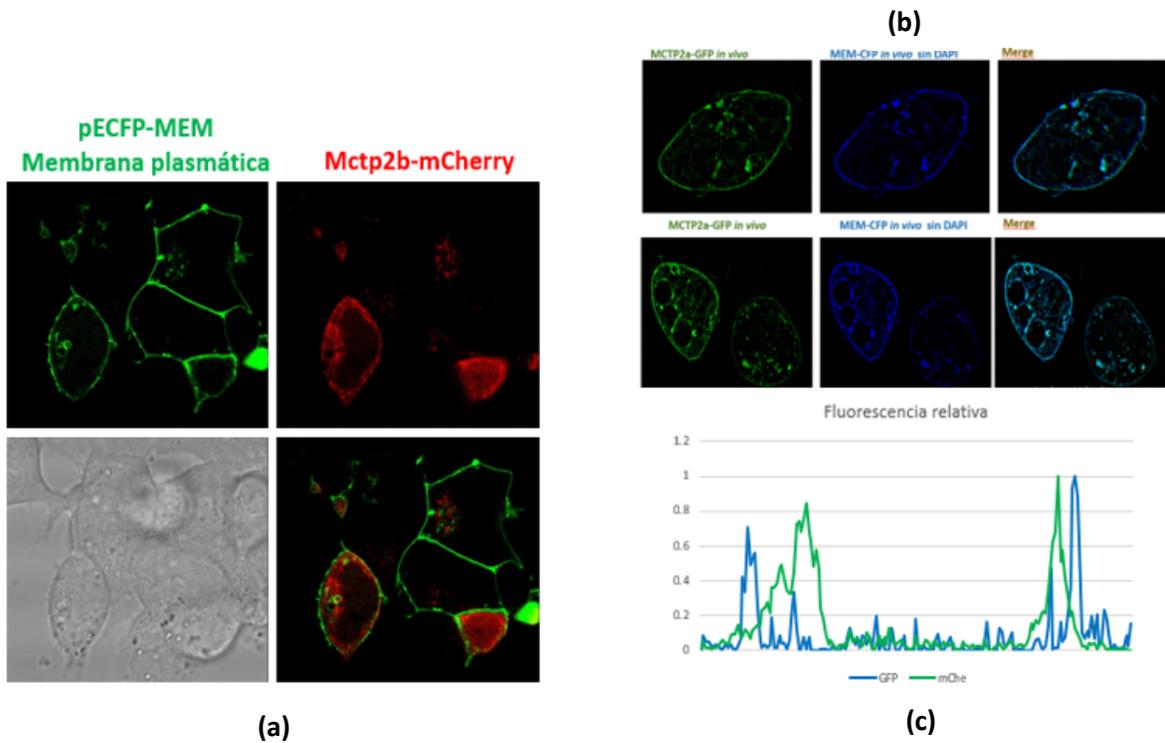
Con base en las observaciones anteriores y considerando que los endosomas tardíos maduran a lisosomas (Hu et al. 2015), transfectamos el plásmido que codifica a la proteína marcadora de lisosomas (Lamp1-RFP) junto con el plásmido que expresa a Mctp2b-GFP para corroborar la presencia de la proteína en lisosomas. En las figuras 19(b) y 19(c) se observa la expresión de ambas proteínas, y en las figuras 19(d) y 19(e) la colocalización entre las proteínas se distingue por los colores amarillo y blanco, respectivamente. Además, la distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de las proteínas muestra empalme de señales en varias regiones (figura 19g). Los promedios de los coeficientes de colocalización Manders calculados para las proteínas fueron de  $M1=0.73$  y  $M2=0.58$ . Estos coeficientes sugieren que Mctp2b-GFP se encuentra localizada en lisosomas. Observaciones que tampoco han sido reportadas con anterioridad.



(f)

**Figura 19. (a)** Imagen en campo claro de célula HEK-293 transfectada con los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp2b-GFP y Lamp1-RFP. **(b y c)** Expresión de las proteínas Mctp2b-GFP y Lamp1-RFP (respectivamente). Colocalización de las proteínas Mctp2b-GFP/Lamp1-RFP en células HEK-293 a las 36 horas post transfección (*in vivo*). **(f)** Promedios de los coeficientes de colocalización Manders:  $M1=0.73$  y  $M2=0.58$ . **(g)** Distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de ambas proteínas (obtenida del eje “X” trazado por la línea color amarillo en 19 (d)).  $N=5$ .

Finalmente, para corroborar la presencia de Mctp2B-GFP en membrana plasmática, realizamos cotransfecciones entre el plásmido pECFP-MEM que codifica a una proteína marcadora de membrana plasmática y el plásmido que codifica a la proteína Mctp2b-mCherry. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal mostraron que la distribución de Mctp2b-mCherry se encuentra muy cercana a la membrana plasmática (figura 20a). Con microscopía confocal fue difícil determinar la localización de Mctp2b-mCherry en membrana plasmática, por esta razón, se realizaron observaciones mediante microscopía de super resolución (figura 20b). Estas imágenes permitieron obtener de manera más precisa la distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de las proteínas expresadas y en ningún caso se observaron empalmes de señales en la membrana plasmática (figura 17c). Resultados que concuerdan con lo reportado por Genç et al. (2017), quienes no encontraron localización de MCTP y en la membrana plasmática de motoneuronas de *Drosophila melanogaster*.



**Figura 20.** (a) Imagen en campo claro de célula HEK-293 transfectada con los plásmidos que expresan a las proteínas Mctp2b-mCherry y pECFP-MEM; expresión de las proteínas Mctp2b-mCherry (rojo) y pECFP-MEM (verde) a las 36 horas post transfección (*in vivo*). (b) No colocalización de las proteínas Mctp2b-GFP/pCFP-MEM en células HEK-293 a las 36 horas post transfección (*in vivo*). (c) Distribución longitudinal de la fluorescencia relativa de las proteínas Mctp2b-GFP (verde) y pCFP-MEM (azul). N=5.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó que las proteínas Mctp2b-mCherry y Mctp2b-GFP muestran una colocalización casi idéntica al ser expresadas en células HEK-293 (figura 7). Esto sugiere que la localización intracelular de la proteína Mctp2b no es alterada por su fusión a distintos marcadores fluorescentes (GFP o mCherry). Asimismo, los distintos análisis de localización (Manders y Pearson) mostraron que las proteínas Mctp1a-GFP, Mctp1b-mCherry, Mctp2a-GFP y Mctp2b-mCherry tienen distribuciones intracelulares similares, pero muestran variaciones en cuanto a su localización, lo que indica que ninguna de las variantes de Mctp de pez cebra presentan una localización intracelular idéntica. Se determinó que los coeficientes de colocalización Pearson entre las distintas Mctp de pez cebra no fueron mayores a 0.69 (Tabla 4). Por lo tanto, se consideró que existe una fracción, en los coeficientes Pearson calculados, que no colocaliza entre las distintas proteínas Mctp de pez cebra, la cual se encuentra entre 0.31 y 0.47. Con la finalidad de determinar las posibles causas del remanente, se realizaron alineamientos locales entre las secuencias primarias de los aminoácidos para cada una de las regiones transmembranales de las distintas Mctp de pez cebra (Mct1a, Mct1b, Mctp2a y Mctp2b) en correspondencia con las combinaciones de las cotransfecciones realizadas de los plásmidos construidos:

**Tabla 5. Coeficientes Pearson y porcentajes de similitud obtenidos de alineamientos locales entre las regiones transmembranales (RTM) de las distintas Mctp de pez cebra**

Cotransfecciones (plásmidos construidos)	Coefficiente Pearson (promedio)	Alineamientos de RTM (% de Similitud)
<i>pCDNA3-mctp2b-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp2b -GFP-LIC</i>	0.9	100
<i>pCDNA3-mctp2b-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp1a-GFP-LIC</i>	0.61	83.19
<i>pCDNA3-mctp1b-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp2b -GFP-LIC</i>	0.53	79.5
<i>pCDNA3-mctp2a-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp2b -GFP-LIC</i>	0.64	83.04
<i>pCDNA3-mctp1b-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp2a-GFP-LIC</i>	0.59	79.65
<i>pCDNA3-mctp2a-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp1a-GFP-LIC</i>	0.67	84.82
<i>pCDNA3-mctp1b-mCherry-LIC</i> y <i>pCDNA3-mctp1a-GFP-LIC</i>	0.69	89.17

El porcentaje de similitud de las secuencias de las distintas Mctp de pez cebra, muestra una relación entre sus coeficientes de colocalización Pearson respectivos. Estas

observaciones sugieren que a mayor porcentaje de similitud entre las regiones transmembranales de las distintas Mctp de pez cebra, mayor es el grado de colocalización entre las proteínas.

Las regiones transmembranales son uno de los mayores determinantes de la localización intracelular de proteínas de membrana en vía secretora y endocítica (Cosson et al. 2013). Shin et al. (2005) y Genç et al. (2017) reportaron que las dos regiones transmembranales de MCTP dirigen su localización en vesículas. Consecuentemente, estas observaciones sugieren que las diferencias en las secuencias aminoacídicas que conforman a las regiones transmembranales de las distintas Mctp de pez cebra (Mct1a, Mct1b, Mctp2a y Mctp2b) podrían provocar variaciones en su localización.

De igual forma, y considerando que en el presente estudio se trabajó con un sistema de expresión heterólogo, también se realizaron alineamientos locales entre las secuencias que codifican a las regiones transmembranales de Mctp1a, Mctp1b, Mctp2a, Mctp2b de pez cebra y a las regiones transmembranales de MCTP1, MCTP2 de humano. En todos los casos, el porcentaje de similitud entre las distintas secuencias nunca fue menor al 79%, resultado similar al obtenido de los alineamientos entre las regiones transmembranales de las distintas Mctp de pez cebra (tabla 5). Además, los patrones de distribución intracelular de MCTP mostrados en trabajos previos como los de Qiu et al. (2015) y Genç et al. (2017) son muy similares a los patrones que obtuvimos en el presente estudio. Debido a ello, consideramos que la expresión heteróloga en células HEK-293 de las proteínas Mctp de pez cebra funciona como un adecuado modelo de aproximación para estudiar la localización de la proteína.

El retículo endoplasmático consiste en una red compleja de túbulos y cisternas que se extienden a través de toda la célula (Stefan et al. 2013). Participa en múltiples funciones, incluyendo la síntesis de proteínas, el metabolismo de lípidos y el almacenamiento de  $Ca^{+2}$  intracelular (Giordano et al. 2013). En el presente trabajo se determinó que la proteína marcadora de retículo endoplasmático colocaliza con la proteína Mctp2b-GFP (figura 15), similar a reportes previos en los que se menciona la presencia de MCTP en el retículo endoplasmático de células PC12 (Qiu et al. 2015) y en el retículo endoplasmático distribuido a lo largo del soma, dendritas, axón y terminales presinápticas de motoneuronas en *D. melanogaster* (Genç et al. 2017).

En la membrana del retículo endoplasmático se encuentran localizadas proteínas similares a MCTP como las sinaptotagminas extendidas (E-Syts), cuya familia de proteínas está conformada por tres tipos: E-Syt1, E-Syt2 y E-Syt3 (Saheki y De Camilli, 2017). Se ha descrito que estas proteínas participan formando sitios de contacto entre la membrana plasmática y el retículo endoplasmático vía sus dominios C2 en el caso de E-Syt2 y E-Syt3. En contraste, la proteína E-Syt1 requiere de aumento en la concentración de  $Ca^{+2}$  intracelular para generar dichos sitios de contacto (Giordano et al. 2013). No existen reportes de que las proteínas MCTP generen sitios de contacto entre el retículo endoplasmático y la membrana plasmática, sin embargo, nuestros resultados muestran que el retículo endoplasmático de células HEK-293 marcado con la proteína Mctp está muy cercano a la membrana plasmática y podría interactuar con ésta. Shin et al. (2005) concluyeron que MCTP no interactúa con fosfolípidos de membrana plasmática; sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que los dominios C2 de MCTP puedan interactuar con algún otro fosfolípido de membrana porque en sus estudios no realizaron ensayos con cada una de las siete especies distintas de fosfatidilinositol presentes en las células (Balla et al. 2013). Además, análisis bioinformáticos en nuestro laboratorio mostraron que los dominios C2A y C2B de las proteínas Mctp1b, Mctp2a y Mctp2b de pez cebra presentan motivos ricos en lisina (Téllez-Arreola y Martínez, 2018, en revisión), mismos motivos que permiten generar sitios de contacto con membrana plasmática a las proteínas sinaptotagminas I, II, III, IV, VI, VII, IX y X; disferlina, mioferlina (Davis et al. 2002) y a las ya mencionadas E-Syt1, E-Syt2 y E-Syt3 (Giordano et al. 2013).

Genç et al. (2017) favorecen la hipótesis de que MCTP está implicada en procesos de presinapsis. Sin embargo, estudios en nuestro laboratorio sugieren que MCTP también podría participar en procesos postsinápticos debido a que la delección de gen *mctp-1* en *C. elegans* altera la coordinación motora del gusano y los mutantes mostraron parcial resistencia a levamisol, agonista del receptor nicotínico, lo que sugiere la posible implicación de MCTP-1 en la postsinapsis. (Téllez-Arreola y Martínez, 2018, en revisión). En este sentido, mutantes del gen *fer-1* que codifica a la proteína disferlina (FER-1) en *C. elegans*, mostraron resistencia a levamisol y defectos sutiles en la locomoción con cambios en la frecuencia de movimiento, así como reducción de la potencia muscular total (Krajacic et al. 2009; Krajacic et al. 2013).

La presencia de MCTP en tejido muscular fue reportada por Shin et al. (2005) y Qiu et al. (2015). Hibridaciones *in situ* del ARNm que codifica a Mctp en embriones de pez cebra sugieren la presencia de esta proteína en el sistema nervioso y sistema muscular a las 24 h post fertilización (Espino-Saldaña, tesis doctoral en proceso, 2018, en revisión). Estos hallazgos sugieren que la proteína MCTP puede estar implicada en procesos postsinápticos en la unión neuromuscular y en la coordinación motora del sistema muscular. Estas observaciones abren la posibilidad de plantear experimentos que permitan corroborar dichas hipótesis.

Trabajos previos, reportaron la localización intracelular de MCTP en dos tipos de endosomas: endosomas tempranos y de reciclaje (Qiu et al. 2015). Sin embargo, nuestros resultados muestran que Mctp2b de pez cebra también se localiza en endosomas tardíos además de los de reciclaje (figuras 17 y 18). Los endosomas son compartimientos de transporte intracelular delimitados por membranas. Existen tres tipos principales: endosomas tempranos, tardíos y de reciclaje (Sorkin y Zastrow, 2002). La endocitosis se divide en dos rutas, la ruta de reciclaje en la que participan los endosomas tempranos y endosomas de reciclaje; y la ruta de la degradación en la que participan principalmente los endosomas tardíos y lisosomas (Grant y Donaldson, 2009). Se considera que, en la endocitosis, después de que los endosomas tempranos han internalizado las moléculas o solutos del exterior al interior de la célula, éstos pueden ser regresados a la superficie celular por la vía endocítica de reciclaje o bien transportados a los endosomas tardíos y lisosomas para su degradación (Lebrand et al. 2002).

Con los hallazgos mencionados y reportes en los cuales no se ha encontrado colocalización de MCTP con vesículas de secreción marcadas con sinaptotagmina-I (Qiu et al. 2015; Genç et al. 2017) se puede considerar que la localización intracelular de MCTP es preferencial en las rutas endocíticas, específicamente en la ruta endocítica de reciclaje. Sin embargo, nuestros resultados también sugieren que MCTP pudiera estar implicada en la ruta endocítica de degradación debido a que Mctp2b-GFP colocalizó con las proteínas marcadoras de endosomas tardíos y lisosomas (figuras 18 y 19 respectivamente).

Nuestras observaciones muestran que Mctp se encuentra en endosomas tardíos y lisosomas. Dichos resultados no habían sido reportados con anterioridad, y es consistente con

reportes de otras proteínas presentes en ambos organelos porque estos se fusionan para formar el llamado complejo endolisosomal (Han et al. 2012; Hu et al. 2015; Redpath et al. 2015).

La localización de Mctp2b en lisosomas es interesante porque estos organelos no están relacionados únicamente con procesos de degradación sino también con el almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  (Galione et al. 2010), en donde Mctp, podría funcionar como proteína censora de este catión. Los lisosomas desempeñan otro tipo de funciones a través de la vía secretora denominada exocitosis lisosomal. Esta vía requiere de dos etapas. La primera etapa es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Jaiswal et al. 2002; Medina et al. 2011) y en ella los lisosomas son reclutados a la proximidad de la superficie celular. En la segunda etapa los lisosomas se fusionan con la membrana plasmática en respuesta al aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (Jaiswal et al. 2002; Tucker et al. 2004). La exocitosis lisosomal dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  es un proceso que ocurre en todos los tipos celulares (Medina et al. 2011). Por lo tanto, es posible plantear experimentos que prueben la participación de MCTP en esta vía.

Estudios recientes relacionan la vía de exocitosis lisosomal con la regulación estructural de la plasticidad de las espinas dendríticas (Padamsey et al. 2017). Además, se sabe que en neuronas la liberación lisosómica de  $\text{Ca}^{2+}$  se da en respuesta a la aplicación de glutamato (Pandey et al. 2009), lo que sugiere que los lisosomas pueden influir en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por actividad neuronal (Evans y Yasuda, 2017); para llevar a cabo esto, los lisosomas requieren de proteínas con la capacidad de censar  $\text{Ca}^{2+}$ , y dado que MCTP es una proteína con esta capacidad, resulta interesante plantear experimentos sobre el papel que MCTP está desempeñando en estos organelos.

De manera general, los resultados del presente estudio muestran que Mctp se encuentra localizada en el retículo endoplasmático y en vesículas pertenecientes a la ruta endocítica de reciclaje y a la ruta endocítica de degradación. Hecho que contrasta con su ausencia en membrana plasmática (figuras 16 y 20), pero coincide con lo reportado por Genç et al. (2017).

Las observaciones hasta ahora realizadas sugieren que MCTP podría estar participando en la interacción de dos interfases de membrana, ambas en respuesta a señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ . La primera interfase es la que se da entre el retículo endoplasmático y

la membrana plasmática a través de la formación de sitios de contacto. La segunda interfase, es la que se forma entre el retículo endoplasmático y los diversos sistemas de membranas internas, particularmente vesículas pertenecientes a las rutas de endocitosis.

Finalmente, en cualquiera de los dos casos, la participación de MCTP en dichas interfaces no se entenderá a plenitud hasta que se confirme su interacción con alguna otra molécula. Las observaciones del presente estudio sugieren que las moléculas con las cuales MCTP podría estar interaccionando son de dos tipos: (1) moléculas de naturaleza lipídica, cualquiera de los siete diferentes tipos de fosfatidilinositol presentes en las membranas celulares; y (2) moléculas de naturaleza proteica, particularmente proteínas que forman parte del complejo SNARE.

## **CONCLUSIÓN**

Los resultados obtenidos y los análisis realizados en el presente estudio permiten concluir que las proteínas Mctp1a, Mctp1b, Mctp2a y Mctp2b de pez cebra, al ser expresadas heterológamente en células HEK-293, tienen una distribución intracelular similar, pero su localización intracelular no es del todo idéntica. Asimismo, la proteína Mctp2b de pez cebra expresada en células HEK-293 se localiza en los siguientes organelos: retículo endoplasmático, endosomas de reciclaje, endosomas tardíos y lisosomas. Sin embargo, Mctp2b no se encuentra localizada en membrana plasmática de estas células.

## LITERATURA CITADA

Balla T. 2013. *Phosphoinositide: Tiny lipids with giant impact on cell regulation*. Physiology Review Journal. 93: 1019–1137.

Charalampos A, Pieter JJ. 1990. *Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)*. Nucleic Acids Research. 18 (20): 6069-6074.

Cho W, Stahelin RV. 2006. *Membrane binding and subcellular targeting of C2 domain*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 1761 (8): 838–849.

Cosson P, Perrin J, Bonifacino JS. 2013. *Anchors Aweigh: Protein Traffic Mediated by Transmembrane Domains*. Trends in Cell Biology. 23(10): 511–517.

Corbalán-García S, Gómez-Fernández JC. 2014. *Signaling through C2 domains: More than one lipid target*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 1838: 1536–1547.

Davis BD, Doherty RK, Delmonte JA, McNally M. 2002. *Calcium-sensitive Phospholipid Binding Properties of Normal and Mutant Ferlin C2 Domains*. The Journal of Biological Chemistry. 277 (25): 22883–22888.

Denessiouk K, Permyakov S, Denesyuk A, Permyakov E, Johnson M.S. 2014. *Two Structural Motifs within Canonical EF-Hand Calcium-Binding Domains Identify Five Different Classes of Calcium Buffers and Sensors*. PLoS ONE. 9(10): e109287.

Djurovic S, Le Hellard S, Kählner AK, Jönsson G, Agartza I, Steend VM, Hallf H, Wangh GA, Rasmussen BH, Mellea I, Wergeh T, Andreassen AO. 2009. *Association of mctp2 gene variants with schizophrenia in three independent samples of Scandinavian origin (SCOPE)*. Psychiatry Research. 168: 256–258.

Eden E. R. 2016. *The formation and function of ER-endosome membrane contact sites*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 1861(8 Part B): 874–879.

Espino-Saldaña AE. 2016. *Patrón de expresión y evaluación de la función de los genes mctp del pez cebra Danio rerio, que codifican para proteínas transmembranales con múltiples dominios C2*. Tesis doctoral en proceso. Universidad Autónoma de Querétaro.

Evans PR, Yasuda R. 2017. *Extracellular Remodeling by Lysosomes: An Inside-Out Mechanism of Spine Plasticity*. Neuron previews. 93 (1): 6-8.

Galione A., Morgan, AJ, Arredouani A, Davis LC, Rietdorf K, Ruas M, Parrington, J. 2010. *NAADP as an intracellular messenger regulating lysosomal calcium-release channels*. Biochemical Society Transactions. 38 (6): 1424–1431.

Genç Ö, Dickman DK, Ma W , Tong A , Fetter RD, Davis GW. *MCTP is an ER-resident calcium sensor that stabilizes synaptic transmission and homeostatic plasticity*. eLife 6: e22904.

Giordano F, Sheki Y, Idevall-Hagren O, Colombo SF, Pirruccello M, Milosevic I, Gravecha OE, Bagrianev SN, Borgese N, De Camilli P. *PI(4,5)P<sub>2</sub>-Dependent and Ca<sup>2+</sup>-Regulated ER-PM Interactions Mediated by the Extended Synaptotagmins*. Cell 153:1494–1509.

Görlach AP, Klappa P, Kietzmann T. 2006. *The Endoplasmic Reticulum: Folding, Calcium Homeostasis, Signaling, and Redox Control*. *Antioxidants and redox Signaling*. 8: 9-10.

Grant DB, Donaldson JG. 2009. *Pathways and mechanisms of endocytic recycling*. *Nature Review of Molecular Cell*. 10(9): 597–608.

Guo X, Liu F, Yu J, Wang Z, Wang C. 2016. *Human Protein Subcellular Localization with Integrated Source and Multi-label Ensemble Classifier*. *Scientific Reports*. 6: 28087.

Han WQ, Xia M, Li PL. 2012. *Lysosome fusion to the cell membrane is mediated by the dysferlin C2A domain in coronary arterial endothelial cells*. *Journal of Cell Science*. 125(5): 1225-1234.

Hu YB, Dammer Eb, Ren RJ, Wang G. 2015. *The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration*. *Translational Neurodegeneration*. 4:18: 1-10.

Jaiswal JK, Andrews NW, Simon SM. 2002. *Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in non-secretory cells*. *Journal of Cell Biology*. 159: 625–635.

Joshi AS, Nebenfuhr B, Choudhary V, Satpute-Krishnan P, Levine TP, Golden A, Prinz WA. *Lipid droplet and peroxisome biogenesis occur at same ER subdomains*. *Nature communications*. 9: 2940.

Kaufman RJ y Malhotra JD. 2014. *Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics*. *Biochimica et Biophysica (BBA)*. 1843: 2233–2239.

Kochubey O, Lou X, Schneggenburger R. 2011. *Regulation of transmitter release by  $Ca^{2+}$  and synaptotagmin: insights from a large CNS synapse*. *Cell Press*. 34 (5): 237-246.

Krajacic P, Pistilli EE, Tanis JE, Khurana TS, Lamitina ST. 2013. *FER-1/Dysferlin promotes cholinergic signaling at the neuromuscular junction in *C. elegans* and mice*. *Biology Open*. 2: 1245–1252.

Krajacic P, Hermanowsky J, Lozynska O, Khurana TS, Lamitina ST. 2009. **C. elegans* dysferlin homolog *fer-1* is expressed in muscle, and *fer-1* mutations initiate altered gene expression of muscle enriched genes*. *Physiol Genomics*. 40: 8 –14.

Lalani SR, Ware MS, Wang X, Zapata G, Tian Q, Franco ML, Jiang Z, Bucasas K, Scott AD, Campeau MP, Hanchard N, Uman L, Cast A, Patel A, Cheung WS, McBride LK, Bray M, Chinault CA, Boggs AB, Huang A, Baker RM, Hamilton S, Towbin J, Jefferies LJ, Fernbach DS, Potocki L, Belmont WJ. 2013. **mctp2* is a dosage-sensitive gene required for cardiac outflow tract development*. *Hum. Mol. Genet*. 22 (21): 4339–48.

Lebrand C, Corti M, Goodson H, Cosson P. 2002. *Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase *Rab7**. *The EMBO Journal*. 21(6): 1289–1300.

Lek A, Evesson FJ, Sutton RB, North KN, Cooper ST. 2012. *Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair*. *Traffic*. 13: 185–94.

- Martens S, McMahon TH. 2008. *Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles*. Molecular Cell Biology (Nature Reviews). 9: 543-556.
- Medina DL, Fraldi A, Bouche V, Annunziata F, Mansueto G, Spampanato C, Puri C, Pignata A, Martina JA, Sardiello M, Palmieri M, Polishchuk R, Puertollano R, Ballabio A. 2011. *Transcriptional Activation of Lysosomal Exocytosis Promotes Cellular Clearance*. Developmental Cell. 21: 421-430.
- Min S, Chang W, Su TC, Ab EX. 2007. *E-Syts, a family of membranous Ca<sup>2+</sup>-sensor proteins with multiple C2 domains*. National Academic of Science (USA). 104: 3823-3828.
- Padamsey Z, McGuinness L, Bardo SJ, Reinhart M, Tong R, Hedegaard A, Hart ML, Emptage NJ. 2017. *Activity-Dependent Exocytosis of Lysosomes Regulates the Structural Plasticity of Dendritic Spines*. Neuron. 93: 132-146.
- Pandey V, Chuang CC, Lewis AM, Aley PK, Brailoiu E, Dun NJ, Churchill GC, Patel S. 2009. *Recruitment of NAADP-sensitive acidic Ca<sup>2+</sup> stores by glutamate*. The Biochemical Journal. 422: 503-512.
- Pangrsic T, Reisinger E, Moser T. 2012. *Otoferlin: a multi-C2 domain protein essential for hearing*. Trends in Neurosciences. 35 (11): 671-680.
- Qiu, L, Liang YH, Liang F. 2015. *Multiple C2 domains transmembrane protein 1 is expressed in CNS neurons and possibly regulates cellular vesicle retrieval and oxidative stress*. J. Neurochem. 135: 492-507.
- Redpath GMI, Sophocleus RA, Turnbull L, Whitchurch CB, Cooper St. 2015. *Ferlins Show Tissue-Specific Expression and Segregate as Plasma Membrane/Late Endosomal or Trans-Golgi/Recycling Ferlins*. Traffic. 17(3): 245-66.
- Reinisch KM, De Camilli P. 2016. *SMP-domain proteins at membrane contact sites: structure and function*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 1861(8): 924-927.
- Sang-Won M, Wen-Pin C, Südhof TC. *E-Syts, a family of membranous Ca<sup>2+</sup> sensor proteins with multiple C2 domains*. PNAS. 104 (10): 3823-3828.
- Saheki Y, De Camilli P. 2017. *The Extended-Synaptotagmins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 1864: 924-927.
- Shin OH, Han W, Wang Y, Südhof TC. 2005. *Evolutionarily conserved multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions (MCTPs) and unusual Ca<sup>2+</sup> binding properties*. J. Biol. Chem. 280: 1641-51.
- Scott LJ, Muglia P, Kong XQ, Guan W, Flickinger M, Upmanyu R, Tozzi F, Li JZ, Burmeister M, Absher D, Thompson RC, Francks C, Meng F, Antoniadis A, Southwick AM, Schatzberg AF, Bunney WE, Barchas JD, Jones EG, Day R, Matthews K, McGuffin P, Strauss JS, Kennedy JL, Middleton L, Roses AD, Watson SJ, Vincent JB, Myers RM, Farmer AE, Akil H, Burns DK, Boehnke M. 2009. *Genome-wide association and meta-analysis of bipolar disorder in individuals of European ancestry*. PNAS. 116 (18): 7501-7506.

Scott MS, Calafell SJ, Tomas DY, Hallet MT. 2005. *Refining Protein Subcellular Localization*. PLoS Computational Biology. 1 (6): 518-528.

Sorkin A, Zastrow Mv. 2002. *Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds*. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 3: 600–614.

Stefan JC, Manford GA, Emr DS. 2013. *ER–PM connections: sites of information transfer and inter-organelle communication*. Current Opinion in Cell Biology. 25: 434–442.

Sutton RB, Davletov B, Berghuis M, Südhof TC, Sprang SR. 1995. *Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel  $Ca^{2+}$ /phospholipid-binding fold*. Cell Press. 80: 929– 938.

Tang J, Maximov A, Shin O, Dai H, Rizo J, Südhof JC. 2006. *A Complexin/Synaptotagmin I Switch Controls Fast Synaptic Vesicle Exocytosis*. Cell. 126: 1175–1187

Téllez-Arreola JL. 2014. *Patrón de expresión y diversidad estructural del gen D2092.1 de C. elegans*. Tesis Maestría en Ciencias. Neurobiología. Universidad Nacional Autónoma de México 37 pp.

Téllez-Arreola JL, Martínez TA. 2018. *Altered rhythmic locomotion of mutants of the gene mctp1 of “Caenorhabditis elegans”*. Artículo sometido a revisión, en espera para ser aceptado para su publicación.

Tucker WC, Weber T, Chapman ER. 2004. *Reconstitution of  $Ca^{2+}$  regulated membrane fusion by synaptotagmin and SNAREs*. Science. 304: 435–438.

Ubach J, Zhang X, Shao X, Südhof TC, Rizo J, 1998.  *$Ca^{2+}$  binding to synaptotagmin: how many  $Ca^{2+}$  ions bind to the tip of a C2-domain?*. EMBO Journal. 17 (14): 3921–3930.

Verma R, Holmans P, Knowles JA, Grover D, Evgrafov OV, Crowe RR, Scheftner WA, Weissman MM, DePaulo JR, Potash JB, Levinson DF. 2008. *Linkage disequilibrium mapping of a chromosome 15q25-26 major depression linkage region and sequencing of NTRK3*. Biol. Psychiatry. 63 (12): 1185–1189.