



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Bases Moleculares de la Interacción
de Proteínas de Transporte Vesicular

D. David López Martínez

2022

Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A (Grupo de Biomembranas) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, bajo la dirección de la Dra. María Senena Corbalán García, para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología con Mención de Doctorado Internacional, por el Graduado David López Martínez.

Publicaciones producidas durante la tesis doctoral:

Serrano-López, E. M., López-Martínez, D., Gómez-Fernández, J. C., Egea-Jimenez, A. L., & Corbalán-García, S. (2021). PKC ϵ controls the fusion of secretory vesicles in mast cells in a phosphatidic acid-dependent mode. *International Journal of Biological Macromolecules*, 377, 377-389. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.06.019

Esta tesis se ha realizado gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación:

- Interacciones de proteínas multidominio con membranas: proteínas quinasas c y rabfilina-3a como paradigmas, financiado por el Ministerio de economía y competitividad (BFU2014-52269-P).
- Interacciones de las PKCs con membranas celulares: un ejemplo de posible aplicación terapéutica financiado por la Fundación Séneca: Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (19409/PI/14)
- Caracterización estructural y funcional de proteínas periféricas de membrana involucradas en señalización celular y fusión de membranas, financiado por el Ministerio de economía, industria y competitividad (BFU2017-87222-P).
- Aplicación de métodos de cribado de alto rendimiento para el descubrimiento de nuevos inhibidores de proteínas quinasas C, financiado por la Fundación Séneca: Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (20885/PI/18)
- *Searching for the rabphilin-3a interactome*. Financiado por el programa Horizonte 2020 de la Unión Europea, con el apoyo de la plataforma EPIC-XS. (EPIC-XS-0000037).

David López Martínez ha desarrollado esta tesis doctoral gracias a la financiación salarial recibida de un contrato competitivo para la formación del profesorado universitario del Ministerio de Educación Cultura y Deporte (FPU16/03065), y opta a la mención de doctorado internacional gracias a la estancia proyectada para realizar en la Universidad de Utrecht en Países Bajos, financiada por las ayudas a la movilidad para estancias breves y traslados temporales para beneficiarios del programa de Formación del Profesorado Universitario (EST19/00313).

AGRADECIMIENTOS

Después de realizar todo el trabajo experimental para escribir esta memoria tengo mucho que agradecer a todas las personas que me han enseñado a investigar, y también me han acompañado y apoyado en esta carrera. En primer lugar, quiero agradecer a Marisén por acogerme en su laboratorio para formar parte de él. Ha sido una experiencia muy completa, desde los comienzos donde estabas siempre atenta a nosotros, hasta estos últimos años donde nos has enseñado a ser mucho más autónomos y madurar científicamente. En segundo lugar, a los antiguos compañeros de laboratorio con especial mención a Tere y MD, vosotras me enseñasteis a trabajar en un equipo muy agradable junto a Consuelo, Sonia, Claudio y Virginia. Sin embargo, a quienes más tengo que agradecer es a mis dos compañeros de doctorado Emilio y Jesús que aprendimos juntos a sacar adelante nuestras investigaciones, y también el laboratorio, además de apoyarnos en esta dura pero gratificante experiencia, sin olvidarme de Alessio por nuestras conversaciones sobre realidades paralelas ni de Paulo por su amabilidad y simpatía durante su estancia de un año al comienzo de la pandemia de COVID-19.

Agradecer a Tudela, Emilio, Román, Luís, Fernanda, y Rebeca, compañeros del Ala E por prestarme la centrífuga o cualquier reactivo agotado, y aconsejarme ante cualquier problema, y también al Ala C en sus comienzos con Rubén, Anabel, Antonio, y Adrián Matencio; a los profesores Fernando Soler, Antonio Ortiz, Juan Carmelo Gómez, y Marisén por acogerme e instruirme para dar docencia práctica en sus asignaturas; a mis alumnos internos Elisa y Javi; a Sergio por el suministro de agua milliQ. A Alfonso por los buenos ratos y su agradable olor a café en el laboratorio. Por supuesto a Jesús Amo por la buena compañía como profesor en las prácticas de laboratorio. Sin olvidarme de los técnicos del laboratorio Pepe, ya jubilado, y la nueva sustituta, Ana.

Quiero agradecer también a todo el personal del ACTI por toda la ayuda y servicios que prestan a toda la comunidad científica que lo desee, sin ellos la investigación de la UMU no saldría adelante: a todas las chicas de cultivos (Toñi, Juana, Silvia, Vero, María Jesús, Pilar y Rosario), y a Pepe por su siempre plena disponibilidad ante cualquier problema o duda sobre células; a Alejandro de

Biología Molecular por su ayuda sobre espectrometría de masas; a María de análisis de imagen por su asistencia en el procesamiento de imágenes; a Tere, Maruja de Microscopía y también Paco Porto de Leica, por su inestimable ayuda sobre el equipamiento de altas prestaciones de microscopía de fluorescencia que disponen.

Agradecer al grupo de proteómica de Utrecht del Prof. Albert Heck por acogerme en una primera estancia de una semana con Charlotte van Gelder, y también a Franziska Vollmy por su posterior ayuda y amabilidad para realizar todos los experimentos de espectrometría de masas planeados para la estancia de tres meses, pero que por la crisis sanitaria del COVID-19 se truncó y no dudaron en procesar mis muestras y enseñarme a analizarlas vía telemática.

A mis amigos biotecnólogos Paco, Ricardo y Jesús, por compartir experiencias, viajes y problemas, seremos futuros investigadores de éxito. También a Ana de la Fuente que renunció a la ciencia para ser una profesora estupenda y también a Álvaro, compañero de piso y persona de éxito.

A mis mejores amigos luntizztos (Sofía, Julio, Juanjo, Marta, Cristina y Susana), por los buenos momentos que paso junto a vosotros, comprenderme y obligarme a distraerme de esta vida de científico loco; a Ruth y Nuria, mis perlas pianistas, por muchas más quedadas musicales, gourmets y por escuchar mis charlas sobre moléculas.

A toda mi familia, con especial mención a mis padres, Eloy y Angelita, por su afecto y apoyo incondicional en todas las decisiones de mi vida; a mi tía Conchi y mi abuela por su cariño y afecto constante; a mi hermano y Esther por su apoyo y su ordenador para terminar los masas, y a mi sobrino Martín que acabas de llegar a la familia mientras terminaba la redacción de esta tesis.

Finalmente, mirando una vez escrita esta memoria de tesis, tengo que agradecer enormemente a incontables personas que he conocido y me han ayudado, pero también quiero ser un poco egocéntrico y ensalzarme a mí mismo por el trabajo y esfuerzo realizado, enhorabuena David lo has conseguido.

LISTA DE ABREVIATURAS

- A. Alanina, 13
ACN. Acetonitrilo, 91
ACTI. Área Científica y Técnica de Investigación de la Universidad de Murcia, 73
ADN. Ácido ribonucleico, 67
ADNc. ADN complementario, 64
ADP. Adenosín difosfato, 56
AOTF. Filtro acústico óptico sintonizable, 103
ARN. Acido ribonucleico, 64
ARNm. ARN mensajero, 65
ATP. Adenosín trifosfato, 56
BCA. Ácido bicinconínico, 83
BSA. Albúmina de Suero bovino, 80
Ca²⁺. Calcio, 38
CBR. Región de unión a calcio, 48
CFP. Proteína cian fluorescente, 106
Crh. Corticoliberina, 190
D. Ácido aspártico, 13
DAG. diacilglicerol, 60
DDA. Adquisición dependiente de los datos, 95
DIA. Adquisición independiente de los datos, 95
DMEM. Dulbecco's Modified Eagle Medium, 73
DTT. Ditiotreitól, 89
E. Ácido glutámico, 13
E.coli. Escherichia coli, 71
EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético, 66
ESI. Ionización por electroespray, 91
FBS. Suero bovino fetal, 73
FcεRI. Receptor de Fc de IgE, 53
FPP. Péptido promotor de la fertilización, 186
G418. Geneticina, 75
GAP. Proteína activadora de la GTPasa, 24
GDF. Factor de desplazamiento de GDI, 25
GDI. Inhibidor de la disociación de GDP, 24
GDP. Guanosín difosfato, 22
GEF. Factor intercambiador de guanina, 23
GFP. Proteína verde fluorescente, 106
GGT. Geranilgeraniltransferasa, 23
GO. Ontología Génica (Gene Ontology), 156
GPCR. Receptor acoplado a proteína G, 197
GTP. Guanosín trifosfato, 22
H. Histidina, 224
HA. Hemaglutinina, 124
Hap1. Proteína 1 asociada a la Huntingtina, 155
HCD. Disociación inducida por colisión de alta energía, 92
HCTT. Tubo de transferencia de alta capacidad, 92
HS. Suero de caballo, 73
HTT. Huntingtina, 22
IgE. Inmunoglobulina E, 52
IL-13. Interleucina 13, 54
IL-4. Interleucina 4, 53
IL-6. Interleucina 6, 54
IP3. Inositol-1,4,5-trisfosfato, 54
K. Lisina, 224
LRC. clúster rico en lisinas, 49
M. Metionina, 222
MCS. Sitios de contacto de membrana, 35
MS. Espectrometría de masas, 91
Mtpn. Miotrofina, 171
Myh. Miosina, 175
Nbn. Nibrina, 154
NGF. Factor de Crecimiento Neuronal, 73
NSF. Factor sensible a N-etilmaleimida, 32
PA. ácido fosfatídico, 61
PBS. Solución de tampón fosfato, 65
PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa, 65
Pfn2. Profilina-2, 171
PI4P. Fosfatidilinositol-4-fosfato, 50
PIP₂. Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, 48

PIP₃. Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato, 58
 PKA. Proteína Quinasa A, 46
 PKC. Proteína Quinasa C, 46
 PKD. Proteína Quinasa D, 60
 PLA. Ensayo de ligación por proximidad, 84
 PLC. Fosfolipasa C, 55
 Plp2. Proteína Proteolípídica, 175
 PMA. Forbol 12-myristato 13-acetato, 55
 p-NAG. 4-nitrofenil N-acetil β-D-galactosaminida, 80
 PPA. Fosfatidil ácido fosfatasa, 61
 PPI. Interacciones proteína-proteína, 84
 PS. Fosfatidilserina, 57
 PSA. Persulfato amónico, 81
 Q. Glutamina, 29
 R. Arginina, 29
 RCA. Amplificación por círculo rodante, 126
 RE. Retículo endoplasmático, 17
 RFP. Proteína roja fluorescente, 107
 Rph3A. Rabfilina3A, 44
 SDS. Dodecilsulfato sódico, 81
 SDS-PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS, 81
 SNARE. receptores de proteínas de fijación soluble de NSF, 27
 Snx3. Nexina clasificadora-3, 166
 Stmn2. Estatmina2, 163
 Strn3. Estriatina-3, 195
 STX1A. Sintaxina1A, 28
 Synj1. Sinaptojanina1, 155
 Syt1 Sinaptotagmina1, 49
 Sytl4. Sinaptotagmina similar 4, 194
 TBST. Solución tamponada de Tris con Tween-20, 82
 TEMED. Tetrametiletilendiamina, 81
 TGN. Red trans-Golgi, 25
 TNFα. Factor de Necrosis Tumoral α, 54
 UHPLC. Cromatografía líquida de ultra alta resolución, 90
 WT. wild-type (silvestre), 132
 YFP. Proteína amarilla fluorescente, 106

RESUMEN

Las vesículas intracelulares se transportan de un orgánulo a otro en respuesta a distintos estímulos. La dirección y eficacia de la entrega de vesículas hasta su membrana de destino están mediadas por la señalización celular, llevada a cabo por numerosas proteínas y segundos mensajeros. Rabfilina3A (Rph3A) es una proteína del tráfico de membranas, sensible a dos segundos mensajeros, calcio (Ca^{2+}) y fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2). $\text{PKC}\epsilon$ es una proteína quinasa implicada en rutas de señalización que actúa fosforilando a otras proteínas, y responde a distintos lípidos como diacilglicerol (DAG) y ácido fosfatídico (PA).

Nuestro grupo de investigación en colaboración con el Instituto de Biología Molecular de Barcelona, han resuelto las estructuras 3D de los dominios C2 de Rabfilina3A unidos a Ca^{2+} y PIP_2 , y también del dominio C2B unido a SNAP25. Además, se determinó previamente que $\text{PKC}\epsilon$ responde a PA. Por tanto, uno de los objetivos de esta tesis doctoral fue caracterizar la función de Rabfilina3A y descubrir nuevas proteínas moduladoras de su función. El segundo objetivo fue investigar el papel que podría tener el PA sobre $\text{PKC}\epsilon$ en la secreción de vesículas de los mastocitos.

Para lograr estos objetivos, se utilizaron técnicas de biología molecular para clonar y mutar genes. Se usaron dos líneas celulares como modelos vivos: la línea celular PC12 como modelo adrenal, también diferenciada con factor de crecimiento neuronal (NGF) a un modelo neuronal, y la línea celular RBL-2H3 como modelo de mastocitos. Se empleó el ensayo de ligación por proximidad (PLA) con microscopía confocal para estudiar la localización e interacciones proteína-proteína. Además, se utilizaron técnicas "ómicas" para la identificación masiva de proteínas cercanas a Rabfilina3A, acoplando la técnica de marcaje por proximidad dependiente de biotina (BioID2) con espectrometría de masas.

Los resultados obtenidos muestran que el dominio C2B de Rabfilina3A presenta una fuerte región electropositiva, en la zona de interacción con SNAP25 que no está conservada en Sinaptotagmina1. Rabfilina3A parece interactuar con VAMP2, Sinaptotagmina1 y SNAP25 en las vesículas de transporte, pero sólo con SNAP25 y Sinaptotagmina1 en la membrana plasmática. La zona de interacción de SNAP25 con Rabfilina3A, y la interacción de Rabfilina3A con PIP₂ parecen ser claves para la correcta localización de SNAP25 en la membrana plasmática. Además, la sobreexpresión de Rabfilina3A en un fenotipo neuronal promueve la localización de SNAP25 en la membrana plasmática. Se caracterizó el interactoma circundante a Rabfilina3A y se descubrió que Rabfilina3A interactúa con STIM1, y Tc1111. STIM1 es una proteína del retículo endoplasmático (RE) encargada de detectar y ayudar a restaurar los valores de Ca²⁺ en el RE. Tc1111 es una proteína de función desconocida. El interactoma realizado de Tc1111 muestra que es una proteína que interactúa con proteínas del citoesqueleto como tubulina y β-actina.

En consecuencia, en relación con el primer objetivo de esta tesis, se propone un modelo en el que Rabfilina3A contribuye al transporte de vesículas y de SNAP25 a la membrana plasmática gracias a la interacción con Tc1111, posteriormente Rabfilina3A vuelve a su situación de partida gracias a STIM1. Los resultados del segundo objetivo sugieren que el borde del bolsillo de unión a DAG del dominio C1B de PKCε es fuertemente electropositivo permitiendo su unión a PA. La activación de PKCε por PA junto con el Ca²⁺ desencadena un incremento de la fusión de vesículas en mastocitos. Este hallazgo se correlaciona con el aumento de la fosforilación de SNAP23 en respuesta a la interacción de PKCε con PA. Por tanto, se sugiere un modelo en el que PKCε es activada por PA y fosforila a SNAP23 facilitando la fusión de vesículas.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ENGLISH REPORT	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	15
I.1. TRÁFICO VESICULAR	16
I.1.1. Movilidad vesicular.....	18
I.1.1.1. Miosina Va en el transporte de vesículas secretoras.....	19
I.1.1.2. Quinesinas y dineínas en el transporte a larga distancia.....	21
I.1.2. Regulación del transporte vesicular por Rab GTPasas	22
I.1.2.1. Mecanismo molecular de activación de Rab GTPasas.....	22
I.1.2.2. Especificidad de membranas de las Rab GTPasas	25
I.1.3. Proteínas SNARE en la fusión de vesículas	27
I.1.3.1. Estructura de las proteínas SNAREs.....	30
I.1.3.2. Familia SNAP25	32
I.1.3.3. SNAP25.....	33
I.1.3.4. SNAP23.....	34
I.1.4. Sitios de contacto de membrana (MCS)	35
I.1.4.1. E-Syts (Sinaptotagminas extendidas) y SNAREs involucradas en MCS.....	37
I.1.4.2. STIM1 en la homeostasis de Ca ²⁺	38
I.1.5. Maquinaria molecular de la fusión de vesículas sinápticas.....	40
I.1.6. Rabfilina3A	44
I.1.6.1. Dominio N-terminal de Rabfilina3A.....	45
I.1.6.2. Dominios C2 de Rabfilina3A.....	47
I.1.6.3. Proteínas homólogas a Rabfilina3A.....	49
I.1.6.4. Función fisiológica de Rabfilina3A	50
I.1.6.5. Rabfilina3A involucrada en diversas patologías	51
I.2. CÉLULAS CEBADAS O MASTOCITOS, IMPLICACIÓN EN ALERGIA.....	52

I.2.1. Mecanismo de activación de los mastocitos	53
I.3. PROTEÍNAS QUINASAS C	54
I.3.1. Clasificación de las PKCs	56
I.3.2. Lípidos reguladores de los dominios C1 y C2	58
I.3.2.1. Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP ₂).....	58
I.3.2.2. Diacilglicerol (DAG)	60
I.3.2.3. Ácido fosfatídico (PA).....	61
I.4. OBJETIVOS.....	62
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	63
II.1. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PLASMÍDICOS	64
II.1.1. Extracción de ARN	65
II.1.2. Síntesis de ADNc	65
II.1.3. Amplificación de genes por PCR.....	65
II.1.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	66
II.1.5. Reacción de ensamblaje <i>Gibson Assembly</i>	67
II.1.6. Mutagénesis dirigida	69
II.1.7. Transformación de las construcciones plasmídicas	71
II.1.8. Amplificación y producción de ADN plasmídico	72
II.2. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES	72
II.2.1. Línea celular PC12.....	72
II.2.1.1. Método y medio de cultivo de la línea celular PC12.....	73
II.2.1.2. Transfección de la línea celular PC12.....	74
II.2.1.3. Generación de líneas transfectadas estables	75
II.2.1.4. Diferenciación neuronal de células PC12.....	76
II.2.1.5. Lisis celular de PC12.....	76
II.2.2. Línea celular RBL-2H3	77
II.2.2.1. Método y medio de cultivo de la línea RBL-2H3	78

II.2.2.2. Transfección de la línea celular RBL-2H3.....	78
II.2.2.3. Estimulación con PA y DAG	79
II.2.2.4. Lisis celular de RBL-2H3	79
II.3. ENSAYO DE LA B-HEXOSAMINIDASA	80
II.4. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS	80
II.4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	81
II.4.2. Electrotransferencia de gel de poliacrilamida (<i>Western-blot</i>).....	81
II.4.3. Revelado de la membrana de nitrocelulosa (<i>Western-blot</i>)	82
II.4.4. Determinación de la concentración de proteína.....	83
II.4.5. Inmunofluorescencia.....	83
II.5. ENSAYO DE LIGACIÓN POR PROXIMIDAD IN SITU (PLA)	84
II.6. ANTICUERPOS UTILIZADOS	86
II.7. BIOID2: ESTUDIO PROTEÓMICO POR MARCAJE DEPENDIENTE DE PROXIMIDAD.	87
II.7.1. Captura y aislamiento de proteínas biotiniladas	88
II.7.2. Digestión de las proteínas biotiniladas capturadas	89
II.8. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	90
II.8.1. Cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC)	90
II.8.2. Espectrometría de masas (MS)	91
II.8.3. Análisis de los datos crudos del espectrómetro de masas	96
II.8.4. Análisis estadístico de la espectrometría de masas	97
II.8.5. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de proteínas	98
II.8.6. Construcción de redes de interacción proteína-proteína (PPI) y diagramas de Venn.....	99

II.9. ENSAYO DE COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE (BIFC)	99
II.10. MICROSCOPIA CONFOCAL Y CITOMETRÍA DE FLUJO.....	102
II.10.1. Microscopía confocal.....	102
II.10.2. Citometría de flujo	105
II.10.3. Fluoróforos utilizados	106
II.11. ANÁLISIS DE IMAGEN Y PROCESAMIENTO DE DATOS	107
II.11.1. Análisis cuantitativo de la localización de SNAP25 en la membrana plasmática.....	108
II.11.2. Análisis estadístico y presentación de datos.....	109
II.12. CÁLCULO DEL POTENCIAL ELECTROSTÁTICO	110
RESULTADOS.....	113
CAPÍTULO III.RABFILINA3A CONTROLA LA LOCALIZACIÓN DE SNAP25 A TRAVÉS DE SU DOMINIO C2B.....	115
III.1. RESUMEN.....	116
III.2. INTRODUCCIÓN.....	117
III.3. RESULTADOS	120
III.3.1. El dominio C2B de Rabfilina3A no conserva la zona de interacción de Sinaptotagmina1 con SNAP25.....	120
III.3.2. Caracterización de la interacción mediante ensayo de ligación por proximidad de Rabfilina3A con proteínas endógenas de fusión de vesículas.	124
III.3.3. Rabfilina3A involucrada en la localización de SNAP25.....	130
III.3.3.1. Implicación de la parte final del dominio C2B-Rph3A en fenotipo adrenal.	132

III.3.3.2. Implicación de la región rica en lisinas del dominio C2A y C2B en fenotipo adrenal.	134
III.3.3.3. Implicación de la parte final del dominio C2B-Rph3A en fenotipo neuronal.....	138
III.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	140
CAPÍTULO IV. INTERACTOMA DE RABFILINA3A Y SUS PROTEINAS MODULADORAS EN FENOTIPO ADRENAL	145
IV.1. RESUMEN	146
IV.2. INTRODUCCIÓN	147
IV.3. RESULTADOS.....	149
IV.3.1. Verificación de la biotilación selectiva de proteínas mediante la construcción BioID2-Rabfilina3A	149
IV.3.2. Detección de las interacciones de Rabfilina3A mediante BioID2 en un fenotipo adrenal.	153
IV.3.3. Verificación de la biotilación selectiva de proteínas mediante la construcción BioID2-SNAP25, BioID2-Tcp1111, BioID2-STIM1 y BioID2-Rph3A-M3.....	157
IV.3.4. Proteínas que interactúan con BioID2-SNAP25 en un fenotipo adrenal.....	161
IV.3.5. Proteínas que interactúan con BioID2-Rabfilina3A-M3 en fenotipo adrenal.....	165
IV.3.6. Proteínas que interactúan con BioID2-STIM1 en fenotipo adrenal	169
IV.3.7. Proteínas que interactúan con BioID2-Tcp1111 en un fenotipo adrenal.....	174
IV.3.8. Interacciones mutuas entre Rabfilina3A, SNAP25, STIM1 y Tcp1111 en el fenotipo adrenal	177
IV.3.9. Ensayo de complementación bimolecular fluorescente.....	181

IV.4. DISCUSIÓN.....	183
CAPÍTULO V. INTERACTOMA DE RABFILINA3A Y SUS PROTEÍNAS MODULADORAS EN FENOTIPO NEURONAL	189
V.1. RESUMEN.....	190
V.2. INTRODUCCIÓN.....	191
V.3. RESULTADOS	193
V.3.1. Proteínas que interaccionan con BioID2-Rph3A en un fenotipo neuronal	193
V.3.2. Proteínas que interaccionan con el mutante BioID2-Rph3A-M3 en un fenotipo neuronal.....	197
V.3.3. Proteínas que interaccionan con BioID2-SNAP25 en un fenotipo neuronal	201
V.3.4. Proteínas que interaccionan con BioID2-STIM1 en un fenotipo neuronal	203
V.3.5. Proteínas que interaccionan con BioID2-Tcp1111 en un fenotipo neuronal	206
V.3.6. Interacciones mutuas entre Rabfilina3A, SNAP25, STIM1 y Tcp1111 en fenotipo neuronal.....	208
V.4. DISCUSIÓN.....	212
CAPÍTULO VI. PKCE INDUCE LA LIBERACIÓN DE VESICULAS Y FOSFORILACIÓN DE SNAP23, A TRAVES DEL DOMINIO C1B QUE RESPONDE A ÁCIDO FOSFATÍDICO	217
VI.1. RESUMEN.....	218
VI.2. INTRODUCCIÓN.....	219
VI.3. RESULTADOS	221

VI.3.1. Identificación de un área electropositiva alrededor del sitio de unión a DAG del dominio C1B de PKC ϵ	221
VI.3.2. Efecto de la interacción y activación de PKC ϵ dependiente de PA sobre la degranulación de vesículas en células RBL-2H3.....	224
VI.3.3. PKC ϵ fosforila la proteína SNARE llamada SNAP23.....	226
VI.3.4. Modelado del SNARE compuesto de VAMP8, SNAP23 y STX4...	229
VI.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	230
CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	237
VII.1. DISCUSIÓN GENERAL	238
VII.2. CONCLUSIONES.....	244
CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	247

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. I.1. Principales rutas del tráfico de membranas en células eucariotas..	16
Figura. I.2. Rutas de transporte de vesículas mediadas por Rab GTPasas.....	20
Figura. I.3. Ciclo de trabajo de las Rabs GTPasas.	23
Figura. I.4. Localización de las Rab GTPasas en la célula.	24
Figura. I.5. El ensamblaje de proteínas SNARE entre membranas opuestas provoca la fusión de membranas.	28
Figura. I.6. Resumen de los complejos SNAREs conocidos.....	29
Figura. I.7. Estructura del complejo neuronal SNARE de cuatro α -hélices.	31
Figura. I.8. Representación esquemática de la familia de proteínas SNAP25. .	33
Figura. I.9. Representación esquemática de las proteínas implicadas en MCS entre el RE y la membrana plasmática.....	36
Figura. I.10. Entrada de Ca^{2+} a través de MCS del RE y la membrana plasmática.	39
Figura. I.11. Zona activa de la terminal sináptica.....	41
Figura. I.12. Modelo del ciclo de la fusión de vesículas sinápticas.	43
Figura. I.13. Esquema de los dominios de Rabfilina3A.....	45
Figura. I.14. Complejo Rab3A y Rabfilina3A.....	46
Figura. I.15. Dominios C2A y C2B de Rabfilina3A.	48
Figura. I.16. Ruta de señalización de Fc ϵ RI unido a un antígeno.	53
Figura. I.17. Dominios de las Proteínas Quinasas C (PKC).....	55
Figura. I.18. Representación de la estructura del PIP ₂	59
Figura. I.19. Representación de la estructura del DAG.....	60
Figura. I.20. Representación de la estructura del ácido fosfatídico.....	61
Figura. II.1. Reacción de Gibson Assembly.	68
Figura. II.2. Mutagénesis dirigida mediante Gibson Assembly.....	70
Figura. II.3. Morfología y fenotipo de las células PC12.	73
Figura. II.4. Células PC12 con fenotipo neuronal.....	76
Figura. II.5. Morfología y fenotipo de células RBL-2H3.....	77
Figura. II.6. Esquema del ensayo de ligación por proximidad (PLA).....	85
Figura. II.7. Técnica BiID2.....	88

Figura. II.8. Representación esquemática de un espectrometro de masas Q Exactive HF	93
Figura. II.9. Esquema de funcionamiento de un analizador Orbitrap™.	94
Figura. II.10. Esquema del ensayo de complementación bimolecular fluorescente (BiFC).....	100
Figura. II.11. Histogramas de los controles negativos y positivos del ensayo BiFC.....	101
Figura. II.12. Esquema de funcionamiento de un microscopio confocal.....	103
Figura. II.13. Fundamento del sistema de detección multibanda modulable de Leica.	104
Figura. II.14. Estructura de la proteína verde fluorescente.....	106
Figura. II.15. Análisis de la localización de SNAP25-YFP en membrana plasmática.....	108
Figura. II.16. Ejemplo de representación de datos y análisis de estimación estadística.....	109
Figura. III.1. Comparación estructural de la interacción de SNAP25 con Rph3A- C2B y con Sinaptotagmina1-C2B.	120
Figura. III.2. Comparación en detalle de la región de interacción SNAP25 con Rabfilina3A y Sinaptotagmina1A.	121
Figura. III.3. Alineamiento de secuencia de los dominios C2B de Sinaptotagmina1 y Rabfilina3A.....	122
Figura. III.4. Comparación del potencial electrostático del final de los dominios C2B de Rph3A y Sinaptotagmina1.	123
Figura. III.5. Esquema molecular de la reacción de PLA.....	124
Figura. III.6. Detalle de célula de microscopía confocal con cuatro sondas fluorescentes.	125
Figura. III.7. Imágenes de inmunofluorescencia en confocal del ensayo de PLA en células PC12.....	128
Figura. III.8. Gráficos de la distribución de eventos de PLA en la membrana y citosol de cada célula.	129
Figura. III.9. Esquema de los dominios de las proteínas de fusión fluorescentes utilizadas.....	130

Figura. III.10. Imágenes de microscopía confocal de PC12 expresando eCFP y eYFP.	131
Figura. III.11. Influencia de la parte final del dominio C2B de Rph3A en SNAP25.	133
Figura. III.12. Modelo molecular de los dominios C2 de Rph3A con PIP ₂	134
Figura. III.13. Esquema de las proteínas de fusión fluorescente Rph3A y SNAP25 y los mutantes de interacción con PIP ₂	135
Figura. III.14. Influencia de la región de interacción Rph3A-PIP ₂ en SNAP25.	137
Figura. III.15. Influencia de Rph3A en SNAP25 bajo un fenotipo neuronal.	139
Figura. III.16. Árbol filogenético de los dominios C2B de Sinaptotagmina1, Rph3A, Doc2A y Doc2B humanas.	141
Figura. IV.1. Representación esquemática de las proteínas de fusión BioID2 con Rph3A.	149
Figura. IV.2. Niveles de expresión de las proteínas de fusión con BioID2 en células PC12.	150
Figura. IV.3. Imágenes de microscopía confocal de Rph3A y BioID2.	151
Figura. IV.4. Western-blot testando la biotilación por BioID2.	152
Figura. IV.5. SNAP25 es biotilado por Rph3A-BioID2.	152
Figura. IV.6. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con Rph3A en el fenotipo adrenal.	154
Figura. IV.7. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiladas por BioID2-Rph3AWT en fenotipo adrenal.	156
Figura. IV.8. Esquema de las proteínas de fusión con BioID2.	157
Figura. IV.9. Western-blot para testar los niveles de expresión de las nuevas proteínas de fusión con BioID2 en células PC12.	158
Figura. IV.10. Imágenes de microscopía confocal de las proteínas de fusión Rph3A-M3, SNAP25, STIM1 y Tc1111 fusionadas a BioID2.	159
Figura. IV.11. Western-blot de la biotilación de las proteínas con BioID2. ...	160
Figura. IV.12. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con SNAP25 en el fenotipo adrenal.	162

Figura. IV.13. Gráfico de barras del análisis de ontología génica del ensayo BioID2-SNAP25 en fenotipo adrenal.	164
Figura. IV.14. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con Rph3A-M3 en el fenotipo adrenal.	165
Figura. IV.15. Diagrama de Venn que muestra las proteínas compartidas entre Rph3A-M3 y Rph3A wild-type en el fenotipo adrenal.	167
Figura. IV.16. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-Rph3A-M3 en fenotipo adrenal.	168
Figura. IV.17. Esquema proteico de la proteína de fusión BioID2-STIM1.	169
Figura. IV.18. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con STIM1 en fenotipo adrenal.	171
Figura. IV.19. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-STIM1 en fenotipo adrenal.	173
Figura. IV.20. Diagrama de volcán de las proteínas que interactúan con Tcp1111 en el fenotipo adrenal.	174
Figura. IV.21. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-Tcp1111 en fenotipo adrenal.	176
Figura. IV.22. Diagrama de Venn de las proteínas compartidas entre Rph3A, SNAP25, STIM1 y Tcp1111 en fenotipo adrenal.	178
Figura. IV.23. Gráfico de barras del análisis GO de las 62 proteínas comunes entre Rph3A, STIM1, SNAP25 y Tcp1111 en fenotipo adrenal.	179
Figura. IV.24. Red de términos enriquecidos de las 62 proteínas comunes entre dos o más condiciones de los análisis de BioID2 en fenotipo adrenal.	180
Figura. IV.25. Red de interacción proteína-proteína de las proteínas de los 4 interactomas en fenotipo adrenal.	181
Figura. IV.26. Gráfico del porcentaje de interacción mediante BiFC.	183
Figura. V.1. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con Rph3A en el fenotipo neuronal.	194
Figura. V.2. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-Rph3A en fenotipo neuronal.	196

Figura. V.3. Diagrama de Venn que muestra las proteínas compartidas entre Rph3A-M3 y Rph3A wild-type en el fenotipo neuronal.	198
Figura. V.4. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con Rph3A-M3 en el fenotipo neuronal.	199
Figura. V.5. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-Rph3A-M3 en fenotipo neuronal.	200
Figura. V.6. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con SNAP25 en el fenotipo neuronal.	202
Figura. V.7. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-SNAP25 en fenotipo neuronal.	203
Figura. V.8. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con STIM1 en el fenotipo neuronal.	204
Figura. V.9. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-STIM1 en fenotipo neuronal.	205
Figura. V.10. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con Tcp1111 en el fenotipo neuronal.	206
Figura. V.11. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-Tcp1111 en fenotipo neuronal.	207
Figura. V.12. Diagrama de Venn de las proteínas compartidas entre Rph3A, SNAP25, STIM1 y Tcp1111.	209
Figura. V.13. Análisis de los términos GO de las 96 proteínas compartidas entre 2 o más análisis de BioID2 en fenotipo neuronal.	210
Figura. V.14. Red de términos enriquecidos de las 96 proteínas comunes entre dos o más condiciones de los análisis de BioID2 en fenotipo neuronal.	210
Figura. V.15. Red de interacción proteína-proteína del interactoma de Rph3A, SNAP25, STIM1 y Tcp1111 en fenotipo neuronal.	211
Figura. VI.1. Predicción de la estructura tridimensional del dominio C1B de la PKC ϵ junto al DAG.	222
Figura. VI.2. Mapa de la distribución de cargas de los dominios C1.	223
Figura. VI.3. Liberación de β -hexosaminidasa en las células inducida por diferentes tipos de estimulación.	226

Figura. VI.4. Western-blot contra SNAP23 de células RBL-2H3 transfectadas con PKC ϵ -WT-EGFP y PKC ϵ -4MUT-EGFP estimuladas con PA+DAG	227
Figura. VI.5. VAMP8 y STX4 no tienen diferentes desplazamientos de movilidad electroforética debido a la fosforilación.....	228
Figura. VI.6. Modelización del complejo SNARE responsable de la degranulación en las células RBL-2H3.....	229
Figura. VI.7. Alineación de los dominios C1 de la familia PKC humana	232
Figura. VII.1. Modelo del ciclo de trabajo de Rph3A.....	240

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Resumen de las proteínas efectoras de las distintas isoenzimas de las familia de las RabGTPasas.	26
Tabla I.2. Sensibilidad a cofactores de los dominios de las PKCs.	57
Tabla II.1 Plásmidos creados y utilizados en esta tesis doctoral.	64
Tabla II.2. Cebadores utilizados para la amplificación de secuencias y su posterior ensamblaje.	66
Tabla II.3. Mutantes utilizados.	71
Tabla II.4. Cantidades de ADN y Lipofectamina para transfectar células PC12.	74
Tabla II.5. Anticuerpos primarios utilizados.	86
Tabla II.6 Anticuerpos secundarios utilizados.	87
Tabla II.7. Rango de emisión y excitación de fluoróforos.	107

ENGLISH REPORT

I. ABSTRACT

Intracellular vesicles are transported from one organelle to another in response to various different stimuli. The direction and efficiency of vesicle delivery to their target membrane are mediated by cell signalling and carried out by numerous proteins and second messengers. Rabphilin3A (Rph3A) is a membrane trafficking protein that responds to two second messengers, calcium (Ca^{2+}) and phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate (PIP_2). PKC ϵ is a protein kinase involved in signalling pathways by phosphorylating other proteins and responding to various lipids such as diacylglycerol (DAG) and phosphatidic acid (PA).

The biomembranas research at the University of Murcia, in collaboration with the Institute of Molecular Biology in Barcelona have solved the 3D structure of the C2 domains of Rabphilin3A bound to Ca^{2+} and PIP_2 , and also the C2B domain bound to SNAP25. Moreover, PKC ϵ has already been found to be sensitive to PA by researchers in my group. One of the objectives of this Ph.D. thesis was to characterize the function of Rabphilin3A and to determine novel proteins that modulate it. The second objective was to investigate the role that PA might have on PKC ϵ during vesicle secretion in mast cells.

To achieve these goals, molecular biology techniques were used to clone and mutate different genes of interest. Two cell lines were used as *in vitro* models: the PC12 cell line as an adrenal model, which was also differentiated with neuronal growth factor (NGF) as a neuronal model, and the RBL-2H3 cell line as a mast cell model. Proximity ligation assay (PLA) with confocal microscopy was used to study protein localization and interactions. In addition, "omics" techniques were used for high-throughput identification of proteins in the vicinity of Rabphilin3A, hence coupling proximity-dependent biotin identification (BioID2) with mass spectrometry.

The results obtained show that the C2B domain of Rabphilin3A has a strong electropositive area in the SNAP25-interacting region that is not conserved

in Synaptotagmin1 (Syt1). Rabphilin3A appears to interact with VAMP2, Synaptotagmin1, and SNAP25 on vesicles, but only with SNAP25 at the plasma membrane. The interaction site of SNAP25 with Rabphilin3A and the interaction of Rabphilin3A with PIP₂ appear to be key for the correct location of SNAP25 at the plasma membrane. Furthermore, overexpression of Rabphilin3A in a neuronal phenotype promotes the location of SNAP25 at the plasma membrane. The Rabphilin3A interactome shows that Rabphilin3A interacts with STIM1 and Tc1111. STIM1 is an endoplasmic reticulum (ER) protein involved in Ca²⁺ sensing in the ER. Tc1111 is a protein of unknown function, but its interactome shows that Tc1111 is a protein that interacts with cytoskeletal proteins such as tubulin and β-actin.

Consequently, relating back to the first objective of this thesis, a model is proposed in which Rabphilin3A contributes to the transport of vesicles and SNAP25 to the plasma membrane as a result of the interaction with Tc1111, Rabphilin3A then returns to its initial state as a result of the interaction with STIM1. Moreover, with the regards to the second goal of this thesis, results suggest that the edges of the DAG-binding pocket of the C1B domain of PKCε are strongly electropositive, allowing its binding to PA. Activation of PKCε by PA together with Ca²⁺ triggers vesicle fusion in mast cells. This finding correlates with the increase in SNAP23 phosphorylation in response to the interaction of PKCε with PA. Therefore, a model is proposed here in which PKCε is activated by PA and phosphorylates SNAP23, facilitating vesicle fusion.

II. INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Eukaryotic cells have a cytoplasm compartmentalized by intracellular membranes. In addition to the plasma membrane, phospholipid bilayers form vesicles and complex internal networks that are needed for separating incompatible biochemical reactions and restricting specific conditions. Moreover, compartmentalization can help accurately regulate the transport of specific molecules from one compartment to other, a process named vesicular trafficking and which is regulated by a myriad of proteins (Cai et al., 2007). Vesicle trafficking

begins with vesicle budding from donor membranes controlled by Rab GTPases and effectors of Rabs proteins such as Rabphilin3A (Homma et al., 2021). Then, their transport to acceptor membranes is carried out by motor proteins that propel vesicles along microtubules and actin filaments; a process that can be assisted by membrane contact sites (MCS) regulated by proteins (Hewlett et al., 2021; Rothman, 1994). Finally, vesicle trafficking ends with vesicle docking and fusion, which results in the incorporation with the acceptor membrane regulated by the principal mediators of specific membrane fusion, the SNARE complexes (Lou & Shin, 2016). SNARE proteins are the molecular engines involved in fusion of vesicles and are finely tuned by modifications such as phosphorylation (Rizo, 2018). PKC proteins are a family of kinases that phosphorylate several proteins, hence activating and suppressing numerous cell responses (Newton, 2018). The focus of this thesis is on how Rabphilin3A functions *in vivo* and how the PA signaling in PKC ϵ is involved in vesicle trafficking.

Rabphilin3A is a membrane trafficking protein involved in the calcium-dependent regulation of secretory vesicle exocytosis in neurons and neuroendocrine cells. The protein is targeted to vesicles through the interaction with the Rab GTPases, Rab3A or Rab27, via its N-terminal Rab-binding domain (Fukuda et al., 2004; Shirataki et al., 1994). Its C-terminal domain consists of two C2 domains that are responsible for the Ca²⁺- and phospholipid-dependent membrane specificity of the protein and participate in other protein-protein interactions. Our lab has a long history in the characterization of the interaction of Rabphilin3A with membranes by using biophysical, biochemical, and cellular biology approaches. Several years ago, we demonstrated how the C2 domains of Rabphilin3A are regulated by Ca²⁺ and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂), showing how these domains interact with the membrane and initiate vesicle fusion (Guillen et al., 2013). Furthermore, four years ago, we revealed a structural insight of a membrane-binding mode by solving the structure of Rph3A-C2B-SNAP25 and Rph3A-C2B-PIP₂ (Ferrer-Orta et al., 2017).

The Protein kinase C family consists of a set of 10 isoenzymes that show phosphotransferase activity, where they specifically phosphorylate Serine (Ser) and Threonine (Thr) residues when they are activated by various signals, most of which are phospholipid and/or Ca^{2+} -dependent (Reyland, 2009). These enzymes are found in an inactive state, dispersed in the cytoplasm in a soluble form, where they bind to phospholipids and/or membrane receptors after activation and perform their phosphotransferase function (Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2006).

Previous work in our lab has determined that $\text{PKC}\epsilon$ shows a high affinity for membranes enriched with phosphatidic acid and diacylglycerol, through its C2 and C1B domains (Egea-Jiménez et al., 2014; Jose Lopez-Andreo et al., 2003). This suggests a new pathway to control the function of this enzyme by membrane protein clustering.

To understand the role of these proteins in vesicle trafficking *in vivo*, the following objectives were proposed:

1. Determine the interactions that occur between Rabphilin3A and the SNARE complex in a living cell model.
2. Identify the role of the Rph3A-SNAP25 interaction in living cells.
3. Discover new proteins modulating the function of Rabphilin3A in different biological models.
4. Study the influence of PA on secretory vesicle fusion in mast cells.
5. Determine proteins phosphorylated by $\text{PKC}\epsilon$ under the influence of PA.

III. MATERIALS Y METHODS

III.1. Construction and site-directed mutagenesis of the plasmids

$\text{PKC}\epsilon$ cDNA was a gift from Drs. Nishizuka and Y. Ono (Kobe University, Kobe, Japan). N-Terminal fusion of rat $\text{PKC}\epsilon$ to a green fluorescent protein (EGFP) was generated by Dr. Antonio Egea. Rabphilin3A was cloned into pECFP-C1 plasmid to fuse cyan fluorescent protein to the N-terminal of human

Rabphilin3A, and into pCGN to fuse HA-tag to the N-terminal of human Rabphilin3A. SNAP25 was cloned into pCMV6 to fuse myc-tag to the C-terminal of SNAP25. Cloning and site-directed mutagenesis were performed by Gibson Assembly. Tcp1111 and SNAP25 cDNAs were obtained from PC12 cells by RT-PCR. Human Rabphilin3A and STIM1 cDNAs were purchased from Addgene.

III.2. Cell culture and transfection

Two cell lines were used for this Ph.D. thesis:

- RBL-2H3 cells that are a Wistar rat basophilic leukaemia cell line isolated and cloned in 1978.
- PC12 cells that are a rat pheochromocytoma cell line isolated and cloned in 1976.

PC12 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated horse serum (HS) and 5% fetal bovine serum (FBS). To promote cell differentiation, the medium was changed to DMEM supplemented with 5% heat-inactivated HS, 2.5% FBS, and 50 ng/mL of mouse submaxillary NGF. The cells were kept under differentiating conditions for 2-3 days and the differentiation medium was replaced every 24 h. Cells were transfected with Lipofectamine LTX following the instructions provided by the manufacturer.

RBL-2H3 cells were grown in DMEM 4.5 g/l glucose culture medium supplemented with 15% FBS, and 4 mM glutamine, maintained at 37°C in moist heat with 7.5% CO₂. For transfection of RBL-2H3 cells, electroporation was performed using the following conditions: exponential decay mode using as parameters: 250 V and 960 µF.

III.3. Immunofluorescence and confocal microscopy

Cells were fixed with 2% p-formaldehyde for 10 min in phosphate-buffered saline (PBS) followed by three washed with PBS. After permeabilizing with 0.1% Triton-X100 in PBS, cells were blocked with the product Image-iT-FX signal enhancer (Invitrogen, USA) for 30 min at room temperature, and then with 1%

bovine serum albumin (BSA) for 30 min at room temperature. Next, cells were incubated with the corresponding primary antibodies in 1% BSA and 0.15% saponin for 1 h at 37°C. After blocking again with 1% BSA for 20 min, immunoreactivity was detected with the suitable fluorophore-conjugated secondary antibody before mounting on slides with the Prolong Gold antifade reagent.

Fixed and live cells were examined with a Leica TCS SP8 (Leica, Heidelberg, Germany) confocal microscopy. The objectives used were PL-APO 63x/1.3 NA (immersion oil). The detectors used were PMT and HyD. Adjusting the excitation and detection wavelength band depending on the fluorophore. Images were analyzed with Fiji-image J-NIH (Schindelin et al., 2012) <https://fiji.sc/>.

III.4. BioID pull-down and mass spectrometry (MS)

2×10^7 cells were incubated with 50 μ M biotin for 16 h. After two rounds of PBS washes, the cells were lysed in 1.25 ml of RIPA buffer with 1x Protease Inhibitor. After 15 rounds of sonication each for 30 seconds on and 30 seconds off on ice, the sonicated cells were collected and centrifugated. The supernatant was transferred to new tubes and protein quantification was performed using BCA assay. 500 μ g of protein was incubated with 150 μ L of superparamagnetic Dynabeads MyOne C1 and rotated overnight at 4°C. Beads were washed 5 times with RIPA buffer, 5 times with 1 M KCl in H₂O, 5 times with 0.1 M Na₂CO₃ in H₂O, 5 times with 2 M urea in 10 mM Tris pH 8, and 5 times with 50 mM NH₄HCO₃. Finally, the beads were resuspended in 200 μ L 50mM NH₄HCO₃ for tryptic digestion. Beads-proteins suspension mix was digested overnight by MS-grade trypsin. The resulting peptides cut at Lys and Arg were recovered from the beads using a magnet and then acidified with 0.5% trifluoroacetic acid.

Peptide separation was performed on the UHPLC 1290 ultra-high pressure liquid chromatography system (Agilent technologies). Before separation,

peptides were first trapped on an in-house made trap column (Dr. Maisch Reprosil C18, 3 μm , 2 cm x 100 μm) and then separated on an analytical column (Agilent Poroshell EC-C18, 2.7 μm , 50 cm x 75 μm). Mobile phases A and B were water with 0.1% formic acid (v/v) and 80/20/0.1% acetonitrile/water/formic acid (v/v/v), respectively. The flow rate of the liquid chromatography was passively split to 300 nl/min.

MS was performed on an Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer (ThermoFisher Scientific). The mass spectrometer was operated in data-dependent acquisition mode. At a resolution of 60000 m/z at 200 m/z, MS full scan spectra were acquired from m/z 375–1600 after accumulation to a target value of 3×10^6 . Up to 15 most intense precursor ions were selected for fragmentation. The quadrupole isolation width was set to 1.4 m/z. HCD fragmentation was performed at a normalized collision energy of 28% after the accumulation to a target value of 1×10^5 . MS/MS was acquired at a resolution of 30000 m/z and spectra acquired from m/z 200-2000. Dynamic exclusion was enabled with an exclusion mass width of 10 ppm and a duration of 16 s.

III.5. Mass Spectrometry Data and Statistical Analysis

The RAW data files were processed with MaxQuant (v1.6.10.43) (Cox & Mann, 2008) and MS2 spectra were searched with the Andromeda search engine against the Swiss-Prot protein database of *Rattus Norvegicus* (8135 entries, downloaded 29/05/2021) supplemented by human Rabphilin3A, human STIM1 and rat Tcp1111 from TrEMBL. Trypsin was specified as enzyme and up to two miscleavages were allowed. Filtering was done at 1% false discovery rate (FDR) at the protein and peptide level. Label-free quantification (LQF) was performed, and "match between runs" was enabled to transfer identifications across different LC-MS/MS replicates based on their masses and retention time within a match time window of 0.7 min and using an alignment time window of 20 min. MaxQuant reported summed intensity for each protein, referred to as LFQ values.

Statistical analysis was performed using the Perseus software platform (v1.6.10.45) (Tyanova et al., 2016). The LFQ intensities were uploaded from the ProteinGroups.txt file obtained by MaxQuant. Proteins marked as contaminant, reverse hits, and "only identified by site" were discarded. Quantifiable proteins were defined as those detected in 100% of samples in at least one condition. Protein intensities were base 2 logarithmized to obtain a normal distribution and reduce the effect of outliers. To overcome the obstacle of missing LFQ values in control samples, missing values were only imputed if missing in at least 3 or 4 control replicates. The imputation was accomplished by replacing the missing value by the lowest LFQ intensity of each replicate to simulate signals of low abundant proteins using default parameters. To determine whether a given detected protein was specifically differentially expressed, a two-sample t-test was done using permutation-based FDR-controlled at 0.01 and employing 250 permutations. The p-value was adjusted using a scaling factor s_0 with a value of 1. A protein was considered statistically significant if its fold change is >1.5 in the adrenal phenotype and >1 in the neuronal phenotype, with $FDR < 0.05$. All the identified differentially expressed proteins were used in protein network or pathway analyses. Each sample was compared to its controls and the differential analysis of these two values were displayed as volcano plots.

III.6. β -hexosaminidase assay

Secretion of RBL-2H3 cells was assessed by measuring the release of β -hexosaminidase. Cells were seeded (1×10^5 cells) in 24 well-plates overnight. Next, cells were washed using Tyrode's buffer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 5.6 mM Glucose, 20 mM HEPES, and 1 mg/mL BSA at pH 7.4). Then, cells were stimulated for 1 hour at 37°C as appropriate in Tyrode's buffer. The supernatant (100 μL) was mixed with 100 μL p-NAG (1 mM) in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5) in a 96-well plate and then incubated for 1 h at 37°C . The reaction was terminated by adding stop buffer (0.2 M, glycine pH 10.7). The total β -hexosaminidase activity was also measured using a whole cell lysate of the RBL-2H3 cells lysed with 0.1% Triton X-100. Absorbance at 405 nm was measured using a FLUOstar Omega microplate reader.

IV. RESULTS

IV.1. Rabphilin3A controls SNAP25 location through its C2B domain

Synaptotagmin1 has high structural homology with the C-terminal part of Rabphilin3A (Shirataki et al., 1993). Both have two C2 domains, and their C2B domains interact with SNAP25 (Ferrer-Orta et al., 2017; Zhou et al., 2015). Structural comparison of Rph3A-C2B and Syt1-C2B with SNAP25, reveals that both interact through different regions with the same area of SNAP25. Both sequence alignment and structural alignment of the two C2B domains, show that the key residues of Syt1-C2B that interact with SNAP25/STX1A are not conserved in the C2B domain of Rabphilin3A, nor vice versa. The C2B domain of Rabphilin3A has a much higher electropositive potential than the C2B domain of Synaptotagmin1.

Using the proximity ligation assay, we characterized whether there were interactions between overexpressed Rph3A-HA with endogenous SNAP25, and with those proteins that have been shown to interact with SNAP25 (VAMP2, STX1A, and Synaptotagmin1). This was done in an attempt to assess the neighbouring environment to SNAP25. Rabphilin3A appears to interact both in the cytoplasm and at the plasma membrane with SNAP25 and Synaptotagmin1. Nevertheless, VAMP2 interacts only in the cytoplasm and does not interact with STX1A in any case.

Rabphilin3A appears to interact with SNAP25 at vesicles both in the cytosol and at the plasma membrane. Rabphilin3A has been shown to interact with SNAP25 structurally, but no physiological function has been associated with it. We assessed whether Rabphilin3A could promote the location of the SNAP25 at the plasma membrane in an *in vivo* model. The results show the location of SNAP25 at the plasma membrane, under the influence of Rabphilin3A in cells, suggesting that Rabphilin3A is increasing and collaborating in the location of SNAP25 at the plasma membrane. This is done perhaps by assisting its palmitoylation by translocating and escorting it to the membrane, or else by

retaining it when Rabphilin3A is bound to the plasma membrane by PIP₂. The interaction region between the two proteins, which was determined by structural methods seems to be essential. In addition, the interaction site of Rabphilin3A with PIP₂ also appears to be of high importance. This finding is much more pronounced in a neuronal phenotype.

IV.2. Interactome of Rabphilin3A and Rabphilin3A surrounding proteins

In this chapter, new protein partners of Rabphilin3A that modulate its functions were elucidated. This was done in order to understand how Rabphilin3A promotes the SNAP25 location and to obtain a deeper understanding about the molecular function of Rabphilin3A. For that reason, it was decided to perform a PPI study using the BioID2 method (Kim et al., 2016). In a first approach, Rabphilin3A fused to BioID2 was used, stable lines were obtained that expressed the construct and it was verified that it induced selective biotinylation. Subsequently, mass spectrometry analysis showed that the proteins that interacted most significantly with Rabphilin3A were STIM1 and Tcp1111.

STIM1 is an endoplasmic reticulum protein that participates as a Ca²⁺ sensor and activates the ORAI1 calcium ion channel in the plasma membrane (Soboloff et al., 2012). Tcp1111 is a protein of unknown function, possibly related to microtubules. As the main goal was the comprehensive identification of the interactome surrounding Rabphilin3A and the proteins modulating its function, the same BioID2 approach was carried out with Tcp1111, STIM1, and SNAP25 in PC12 cells under an adrenal and neuronal phenotype. In the Rabphilin3A interactome under neuronal phenotype, Tcp1111 and STIM1 were again obtained as significantly enriched proteins together with Zwint, proteins that also appeared strongly biotinylated in the Rabphilin3A adrenal phenotype. These results support that the idea that these proteins are candidates for interaction with Rabphilin3A. In the SNAP25 interactome in the adrenal phenotype, several STX proteins appeared, with the STX7 being the one with highest value. The STIM1 interactome mainly contains actin regulatory proteins such as myotrophin (Mtpn).

The data obtained in this chapter on Tcp1111 indicate that the most likely function of this protein seems to be related to cytoskeleton regulation of endoplasmic reticulum, mitochondria, and vesicles, especially in neuronal function. In the adrenal phenotype, the most significantly enriched proteins are proteolipid 2 (Plp2) and myosin-11 (Myh11). In the neuronal phenotype, the most significantly biotinylated proteins are related to actin, in particular β -actin (Actb).

In summary, the function that these four proteins could be performing is divided into two areas. Tcp1111 and STIM1 regulate the cytoskeleton and organelle transport, respectively. SNAP25 executes vesicle fusion. Therefore, Rabphilin3A could be the potential link between them, a multifunctional protein that is orchestrating the regulation of membrane trafficking through the regulation of cytoskeleton proteins and organelle movement to transport different vesicles and proteins to the plasma membrane, such as SNAP25.

IV.3. PKC ϵ induces vesicle release and snap23 phosphorylation through its phosphatidic acid-sensitive C1B domain.

PKCs are one of the paramount protein families involved in mast cell signal transduction pathways (Tan & Parker, 2003). However, there is a lack of information on the PA signal transduction pathways in these cells and the molecular mechanisms that control signalling between the cell surface and the fusion machinery involved in exocytosis. We, therefore, sought to combine structural analyses performed using bioinformatics tools with living cells, to elucidate the signalling that triggers PKC ϵ activation by PA, and how this specific lipid signalling may control the degranulation process of RBL-2H3 mast cells.

The lack of a high-resolution structure of the C1-DAG complex in PKCs has prevented us from determining the structural causes of the different affinities of these isoenzymes for PA. Using bioinformatics tools, a 3D structure of the C1B domain of PKC ϵ was predicted and the surface electrostatic potential distribution was calculated and compared with that of the C1B domain of PKC δ . Surprisingly, the C1B ϵ domain exhibited a large predominant positive electrostatic potential

conferred by a set of K and R residues forming a basic rim on top of the domain. This electrostatic rim is partially conserved in the C1B δ domain, however, the presence of M239 in one of the edges of the DAG pocket drastically decreases the electropositive surface available to interact with membranes.

The data in this chapter show that PA-dependent activation of PKC ϵ increases secretion from RBL-2H3 cells, and this could be related to the phosphorylation of some components of the SNARE complex: SNAP23, STX4, and VAMP8. Cells that are expressing PKC ϵ -WT show PA-dependent phosphorylation of SNAP23, and this effect can be stabilizing and increasing the number of vesicles primed for exocytosis in the presence of Ca²⁺.

The most plausible hypothesis is that the specific lipid-protein interaction is responsible for localizing the kinase in the appropriate orientation on the membrane to activate and engage with the SNARE fusion machinery, directly controlling SNAP23 phosphorylation.

V. CONCLUSIONS

The following general conclusions can be drawn from the results presented in this report:

1. The C2B domain of Rabphilin3A does not have the SNAP25-interacting residues of Synaptotagmin1; this protein is specialized for interacting with SNAP25 through the α -helix of the C2B domain, which has a high electropositive potential.
2. Rabphilin3A interacts with the endogenous SNAP25, Synaptotagmin1, and VAMP2 proteins of vesicles located in the cytoplasm of PC12 cells detected by PLA, and only with SNAP25 and Synaptotagmin1 in the plasma membrane.
3. SNAP25 residues E38A/D41A/R45A are required for SNAP25 location at the plasma membrane of PC12 cells.

4. Rabphilin3A assists SNAP25 location to the plasma membrane via its α - helix and is dependent on interaction with PIP₂.
5. The effect of Rph3A-dependent promotion of SNAP25 location at the plasma membrane is much more pronounced in a neuronal phenotype.
6. The Rabphilin3A interactome in adrenal and neuronal phenotype determines that this protein interacts with STIM1, Tcp1111, Fmr1 and Zwint.
7. The Tcp1111 interactome determines that this protein is directly involved with the cytoskeleton through actin filaments and microtubules since it interacts with Actb, Tubb2a, Diaph1, Plp2, and Myh11.
8. PKC ϵ has a strongly electropositive rim around the DAG-binding site pocket of its C1B domain allowing it to bind phosphatidic acid.
9. The presence of overexpressed PKC ϵ in RBL-2H3 cells increases SNAP23 phosphorylation and vesicle release upon phosphatidic acid and Ca²⁺ stimulus.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I.1. Tráfico vesicular

La aparición de membranas fosfolipídicas en el interior celular fue un paso clave en el desarrollo de las células eucariotas. Durante la transición de procariota a eucariotas, hubo una etapa en la que aparecieron varios compartimentos subcelulares doblados y plegados, unidos a la membrana celular compuestos de fosfolípidos. Esto contribuyó a la organización del actual sistema de endomembranas de los eucariotas (Dacks & Field, 2018). Estas estructuras expanden directamente el área total de la membrana en la célula, proporcionando un andamiaje para proteínas y lípidos. Al mismo tiempo, divide

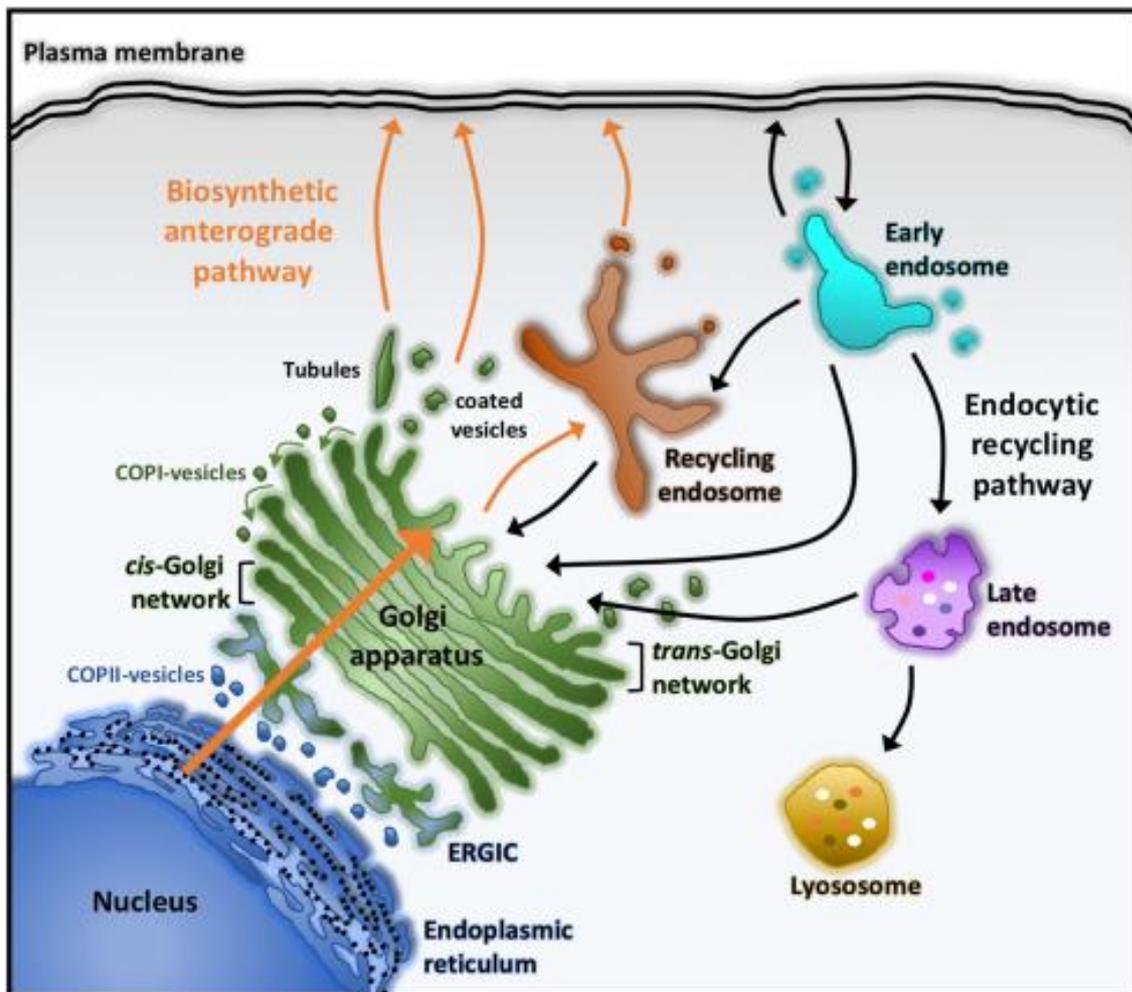


Figura. I.1. Principales rutas del tráfico de membranas en células eucariotas. Esquema mostrando en flechas naranjas las rutas de la vía biosintética, y en flechas negras las rutas de la vía endocítica. La ruta biosintética comienza en el retículo endoplasmático (RE) donde nuevas vesículas se forman cubiertas de la envoltura COPI, posteriormente se dirigen hacia al aparato de Golgi, el cual las clasifica de manera selectiva hacia su lugar de destino, que puede ser la membrana plasmática, los endosomas y los lisosomas. Este sistema está altamente optimizado donde existe un gran reciclaje de las proteínas utilizadas en cada paso y converge con la ruta endocítica que sigue un destino similar dependiendo de las necesidades. Imagen tomada de J. Z. A. Tan & Gleeson, 2019.

a la célula en distintos compartimentos y regiones funcionales, asegurando un ambiente adecuado para determinadas reacciones bioquímicas y procesos celulares (Klumperman & Pucadyil, 2021).

El transporte de ciertas moléculas se encuentra vehiculizado y dirigido gracias a un sistema de transporte vesicular dinámico. Esto permite tomar macromoléculas del exterior, gracias a la llamada ruta endocítica (Figura. I.1), donde las cargas recogidas del exterior son dirigidas al sistema de membranas llamado endosomas (endosoma temprano, endosoma tardío y endosoma de reciclaje), que se encarga de clasificar las cargas hacia distintos orgánulos como los lisosomas, el aparato de Golgi o el retículo endoplasmático (RE), para su procesamiento (Hughson & Reinisch, 2010). Opuestamente, la ruta biosintética secretora (Figura. I.1) le permite a la célula crear o modificar distintas moléculas en compartimentos estancos, empaquetarlas o almacenarlas y posteriormente secretarlas al espacio extracelular gracias a un proceso llamado exocitosis (Tan & Gleeson, 2019). El mecanismo molecular que regula este transporte vesicular es muy complejo, y participan distintos orgánulos controlados por numerosas proteínas y lípidos, que modulan la gemación, transporte, anclaje, fusión de estas vesículas (Figura. I.1) (Cai et al., 2007).

El estudio del tráfico vesicular es actualmente un área de conocimiento muy amplia que incluye muchos procesos y rutas bioquímicas, así como su desregulación está implicada en numerosas patologías. El estudio en esta área ha sido galardonado en varias ocasiones con el Premio Nobel de Medicina o Fisiología a los siguientes investigadores: a Albert Claude, George Palade y Christian DeDuve en 1974 “por sus descubrimientos sobre la organización estructural y funcional de la célula” (Ehrenreich et al., 1973), a Michael Brown y Joseph Goldstein en 1985 “por sus descubrimientos sobre la regulación del metabolismo del colesterol” (Goldstein & Brown, 2015); a Gunter Blobel en 1999 “por su descubrimiento de que las proteínas tienen señales intrínsecas que gobiernan su transporte y localización en la célula” (Birmingham, 1999), y recientemente a James Rothman, Randy Schekman, y Thomas Südhof en 2013

“por sus descubrimientos de la maquinaria de regulación del transporte de vesículas, el importante sistema de transporte de nuestras células” (Südhof & Rothman, 2009). Gracias al estudio de estas personas, y a la comunidad científica de todo el mundo que trabaja de manera coordinada, en la actualidad conocemos las principales rutas y la maquinaria básica molecular de transporte para transferir contenido entre los distintos orgánulos membranosos de las células. Este fenómeno implica el reconocimiento selectivo de proteínas y lípidos ante señales que producen la formación de vesículas por fisión de la membrana donadora, a continuación, se produce su transporte y entrega dirigida, hasta que finalmente se fusiona con su membrana de destino. A pesar de que se conocen las vías principales de transporte reguladas por numerosas proteínas y lípidos, por ejemplo, proteínas de envoltura de vesículas como COPI, COPII y clatrina (Lee & Goldberg, 2010), proteínas motoras como quinesinas y dineínas que transportan las vesículas a lo largo de los microtúbulos (Hirokawa et al., 2009; Reck-Peterson et al., 2018), proteínas que permiten la fusión de vesículas como las SNAREs (Südhof & Rothman, 2009), otros componentes reguladores como las proteínas Rab GTPasas (Homma et al., 2021), los complejos ESCRT (Jimenez et al., 2014), incluso lípidos específicos como los fosfoinosítidos (Hammond & Burke, 2020), todavía hay numerosas moléculas reguladoras que no se conoce bien su función o incluso permanecen desconocidas o bajo debate. Por tanto, deben ser abordadas para esclarecer las causas moleculares de los fenómenos que desencadenan, y también para comprender las causas de distintas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson entre otras donde está implicado el transporte vesicular (Bourke et al., 2018).

I.1.1. Movilidad vesicular

Las vesículas deben ser transportadas de un orgánulo a otro, la direccionalidad y eficacia de la entrega de la vesícula hasta su membrana de destino es en parte mediada por el citoesqueleto, en concreto por los filamentos de actina y los microtúbulos, los cuales facilitan el transporte local y lejano, respectivamente (Pollard & Goldman, 2018). Sin embargo, los verdaderos impulsores que producen el desplazamiento son las llamadas proteínas motoras.

Las células eucariotas presentan varias proteínas motoras, que permiten el transporte de orgánulos, macromoléculas y sus propios movimientos, mediante el uso de energía a través de la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP). Estas proteínas, se mueven literalmente a través de los filamentos de actina o los microtúbulos, que actúan como si fueran pistas de desplazamiento (Sweeney & Holzbaur, 2018). Existen tres tipos de superfamilias de proteínas motoras: las miosinas que interaccionan con actina (Houdusse & Titus, 2021), y las quinesinas y dineínas que interaccionan y se mueven a lo largo de la tubulina de los microtúbulos (Konjikusic et al., 2021).

Las quinesinas están implicadas en la mitosis, meiosis y otros tipos de transporte celular como el transporte hacia la terminal de los axones. Se desplazan hacia el extremo positivo de los microtúbulos por lo que es conocido que las quinesinas intervienen en el transporte anterógrado (Nabb et al., 2020). Por el contrario, las dineínas se mueven hacia el extremo negativo de los microtúbulos y median el transporte retrógrado, generalmente hacia el núcleo (Vale & Milligan, 2000).

Estas proteínas actúan como motores de transporte, pero la regulación es llevada a cabo principalmente por las Rab GTPasas y sus proteínas efectoras junto a otras proteínas adaptadoras, que son las encargadas de dirigir a los orgánulos y vesículas hacia su destino (Figura. 1.2) (Horgan & McCaffrey, 2011).

1.1.1.1. Miosina Va en el transporte de vesículas secretoras

La miosina V está implicada en el transporte de vesículas y orgánulos y se desplaza por los filamentos de actina (N. Zhang et al., 2018). Un ejemplo bien estudiado implica a Rab27a. Es una Rab que se encuentra en melanosomas, y que recluta a una de sus proteínas adaptadoras, melanofilina, conectando los melanosomas a miosina Va. Miosina Va a través de los filamentos de actina transporta las vesículas hacia la periferia celular, siendo esencial para el correcto funcionamiento de los melanocitos (Wu et al., 2002). Posteriormente, un segundo efector de Rab27a, la proteína similar a Sinaptotagmina 2 (Sytl2),

interacciona con ella para mediar la correcta distribución periférica de los melanosomas (Kuroda & Fukuda, 2004).

Otra isoforma de Miosina Va llamada *brain-spliced isoform of Myosin Va* (BR-MyoVa) juega un papel importante en el transporte de vesículas secretoras *dense-core*, junto a Rab27a y sus proteínas efectoras. Rab27a interacciona con su proteína efectora granofilina, que junto a BR-MyoVA transportan vesículas

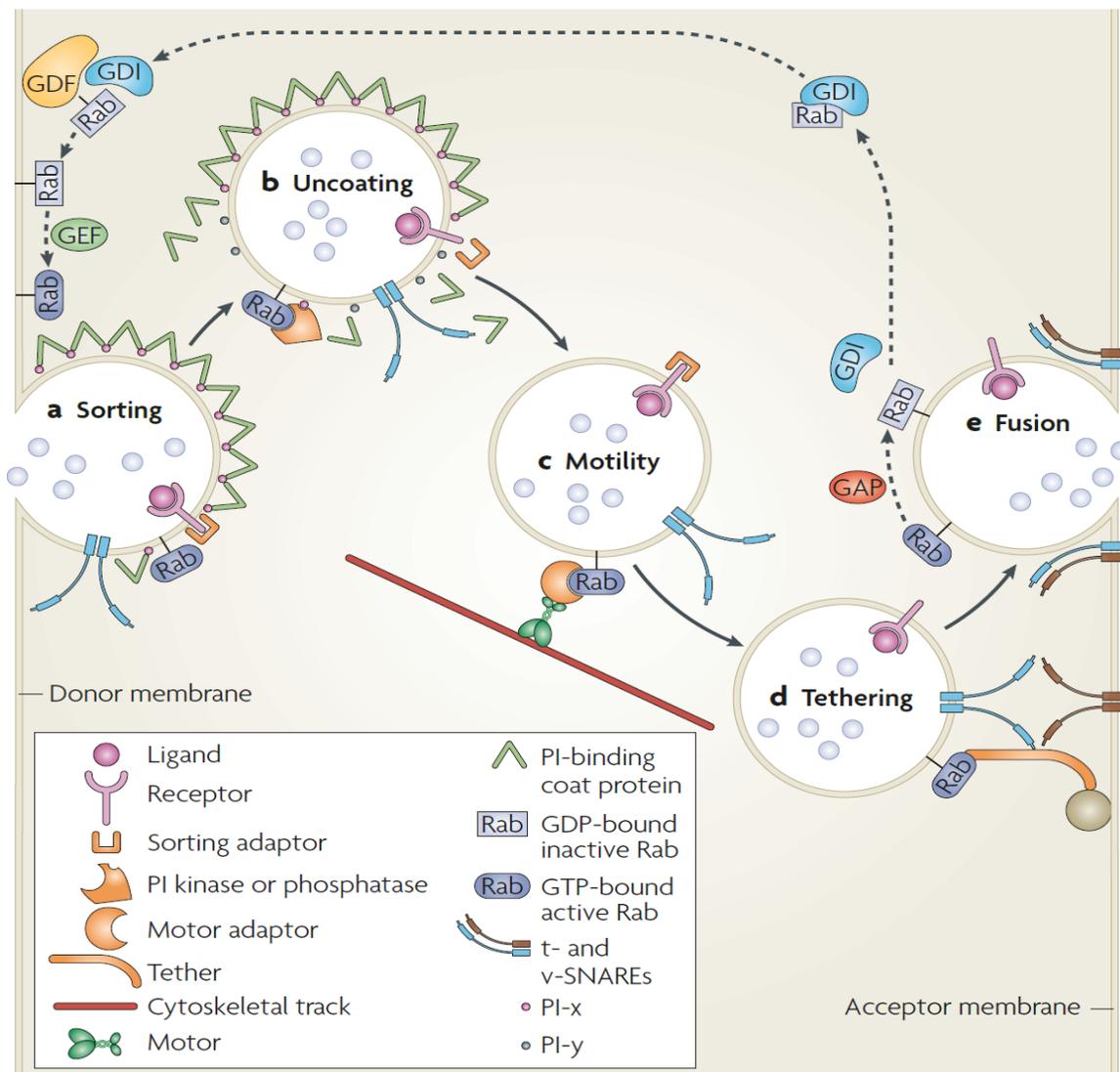


Figura. 1.2. Rutas de transporte de vesículas mediadas por Rab GTPasas. Los distintos pasos del tráfico vesicular son contralados por las RabGTPasas y sus efectoras (indicados en color naranja). **A)** Gemación de la membrana donadora y formación de la vesícula gracias a las proteínas de recubrimiento como la clatrina. **B)** Eliminación de las proteínas de recubrimiento y modificación de las proteínas reguladoras por quinasas y fosfatasas. **C)** Transporte de la vesícula a través de los microtúbulos y los filamentos de actina por regulación de las Rab GTPasas y proteínas reguladoras. **D)** Anclaje de la vesícula en la membrana aceptora a través de las proteínas SNARE y otras proteínas reguladoras. **E)** Fusión de la vesícula con la membrana y reciclaje de las proteínas, la Rab GTPasa se inactiva hidrolizando el GTP y es reclutada por el GDI para comenzar un nuevo ciclo. Imagen tomada de Stenmark, 2009

cargadas de neuropéptidos y hormonas desde la región perinuclear hasta la membrana. Esta función es compartida con otra de las proteínas efectoras de Rab27a, Rabfilina3A que potencia la secreción hacia la membrana plasmática de células productoras de neuropéptidos y hormonas (Brozzi, Diraison, et al., 2012).

I.1.1.2. Quinesinas y dineínas en el transporte a larga distancia

Los microtúbulos actúan como autopistas en el transporte de vesículas, a diferencia de la actina que son como carreteras secundarias que llevan la carga hacia el destino final. Los microtúbulos están organizados por el centrosoma, desde donde la tubulina comienza a polimerizar en dirección positiva (Akhmanova & Steinmetz, 2015). Las proteínas motoras que viajan en dirección positiva son las quinesinas, y las que viajan hacia el extremo negativo son las dineínas. Ambas proteínas también son reguladas por las Rab GTPasas, junto a otras proteínas que dirigen las cargas en vesículas hacia su destino (Horgan & McCaffrey, 2011). Por ejemplo en las neuronas, las vesículas cargadas de neurotransmisores y proteínas tienen que transportarse desde el soma hacia la terminal sináptica, y en numerosas ocasiones son distancias considerables (Kapitein & Hoogenraad, 2015).

Un caso estudiado es el transporte de vesículas con precursores sinápticos, donde las vesículas que presentan GTP-Rab3 interactúan con la proteína efectora DENN/MADD, y está a su vez interactúa con los dominios tallo de KIF1B y KIF1A, para transportar estas vesículas hacia la terminal sináptica (Niwa et al., 2008). Otro proceso estudiado es el transporte de los receptores de neurotrofinas llamados Trk, que son transportados a través del axón hasta llegar a la membrana plasmática axonal en vesículas que presentan Rab27a y Rab27b. La quinesina 5 y la subunidad de quinesina 1 interactúan con la proteína similar a sinaptotagmina 1 (Slp1) que es efectora de Rab27b y de esta manera regula el transporte de estas proteínas hasta la terminal sináptica (Arimura et al., 2009).

Un ejemplo en el que están implicadas las dineínas, es en el proceso de clasificación para efectuar el reciclaje en el endosoma. Rab11A controla este proceso al unirse a dineína 1 citoplasmática a través del efector de Rab11 llamado FIP3 (Horgan et al., 2010). Otra conexión entre las dineínas y el endosoma tiene lugar a través de huntingtina (HTT) y Rab5 (Gillingham et al., 2014). Rab5 es un marcador del endosoma temprano, y se une a HTT, a su vez HTT se une a dineína (Caviston et al., 2011), y la proteína asociada a huntingtina 1 (HAP1) se une a dinactina (Engelender et al., 1997), de esta forma la carga es transportada en dirección retrógrada gracias a HTT y HAP1.

I.1.2. Regulación del transporte vesicular por Rab GTPasas

La familia de las proteínas Rab GTPasas constituye la mayor subfamilia de las pequeñas proteínas G Ras GTPasas. Esta familia se divide en cinco subfamilias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran. La subfamilia Rab está implicada en la formación, control y transporte de vesículas, y existen más de 60 isoenzimas de Rab que se encuentran en distintos compartimentos celulares (Pfeffer, 2017). Estructuralmente, presenta un plegamiento GTPasa que consiste en una hoja β de 6 cadenas β flanqueada por 6 hélices α (Schwartz et al., 2007). Las Rab GTPasas funcionan como interruptores moleculares que alternan entre dos estados conformacionales (Goody et al., 2005).

I.1.2.1. Mecanismo molecular de activación de Rab GTPasas

Las proteínas Rab GTPasas experimentan un ciclo donde alternan entre un estado activo unido a guanosín trifosfato (GTP) , y uno inactivo unido a guanosín difosfato (GDP). De esta forma oscilan entre distintas localizaciones subcelulares para llevar a cabo su función (Sasaki et al., 1990; Veleri et al., 2018). Además, cuando se encuentran en su estado activo interaccionan con efectores específicos para facilitar el transporte vesicular desde la fisión hasta la fusión. Su función está regulada por la asociación-disociación a membranas y por su ciclo activo-inactivo (de Renzis et al., 2002).

Inicialmente, se encuentran en el citosol, y comienzan su ciclo de trabajo (Figura. I.3) al producirse una prenilación o lipidación por la Rab geranylgeraniltransferasa (GGT) que junto con chaperonas específicas transfieren y anclan grupos geranylgeranilo a uno o dos residuos de cisteínas localizados en el extremo C-terminal de la GTPasa (Shen & Seabra, 1996). El incremento de la hidrofobicidad debido a la prenilación provoca que la proteína tenga que ser anclada a una membrana, determinada por factores accesorios como la Rab escort protein (REP) (Alexandrov et al., 1994). Una vez anclada en la membrana, la proteína Rab se activa mediante el intercambio de GDP por GTP, activado por el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) (Eathiraj et al., 2005). Cuando presenta unido GTP, las Rab GTPasas se encuentran en su conformación activa, las cuales pueden interactuar con sus proteínas efectoras que pueden ser varias, y llevar a cabo su función (Vitale et al., 1998). Una vez que ha completado un ciclo de transporte, estas proteínas tienen actividad GTPasa intrínseca, aunque

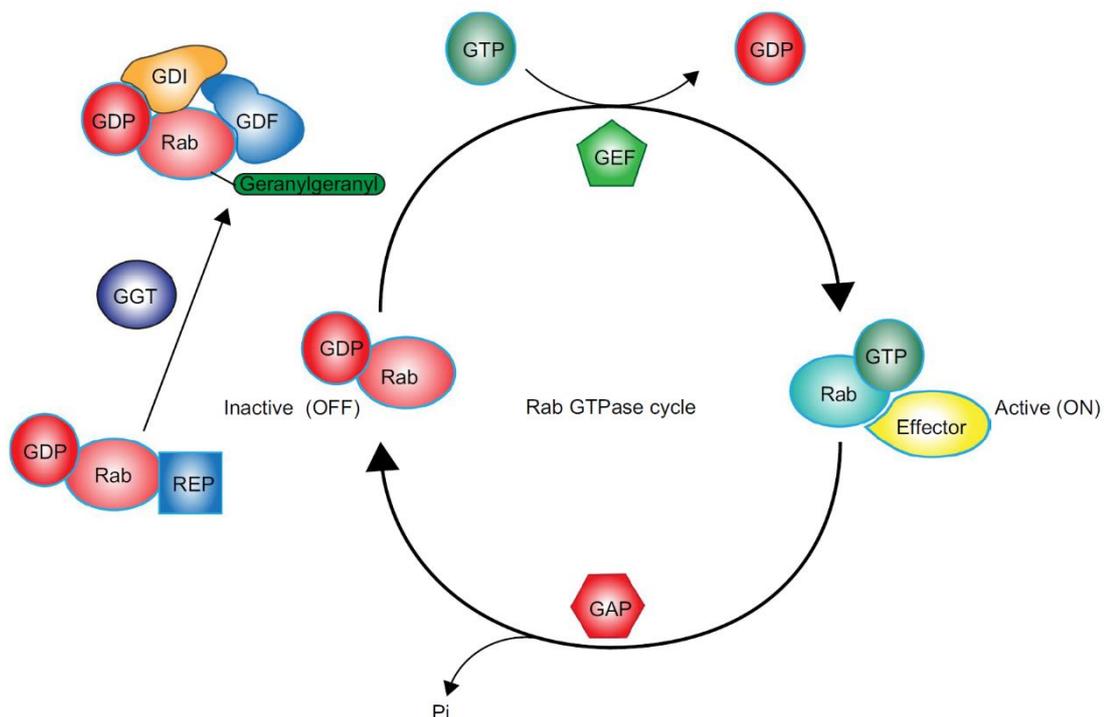


Figura. I.3. Ciclo de trabajo de las Rabs GTPasas. La proteína Rab recién sintetizada unida a GDP, es reconocida por la proteína Rab escort (REP), esta proteína acerca a Rab a una geranylgeranil transferasa (GGT), que geranylgeranila a Rab en una o dos cisteínas. La proteína geranylgeranilada unida a GDP es reconocida por el inhibidor de la disociación de GDP (GDI), el cual regula el ciclo de unión a membranas de Rab. La unión de la Rab a la membrana está mediada por la interacción de un factor de desplazamiento a la membrana (GDF). Una vez en la membrana, el intercambio de GDP por GTP es catalizado por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF). El GTP provoca un cambio conformacional en la proteína Rab que permite ser reconocida por múltiples proteínas efectoras. Posteriormente la proteína vuelve a su estado inactivo hidrolizando el GTP estimulada por la proteína activadora de GTPasas (GAP), que hidroliza el GTP y libera un fosfato inorgánico. Imagen tomada de Veleri et al., 2018.

unas proteínas llamadas activadoras de la GTPasa (GAP), aceleran la hidrólisis del GTP (Barr & Lambright, 2010) y finalmente es reconocida de nuevo por el inhibidor de la disociación de GDP (GDI), cuya función es secuestrar la proteína Rab en el citosol hasta que es reclutada a la membrana para empezar otro ciclo de transporte (Figura. I.3). La proteína GDI actúa como chaperona de las Rab GTPasa geranilgeranilada manteniendo a la proteína en el citosol, permitiendo

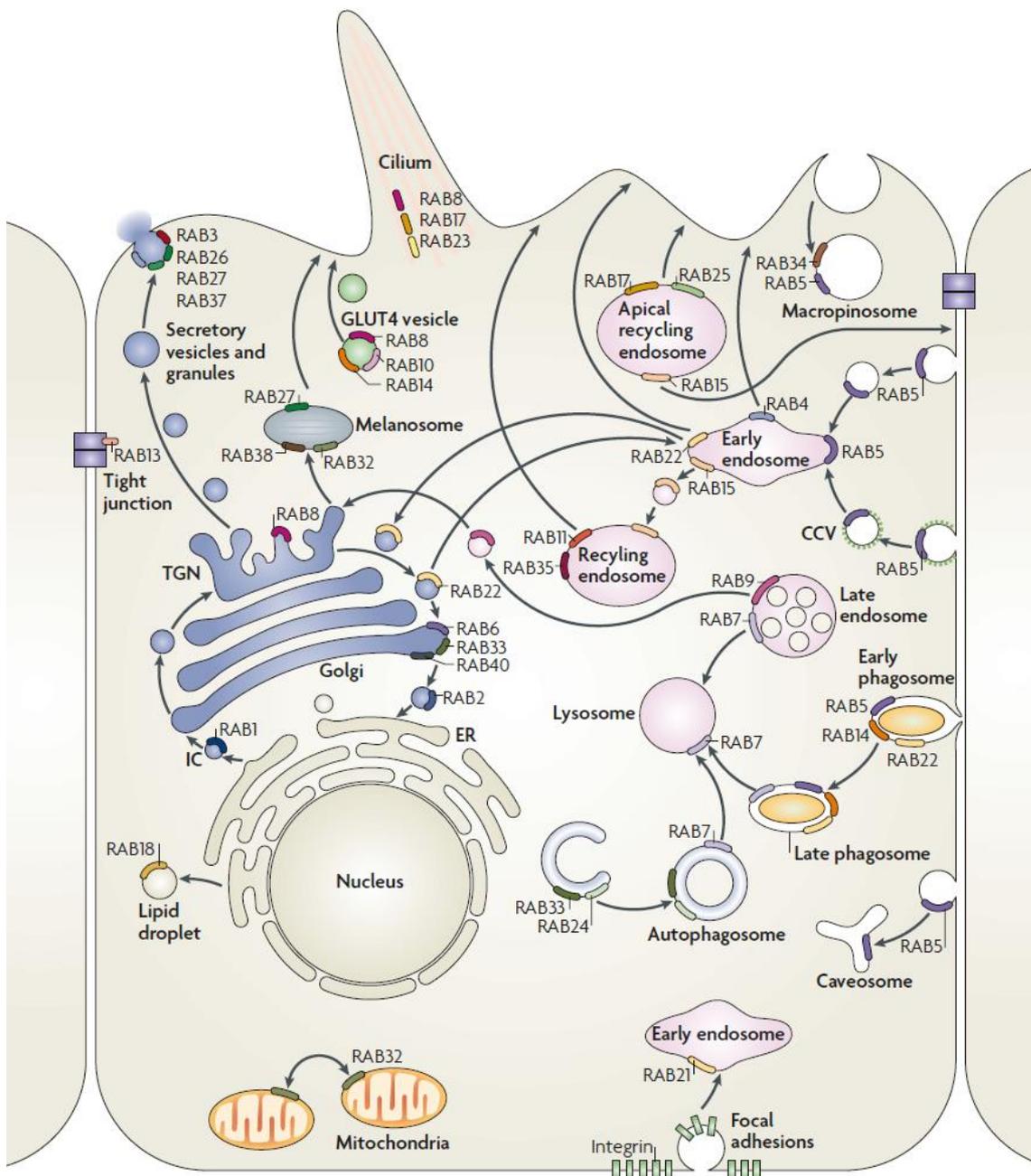


Figura. I.4. Localización de las Rab GTPasas en la célula. Imagen tomada de Stenmark, 2009.

su reciclaje para un nuevo ciclo hasta que es reconocida por el factor de desplazamiento de GDI (GDF) (Matsui et al., 1990).

I.1.2.2. Especificidad de membranas de las Rab GTPasas

Una característica destacada de la familia de Rab GTPasas es la localización intracelular específica de sus distintos miembros (Hutagalung & Novick, 2011). La causa de la especificidad de cada Rab por un tipo de membrana u otro aún no se comprende completamente (Figura. I.4). No obstante, hay cierta evidencia de que el factor de desplazamiento GDF unido junto a GDI y Rab-GDP, juegan un papel clave en la especificidad de ciertas membranas para promover la liberación de GDI, facilitando así la asociación de la Rab GTPasa geranilgeranilada con la membrana correspondiente (Sivars et al., 2003). En la Figura. I.4 observamos la localización de la gran mayoría de Rab GTPasas (Stenmark, 2009). Rab1 y Rab2, se encuentran en el RE y el compartimento intermedio del pre-Golgi, mediando el tráfico entre el RE y el Golgi (Plutner et al., 1991). En el aparato de Golgi se encuentran Rab6, Rab33 y Rab40 (Liu & Storrie, 2015). Rab8 media la ruta biosintética desde la red trans-Golgi (TGN) hasta la membrana plasmática, que junto a Rab17 y Rab23 regulan la cilioagénesis (Lim et al., 2011). Rab8 junto a Rab10 y Rab14 regulan la translocación de vesículas con GLUT4 (Dugani & Klip, 2005). Las implicadas en la regulación y liberación de los gránulos y vesículas secretoras son la Rab3, Rab26, Rab27 y Rab37 que median distintos tipos de eventos de exocitosis (Fukuda, 2008). Además, Rab27 también regula la traslocación de melanosomas hasta la periferia celular (Izumi et al., 2003). Rab32 y Rab38 están implicados en la biogénesis de melanosomas, y Rab32 controla la fisión de las mitocondrias (Bultema & Di Pietro, 2013). Rab18 controla la formación de los lípidos (Dejgaard & Presley, 2019). Rab22 media el tráfico entre la TGN y el endosoma temprano, y viceversa (Wang et al., 2011). Rab5 participan en la endocitosis y la fusión del endosoma con las vesículas cubiertas de clatrina (Saitoh et al., 2017). Rab21 media la endocitosis de integrina (Pellinen et al., 2008). Rab11 y Rab35 intervienen en la división celular y el cáncer (Gibieža & Petrikaitė, 2021), mientras que Rab4 media el reciclaje rápido de endocitosis (Fréchette et al., 2020). Rab15

está implicada en el transporte desde el endosoma temprano hasta el endosoma de reciclaje, y desde el reciclaje apical hasta la membrana plasmática basolateral (Strick & Elferink, 2005). Rab17 y Rab25 controla el transporte a través del endosoma de reciclaje apical a la membrana plasmática (Yin et al., 2019). Rab7 está asociado al endosoma tardío e intercede en la maduración del endosoma tardío, los fagosomas, y la fusión con los lisosomas (Guerra & Bucci, 2016). Rab9 regula el transporte desde el endosoma tardío hasta la TGN (Chia et al., 2011).

La regulación de la activación e inactivación está sujeta a señalización dependiendo de las necesidades del tráfico celular. Las proteínas reguladoras (GEFs, GAPs, GDIs) son fosforiladas en respuesta a estrés, factores de crecimiento y otras señales, potenciando o inactivando la actividad de las Rabs (Bailly et al., 1991; Karniguan et al., 1993). Sin embargo, las proteínas efectoras junto a las Rab GTPasas son las que desencadenan su funcionalidad. En la presente tesis doctoral se estudiará la proteína Rabfilina3A efectora de dos Rab GTPasas Rab3 y Rab27 (Fukuda et al., 2004; Shirataki et al., 1993). En la Tabla I.1 se resumen las proteínas efectoras de las distintas Rab GTPasas conocidas hasta el momento.

Tabla I.1. Proteínas efectoras de las distintas isoenzimas de la familia de las RabGTPasas. Tabla modificada y actualizada de Hutagalung & Novick, 2011.

Rab	Proteínas Efectoras
Rab1A, B	Golgin-84, Golgin-95, p115, GM130, Giantin, Cog6
Rab2A, B	Golgin-45, ICA69, PKC λ /I, INPP5B
Rab3A, B, C, D	Rabphilin3A, Rabin3, RIM1/2, Granuphilin, Noc2, synapsin, DENN/MADD, SNAP29, Zwint(Rab3c), Gas8(Rab3b)
Rab4A, B, C,	Rabip4, RCP, Rabenosyn-5, Rabaptin-5, Syntaxin4
Rab5A, B, C,	Rabaptin-5, Rabenosyn-5, EEA1, p150/Vps15, Rabankyrin-5, APPL1/2, type II inositol 5-phosphatase, type Ia PtdIns(3,4)P2 4-phosphatase, p110 β , HAP40
Rab6A, B, C,	Giantin, Rabankyrin-6, Rab6IP1, GCC185, Bicaudal D1, TMF/ARA160, Mint3, Vps52
Rab7A, B, C,	RILP, Vps26/29/35 trimer (retromer subcomplex), Vps34, p150/Vps15, rabring7
Rab8A, B, C,	Optineurin, FIP-2, Myosin Vb (only Rab8a), JRAB, otoferlin
Rab9A, B, C,	TIP47, p40, GCC185
Rab10	Rim1
Rab11A, B	Nuf, FIP-2, FIP-3, FIP-4, FIP-5, Sec15, RCP, Myosin Vb, Protrudin

Rab12	TGN-PM trafficking
Rab13	JRAB
Rab14	FIP2, RCP, Rip11, d-AKAP2
Rab15	REP15
Rab16	
Rab17	
Rab18	
Rab19A, B	dGolgin97
Rab20	INPP5E
Rab21	
Rab22	EEA1, Rabex-5
Rab23	
Rab24	Cyclophilin A, GABARAP
Rab25	Myosin Vb, Integrin $\alpha 5\beta 1$
Rab26	Rim1
Rab27A, B	Rabphilin3A, melanophilin, Noc2, Slp1, Slp2, Slp3, Slp4/ granuphilin, Slp5, Munc13-4, Golga4
Rab28	
Rab29	
Rab30	Golgin-97, GCC88, GM130 (in <i>Drosophila</i>)
Rab31	
Rab32	Regulatory subunit type II of PKA
Rab33A, B	Atg16L, GM130, Rabaptin-5
Rab34	RILP, Hmunc13
Rab35	
Rab36	
Rab37	Rim1
Rab38	Varp
Rab39	GCC88 (in <i>Drosophila</i>)
Rab40A,B,C	ElonginB/C, Cullin5 (in <i>Xenopus</i>), RILP-L1
Rab41	Cog6, Golga4/p230, d-AKAP2
Rab42	
Rab43	
Rab44	
Rab45	Dynein/Dynactin

I.1.3. Proteínas SNARE en la fusión de vesículas

Las proteínas SNARE, del acrónimo en inglés **Soluble NSF Attachment Protein REceptor**, constituyen la maquinaria molecular básica para producir la fusión de membranas celulares. Es decir, una vez que la vesícula ha llegado a su membrana de destino, se ancla a ella y posteriormente se tiene que producir la fusión de las dos membranas y la liberación del contenido (Zorec, 2018). Este

proceso no es energéticamente favorable debido a la naturaleza de las bicapas lipídicas que se repelen de forma innata debido a las fuerzas electrostáticas. Sin embargo, la unión y ensamblaje de las proteínas SNARE localizadas en las distintas membranas, es un evento energéticamente favorable para acercar suficientemente las membranas opuestas y de esta forma producir una disrupción de las membranas, y provocar la apertura del poro de fusión (Y. A. Chen & R. H. Scheller, 2001). Las SNARE más investigadas son el triplete formado por Sintaxina1A (STX1A), SNAP25 y VAMP2, que median la fusión de vesículas sinápticas con la membrana presináptica para liberar los neurotransmisores en la sinapsis neuronal, al formar un *coiled-coil* de 4 α -hélices (Sauvola & Littleton, 2021).

La familia de proteínas SNARE se encuentra distribuida por todos los eucariotas, y presenta más de 60 isoenzimas en las células de mamíferos. Su función principal es mediar la fusión de vesículas, y se dividen en dos categorías dependiendo de la membrana en la que se encuentren: v-SNAREs, serían las que se encuentran en las vesículas de transporte que se forman, y las t-SNAREs, t del inglés *target*, son las que están en la membrana receptora (Yoon & Munson, 2018). Cuando estas proteínas se encuentran desde distintas membranas, forman el llamado “complejo SNARE”, por ejemplo, VAMP2 es una v-SNARE, en cambio Sintaxina1A y SNAP25 son t-SNAREs (Figura. I.5).

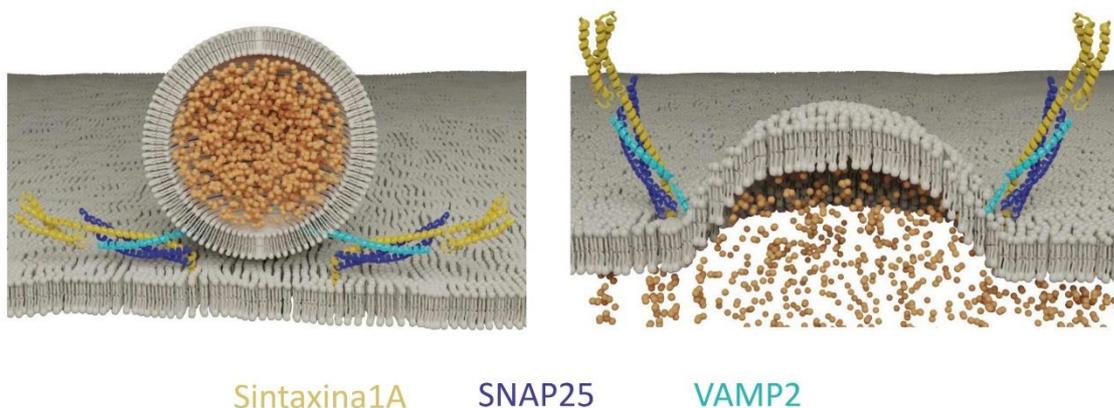


Figura. I.5. El ensamblaje de proteínas SNARE entre membranas opuestas provoca la fusión de membranas. Una hélice de la proteína v-SNARE se ensambla con tres hélices t-SNARE (una de STX1A y dos de SNAP25) para formar un paquete de cuatro hélices y formar el complejo trans-SNARE, y acercar las membranas. Posteriormente, el complejo SNARE queda por completo en la membrana plasmática y se pasa a llamarse cis-SNARE. Imagen tomada de Sauvola & Littleton, 2021

Otro tipo de clasificación más reciente tiene en cuenta características estructurales, debido a que algunas SNARE se han visto localizadas tanto en vesículas como en membranas receptoras, dividiendo la familia en R-SNAREs y Q-SNAREs. Normalmente, las R-SNAREs son v-SNAREs y las Q-SNAREs son t-SNAREs. Su nombre viene de que las R-SNAREs aportan un residuo de arginina (R) en la formación de la capa cero del complejo SNARE. Las Q-SNAREs aportan a esta capa cero un aminoácido de glutamina (Q), suelen ser tres Qa, Qb, Qc. La mayoría de los complejos SNARE están compuestos de

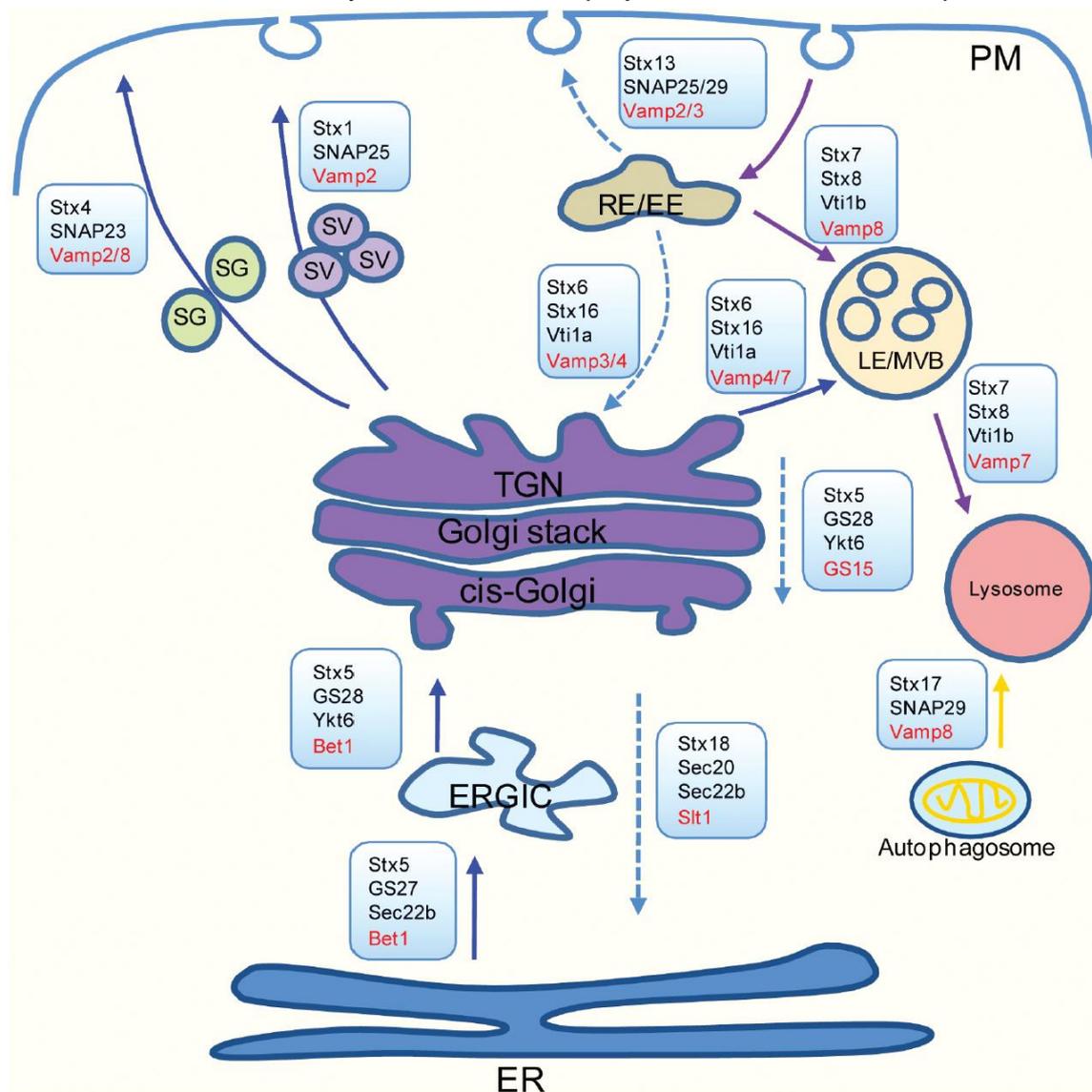


Figura. 1.6. Resumen de los complejos SNAREs conocidos. Localización de las proteínas SNAREs y el compartimento en el que están implicados, marcadas en rojo las proteínas v-SNARE, y en negro las t-SNARE. Imagen tomada de T. Wang, Li, & Hong, 2017.

cuatro proteínas, sin embargo, en otros como el complejo SNARE neuronal está compuesto por tres proteínas, pero siempre el complejo lo forman 4 α -hélices donde a la capa cero dos Q son aportadas por SNAP25, otra aportada por Sintaxina1A, y la R es aportada por VAMP2 (Fukuda et al., 2000; Sutton et al., 1998). Sin embargo, el SNARE endosomal está formado por 4 proteínas, tres Q-SNAREs, Vti1b, Sintaxina 8 y Sintaxina 7, y una R-SNARE que es VAMP8 (Antonin et al., 2002). Estas proteínas a pesar de ser el motor molecular que produce la fusión de las membranas, están finamente reguladas por otras proteínas reguladoras y adaptadoras que dirigen el momento en el que se tiene que producir la fusión (Koike & Jahn, 2022; Sauvola & Littleton, 2021).

Las distintas isoenzimas SNARE se encuentran distribuidas específicamente en determinados compartimentos subcelulares, y forman complejos específicos entre ellas, aunque algunas pueden combinarse con distintas SNAREs (Wang et al., 2017) (Figura. I.6).

I.1.3.1. Estructura de las proteínas SNAREs

La familia SNARE está caracterizada por ser proteínas pequeñas de unos 20-30 kDa con una o dos secuencias características de aproximadamente 70 aminoácidos que forman una o dos α -hélices conocidas como motivo SNARE compuestas de repeticiones de siete aminoácidos. Están ancladas a las membranas a través de dominios C-terminal, aunque otras se encuentran unidas a través de palmitoilaciones como es el caso de SNA25 y SNAP23. Los motivos SNARE de diferentes proteínas presentan la capacidad de formar estructuras *coiled-coil* de paquetes de 4 α -hélices muy estables, gracias a la repetición de siete aminoácidos, donde los residuos a y d son hidrofóbicos (Burkhard et al., 2001; Jahn & Scheller, 2006).

En su estado nativo, las proteínas SNARE son filamentos desordenados que se proyectan desde sus membranas hacia el citosol, y cada una muestra unión selectiva a un conjunto de SNAREs (Figura. I.6). SNAP25, VAMP2 y Sintaxina1A forman el complejo que interviene en las vesículas sinápticas, y

según estudios estructurales, se ensamblan las tres proteínas en un *coiled-coil* de 4 α -hélices paralelas llamado complejo trans-SNARE, que acerca y fusiona las membranas opuestas. SNAP25 aporta dos α -hélices, y VAMP2 y Syntaxin1A, aporta una cada una (Figura. I.7). Los modelos indican, que en un primer lugar se reconocerían y formarían un complejo trans-SNARE parcial comenzando desde el extremo N-terminal, donde quedaría paralizado por proteínas chaperonas como complexina, Munc13, Munc18 entre otras, para que la fusión se produzca en el momento preciso al llegar la señal de Ca^{2+} . Al llegar el Ca^{2+} se completa la formación del complejo trans-SNARE hacia el extremo C-terminal transmembrana como si fuera una cremallera que se cierra, y de este modo acercar las dos membranas y abrir un poro de fusión al desestabilizar dichas membranas (Lou & Shin, 2016; Rizo, 2018).

Cuando este ensamblado se observa desde un lado, los residuos hidrofóbicos de las posiciones “a” y “d” de cada repetición de siete aminoácidos de cada hélice, se orientan hacia el interior, permitiendo formar un motivo *coiled-coil*. De este modo, se forman 15 capas internas que se designan como “*layer*” o nivel (Figura. I.7). Las capas se designan de -7 a +8, desde el extremo N al C

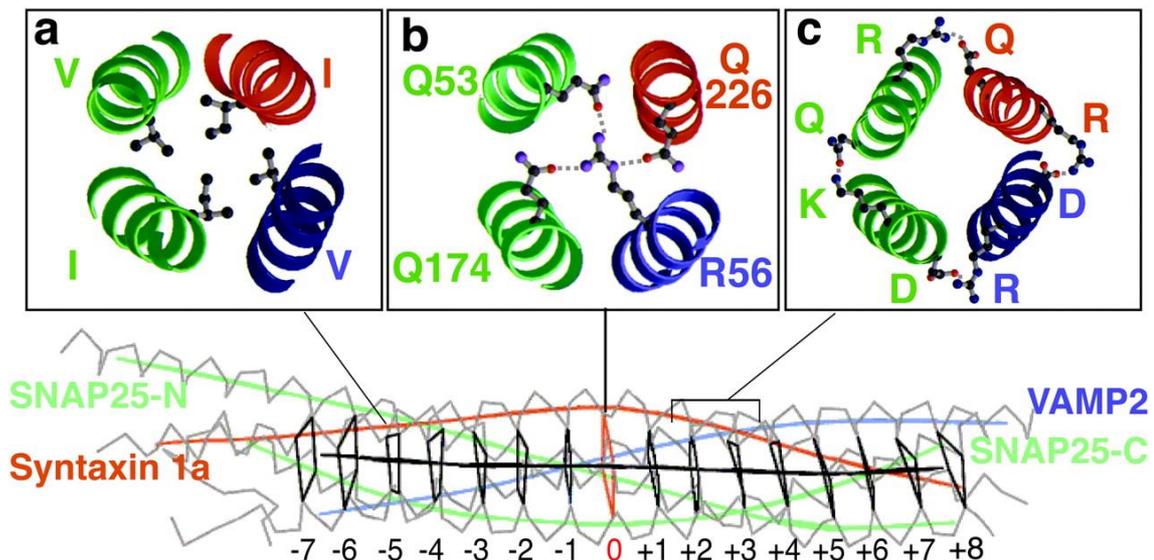


Figura. I.7. Estructura del complejo neuronal SNARE de cuatro α -hélices. En rojo STX1A, en verde SNAP25 y en azul VAMP2. Abajo, los polígonos negros indican las capas hidrofóbicas, la capa iónica 0 está marcada en naranja. **A)** sección de la capa hidrofóbica -5. **B)** Capa iónica 0, las líneas de puntos indican los tres enlaces de hidrógenos formados entre estos residuos. **C)** Ejemplo de interacciones electrostáticas superficiales entre distintas hélices. Imagen tomada de Scales, Yoo, & Scheller, 2001.

terminal, y están estabilizadas por interacciones hidrofóbicas de las cadenas laterales de aminoácidos formando un interior hidrofóbico. Sin embargo, la capa 0 está formada por aminoácidos cargados que establecen interacciones iónicas y forman puentes de hidrógeno entre las glutaminas de la familia de Sintaxinas (Qa) y SNAP25 (Qb, Qc), y una arginina de VAMP2 (Figura. I.7). Esta capa es la más conservada entre la familia de SNAREs, siendo muy importante para la formación del complejo, dado que le aporta mucha estabilidad al complejo *trans*-SNARE (Fasshauer et al., 1998; Sutton et al., 1998).

Después de la fusión, este complejo es llamado *cis*-SNARE porque ahora todas las proteínas se encuentran en la membrana receptora (Figura. I.5). El complejo *cis*-SNARE tiene que ser desensamblado mediante la unión al factor α -SNAP y al NSF (factor sensible a N-etilmaleimida) para formar un complejo 20S temporal. Posteriormente, la ATPasa del NSF hidroliza ATP resultando en cambios conformacionales para desensamblar el complejo SNARE, y separar las tres proteínas para una siguiente ronda de fusión de vesículas (Scales et al., 2001; Vivona et al., 2013).

I.1.3.2. Familia SNAP25

La familia de proteínas SNAP25 es una subfamilia de las proteínas SNARE que se encuentra ampliamente distribuida desde el reino animal, hasta plantas y hongos. En vertebrados está compuesta por SNAP25, SNAP23, SNAP29 y SNAP47 (Figura. I.8). Las cuatro proteínas contienen un pequeño extremo N-terminal, un motivo SNARE (Qb), una región conectora y un segundo motivo SNARE (Qc). SNAP23 y SNAP25 se originaron a partir de una probable duplicación de un gen ancestral, la primera está ampliamente distribuida por los tejidos mientras que SNAP25 se especializó en la exocitosis de vesículas sinápticas en el sistema nervioso (Kienle et al., 2009).

SNAP23 y SNAP25 están implicadas en la ruta secretora regulada, y se encuentran ancladas a la membrana plasmática a través de la región conectora que contiene cuatro o cinco residuos de cisteína justo después del C-terminal del

primer dominio SNARE, que se palmitoilan y le permite unirse a la membrana plasmática (Salaün et al., 2004). En cambio, SNAP29 y SNAP47 tienen regiones conectoras de mayor tamaño, se han visto implicadas en el tráfico intracelular de membranas, pero no presentan las cisteínas palmitoiladas (Figura. I.8) y se encuentran ancladas a membranas a través de proteínas adaptadoras (Varoqueaux & Fasshauer, 2017). En la presente tesis doctoral se estudian dos proteínas de la familia SNARE implicadas en la fusión de vesículas con la

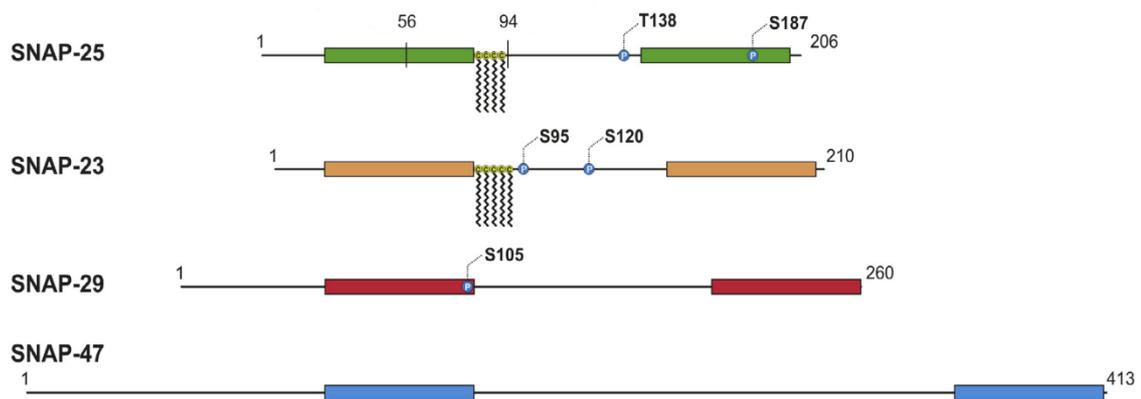


Figura. I.8. Representación esquemática de la familia de proteínas SNAP25. Marcado con cajas los motivos SNARE, con un punto azul los sitios de fosforilación descritos, en líneas de zigzag las cisteínas palmitoiladas. Imagen tomada de Kádková, Radecke, & Sørensen, 2019

membrana plasmática: SNAP23 y SNAP25.

I.1.3.3. SNAP25

SNAP25 se encuentra ampliamente expresada por todo el tejido cerebral (excepto en la astrogía), y también en otras células endocrinas y cromafines (Boschert et al., 1996). Su rol principal es participar en la exocitosis a través de la formación del complejo SNARE junto a VAMP2 y Sintaxina1A. La neurotoxina botulínica A (BoNT/A) y E (BoNT/E) escinden específicamente a SNAP25 y producen un bloqueo de la liberación de neurotransmisores (Schiavo et al., 1993). Su implicación en la fusión de vesículas sináptica y la transmisión nerviosa es muy importante, estudios con ratones *knockout* para SNAP25 y deleciones genómicas en células PC12 y neuronas indican que es necesaria para la fusión de vesículas sinápticas de forma regulada, aunque la liberación de

vesículas de forma espontánea persiste probablemente debido a la redundancia con otras SNAREs (Imig et al., 2014).

La unión de SNAP25 a la membrana plasmática es mediada por las palmitoilaciones que se producen en cuatro residuos de cisteína. Esta acilación es catalizada por la DHHC (Asp-His-His-Cys) palmitoil transferasa, principalmente por DHHC3, 7 y 17 localizadas en la membrana del aparato de Golgi y por DHHC2 y 15 en la membrana plasmática (Greaves et al., 2010). No obstante, SNAP25 es una proteína soluble, y dado que las DHHCs son proteínas de membrana, SNAP25 debe de asociarse a la membrana antes de que sea palmitoilado, estudios recientes indican que esto podría ser mediado electrostáticamente gracias a residuos cargados positivamente alrededor de las cisteínas (Weber et al., 2017). Además, se ha determinado que cuando SNAP25 llega a la membrana, se organiza en clústeres ricos en colesterol junto a Sintaxina1A (Lang et al., 2001).

SNAP25 se ha visto que es regulada mediante la fosforilación de varios residuos de serina y treonina (Figura. I.8). Es fosforilada por PKC en la serina 187, la cual parece potenciar el número de vesículas preparadas para fusionarse (Gao et al., 2016). Sin embargo, la fosforilación en la treonina 138 llevada a cabo por PKA y *Rhoa-activated kinase* (ROK) parece regular negativamente el ensamblado del complejo SNARE (Horváth et al., 2017).

I.1.3.4. SNAP23

SNAP23 es un 59% idéntica a SNAP25 a nivel de secuencia de aminoácidos. A nivel estructural presenta la misma configuración tridimensional, incluida la región conectora y las palmitoilaciones que la anclan a la membrana plasmática (Vogel & Roche, 1999). Su expresión es ubicua por numerosos tejidos del cuerpo incluso en el cerebro, aunque no en la terminal presináptica (Ravichandran et al., 1996). Presenta una interacción más promiscua que SNAP25 con otras Qa-SNAREs, incluyendo la Sintaxina1, 2, 3, 4, 6 y 11, respecto a las R-SNAREs interacciona con VAMP2, 3 y 8. Se ha visto implicada en la exocitosis de numerosas células, como la liberación de histamina y

citocinas en mastocitos, liberación de NGF en células de Schwann, en la liberación de renina en las células yuxtaglomerulares entre otras (Mendez & Gaisano, 2013). Además, se ha visto que se encuentra también en pequeñas zonas del endosoma tardío y en TGN. Por ello, SNAP23 es un gen esencial y su delección provoca la letalidad de los ratones desde la implantación embrionaria (Suh et al., 2011)

SNAP23 también está sujeta a regulación por fosforilación. En mastocitos de roedores, SNAP23 es fosforilada en la Serina 95 y Serina 120 por PKC (Figura. I.8), en la región conectora, no obstante la serina 120 no se encuentra en humanos (Hepp et al., 2005). También se ha visto que estos mismos residuos son fosforilados por *IκB kinasa 2* produciendo un incremento de la degranulación (Karim et al., 2013). Recientes descubrimientos muestran que la fosforilación de SNAP23 en la Serina 95 por la piruvato quinasa M2 (PKM2) produce un incremento en la liberación de exosomas (Wei et al., 2017). En resumen, si bien existen otros posibles sitios de fosforilación para SNAP23, parece ser que la Serina 95 es el principal sitio regulador de SNAP23 por fosforilación.

I.1.4. Sitios de contacto de membrana (MCS)

En los años 70 se descubrió la existencia de grandes regiones funcionales de membrana que se encuentran en estrecha proximidad con otras membranas, llamadas sitios de contacto de membrana, en inglés *membrane contact sites* (MCS). Estas regiones ponen en contacto áreas del RE con la membrana plasmática, u otras membranas de orgánulos como las mitocondrias, peroxisomas, y lisosomas (Gatta & Levine, 2017; Hewlett et al., 2021). Aunque han sido descubiertos en una gran variedad de organismos y tipos celulares, su estructura y función aún no está completamente comprendida. Existe una gran diversidad de MCS, por ejemplo, los contactos entre el RE y la mitocondria son importantes en el transporte de lípidos, metabolismo y fisión de las mitocondrias (Wu et al., 2006). Además, otros numerosos procesos celulares dependen de MCS con el RE, por ejemplo, la homeostasis de Ca^{2+} , el transporte lípidos, la

autofagia, y la modulación de la excitabilidad de las neuronas y las fibras musculares (Sahu et al., 2019).

Los MCS entre el RE y la membrana plasmática presentan las siguientes características generales:

- Las dos membranas implicadas están ancladas a una distancia de entre 7 y 30 nm la una de la otra.
- A pesar de su estrecha proximidad, la estabilidad de las membranas se mantiene y no hay indicios de fusión entre ellas.
- Distintas proteínas y lípidos específicos se encuentran enriquecidos en los MCS, creando microdominios funcionales específicos.
- Pueden ser transitorios o estables en el tiempo.

Los MCS se definen como microdominios donde determinadas proteínas establecen un puente físico entre membranas, y reclutan a otras proteínas para llevar a cabo funciones específicas (Scorrano et al., 2019). Las proteínas implicadas suelen ser proteínas integrales de membrana del RE capaces de unirse directamente a lípidos de la membrana o a proteínas periféricas de membrana (Gallo et al., 2016). A pesar de que múltiples familias de proteínas se han visto implicadas en los MCS, no existe ninguna familia que esté implicada exclusivamente en este tipo de interacciones membrana-membrana. Lo más común, es que estas proteínas estén implicadas en funciones adicionales junto

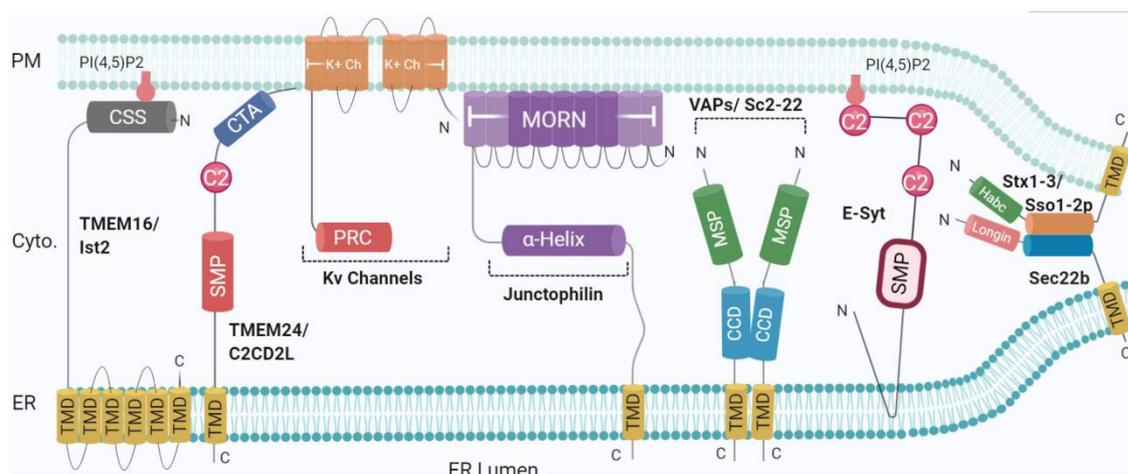


Figura. 1.9. Representación esquemática de las proteínas implicadas en MCS entre el RE y la membrana plasmática. Imagen tomada de Hewlett, Singh, Vannier, & Galli, 2021.

con otras, lo que indica que existe una redundancia funcional. Muchas familias se han visto implicadas como la familia TMEM16, E-syt (*Extended Synaptotagmins*), VAPs (*VAMP-associated proteins*), Junctofilinas, STIMs y más recientemente algunas SNAREs (Figura. I.9) (Eisenberg-Bord et al., 2016).

I.1.4.1. E-Syts (Sinaptotagminas extendidas) y SNAREs involucradas en MCS

Las Sinaptotagminas extendidas (E-Syts) del inglés *Extended Synaptotagmins* son proteínas evolutivamente conservadas que actúan en los MCS entre el RE y la membrana plasmática de organismos pluricelulares (H. Yu et al., 2016). En mamíferos existen tres isoenzimas que tienen homología de secuencia con la familia de las tricalbinas de levadura (Saheki & De Camilli, 2017).

Se encuentran ancladas a la membrana del RE por un dominio transmembrana localizado en el extremo N-terminal. En su región citoplasmática presentan un dominio *synaptotagmin like mitochondrial lipid-binding protein* (SMP), y de tres a cinco dominios C2 que le permiten unirse a membranas de una manera dependiente de Ca^{2+} y PIP_2 . E-Syt1 presenta 5 dominios C2, mientras que E-Syt2 y E-Syt3 tienen tres dominios C2. Los dominios C2 de estas proteínas permiten el reclutamiento de la membrana del RE y la membrana plasmática cuando se incrementa el nivel de Ca^{2+} en el citosol (Figura. I.9). Además, la dimerización de los dominios SMP forma un canal hidrofóbico que facilita la transferencia de lípidos (Min et al., 2007). Sin embargo, aunque las proteínas E-syts han sido identificadas en neuronas de mamíferos, su función fisiológica no está clara dado que triples *knockouts* de ratón no presentan ninguna alteración (Sclip et al., 2016).

La proteína v-SNARE llamada Sec22b localizada en el RE presenta un dominio N-terminal Longin seguido de un dominio SNARE y culmina con un dominio transmembrana en el extremo C-terminal. Esta proteína se ha visto asociada con Sintaxina1 en MCS entre el RE y la membrana plasmática

implicada en el desarrollo de los conos de las neuronas (Figura. I.9). Sin embargo, no se ha visto asociada con SNAP23/25/29/47, y asimismo Sec22b no se ha encontrado en la membrana plasmática, sugiriendo que la interacción Sec22b/Stx1 no produce la fusión típica de las membranas, sino que se encarga de determinar la distancia de asociación entre el RE y la membrana plasmática (Petkovic et al., 2014). Recientemente se ha visto que las E-syts interaccionan con complejos Sec22b/Stx1 pero no con SNAP25, estando implicadas en el desarrollo neuronal y el crecimiento de los conos y filopodios, asimismo en el transporte de lípidos entre distintas membranas. La inhibición de la interacción con SNAP25 es debida al dominio *Longin* (Gallo et al., 2020).

I.1.4.2. STIM1 en la homeostasis de Ca²⁺

El Ca²⁺ es un segundo mensajero esencial en todos los eucariotas. Un requisito de la señalización de Ca²⁺, es mantener un nivel bajo de concentración de Ca²⁺ en el citosol, y disponer de reservas de Ca²⁺ en el lumen del RE. En condiciones de reposo, los niveles de Ca²⁺ en el citosol se mantienen de manera activa en el rango nanomolar ($\sim 10^{-7}$ M), esto es varios órdenes de magnitud por debajo de la concentración extracelular ($\sim 10^{-3}$ M) y del RE ($1-5 \cdot 10^{-4}$ M) (Putney & Ribeiro, 2000). En células no excitables, es decir que no generan potencial de acción, el Ca²⁺ también actúa como segundo mensajero, pero en este caso, la señalización se desencadena por la PLC produciendo la hidrólisis del PIP₂ a diacilglicerol (DAG) e IP₃ (Bill & Vines, 2020). El IP₃ generado se une al receptor IP₃R provocando la liberación de Ca²⁺ en el citosol desde el RE (Figura. I.10). Tras este evento de señalización, la célula debe volver rápidamente a las condiciones de reposo, y volver a rellenar las reservas de Ca²⁺ del RE que se han vaciado. Este proceso es ayudado por el Ca²⁺ extracelular, y en el intervienen los MCS para generar una especie de túnel de Ca²⁺ entre el espacio extracelular y el RE, ayudados por STIM1 y el canal de Ca²⁺ Orai1 (Liou et al., 2005).

STIM1 es una proteína estudiada en esta tesis doctoral, se trata de una proteína residente en la membrana del RE que oligomeriza tras detectar una bajada de Ca^{2+} en el RE, y produce MCS entre la membrana plasmática y el RE, donde se une y activa al canal de Ca^{2+} Orai1 (Zhou et al., 2013). Esta interacción que dirige STIM1, guía al Ca^{2+} extracelular hasta el lumen del RE a través de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA). STIM1 presenta un dominio transmembrana, un dominio citosólico que incluye una región polibásica que le permite unirse a lípidos de membrana, y tres dominios *coiled-coil* necesarios para la unión y activación de Orai1. En el espacio luminal presenta un dominio de manos EF que detecta la concentración de Ca^{2+} del RE, y dirige el cambio conformacional para producir la oligomerización de STIM1 (Figura. I.10) (Park et al., 2009).

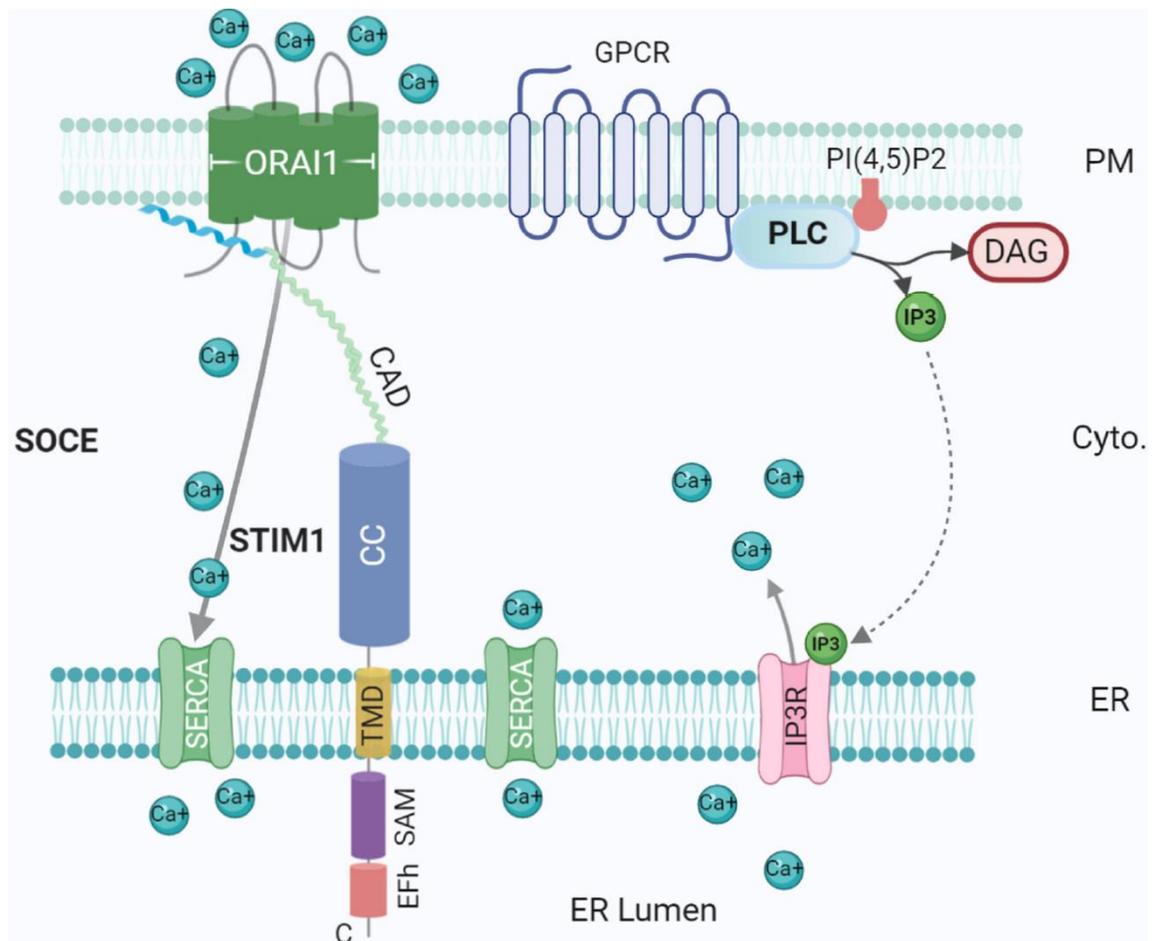


Figura. I.10. Entrada de Ca^{2+} a través de MCS del RE y la membrana plasmática. Proteínas implicadas en el control del flujo de iones de Ca^{2+} entre el espacio extracelular, el citosol y el lumen del RE. IP_3R se activa por el IP_3 generado por la PLC produciendo la liberación de Ca^{2+} del RE, posteriormente este es restablecido con la ayuda de STIM1 y Orai1 junto con SERCA en los MCS generados entre el RE y la membrana plasmática. Imagen tomada de Hewlett, Singh, Vannier, & Galli, 2021.

El complejo STIM1-Orai1 está regulado además por otras proteínas que tienen dominios de manos EF como las proteínas citoplasmáticas CRACR2A, CRACR2B, o por proteínas del RE como Junctato, Junctofilina-4 o el complejo TMEM110/STIMATE que interaccionan y modulan la actividad de STIM1 facilitando la translocación de STIM1 a la membrana plasmática (Jing et al., 2015; Woo et al., 2016). Otras proteínas regulan negativamente el complejo STIM1-Orai1 como SARAF que facilita la disociación de STIM1 de los MCS (Palty et al., 2012).

I.1.5. Maquinaria molecular de la fusión de vesículas sinápticas

En la sinapsis neuronal, el Ca^{2+} es la molécula desencadenante de la transmisión del impulso nervioso a la siguiente neurona. Cuando el potencial de acción llega a la terminal sináptica, los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje de la membrana presináptica se abren, y el Ca^{2+} entra en el citosol desencadenando la fusión de vesículas cargadas de neurotransmisores que se liberan al espacio sináptico, contactando con la siguiente neurona y provocando una despolarización de la membrana postsináptica. Este evento ocurre en menos de un milisegundo, y se encuentra altamente sincronizado y regulado (Südhof, 2013b). El mecanismo molecular que dirige este proceso es llevado a cabo por proteínas SNARE, RabGTPasas, proteínas sensibles a Ca^{2+} , y numerosas proteínas adaptadoras y reguladoras como Munc18, Munc13, Rab3 y otras de las que aún queda mucho por descubrir (Brunger et al., 2019; Rizo & Rosenmund, 2008).

El transporte de vesículas hacia la terminal sináptica se ejecuta gracias a las proteínas Rabs y sus proteínas efectoras como se comentó en el epígrafe I.1.2. En la terminal presináptica existen unas zonas activas donde residen proteínas de andamiaje específicas del citoesqueleto de las neuronas como Piccolo y Bassoon que dirigen las vesículas sinápticas hacia la membrana presináptica y forman unos microdominios activos con numerosas proteínas donde se producirá la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico (Figura. I.11A) (Mukherjee et al., 2010). Rab3 es la encargada de llevar las vesículas hacia las

zonas activas que están enriquecidas en numerosas proteínas entre las que se encuentran los canales de Ca^{2+} activados por voltaje (Wang et al., 1997). Este primer paso en el que la vesícula se posiciona en la zona activa es llamado *docking* (Ng & Tang, 2008). Este es llevado a cabo gracias al complejo que forma RIM, RIM-binding protein y los canales de Ca^{2+} , donde RIM es una proteína efectora de Rab3 (Figura. I.11B) (Mittelstaedt et al., 2010).

Una vez que las vesículas sinápticas se encuentran en el lugar donde se tiene que producir la fusión, ocurre el proceso de *priming*, donde las vesículas

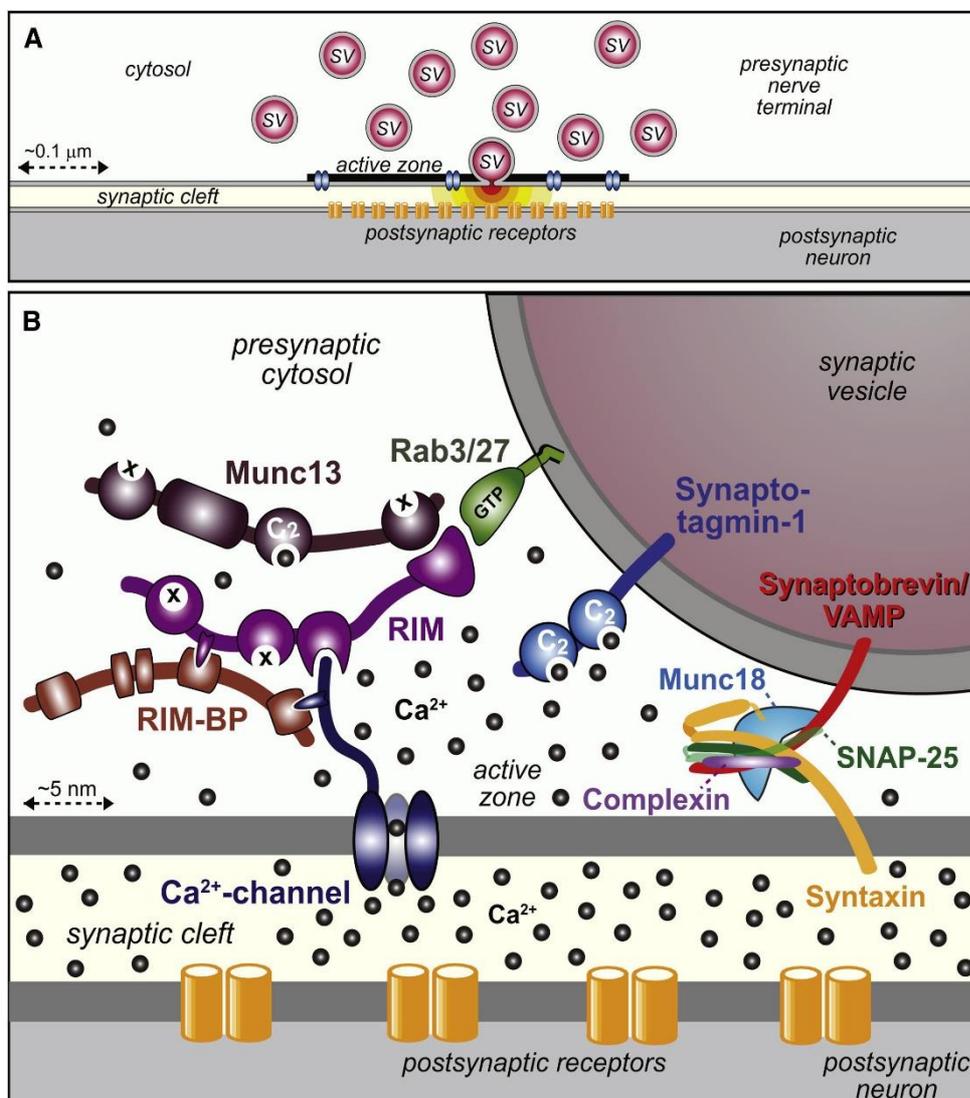


Figura. I.11. Zona activa de la terminal sináptica. **A)** Dibujo de una sinapsis con vesículas sinápticas (SV, morado), una zona activa que contiene canales de Ca^{2+} (azul) y un grupo postsináptico de receptores (naranja). Una vesícula de la zona activa se representa en proceso de fusión, con neurotransmisores rojos saliendo del poro de fusión. **B)** Esquema de la maquinaria molecular compuesta por distintas proteínas que media la fusión de vesículas sinápticas desencadenada por el Ca^{2+} . Imagen tomada de Südhof, 2013b.

se preparan para fusionarse en el preciso momento en el que llega el Ca^{2+} y no antes (Figura. I.12). Como se ilustró en el epígrafe 0 la fusión de membranas es llevada a cabo por las proteínas SNARE. En la fusión de vesículas sinápticas están involucradas la v-SNARE, VAMP2 y las t-SNARE SNAP25 y Sintaxina1A localizadas en la membrana presináptica (Sutton et al., 1998). Este evento de fusión está finamente regulado por las proteínas SM, Munc13, Munc18 y RIM (Rizo & Rosenmund, 2008). En el *docking*, la proteína Sintaxina1A se encuentra en una conformación cerrada, unida a Munc18 para evitar que interaccione con las otras SNARE y se produzca una fusión prematura (Figura. I.12) (Rathore et al., 2010). En el *priming I* actúa Munc13 que interacciona con RIM y posiciona mejor la vesícula. Además, Munc13 presenta un dominio MUN que induce cambios conformacionales en Munc18 y Sintaxina1A produciendo la apertura de Sintaxina1A, permitiéndole interactuar con SNAP25, aunque Munc18 sigue aún interactuando con el complejo SNAP25-STX1A (Figura. I.12) (Ma et al., 2011). A continuación, se produce un ensamblado parcial del complejo SNARE al interactuar con VAMP2. El ensamblado total es inhibido gracias a la proteína reguladora Complexina 1, que actúa en el paso llamado *priming II*. Complexina 1 es una pequeña proteína reguladora que ayuda a prevenir que el complejo SNARE se forme por completo, y se produzca una fusión prematura (Maximov et al., 2009). Además, Sinaptotagmina1, una proteína anclada a la vesícula sináptica que contiene dos dominios C2 con sensibilidad a Ca^{2+} , se une al complejo SNARE a través de SNAP25 (Zhou et al., 2015). De esta forma la inclusión de complexina y sinaptotagmina permite que la vesícula se mantenga en un estado de preparación para que la fusión ocurra cuando entre el Ca^{2+} (Zhou et al., 2017).

El paso de fusión es activado al llegar el potencial de acción a la terminal presináptica que provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje. El Ca^{2+} entra por las zonas activas y los iones se unen a una variedad de proteínas sensibles a Ca^{2+} , que presentan dominios C2 sensibles a Ca^{2+} , entre la que se incluye sinaptotagmina1, la principal responsable de detectar Ca^{2+} y desencadenar la fusión de la vesícula (Südhof, 2013a).

Sinaptotagmina1 es una proteína anclada a la vesícula sináptica, presenta dos dominios C2 que interaccionan con Ca^{2+} neutralizando sus cargas negativas y permitiéndole interaccionar con lípidos de la membrana plasmática (Perin et al., 1991). El cambio conformacional desencadenado por la interacción con Ca^{2+} en Sinaptotagmina1 provoca que complexina permita la formación del complejo *trans*-SNARE al completo, causando la apertura del poro de fusión y produciendo la liberación de los neurotransmisores (Figura. I.12) (Zhou et al., 2017).

A pesar de haber otras proteínas en la terminal sináptica que unen Ca^{2+} como Rabfilina3A, RIM, Munc13 y Doc2, parece ser que Sinaptotagmina1 es la encargada de activar la liberación rápida y sincronizada de neurotransmisores después de un potencial de acción. Esto es debido a que sus dominios C2 presentan una baja afinidad por Ca^{2+} , concretamente en el rango de micromolar,

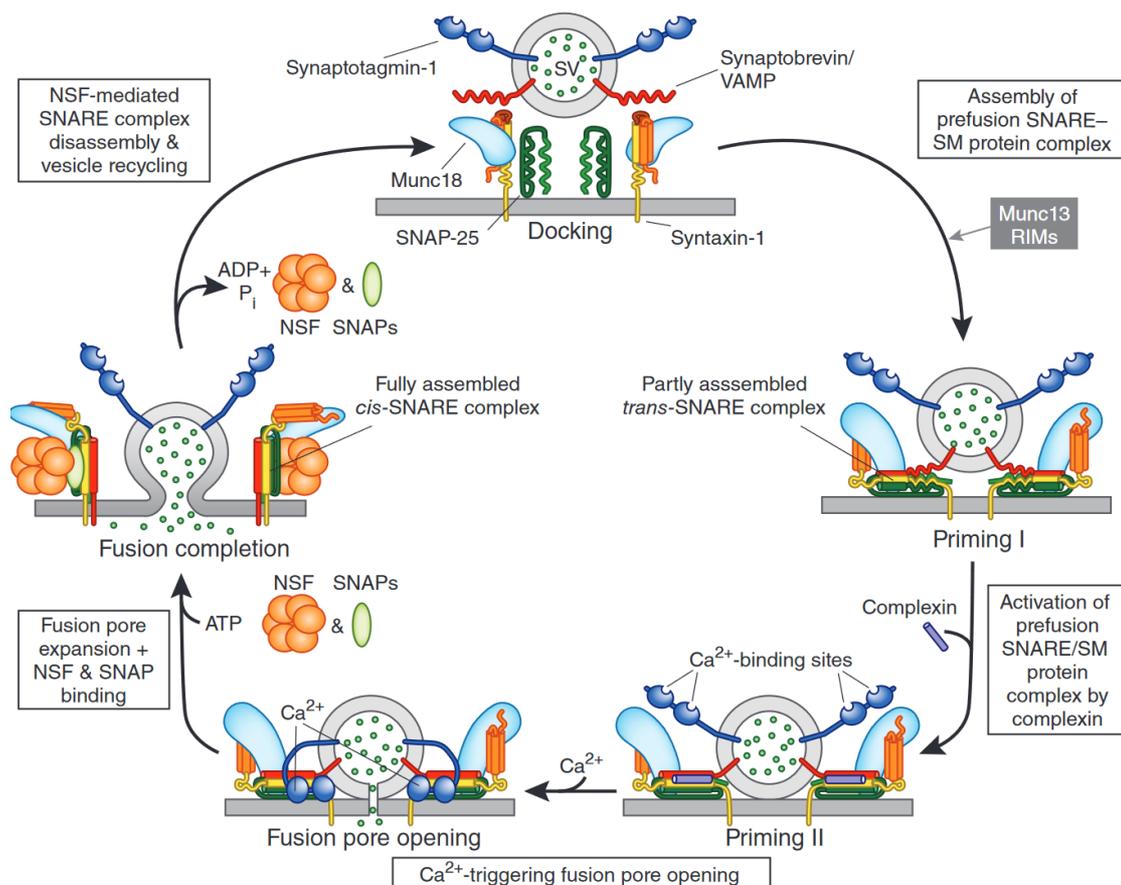


Figura. I.12. Modelo del ciclo de la fusión de vesículas sinápticas. Vista del ciclo que siguen las proteínas SNARE y sus proteínas reguladoras, proteínas SM, sinaptotagmina y complexina, NSF, en las cinco etapas de la fusión de vesículas sinápticas: docking, priming I, priming II, fusión y desensamblaje. Imagen tomada de Südhof, 2013a.

minimizando la probabilidad de que Sinaptotagmina1 sea activada en ausencia de un potencial de acción (Courtney et al., 2019). Dado que sólo se alcanzan concentraciones micromolares de Ca^{2+} cerca de los canales activados por voltaje después de un potencial de acción, es esta la razón por la que las vesículas se encuentran preparadas en estas zonas activas (Fernández-Chacón et al., 2001). Por ese motivo, ratones *knockout* para Sinaptotagmina1 mueren después de nacer, debido a una liberación asíncrona de neurotransmisores que los incapacita para respirar correctamente (Neher & Penner, 1994).

El último paso del ciclo, tras producirse la fusión donde el complejo *trans*-SNARE se convierte en *cis*-SNARE, consiste en la recuperación y reciclaje de las proteínas implicadas. Aquí, actúa la ATPasa NSF que se une al complejo *cis*-SNARE junto a la proteína adaptadora SNAP y provoca el desenrollamiento del complejo, y el reciclaje de las distintas proteínas (Figura. I.12) (Vivona et al., 2013).

I.1.6. Rabfilina3A

Rabfilina3A (Rph3A) es la proteína principal de estudio de esta tesis doctoral, está codificada por el gen Rph3A, su nombre proviene de su descubrimiento a principios de los años noventa como una proteína con afinidad por Rab3A: una proteína de la familia de las pequeñas Rab GTPasas, involucrada en el tráfico de vesículas y la liberación de neurotransmisores (Shirataki et al., 1993; Shirataki et al., 1994; Yamaguchi et al., 1993). La función primordial de Rabfilina3A se describió como proteína reguladora del tráfico vesicular de forma dependiente de Ca^{2+} , en concreto en la exocitosis de vesículas neuronales y de células neuroendocrinas (Fukuda et al., 2004). Aunque su preciso papel permanece incierto a pesar del paso de los años, parece tener un papel más multiregulador y multifuncional.

A nivel estructural, Rabfilina3A presenta dos regiones funcionales claramente separadas (Figura. I.13). La primera en el extremo N-terminal, conteniendo un dominio *zinc-finger* de unión a Rab3A, la segunda región está localizada en el extremo C-terminal y está compuesta por dos dominios C2 en tándem. Estos dominios C2 le permiten a la proteína interactuar con lípidos de manera dependiente de Ca^{2+} (Yamaguchi et al., 1993), y también con otras proteínas moduladoras de su función.

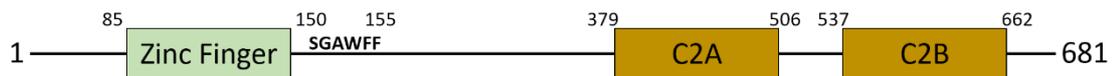


Figura. I.13. Esquema de los dominios de Rabfilina3A.

I.1.6.1. Dominio N-terminal de Rabfilina3A

El extremo N-terminal de Rabfilina3A tiene una funcionalidad importante, y es que a pesar de ser una proteína citoplasmática, interacciona con las vesículas gracias a su dominio *zinc-finger* que presenta afinidad por las proteínas vesiculares Rab3 (McKiernan et al., 1996) y Rab27 (Fukuda et al., 2004). Como vimos en el epígrafe I.1.2.1, la familia de las Rabs GTPasas presentan dos estados conformacionales. Están en su forma activa al tener GTP unido permitiendo interaccionar con sus proteínas efectoras, en cambio, al hidrolizarlo sufren un cambio conformacional y ya no son capaces de interaccionar con ellas. Rabfilina3A es una de estas proteínas efectoras e interacciona con las Rabs a través de su *Rab-binding domain* (RabBD), que es un *zinc finger* atípico de tipo FYVE. El dominio consiste en dos largas hélices separadas por el dominio *zinc finger* atípico FYVE. La zona de interacción con las Rabs no es la parte central del dominio, sino que participan su primera α -hélice y los residuos SGAWFF del final del dominio *zinc-finger* (Figura. I.14), permitiendo unirse a vesículas sinápticas y ayudar a su transporte hasta la terminal sináptica (Ostermeier & Brunger, 1999).

Tras este dominio se encuentran sitios de fosforilación dependientes de la familia de las quinasas dependientes de Ca^{2+} como las Proteínas Quinasas A (PKA), C (PKC) y la Ca^{2+} calmodulina quinasa II (Foletti et al., 2001; Fykse et al., 1995). Estas fosforilaciones podrían modular la actividad de Rabfilina3A posiblemente afectando a distintos pasos del reciclado de vesículas o la plasticidad sináptica.

No sólo las fosforilaciones son las modificaciones que sufre Rabfilina3A en este dominio, recientemente se ha determinado que la α -hélice 1 involucrada en la interacción con Rab3A, interacciona con la ubiquitinilasa UBE3A actuando como competidora de Rab3A, y ubiquitinando a Rabfilina3A. Esta modificación no afecta a su estabilidad incrementando su degradación, sino que actuaría como modificación postraduccional regulando la actividad de la proteína e impidiendo la unión con Rab3A (Avagliano Trezza et al., 2021). Esto tiene un

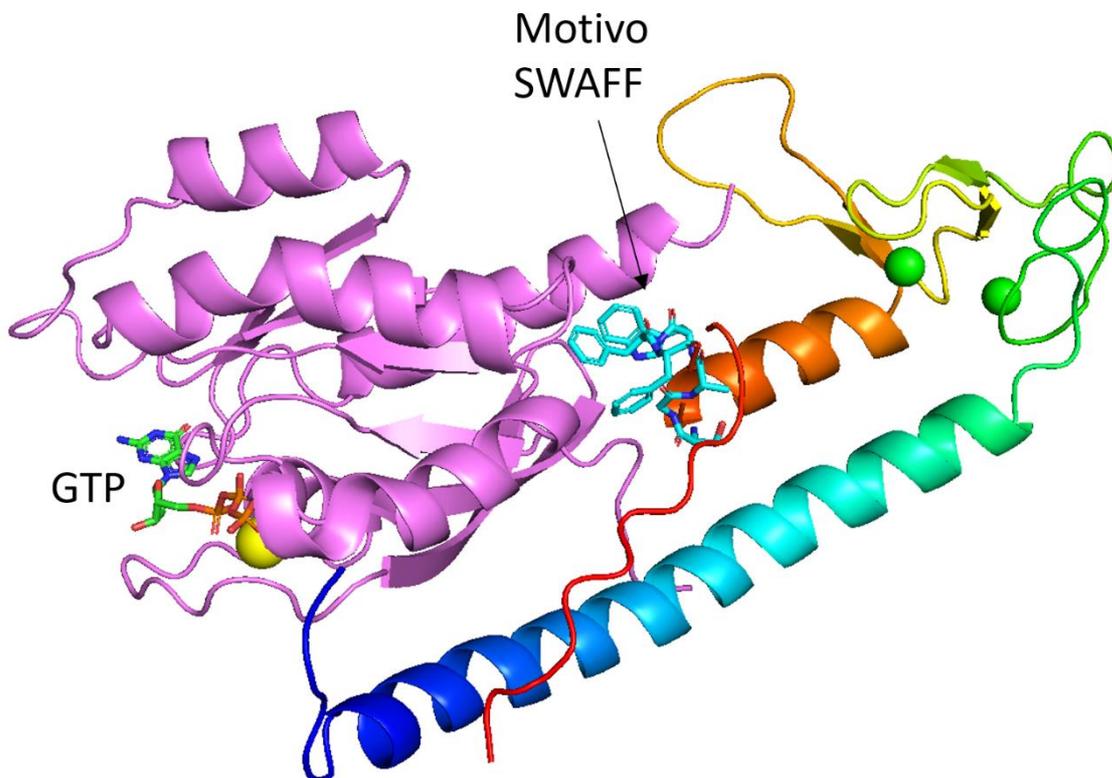


Figura. 1.14. Complejo Rab3A y Rabfilina3A. En lila la proteína Rab3A en su estado activo con GTP unido y el átomo de magnesio en amarillo. En espectral de arcoíris, Rph3A, en azul N-terminal y rojo C-terminal, se observan los átomos de zinc en verde que coordinan y estabilizan el dominio zinc-finger. La primera α -hélice y el motivo SWAFF con los residuos en varillas en el lado C-terminal, partes claves de Rph3A para interactuar con Rab3A. PDB:1ZBD.

efecto regulador en el número de vesículas ancladas a la membrana en la terminal presináptica, es por ello que en los primeros estudios de Rabfilina3A se vio implicada en la regulación de la exocitosis al observar que inyectando la proteína completa en sinapsis de calamar gigante, se inhibía la liberación de neurotransmisores impidiendo la preparación de vesículas sinápticas (Burns et al., 1998), probablemente debido a que el exceso de Rabfilina3A se unía a Rab3A inhibiendo la hidrólisis del GTP de Rab3A. Esta modificación es eliminada por la desubiquitinilasa CAND1 (Nakashima et al., 2018).

Rabfilina3A también se ha visto que tiene un papel en la endocitosis, al sobreexpresar Rabfilina3A se ha visto que se incrementa el número de vesículas recicladas. Después de la disociación de Rab3A, Rabfilina3A se une a través de su extremo N-terminal con Rabaptin5, una proteína clave en el proceso endocítico (Coppola et al., 2001). Esta interacción es clave para iniciar la endocitosis de vesículas orquestando el complejo multiproteico para producir este fenómeno (Stenmark et al., 1995). Se ha descrito otra interacción adicional en esta región solapante con la interacción de Rab3A, se ha visto que Rabfilina3A es capaz de unirse a α -actinina cuando no está asociada a Rab3A, probablemente regulando los filamentos de actina y dirigiendo las vesículas (Kato et al., 1996).

1.1.6.2. Dominios C2 de Rabfilina3A

Rabfilina3A interactúa con las vesículas a través de otras proteínas, pero además es capaz de interactuar directamente con la membrana plasmática a través de sus dos dominios C2, permitiéndole interactuar de forma transitoria de una manera dependiente de Ca^{2+} con lípidos de la membrana plasmática (Guillen et al., 2013).

Los dominios C2 son la parte más versátil de la proteína, son módulos proteicos que constan de aproximadamente 130 aminoácidos. Se han encontrado en numerosas proteínas principalmente involucradas en el tráfico vesicular y en la transducción de señales que contienen estos dominios

(Corbalan-Garcia & Gomez-Fernandez, 2014). A nivel estructural están compuestos por 8 cadenas β antiparalelas, formando la estructura sándwich β compacto. Entre los lazos que conectan las cadenas β se encuentran las regiones funcionales que en algunos casos pueden llegar a formar pequeñas α -hélices (Cho & Stahelin, 2006). Algunos dominios C2 tienen la capacidad de detectar Ca^{2+} cuando presentan 5 residuos de aspárticos en los lazos superiores del dominio, llamados *calcium binding region* (CBR), si se conservan estos residuos, el Ca^{2+} neutraliza las cargas negativas de los aspárticos (Fernandez et al., 2001). Los dos dominios C2 de Rabfilina3A (C2A y C2B) son capaces de unirse a Ca^{2+} con gran afinidad en el rango submicromolar, y al coordinarlo unirse a fosfolípidos de membrana como la fosfatidilserina (PS) (Verdaguer et al., 1999). Asimismo, ambos dominios C2 son capaces de unirse al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), de una manera independiente de Ca^{2+} a través de una región distinta a los CBR, aunque su afinidad está potenciada en presencia de Ca^{2+} , este hallazgo fue descubierto por nuestro grupo de investigación de Biomembranas en colaboración con el grupo de Biología Estructural de la Dra. Nuria Verdaguer del IMBM-CSIC de Barcelona, dilucidaron la estructura cristalina de varios dominios C2 en conjunto con el PIP_2 . Han determinado que

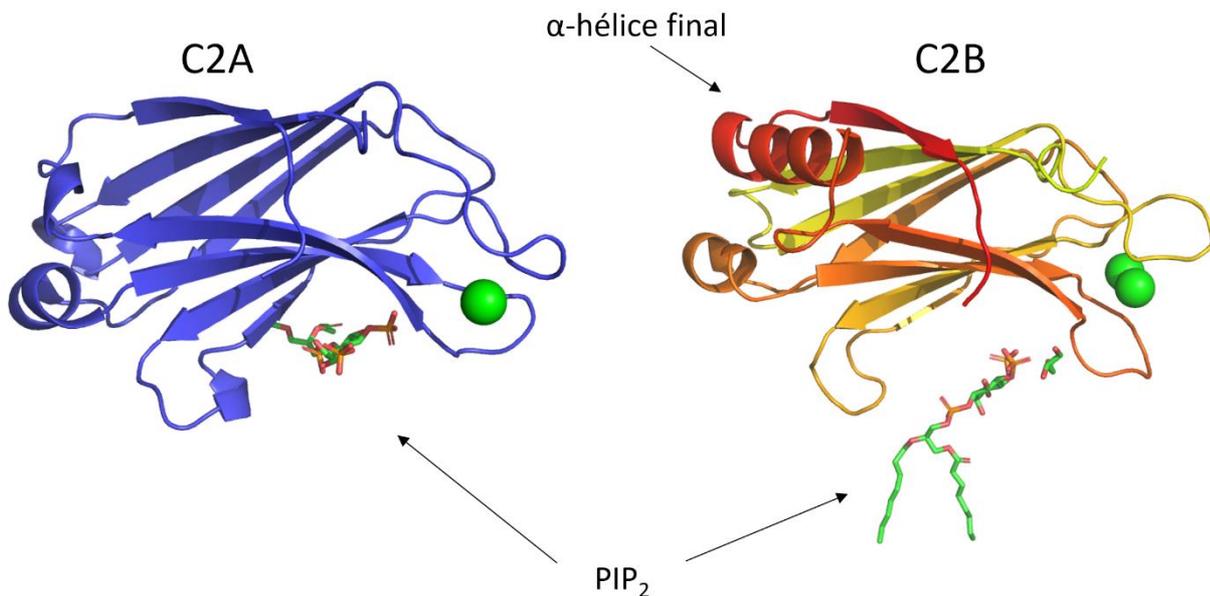


Figura. I.15. Dominios C2A y C2B de Rabfilina3A. En azul el dominio C2A, junto con la cabeza del PIP_2 en el bolsillo de las Lysine Rich Cluster, y en verde un átomo de Ca^{2+} en el calcium binding domain. A la derecha el dominio C2B, en amarillo la parte N-terminal y en rojo la parte C-terminal, se observan los átomos de Ca^{2+} en el calcium binding domain y el PIP_2 en el Lysine Rich Cluster. PDB de C2A solapado: 4NS0 y 4LT7, PDB de C2B: 5L08.

una región polibásica denominada *Lysine Rich Cluster* (LRC) localizada en las cadenas $\beta 3$ y $\beta 4$, que contienen los aminoácidos clave para interactuar con este fosfoinosítido (Figura. I.15) (Ferrer-Orta et al., 2017; Guerrero-Valero et al., 2009; Guillen et al., 2013). Además, nuestro grupo determinó a nivel atómico la interacción de la hélice final del dominio C2B de Rabfilina3A con SNAP25 (Ferrer-Orta et al., 2017; Tsuboi & Fukuda, 2005). Otras investigaciones han dilucidado interacciones con otras proteínas a través de estos dominios, por ejemplo se ha determinado por ensayo de doble híbrido que el dominio GUK de la proteína CASK interactúa con este mismo dominio C2B junto a las β -neurexinas (Zhang et al., 2001), también se ha visto que interactúa con la proteína Anexina A4 indicando que Rabfilina3A está implicada en procesos vesiculares de la terminal presináptica, (Willshaw et al., 2004).

I.1.6.3. Proteínas homólogas a Rabfilina3A

A nivel evolutivo, Rabfilina3A presenta numerosas proteínas homólogas, que podrían eclipsar o compartir su función. Sin embargo, presentan importantes diferencias respecto a la composición y propiedades de sus dominios.

La proteína Noc2 presenta el dominio *zinc-finger* y es capaz de unirse a Rab27A en células PC12 del mismo modo que Rabfilina3A (Fukuda et al., 2004) pero carece de los dos dominios C2, de ahí su nombre. Por otro lado, existen otras proteínas homólogas, pero de un modo contrario a Noc2, carecen del dominio zinc-finger. Estas son las proteínas Doc2, presentan una alta homología de secuencia en sus dominios C2, especialmente las proteínas Doc2a y Doc2b (61% y 73% de identidad respectivamente), la proteína Doc2c es más atípica (Verhage et al., 1997). También existen otras proteínas que presentan dos dominios C2 en tándem, como copine-6 o sinaptotagmina 1 (Syt1) de la familia de Sinaptotagminas. Las proteínas RIM, como RIM1 y RIM2, tiene cierta homología con Rabfilina3A presentando un dominio *zinc-finger* que es capaz de interactuar con Rab3A pero no con Rab27A (Fukuda, 2003), y además posee dos dominios C2 pero no son sensibles a Ca^{2+} (Dai et al., 2005).

I.1.6.4. Función fisiológica de Rabfilina3A

A nivel fisiológico, numerosos estudios han sugerido que Rabfilina3A tiene un papel como proteína reguladora del reciclado, anclaje y exocitosis de vesículas sinápticas, especialmente en células adrenales PC12 (Chung et al., 1995; Deak et al., 2006; Komuro et al., 1996) y en neuronas (Deak et al., 2006). Otras investigaciones han determinado que Rabfilina3A está involucrada también en la terminal postsináptica, estabilizando la interacción del receptor NMDA a través de la subunidad GluN2A junto a la proteína PSD-95 (Stanic et al., 2015). Investigaciones más recientes de la última década han determinado que no sólo está implicada en procesos neurológicos sino también en procesos como la secreción de hormonas a través de la proteína Rab27 junto a la proteína de transporte MyoVa, ayudando al transporte de vesículas y a la secreción en células β pancreáticas (Brozzi, Diraison, et al., 2012). También está presente en el acrosoma de la cabeza de los espermatozoides, participando en la reacción acrosómica que ocurre en la fertilización al fusionarse la membrana plasmática del ovocito con la membrana externa del acrosoma del espermatozoide, donde Rabfilina3A participa junto a Rab27A y GRAB en la exocitosis regulada por Ca^{2+} que ocurre en dicha reacción (Quevedo et al., 2019). Incluso se ha evidenciado que Rabfilina3A juega un papel importante junto a las proteínas Rabs en la función de los podocitos, células especializadas en el transporte vesicular del riñón (Martinez-Arroyo et al., 2020). También participa en la función inmunitaria en la polarización celular, en concreto en la de adhesión y migración durante la infiltración celular tras un proceso inflamatorio. Rabfilina3A participa en la polarización de la membrana plasmática al unirse al fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P) y recluta a Rab21 e interacciona con ARF6 (Ren et al., 2020). Rabfilina3A está sujeta a regulación por modificaciones postraduccionales como la ubiquitinación, y se ha visto que CAND1 inhibe su ubiquitinación regulando la secreción de hormona antidiurética (Nakashima et al., 2018).

Sin embargo, a pesar del papel multifuncional de Rabfilina3A en diversos procesos vesiculares y de secreción, se observó que ratones *knockout* de Rab3A presentan alteraciones notables en sus propiedades sinápticas, mientras que

ratones *knockout* de Rabfilina3A son totalmente fértiles, viables y no presentan ninguna alteración fisiológica aparentemente (Schluter et al., 1999) sugiriendo que Rabfilina3A no es imprescindible para la transmisión sináptica. No obstante, esto no es determinante para dar la posibilidad de que la función de Rabfilina3A sea redundante, dado que se ha visto implicada en diversas patologías principalmente neurodegenerativas.

I.1.6.5. Rabfilina3A involucrada en diversas patologías

Se ha relacionado que diversas patologías están asociadas con alteraciones de la función normal de Rabfilina3A, y también con la generación de autoanticuerpos contra Rabfilina3A, indicando que hay un mal funcionamiento de esta proteína.

Rabfilina3A se ha visto implicada principalmente en enfermedades neurodegenerativas. En la enfermedad de Huntington se ha descrito que el neocórtex de los pacientes que habían padecido la enfermedad presentaba una disminución de la proteína SNAP25 y Rabfilina3A (Smith et al., 2007). En la enfermedad de Parkinson se produce la formación de los cuerpos de Lewy donde se acumula de forma anormal la proteína α -sinucleína, una proteína abundante en la terminal presináptica. Esta proteína desplaza la formación del complejo Rab3A-Rph3A, al interaccionar con la proteína Rab3A, alterando la función de Rabfilina3A (Chen et al., 2013; Dalfó et al., 2004). Además, se ha visto que Rabfilina3A se une al receptor NMDA, estando sobreexpresada en ratas parkinsonianas que muestran un perfil discinético (Stanic et al., 2017). En la enfermedad de Alzheimer se ha visto que hay una disminución en la cantidad de Rabfilina3A provocando una alteración del complejo SNARE, asociado a un incremento en la concentración de la proteína β -amiloide (Tan et al., 2014).

También se ha visto involucrada en enfermedades de la glándula de la pituitaria, en especial la infundíbulo neurohipofisitis linfocítica (Yasuda et al., 2018). Esta enfermedad es un desorden inflamatorio poco común de origen autoinmune, que produce una inflamación del lóbulo posterior de la pituitaria

(neurohipófisis) y el infundíbulo hipotalámico o tallo hipofisario: la porción del hipotálamo que conecta con la hipófisis. La enfermedad produce principalmente una diabetes insípida central, debido a una cantidad insuficiente de hormona antidiurética (Scherbaum, 2021). Rabfilina3A parece ser un antígeno patogénico desencadenante de esta enfermedad autoinmune, se ha contrastado que se produce una generación de autoanticuerpos contra Rabfilina3A, permitiendo esto ser un marcador no invasivo de diagnóstico de la enfermedad (Iwama et al., 2015; Sakurai et al., 2017).

I.2. Células cebadas o mastocitos, implicación en alergia

Las células cebadas o también llamadas mastocitos, juegan un papel crucial en el sistema inmunitario, tienen un linaje hematopoyético y proceden de progenitores pluripotentes de la médula ósea. Bajo condiciones normales se localizan en el tejido epitelial y las mucosas de todo el cuerpo, especialmente en los puntos de entrada de antígenos (tracto digestivo, epitelio respiratorio y la piel), y no circulan por el torrente sanguíneo (Galli & Tsai, 2010; Metcalfe & Boyce, 2006). Estas células presentan en su citoplasma numerosos gránulos vesiculares donde almacenan mediadores inflamatorios, como histamina, heparina, citoquinas, sulfato de condroitina, proteasas (da Silva et al., 2014). La activación de los mastocitos por antígenos conlleva la liberación de sustancias proinflamatorias que producen diferentes efectos en tejidos y órganos. Por ejemplo, en la mucosa del tracto respiratorio provoca un incremento de la producción de moco, tos, y constricción de las vías aéreas debido a la entrada de antígenos por inhalación de aire. En el tracto gastrointestinal la exposición a antígenos provoca un incremento de la secreción de fluidos, mayor contracción del tejido muscular liso y peristalsis. Los antígenos penetran en las capas profundas de la piel produciendo urticaria, eczema o angioedema. Estos efectos se producen porque el antígeno que se ha introducido es detectado por la inmunoglobulina E (IgE) de la superficie de los mastocitos, provocando la activación de estas células que comienzan a liberar una variedad de mediadores proinflamatorios (Metcalfe & Boyce, 2006).

I.2.1. Mecanismo de activación de los mastocitos

Los mastocitos median reacciones de alergia a través de anticuerpos IgE que se acoplan al receptor de alta de la región Fc de las inmunoglobulinas IgE, llamado receptor FcεRI que está presente en su membrana plasmática. Los anticuerpos IgE son producidos por los linfocitos B maduros en respuesta a los linfocitos T CD4+, cuando interactúan con la IL-4 producida por este tipo de linfocito T (Galli et al., 2005). La mayoría de los anticuerpos IgE se encuentran acoplados al receptor de alta afinidad FcεRI de los mastocitos y, muy poca cantidad de IgE se encuentra de forma soluble en circulación (Nagata & Suzuki, 2022).

En el momento que un antígeno entra en contacto con este complejo IgE-FcεRI de los mastocitos, varios receptores FcεRI se entrecruzan y activan la liberación de vesículas (Siraganian, 2003). Para ello se produce una cascada de

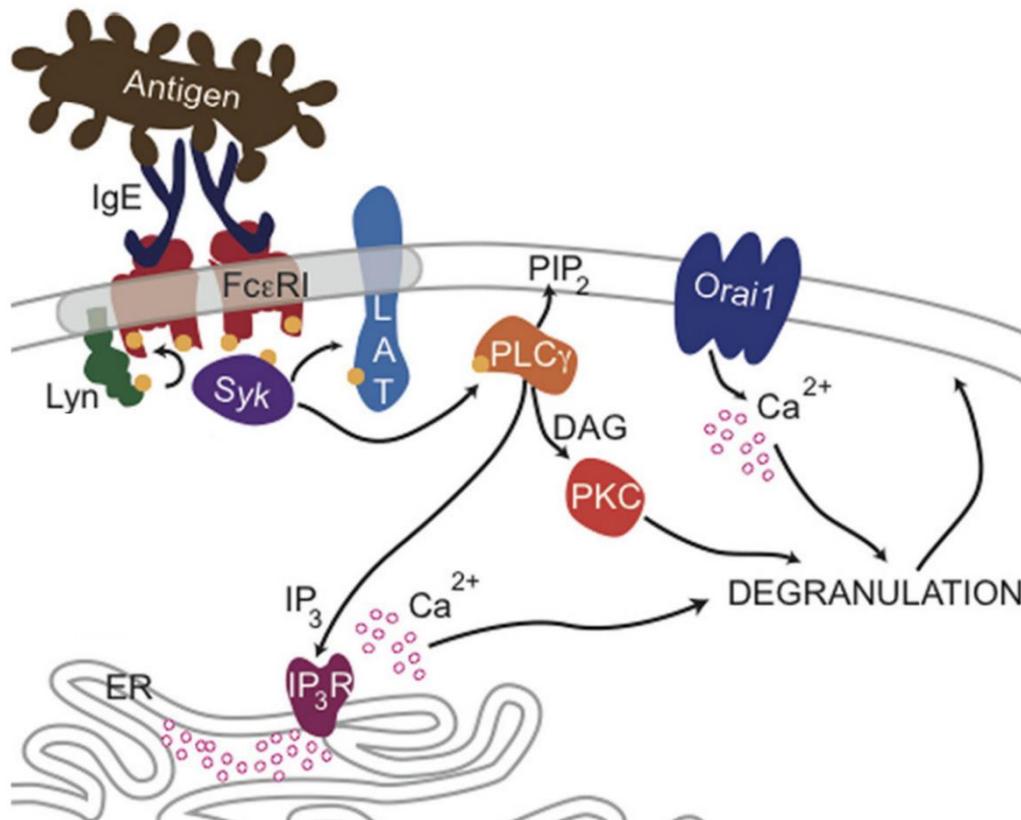


Figura. I.16. Ruta de señalización de FcεRI unido a un antígeno. Al unirse el antígeno al receptor FcεRI provoca la activación de la PLCγ que activa a la PKC al producir DAG y la liberación de Ca²⁺, que como consecuencia provocan la activación de la degranulación de vesículas. Imagen tomada de N.L. Smith et al., 2013.

señalización donde participa la LYN tirosina quinasa, que fosforila los motivos ITAM de la cadena β y γ del receptor. Esta misma quinasa activa a la Syk tirosina quinasa, que fosforila a otras proteínas señalizadoras (Tkaczyk et al., 2005) entre las que se encuentra la PLC γ . Esta última, al ser fosforilada se activa e hidroliza el PIP₂ a inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃) y DAG (Figura. I.16). El IP₃ y el DAG son segundos mensajeros muy importantes. El IP₃ provoca la movilización y liberación de Ca²⁺ desde el RE hacia el citoplasma (Hitomi et al., 2004). La liberación de Ca²⁺ junto con el DAG provoca la activación de la familia de PKCs provocando la desgranulación de vesículas cargadas de mediadores proinflamatorios, y también causa que el NF κ B se trasloque al núcleo celular, activando la transcripción de varias citoquinas como IL-6, TNF α , y IL-13 (Figura. I.16) (Smith et al., 2013).

La activación del receptor Fc ϵ RI provoca la activación de numerosas quinasas, junto a la degranulación y síntesis de muchos mediadores inflamatorios (Blank et al., 2021). Los gránulos vesiculares de los mastocitos son similares a los lisosomas los cuales presentan un bajo pH, y enzimas lisosomales como la β -hexosaminidasa y caspasa-3, junto con sustancias proinflamatorias. Estos mecanismos moleculares son los que desencadenan los síntomas de la alergia. (Garcia-Faroldi et al., 2013).

I.3. Proteínas quinasas C

La familia de las Proteínas quinasas C la forman un conjunto de 10 isoenzimas que presentan actividad fosfotransferasa, donde fosforilan específicamente residuos de Serina (Ser) y Treonina (Thr) de sus proteínas sustrato al ser activadas por diversas señales, generalmente dependientes de fosfolípidos y/o Ca²⁺ (Newton, 2018). Estas enzimas se encuentran inactivas dispersas por el citoplasma de forma soluble, cuando se activan se unen a fosfolípidos y/o receptores de membranas donde desempeñan su función fosfotransferasa (Bell & Burns, 1991; Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2006).

Se encuentran en casi todos los tejidos expresándose en una amplia variedad de tipos celulares, siendo una familia muy extendida por los eucariotas. Esto les confiere una gran cantidad de funciones celulares, tales como la división, proliferación celular, secreción de vesículas, diferenciación neuronal, reorganización del citoesqueleto especialmente a través de la actina, modulación de los canales de Ca^{2+} (Tan & Parker, 2003). Su desregulación provoca muchas enfermedades entre las que se encuentran principalmente distintos tipos de cáncer como el de mama, pulmón y también enfermedades coronarias (Dekker & Parker, 1994; Newton, 2001).

Estas proteínas son enzimas modulares compuestas por una región reguladora que presenta distintos dominios sensibles a lípidos y Ca^{2+} , y otra región relativamente conservada llamada región catalítica (Figura. 1.17). Tradicionalmente se han visto como enzimas sensibles a lípidos que eran activadas por receptores de membrana que activan a la fosfolipasa C (PLC), una enzima que hidroliza PIP_2 para generar DAG que activa a las PKCs e IP_3 que moviliza Ca^{2+} intracelular (Huang, 1989). No obstante, también son moduladas por otros cofactores como ácido araquidónico o ceramidas. Muchas PKCs son activadas por esteres de forbol, compuestos cancerígenos, como el *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA), uniéndose al dominio C1 (Steinberg, 2008).

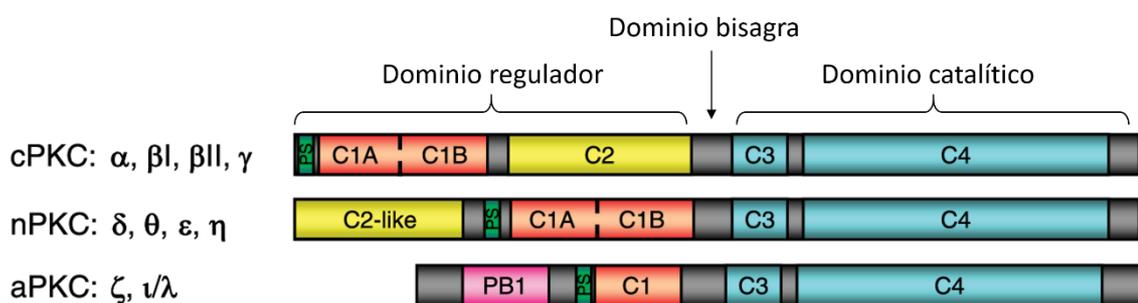


Figura. 1.17. Dominios de las Proteínas Quinasas C (PKC). Todas las isoformas presentan un dominio pseudosustrato (verde) en el N-terminal del dominio C1 (naranja). El tándem de dominios C1 de cPKCs y nPKCs son sensibles a PMA y DAG; mientras que el de las aPKC no. El dominio C2 de las cPKC (amarillo) es sensible a fosfolípidos de una manera dependiente de Ca^{2+} , mientras que el de nPKC no es sensible a Ca^{2+} . El dominio C3 une ATP, y el dominio C4 la proteína sustrato. Imagen tomada y adaptada de Steinberg, 2008.

La región catalítica consiste en distintos motivos que tienen la capacidad de unirse a ATP y al sustrato que va a ser fosforilado. De este modo con su actividad fosfotransferasa transfieren un grupo fosfato del ATP a una Ser o Thr de una proteína y liberan el ADP. Estructuralmente esta región está compuesta por dos regiones un lóbulo N-terminal pequeño también llamado dominio C3, que contiene un *loop* rico en glicinas que es donde se encuentra la región para unir el ATP. Posteriormente un lóbulo mayor llamado lóbulo C o dominio C4 que engloba tres zonas: *loop* de activación, motivo de giro (*turn motif*) y motivo hidrofóbico. En este último lóbulo ocurre la unión de la proteína sustrato y el comienzo de la transferencia del grupo fosfato (Newton, 2001; Xu et al., 2004).

I.3.1. Clasificación de las PKCs

Hasta la fecha se han identificado 10 diferentes isoenzimas de PKC: alfa (PKC α), beta I (PKC β I), beta II (PKC β II), gamma (PKC γ), delta (PKC δ), épsilon (PKC ϵ), iota/lambda (PKC i/λ), eta (PKC η), theta (PKC θ), y zeta (PKC ζ) (Reyland, 2009). Las PKC presentan dos regiones claramente diferenciadas, una región reguladora compuesta por dominios que modulan su función, donde se encuentran los dominios C1, C2 y pseudosustrato, y la región catalítica que es la encargada de llevar a cabo la fosforilación de sus sustratos, donde se encuentra el dominio C3 y C4. Dependiendo del orden de los dominios y sensibilidad a los diferentes cofactores de la región reguladora, la familia de proteínas quinasa C (PKC) se pueden clasificar en tres grupos diferentes (Figura. I.17):

- PKCs clásicas o convencionales (cPKC): este grupo incluye a alfa (PKC α), beta I (PKC β I), beta II (PKC β II) y gamma (PKC γ). Éstas son reguladas por DAG, lípidos aniónicos y Ca²⁺ (Martiny-Baron & Fabbro, 2007). La región reguladora la componen el dominio pseudosustrato, que se encuentra en el extremo N-terminal responsable de bloquear e inhibir el centro activo cuando la proteína está inactiva, seguido de dos dominios C1 en tándem que son responsables de unirse a DAG y éster de forbol (Conesa-Zamora et al., 2000). Posteriormente, un dominio C2 de tipo I,

que tiene capacidad para detectar Ca^{2+} y unirse a fosfolípidos aniónicos como la PS, y también presenta la capacidad de unirse al PIP_2 (Conesa-Zamora et al., 2001).

- PKCs nuevas (nPKC): este grupo lo componen 4 isoenzimas, épsilon ($PKC\epsilon$), delta ($PKC\delta$), eta ($PKC\eta$), theta ($PKC\theta$). Se diferencian del grupo anterior debido a que la proteína comienza con un dominio C2 de tipo II que se encuentra al inicio de la proteína, y no es sensible a Ca^{2+} (Corbalán-García et al., 2003). A continuación, se encuentra el dominio pseudosustrato y dos dominios C1 en tándem que interaccionan con DAG, pero con el doble de afinidad que las PKC clásicas (Tabla I.2) (Jose Lopez-Andreo et al., 2003).
- PKCs atípicas (aPKC): esta subfamilia está compuesta por sólo dos miembros iota/lambda ($PKC\iota/\lambda$), y zeta ($PKC\zeta$). PKC iota es el nombre que se refiere para humanos y PKC lambda para ratones. Este grupo no contiene dominios C2, por lo que también son insensibles a Ca^{2+} . Comienzan con un dominio PB1 (*Phox and Bem 1*) que interacciona con proteínas de andamiaje como la p62. Su dominio C1 es atípico y no interacciona ni con DAG ni con PMA, sino que une PIP_3 y ceramidas (Reina-Campos et al., 2019).

Tabla I.2. Sensibilidad a cofactores de los dominios de las PKCs.

	Dominio C1			Dominio C2	
	DAG	PS	PIP_3	Ca^{2+}	PIP_2
cPKC	+	+	-	+	+
nPKC	++	+	-	-	-
aPKC	-	+	+	-	-

I.3.2. Lípidos reguladores de los dominios C1 y C2

I.3.2.1. Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂)

El fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) es un tipo de fosfoinosítido presente en la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Los fosfoinosítidos son fosfolípidos ácidos con un *myo*-inositol como grupo de cabeza de lípido, el PIP₂ presenta dos fosforilaciones en la posición 4 y 5 del fosfatidilinositol (PIP) (Figura. I.18). Constituye el 1% del total de lípidos de las membranas celulares. No obstante, como fosfoinosítido es el más abundante de ellos. A pesar de su pequeña abundancia regula numerosos procesos celulares especialmente de señalización celular, uniéndose a distintos dominios de una gran diversidad de proteínas (McLaughlin & Murray, 2005; Stephens et al., 1993).

Inicialmente se creía que este lípido era únicamente el sustrato de dos enzimas: fosfolipasa C (PLC) que lo escindía para generar inositol (1,4,5)-trisfosfato (IP₃) y DAG, y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) que producía fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PIP₃). Con el paso de los años se ha visto que es un segundo mensajero clave de muchas proteínas y eventos celulares, como por ejemplo la adhesión celular, regulación del citoesqueleto (Ling et al., 2007), y en la función cerebral regulando la función de los canales iónicos estabilizando el receptor de dopamina (Hamilton et al., 2014), el transportador de serotonina humano (Anderluh et al., 2017), siendo su papel muy importante en el control de la exocitosis y endocitosis de vesículas sinápticas (Czech, 2000). Por ejemplo, participa en el paso previo a la fusión de vesículas, cuando las vesículas se están preparando para el proceso de exocitosis, dado que ratones *knockout* para PI(4)P quinasa, presentaban una disminución de vesículas *dense-core* preparadas para liberarse (Gong et al., 2005). Además la sobreexpresión de esta enzima provoca un aumento de la secreción vesicular (Milosevic et al., 2005)

El modo de interacción de este lípido con sus proteínas diana es muy dispar, presentando distintos niveles de afinidad y especificidad dependiendo de la proteína. Interacciona con muchas proteínas entre las que se encuentran la familia de proteínas WASP, GAP-43, CAP23, MARCKS (Lemmon, 2003).

También proteínas que presentan dominios C2, PH, ENTH, ANTH (Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2010; Lemmon, 2008). No obstante, aunque no exista un único motivo estructural de interacción, el modo de interacción es generalmente electrostático, involucrando a un grupo de residuos básicos que coordinan interacciones electrostáticas con las cargas negativas de los fosfatos del PIP₂ (McLaughlin et al., 2002).

El PIP₂ parece acumularse a lo largo de la membrana plasmática en microdominios. Un estudio realizado por microscopía de super-resolución STORM determinó que estos dominios enriquecidos con PIP₂ eran de un tamaño aproximado de 64 nm (Wang & Richards, 2012).

El sitio de unión del PIP₂ a los dominios C2 ha sido completamente caracterizado por nuestro grupo de investigación. Se trata de un clúster de lisinas localizados en las hebras β3 y β4 del dominio (Guerrero-Valero et al., 2009; Guillen et al., 2013). Este fosfoinosítido es importante para la localización en la membrana de las proteínas que contienen dominios C2 sensibles a PIP₂ (Marín-Vicente et al., 2008). Aunque el dominio C2 puede unirse al PIP₂ sin la necesidad de Ca²⁺, su afinidad esta potenciada por Ca²⁺ (Sánchez-Bautista et al., 2006), y es muy necesario para la exocitosis de vesículas actuando junto a proteínas con dominios C2 sensibles a Ca²⁺ como Doc2, Munc13, Rabfilina3A, Sinaptotagmina 1, además también se ha caracterizado que la proteína SNARE Sintaxina1 es capaz de unirse PIP₂ (Martin, 2015).

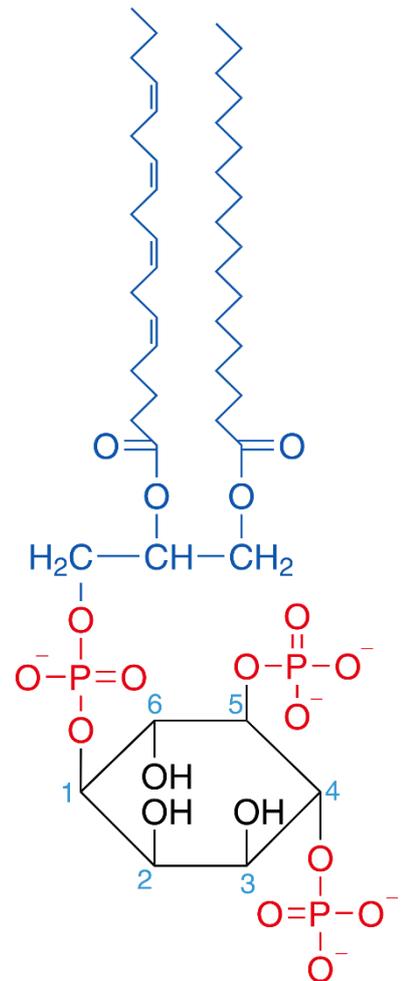


Figura. 1.18. Representación de la estructura del PIP₂.

I.3.2.2. Diacilglicerol (DAG)

El diacilglicerol (DAG) es un lípido simple que consiste en una molécula de glicerol unida a través de dos enlaces éster a dos ácidos grasos (Figura. I.19). Presenta dos funciones: como intermediario en el metabolismo y como segundo mensajero de diversas rutas de señalización (Wakelam, 1998). Hay numerosas enzimas que controlan los niveles de DAG en las membranas eucarióticas (Hodgkin et al., 1998). Se genera principalmente debido de la activación dependiente de receptores de la fosfolipasa C (PLC) que lo genera hidrolizando el PIP₂ a DAG y IP₃ (Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2006; Pettitt et al., 1997).

Se descubrieron como segundos mensajeros de la familia de las proteínas quinasas C (PKC), especialmente de las PKCs clásicas y nuevas como la PKC ϵ (Huang, 1989). Este lípido es detectado a través del dominio C1 permitiendo que las proteínas se transloquen a la membrana. Para que este dominio interaccione con DAG debe de contener la siguiente secuencia consenso de 50 aminoácidos: HX₁₁₋₁₂CX₂CX₁₂₋₁₄CX₂CX₄HX₂CX₆₋₇C (Hall et al., 2005).

El DAG tiene numerosas otras funciones, como fuente de prostaglandinas (Sakai et al., 2004), activador de la subfamilia de canales catiónicos TRPC (Soboloff et al., 2007). Además de activar a las PKCs, hay otras seis familias de proteínas que contienen dominios C1 y responden a este lípido como la familia de Munc13, proteínas liberadoras de guanilo Ras (RasGRP), proteínas quimerinas del tejido nervioso, proteína quinasa D (PKD), la MRCK serin/treonin proteína quinasa y las DAG quinasas β y γ (Gómez-Fernández & Corbalán-García, 2007; Yang & Kazanietz, 2003).

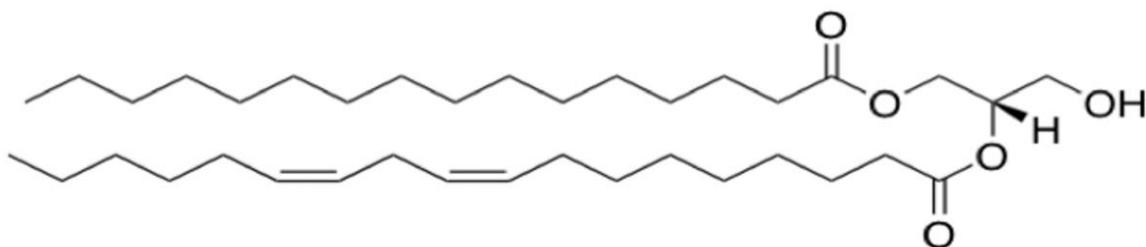


Figura. I.19. Representación de la estructura del DAG.

I.3.2.3. Ácido fosfatídico (PA)

El ácido fosfatídico (PA) es similar al DAG, con la diferencia que el tercer grupo hidroxilo libre del glicerol se encuentra esterificado con un grupo fosfato (Figura. I.20). Es una molécula ácida con dos cargas negativas siendo un importante lípido aniónico que actúa como intermediario de la biosíntesis de triacilglicerol y fosfolípidos, pero también como molécula señalizadora (Lambeth & Ryu, 1996). Se ha visto implicado en la proliferación celular, diferenciación y carcinogénesis. También parece regular el tráfico vesicular, como la exocitosis y formación de vesículas. Eventos que modula translocando proteínas como quinasas, fosfatasa y proteínas G a la membrana (Deo et al., 2004; Kim & Wang, 2020).

Su síntesis ocurre principalmente por la activación de la PLD, la cual hidroliza fosfatidilcolina para producir PA y colina (Jang et al., 2012). A su vez puede ser convertido en DAG por la enzima fosfatidil ácido fosfatasa (PPA), esta reacción puede ser revertida por la quinasa (DGK) (Fantini & Yahi, 2015).

Muchos estudios han determinado que el dominio C2 de la PKC α , favorece el anclaje de la proteína a la membrana a través de la unión al PA mediante un clúster rico en lisinas (Ochoa et al., 2002), del mismo modo parece interactuar con el dominio C2 de la PKC ϵ (Jose Lopez-Andreo et al., 2003), aunque como se verá en el capítulo VI.3.1 parece tener un papel más relevante el dominio C1.

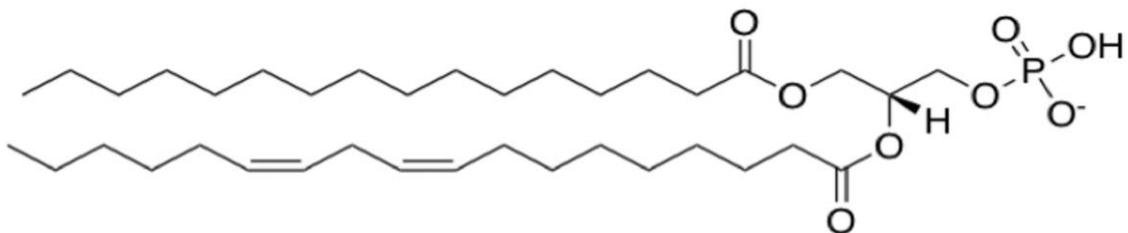


Figura. I.20. Representación de la estructura del ácido fosfatídico.

I.4. Objetivos

Trabajos previos del laboratorio de biomembranas han caracterizado a nivel biofísico la estructura y especificidad de Rabfilina3A por ligandos como el Ca^{2+} , el PIP_2 (Guillen et al., 2013), incluso por proteínas como SNAP25 (Ferrer-Orta et al., 2017). Además, se determinó que $\text{PKC}\epsilon$ es mucho más sensible a PA que otras isoenzimas de PKC (Egea-Jiménez et al., 2014; Jose Lopez-Andreo et al., 2003). Para tratar de entender el papel de estas proteínas *in vivo* e ir un paso más allá hacia su comprensión en un modelo biológico se propusieron los siguientes objetivos:

1. Determinar las interacciones que ocurren entre Rabfilina3A y el complejo SNARE en un modelo de célula viva.
2. Identificar el papel de la interacción Rabfilina3A-SNAP25 en cultivos celulares.
3. Descubrir nuevas proteínas moduladoras de la función de Rabfilina3A en diferentes modelos biológicos.
4. Estudiar la influencia del PA sobre la fusión de vesículas secretoras.
5. Determinar proteínas fosforiladas por $\text{PKC}\epsilon$ bajo la influencia del PA.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Construcción de vectores plasmídicos

Los genes estudiados en esta tesis doctoral se obtuvieron de la línea celular de estudio PC12. En primer lugar, se extrae el ARN y a partir de él, se sintetiza el ADNc para clonarlo en los respectivos plásmidos y realizar mutagénesis dirigida si fuera necesario. No obstante, otros plásmidos se compraron en Addgene como la versión humana de STIM1 (Addgene #87619), Rabfilina3A, la biotinilasa BioID2 (Addgene #74223), el fragmento N-terminal (Addgene #27097) y C-terminal (Addgene#22011) de la proteína fluorescente mVenus y posteriormente se clonaron las secuencias en los plásmidos correspondientes. Las secuencias de PKC fueron cedidas por los Drs. Nishizuka y Ono, y el mutante de PKC ϵ fue realizado por el Dr. Antonio Egea.

Tabla II.1 Plásmidos creados y utilizados en esta tesis doctoral.

Nuevo plásmido creado	Plásmido de origen	Etiqueta	Posición de la etiqueta
PKCϵ-WT-EGFP	pEGFP-C1	eGFP	N-terminal
Rph3A-WT-HA	pCGN	HA	N-terminal
Rph3A-WT-CFP	pECFP-C1	CFP	N-terminal
SNAP25-WT-YFP	pEYFP-N1	YFP	C-terminal
BioID2-SNAP25	myc-BioID2-MCS	Myc-BioID2	N-terminal
BioID2-STIM1	myc-BioID2-MCS	Myc-BioID2	N-terminal
BioID2-Tcp1111	myc-BioID2-MCS	Myc-BioID2	N-terminal
BioID2-Rph3A	myc-BioID2-MCS	Myc-BioID2	N-terminal
Rph3A-VN155	VN155	N-terminal of mVenus	C-terminal
VN155-Rph3A	VN155	N-terminal of mVenus	N-terminal
SNAP25-VN155	VN155	N-terminal of mVenus	C-terminal
SNAP25-VC155	VC155	C-terminal of mVenus	C-terminal
Tcp1111-VC155	VC155	C-terminal of mVenus	C-terminal
Zwint-VC155	VC155	C-terminal of mVenus	C-terminal
Rab27-VC155	VC155	C-terminal of mVenus	C-terminal
bFos-VC155	VC155	C-terminal of mVenus	C-terminal
bJun-VN155	VN155	N-terminal of mVenus	C-terminal
bFosDelZip-VC155	VC155	C-terminal of mVenus	C-terminal

II.1.1. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN de las células PC12, se usa el kit comercial de purificación de ARN por columnas llamado EXTRACTME TOTAL RNA KIT de la marca comercial Blirt (Polonia). Se cultivan 10 millones de células y se recogen lavando previamente con tampón fosfato salino (PBS), finalmente se siguen los pasos meticulosamente del kit comercial hasta obtener el ARN total purificado.

II.1.2. Síntesis de ADNc

La síntesis de los genes se lleva a cabo realizando la transcripción inversa del ARNm extraído de las células PC12 a ADNc. Para ello se usa el kit comercial NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYtech, Portugal), siguiendo las instrucciones suministradas por la casa comercial. Básicamente contiene una transcriptasa inversa, junto a una mezcla de hexámeros aleatorios de oligonucleótidos que hibridan con distintas regiones del ARN purificado, y oligonucleótidos poliT que hibridan con el extremo 3' de la cadena de poliA del ARNm. Esto permite la síntesis de la primera cadena de ADNc, posteriormente se realiza un tratamiento con RNAsa H para degradar el ARN molde.

II.1.3. Amplificación de genes por PCR

La amplificación de los genes de interés se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando un termociclador. Se utiliza la polimerasa DNA AmpliTools Master Mix 2x (Biotools, Madrid). Se diseña el programa del termociclador según las instrucciones del fabricante, y la temperatura de *melting* de los oligonucleótidos. La Master Mix 2x es una mezcla doblemente concentrada que contiene la polimerasa DNA Taq, los desoxinucleótidos y el tampón de reacción, a falta de añadir 15-30 ng de ADNc, y los oligonucleótidos *forward* y *reverse* a una concentración final de 0.5 μ M. Los oligonucleótidos fueron diseñados y comprados en Integrated DNA Technologies (Iowa, USA) con una longitud de hibridación mínima de 20 nucleótidos, teniendo en cuenta la región codificante del inicio y final del gen de rata a amplificar,

depositado en la base de datos del *European Nucleotide Archive (ENA)* del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI).

Tabla II.2. Cebadores utilizados para la amplificación de secuencias y su posterior ensamblaje. En color las regiones que hibridan con los plásmidos en los que se quiere introducir la secuencia. Con fondo amarillo los oligonucleótidos que se usaron para introducir mutaciones, marcadas en rojo las bases mutadas para lograr la mutagénesis dirigida.

Nombre cebador	Secuencia (5'-3')	Aplicación
hRPH3A-BiFC-F	CTT ATG GCC ATG GAG GCC CGA ACT GAC ACC GTG TTC AGC A	Clonar Rph3A en VC155
hRPH3A-BiFC-R	GGT ACC TCG AGA GAT CTC GGT ATC ACT TGA CAC GTG GT	
BiFC-SNAP25-F	CTT ATG GCC ATG GAG GCC CGA GCC GAG GAC GCA GAC ATG CGT AA	Clonar SNAP25 en VC155
BiFC-SNAP25-R	GGT ACC TCG AGA GAT CTC GGT ACC ACT TCC CAG CAT CTT TGT TG	
BiFC-Rab27a-F	CTT ATG GCC ATG GAG GCC CGA TCG GAT GGA GAT TAT GAC TAC CT	Clonar Rab27 en VC155
BiFC-Rab27a-R	GGT ACC TCG AGA GAT CTC GGT ACA GCC GCA TAA CCC CTT CTC CT	
BiFC-Cops6-F	CTT ATG GCC ATG GAG GCC CGA GAA AGG GGC GGG CCG TGG CTG GC	Clonar Cops6 en VC155
BiFC-Cops6-R	GGT ACC TCG AGA GAT CTC GGT GAA AAA CAG TCC CCG CAT CCG CC	
BiFC-Zwint-F	CTT ATG GCC ATG GAG GCC CGA GCG GAC GCG GAG AAA AAC GCT GT	Clonar Zwint en VC155
BiFC-Zwint-R	GGT ACC TCG AGA GAT CTC GGT CGG AGA CTT GGG TGG AAG GGC GGG	
BiFC-STIM1-F	CTT ATG GCC ATG GAG GCC CGA GAT GTG TGC GCT CGT CTT GCC CT	Clonar STIM1 en VC155
BiFC-STIM1-R	GGT ACC TCG AGA GAT CTC GGT CTT CTT AAG AGG CTT CTT AAA AA	
BiFC-Tcp111l-F	CTT ATG GCC ATG GAG GCC CGA TCT GAA AAC CTT GAC AAG TCC CA	Clonar Tcp111l en VC155
BiFC-Tcp111l-R	GGT ACC TCG AGA GAT CTC GGT GGA GCG GAG GAG GAG CTT ACT GA	
STIM1-BiolD2-F	CAC CAC ACT GGA CTA GTG GAT CCG GAT GTG TGC GCT CGT CTT GCC CTG	Clonar STIM1 en BiolD2
STIM1-BiolD2-R	ATC AGC GGT TTA AAC TTA AGC TTT CAC TTC TTA AGA GGC TTC TTA AA	
Tcp111l-BiolD2-F	CAC CAC ACT GGA CTA GTG GAT CCG TCT GAA AAC CTT GAC AAG TCC CA	Clonar Tcp111l en BiolD2
Tcp111l-BiolD2-R	ATC AGC GGT TTA AAC TTA AGC TTT CAG GAG CGG AGG AGG AGC TTA CTG A	
SNAP25-BiolD2-F	CAC CAC ACT GGA CTA GTG GAT CCG GCC GAG GAC GCA GAC ATG CGT AA	Clonar SNAP25 en BiolD2
SNAP25-BiolD2-R	ATC AGC GGT TTA AAC TTA AGC TTT CAA CCA CTT CCC AGC ATC TTT GTT G	
CFPRph3A-F	TTC TGC AGT CGA CCG TAC CGA ACT GAC ACC GTG TTC AGC A	Clonar Rph3A en CFP
CFPRph3A-R	GGT ATG GCT GAT TAT GAA TC ACT TGA CAC GTG GT	
YFPSNAP25-F	TGC AGC TCA AGC TTC GAA TTC GCC GAG GAC GCA GAC ATG CGT AA	Clonar SNAP25 en YFP
YFPSNAP25-R	GGT GGA TCC CGG GCC CGC GGT ACC ACT TCC CAG CAT CTT TG	
pCGNRph3A-F	AGC CTG GGA GGA CCT TCT AGA ATG ACT GAC ACC GTG TTC AGC	Clonar Rph3A junto a pCGN (HA)
pcGNRph3A-R	TTC TCA GGA TCC TCA ATC ACT TGA CAC GTG GTT	
ampliVN+Rph3A-F	TCT CAG AGG AGG ACC TGC TTA TGG TGA GCA AGG GCG AGG A	Amplificar VN
ampliVN+Rph3A-R	TAC TCC CGC CAC CTC CGC TCC CGC CAC CTC CGG CGG TGA GAT AGA CGT TG	
VN+amplirRph3A-F	GGA GGT GGC GGG AGC GGA GGT GGC GGG AGT ATG GCC ATG GAG GCC CG	Amplificar Rph3A
VN-amplirRph3A-R	GTC TGG ATC CCC GCG GCC GCT CAG TCG CTC GAC ACG TGG TTC TC	
Vector-VN-F	TGA GCG GCC GCG GGG ATC CAG ACA TGA TAA GAT ACA TTG ATG A	Amplificar Vector
Vector-VN-R	TCC TCG CCC TTG CTC ACC ATA AGC AGG TCC TCC TCT GAG A	
MutSNAP-E38D41R45A-F	CAA CTG GTT GAA GCG AGT AAA GCT GCT GGT ATC GCG ACT TTG GTT ATG	Mutación SNAP25
MutSNAP-E38D41R45A-R	CAT AAC CAA AGT GCG GAT ACC AGC AGC TTT ACT GCG TTC AAC CAG TTG	
MutRph3A-H627A-F	TTC TAT GAC ATC AAA GCC AGT GAC CTG GCA AAG AAG TCA	Mutación Rph3A H627A
MutRph3A-H627A-R	TGA CTT CTT TGC CAG GTC ACT GCC TTT GAT GTC ATA GAA	
MutR-K661K666K673A-F	TCT GCC GCG GGA GAG CGC TTA GCA CAC TGG TAC GAG TGT CTG GCA AAT AAA GAC	Mutación Rph3A K661A/K666A/K673A
MutR-K661K666K673A-R	GTC TTT ATT TGC CAG ACA CTC GTA CCA GTG TGC TAA GCG CTC TCC CGC GGC AGA	

II.1.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para la verificación y purificación de fragmentos de ADN se realiza una electroforesis en gel de agarosa. Se preparan geles horizontales de agarosa de porcentaje entre 0.5% - 1.3%, dependiendo del tamaño del fragmento a analizar. Para ello se pesa la agarosa y se disuelve en tampón TAE 1x que contiene 40 mM de Tris, 40 mM de acetato y 1 mM de EDTA a pH 8.0. La disolución se lleva

a ebullición en un microondas hasta su completa disolución. Para la visualización con luz ultravioleta de los fragmentos de ADN se añade la tinción SERVA DNA Stain G a una dilución 1:50000 a la agarosa caliente tras su disolución en el microondas, y siempre antes de que ocurra la polimerización al enfriarse. El marcador de peso molecular de ADN utilizado es GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Scientific, USA). El ADN se carga en el gel mezclado con tampón de carga que contiene azul de bromofenol 0.25 % (p/v), glicerol 30% (v/v), Tris 0.5 mM pH 8.0, la electroforesis se lleva a cabo a un voltaje de 160 voltios durante 40 minutos.

En el caso de purificación de fragmentos se usa una agarosa de bajo punto de fusión (NZYtech, Portugal), la banda de interés se recorta con un bisturí y se purifica usando el kit comercial NZY GelPure (NZYtech, Portugal).

II.1.5. Reacción de ensamblaje *Gibson Assembly*

La creación de los plásmidos utilizados en este trabajo se lleva a cabo mediante el método de clonación molecular *Gibson Assembly* creado por Daniel G. Gibson (Gibson et al., 2009). Este método permite el ensamblaje de varios fragmentos de ADN que presentan extremos solapantes de unos 20 pares de bases, los cuales se añaden previamente mediante una PCR (Figura. II.1).

El gen que se desea insertar en un plásmido debe amplificarse por PCR con oligonucleótidos diseñados con extremos solapantes a la zona del fragmento con el que se quiere unir o con el plásmido en el que se quiere insertar. El esqueleto del plásmido se debe cortar con dos enzimas de restricción diferentes para evitar la autoligación, o amplificar la región mediante PCR.

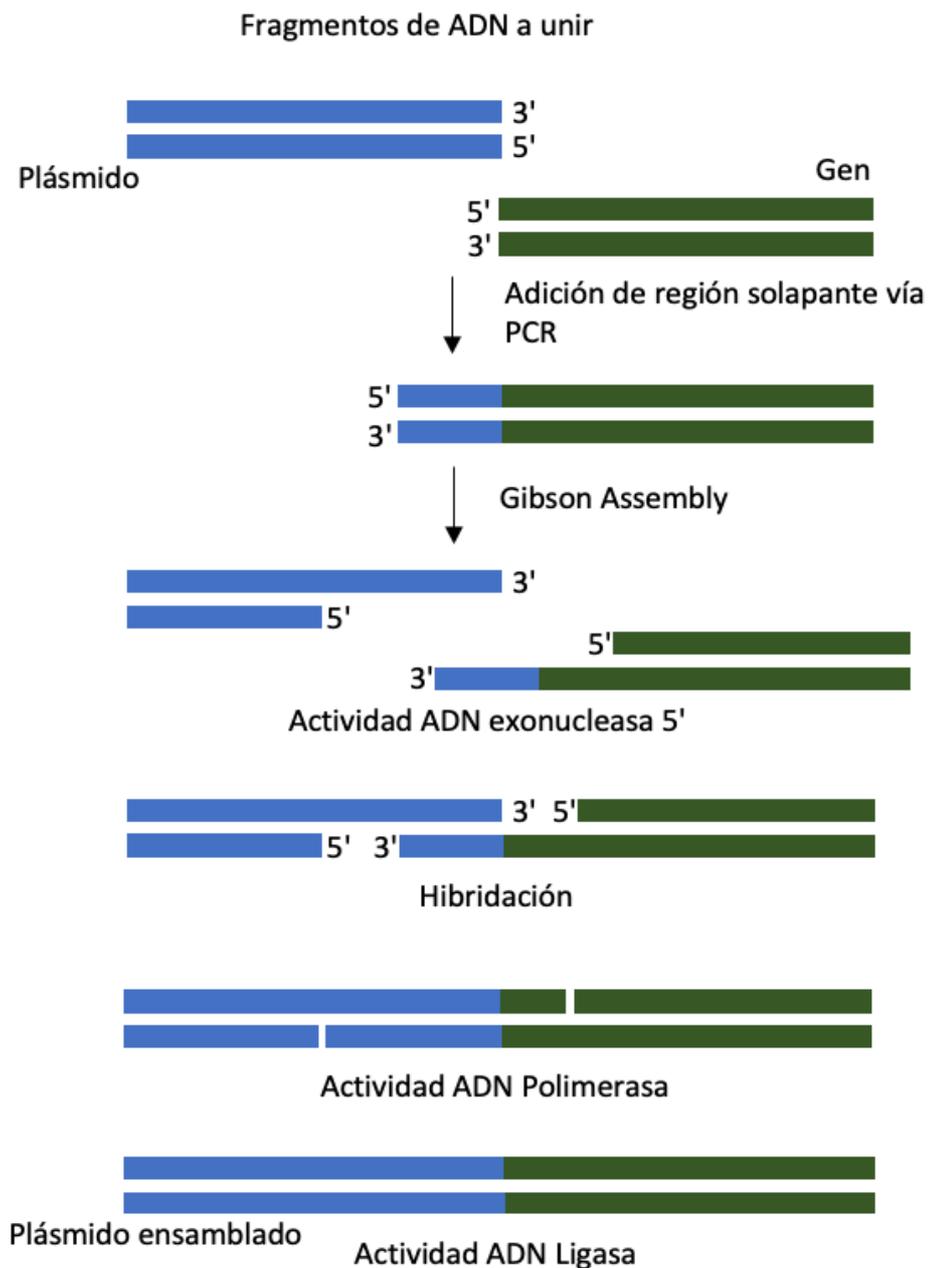


Figura. II.1. Reacción de Gibson Assembly. Imagen modificada de Gibson et al., 2009 y de <https://international.neb.com/>.

La reacción consiste en mezclar los fragmentos en proporciones equimoleculares (0.05 picomoles de cada fragmento), e incubar durante una hora a 50°C. En la reacción isotérmica tienen lugar tres actividades enzimáticas (Figura. II.1):

- Actividad exonucleasa T5: elimina nucleótidos del extremo 5' de cada cadena. Esto permite crear extremos cohesivos de una sola cadena que

pueden hibridar con el fragmento a unir al ser solapantes. La T5 exonucleasa es termolábil y se inactiva al tiempo de la incubación a 50°C.

- Actividad ADN polimerasa: incorpora los nucleótidos por el extremo 3' al hibridar con el otro fragmento. Esta actividad no es inhibida por la actividad exonucleasa 5' porque añade nucleótidos por el extremo 3'.
- Actividad ADN ligasa: liga covalentemente la mella que queda entre los dos fragmentos unidos.

El resultado es un producto con los diferentes fragmentos unidos en uno, en nuestro caso el gen de interés insertado dentro del plásmido (Figura. II.1). Este método permite construir distintas construcciones de forma personalizable, siempre y cuando se tengan las secuencias que se quieren construir, y las secuencias que solapen sean totalmente distintas unas de otras. Con esta técnica se pueden unir hasta 5 fragmentos distintos de una sola vez, y generalmente la tasa de clones positivos es superior al 80%, además permite realizar también mutagénesis dirigida.

II.1.6. Mutagénesis dirigida

Para mutar las regiones de interés de los genes extraídos o comprados, en concreto de Rabfilina3A y de SNAP25 (Tabla II.3), se utiliza la misma reacción de ensamblaje de *Gibson Assembly*. Dada la versatilidad de este método se pueden obtener mutantes de regiones distantes en una única reacción. Previamente, se crean distintos fragmentos de PCR del gen a amplificar, insertando las mutaciones en la región solapante mediante oligonucleótidos que contengan la mutación que se desea. Para ello se diseñan oligonucleótidos conteniendo la mutación, y otros para amplificar el fragmento deseado, y posteriormente se ensamblan con la reacción de Gibson (Figura. II.2).

Este método es bastante versátil, y ofrece una tasa de mutantes positivos superior al 80%, dado que el mutante se crea únicamente si ocurre el ensamblaje de los fragmentos de PCR a utilizar en el proceso de clonación. Además permite introducir grandes deleciones, o inserciones así como introducir mutaciones que estén alejadas al menos a una distancia mínima de 200 nucleótidos, de una única vez.

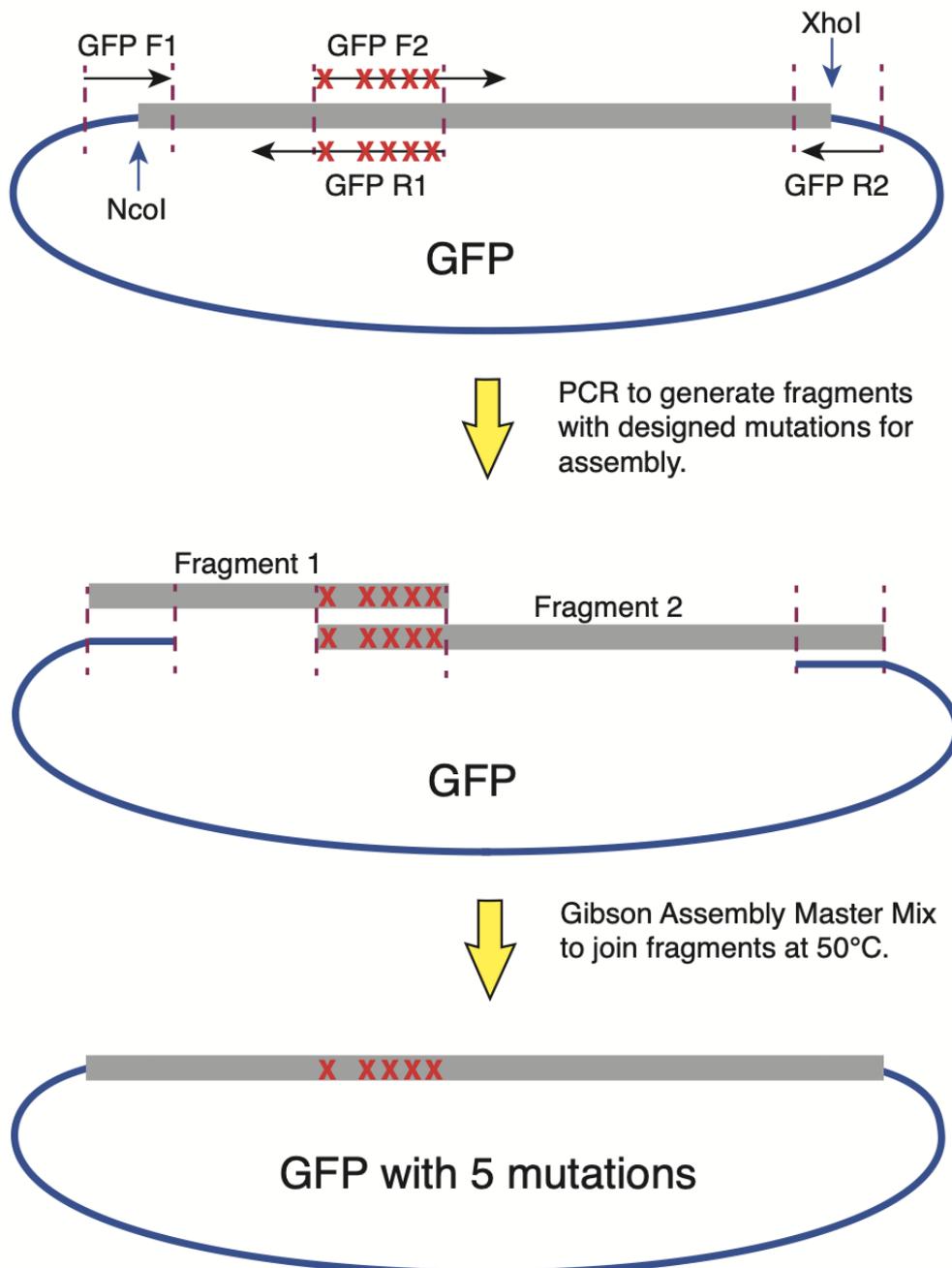


Figura. 11.2. Mutagénesis dirigida mediante Gibson Assembly. Imagen tomada de Application Note methods for site directed mutagenesis using Gibson Assembly.

Tabla II.3. Mutantes utilizados.

NOMBRE DEL MUTANTE	MUTACIONES
Rpha3A-M3	K661A/K666A/K673A/H627A
Rph3A-LRC1	K445/R447
Rph3A-LRC2	K603/K605
Rph3A-LRC3	K445/R447/K603/K605
SNAP25-M1	E38A/D41A/R45A
PKC ϵ -4MUT	K251A/R268A/R282A/R283A

II.1.7. Transformación de las construcciones plasmídicas

Una vez realizadas las reacciones de ensamblaje con el objetivo de amplificar los distintos vectores creados, se procede a realizar una transformación bacteriana, y posteriormente una amplificación de la bacteria transformada seleccionada por antibiótico en cultivo líquido.

La transformación bacteriana es un fenómeno en el que las bacterias incorporan por absorción directa un material genético exógeno. En nuestro caso, se usa la cepa DH10B de *E.coli* químicamente competente de la casa comercial Invitrogen, llamadas *MAX Efficiency DH10B Competent Cells*. Estas bacterias han sido tratadas con cloruro de calcio que permite que sean químicamente competentes de manera artificial. Este tratamiento permite la incorporación de un ADN circular foráneo al ser incubadas en hielo durante 30 minutos, y recibir un choque térmico de 42°C durante 45 segundos, posteriormente se incuban 2 minutos en hielo y a continuación se dejan durante 1 hora a 37°C en agitación a 200 rpm con medio *Super Optimal broth with Catabolites repression (SOC)* para su recuperación. En último lugar se siembran en una placa Petri con el antibiótico correspondiente dependiendo del marcador de selección del plásmido transformado.

II.1.8. Amplificación y producción de ADN plasmídico

Para la amplificación y producción del ADN plasmídico, se pone en cultivo una colonia en medio *Lysogeny broth* (LB) y se deja creciendo a 37°C en agitación a 225 rpm durante 16 horas. A la mañana siguiente se peletizan las bacterias por centrifugación, y se procede a lisarlas para captar y purificar el ADN plasmídico mediante columnas comerciales de sílice por adsorción a ella. Estas columnas permiten la purificación de ácidos nucleicos (ADN y ARN indistintamente). Si se va a realizar una purificación exclusiva del ADN plasmídico, se ejecuta una lisis alcalina rápida de las bacterias en alta concentración de sal, permitiendo sólo el superenrollamiento del ADN plasmídico y no el ADN genómico bacteriano que precipita en el paso de centrifugación, junto a los desechos celulares al estar anclado a la pared bacteriana. El ARN es eliminado mediante la adición de RNAasas. Dependiendo de la cantidad de ADN plasmídico que se desea purificar y su calidad, se utilizan distintos kits comerciales: *NZYMiniprep* para amplificación a pequeña escala, y *NZYMaxiprep Endotoxin free* para amplificación de ADN en alta concentración y libres de endotoxinas para transfectar células de mamífero, ambos kits son de la casa comercial NZYtech.

II.2. Cultivo de líneas celulares

II.2.1. Línea celular PC12

La línea celular PC12 procede de un feocromocitoma de células cromafines de la médula adrenal de rata (Greene & Tischler, 1976). Se utiliza frecuentemente en investigación en neurociencias, especialmente en estudios de neurosecreción, y diferenciación neuronal. Bajo condiciones de crecimiento normal, las células presentan una morfología y fenotipo de célula adrenal (Figura. II.3). Es ampliamente empleada en estudios de neurosecreción y exocitosis, dado que presenta un gran número de vesículas pequeñas y también grandes vesículas *dense-core* que contienen catecolaminas. Además, tiene la capacidad de experimentar una diferenciación celular hacia un fenotipo neuronal similar al de las neuronas de los nervios simpáticos, con la adición de factor de

crecimiento neuronal (NGF) (Figura. II.4) (Westerink & Ewing, 2008). Esta línea celular se obtuvo del Servicio de Cultivo de Tejidos del Área Científica y Técnica de Investigación de la Universidad de Murcia (ACTI).

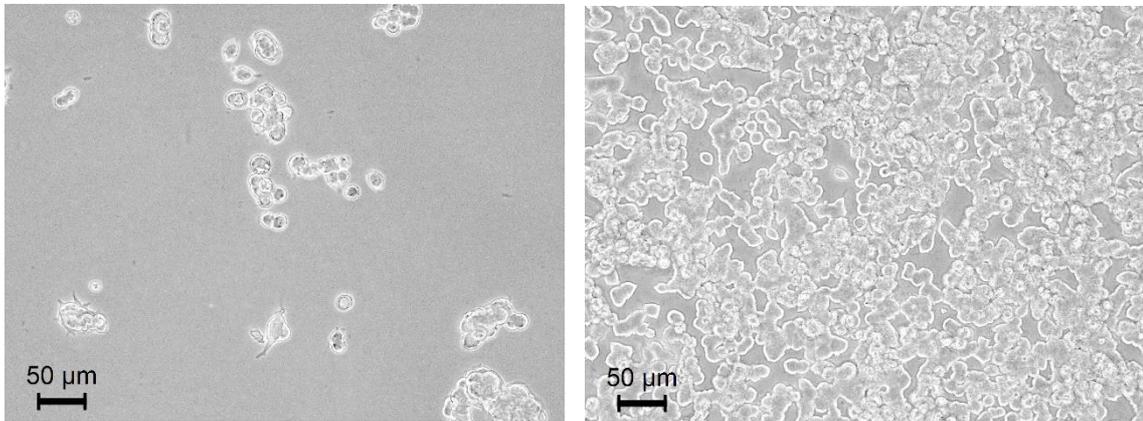


Figura. II.3. Morfología y fenotipo de las células PC12. A la izquierda células en baja densidad tras realizar un subcultivo. A la derecha células en alta densidad.

II.2.1.1. Método y medio de cultivo de la línea celular PC12

Las células se mantienen en frascos de 75 cm² dentro de una incubadora humidificada y termostaticada a 37°C, con 7,5% de CO₂, inmersas en 10 mL de medio basal Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sin rojo fenol con 4500 mg/L de glucosa (Sigma-aldrich, USA), suplementado con 10% (v/v) de suero de caballo (HS) (Gibco, USA), 5% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) (Biowest, USA), 2 mM de L-glutamina y 1 mM de piruvato sódico.

Las células se siembran en frascos a una densidad de 10.000 células/cm², se les cambia el medio a las 72 horas, y alcanzan la confluencia a los 5 días aproximadamente, obteniendo alrededor de 10 millones de células. En este momento, se subcultivan las células despegándolas del frasco mediante separación mecánica usando un raspador, se centrifugan a 200 g durante 5 minutos, y se resuspenden suavemente en medio de cultivo para volverlas a sembrar en un nuevo frasco.

II.2.1.2. Transfección de la línea celular PC12

Para la expresión de los genes de las construcciones plasmídicas en la línea celular PC12, se transfectan las células mediante el método de liposomas catiónicos. Este método se basa en la interacción electrostática entre los liposomas catiónicos y las cargas negativas del ADN, luego estos liposomas se fusionan con la membrana plasmática de la célula permitiendo la entrada del material genético en el citosol. Se usa el reactivo comercial de liposomas llamado Lipofectamin LTX with Plus reagent (Invitrogen, USA).

En la Tabla II.4, se encuentran las cantidades de Lipofectamina LTX dependiendo de la superficie de la placa utilizada. El día antes de la transfección se siembran las células en medio completo, a una densidad de 20.000 células/cm². Al día siguiente, se hace la mezcla lípido-ADN: diluyendo el ADN en DMEM (en caso de doble transfección se divide la cantidad de ADN), y añadiendo el reactivo Plus Reagent a una ratio 1:1, y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añade la Lipofectamin LTX y se incuba 25 minutos a temperatura ambiente para que se formen los complejos. Finalmente se elimina el medio de cultivo de las células, se reemplaza por medio nuevo, y se añade la mezcla confeccionada para que se produzca la transfección celular. A las 24-48 horas se expresa el gen transfectado.

Tabla II.4. Cantidades de ADN y Lipofectamina para transfectar células PC12.

Superficie de la placa	Volumen de DMEM mezcla lípido-DNA	ADN	Plus Reagent	Lipofectamin LTX Reagent
0.3 cm ²	10 µL	0.1 µg	0.1 µL	0.15 µL
1 cm ²	20 µL	0.5 µg	0.5 µL	0.3 µL
10 cm ²	200 µL	2.5 µg	2.5 µL	4 µL
21.5 cm ²	400 µL	6 µg	6 µL	9 µL

II.2.1.3. Generación de líneas transfectadas estables

La eficacia de transfección mediante Lipofectamina en células no suele ser superior al 20%, y además es transitoria. No obstante, un bajo número de células pueden llegar a integrar el plásmido en su genoma, y expresar los genes del plásmido de manera estable y constitutiva. Para poder seleccionar las células que han integrado el plásmido en el genoma se usan genes de resistencia a antibióticos que incluyen los plásmidos, todos los plásmidos utilizados en esta tesis doctoral tenían el gen de resistencia a neomicina y G418, llamado NeoR. Se utilizó el antibiótico estructuralmente relacionado con la gentamicina llamado Geneticin (G418). Este antibiótico es tóxico para bacterias, levaduras, células de mamíferos y plantas, al inhibir la síntesis proteica y bloquear el paso de elongación al unirse a la subunidad ribosomal 16S. Se seleccionaron las células transfectadas con el plásmido myc-BioID2 que integraron dicho plásmido, gracias a que posee el gen marcador de selección de resistencia a G418 (NeoR) que codifica la aminoglicósido 3' fosfotransferasa del transposón Tn5. Esta enzima inactiva el antibiótico permitiendo seleccionar a las células que han integrado el plásmido en su genoma, añadiendo el antibiótico durante varios días.

A los tres días de la transfección, se añaden 400 µg/mL de G418, y se mantienen durante al menos tres semanas. A los pocos días las células empiezan a morir, se cambia el medio con antibiótico cada dos días para ir retirando las células muertas. A los 7 días se traspasan todas las células vivas que han quedado a una placa más pequeña, y se continúa con la selección con G418 durante 14 días más, hasta que se observa la aparición de colonias de células resistentes al antibiótico. De esta manera mediante la adición del antibiótico obtendremos un cultivo uniforme donde todas las células que sobrevivan expresan nuestro gen de interés.

II.2.1.4. Diferenciación neuronal de células PC12

Para la diferenciación de las células PC12 hacia un fenotipo neuronal (Figura. II.4), se siembran las células PC12 a una densidad celular de 8000 células/cm² sobre una superficie pretratada previamente con poly-L-ornitina al 0.005% (0.005 mg/mL) durante una hora a 37°C. La poly-L-ornitina es usada para el agarre y diferenciación de células neuronales. Al día siguiente de la siembra, se cambia el medio por un medio de diferenciación que consiste en el mismo medio que el de crecimiento, pero con la cantidad de suero a la mitad (5% HS y 2.5% FBS) suplementado con 50 ng/mL de NGF. Este medio se cambia cada 24 horas, durante tres días, para obtener una máxima

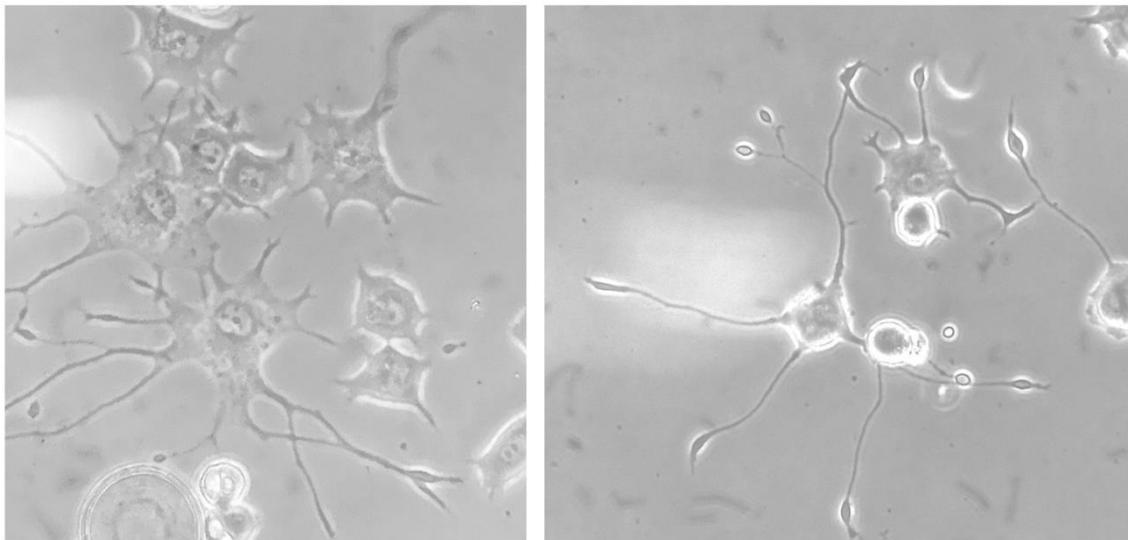


Figura. II.4. Células PC12 con fenotipo neuronal. A la izquierda células con un fenotipo neuronal con dendritas, a la derecha células con grandes axones.

diferenciación.

II.2.1.5. Lisis celular de PC12

Para la extracción de proteínas de las células PC12 se usan dos métodos de lisis distintos dependiendo del tipo de experimento a realizar:

- Para la detección de proteínas de membrana y citosólicas para analizar mediante *Western-blot*, se resuspenden las células en hielo a una concentración de 5.000 células/ μ L en tampón de lisis 50 mM Tris pH 7.5, con 150 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 1% de Tritón X-100, inhibidor de

proteasas, e inhibidor de fosfatasa. Las células se pasan por una aguja de calibre 26G^{1/2}, moviendo arriba y abajo 10 veces para romperlas por cavitación, y se dejan 10 minutos en hielo. A continuación, se centrifugan 20 minutos a 20.000g a 4°C, y se recupera el sobrenadante.

- Para la captura de proteínas mediante resina de estreptavidina, las células se resuspenden en hielo a una concentración de 10.000 células/ μ L en tampón RIPA que contiene: 150 mM de NaCl, 0.1 % SDS, 0.5% sodio-desoxicolato, 1% Tritón X-100, e inhibidor de proteasas tamponado con 50 mM de Tris pH 7.4. Las células se someten a 15 ciclos de sonicación, 30 segundos encendido, y 30 segundos apagado en un baño a 4°C. A continuación, el lisado se clarifica por centrifugación 20 minutos a 20.000g a 4°C.

II.2.2. Línea celular RBL-2H3

Las células RBL-2H3 (*Rat Basophilic Leukemia 2H3*) son una línea celular aislada de sangre de ratas Wistar que presentaban una leucemia basofílica (Figura. II.5). Estas células tienen una morfología similar a los fibroblastos y han sido ampliamente usadas como modelo para estudios de secreción, incluyendo cambios en el Ca²⁺ intracelular, activación de fosfolipasas, proteínas quinasas y pequeñas proteínas G, pero en especial en fenómenos asociados con la alergia, dado que expresan abundantemente el receptor Fc ϵ RI (Fc de IgE) que presenta

ATCC Number: CRL-2256
Designation: RBL-2H3

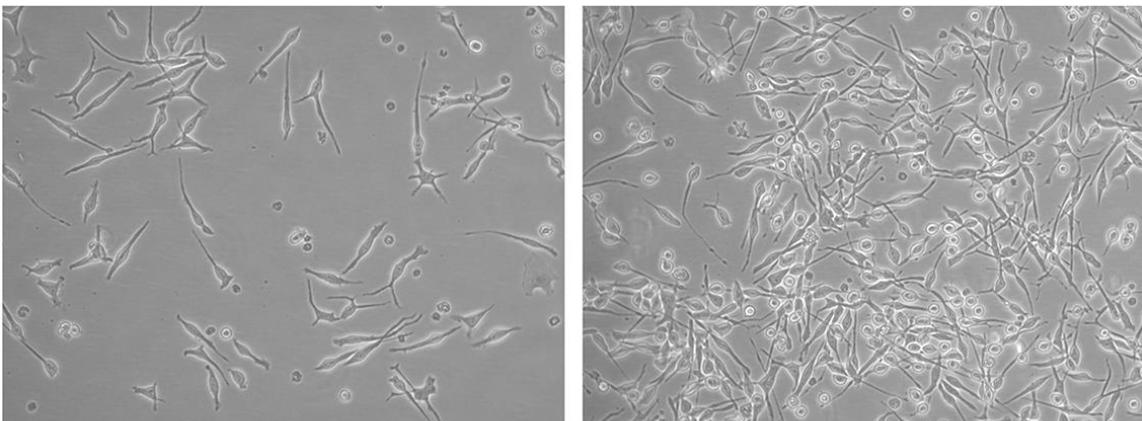


Figura. II.5. Morfología y fenotipo de células RBL-2H3. A la izquierda células en baja densidad tras ser subcultivadas. A la derecha células a punto de alcanzar el 90% de confluencia. Imagen de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

alta afinidad por la inmunoglobulina E (IgE), y puede ser activado añadiendo IgE y su antígeno desencadenando la liberación de histamina y otros mediadores de la alergia (Falcone et al., 2018).

II.2.2.1. Método y medio de cultivo de la línea RBL-2H3

Las células se descongelan a 37°C en un baño de agua al sacarse el vial del tanque de nitrógeno líquido con aproximadamente 4 millones de células. Se ponen en medio de cultivo en un frasco ventilado de 75 cm² para células adherentes, dentro de una estufa humidificada a 37°C con 7,5% de CO₂. El medio de cultivo consiste en DMEM con 4,5 g/L de glucosa, 1 mM de piruvato y 4 mM de L-glutamina suplementado con 15% (v/v) de FBS.

Estas células tienen una alta tasa de duplicación, si sembramos a una densidad de 5000 células/cm² alcanza la confluencia a las 72 horas, obteniendo aproximadamente 15 millones de células por frasco. Es recomendable cambiar el medio a las 48 horas. Para realizar un subcultivo, las células se despegan del frasco usando un raspador, se pasan a un falcom y se centrifugan a 200g durante 5 minutos. Después se elimina el sobrenadante para eliminar las células muertas y se resuspenden en medio nuevo para disgregarlas, finalmente se cuentan y se siembran en un nuevo frasco.

II.2.2.2. Transfección de la línea celular RBL-2H3

La línea celular RBL-2H3 se puede transfectar mediante electroporación. Para proceder a la electroporación, las células tienen que estar en un estado excepcional, estando casi en confluencia dado que es un proceso agresivo. Se cogen 5 millones de células y se resuspenden en 400 µL de tampón de electroporación compuesto por: 120 mM de NaCl, 25 mM de glucosa, 5.5 mM de KCl, 2.8 mM de MgCl₂, tamponado con 20 mM de Hepes pH 7.2. Se añaden 15 µg de DNA, y se introducen en la cubeta de electroporación de 0.4 cm de ancho. A continuación, se introducen en el electroporador para proceder al electroshock usando el equipo Gene Pulser X cell (BioRad, USA). Se programa el equipo con el método de onda exponencial a 250V y 960 µF. Justo después del electroshock

se incuban 5 minutos en hielo. Finalmente se siembran en frascos y se incuban a 37°C en su estufa humidificada. A las 6 horas se cambia el medio para eliminar las células que no han sobrevivido al proceso. Para proceder a la selección de los clones transfectados mediante G418, a los dos días se añade el antibiótico G418 a 700 mg/mL y se ponen en cultivo con medio con antibiótico durante al menos tres semanas, hasta obtener colonias individuales.

II.2.2.3. Estimulación con PA y DAG

Las células se siembran en placas de cultivo de 9 cm de diámetro a una densidad de 50.000 células/cm² (3.000.000 de células), y se dejan 36-48 horas en cultivo. La estimulación se realiza con 4 mg/mL de DAG (1,2-Dioctanoylglycerol) y 5 mg/mL de PA (1,2-dioctanoyl-*sn*-phosphatidic acid) diluido en buffer HBS que contiene 120 mM de NaCl, 25 mM de glucosa, 5.5 mM de KCl, 1.8 mM de CaCl₂, y 1 mM de MgCl₂, tamponado con 20 mM Hepes pH 7.2, incubando las células durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, dependiendo si se realiza el experimento de la β-hexosaminidasa se sigue su procedimiento, y si se realiza un *western-blot* rápidamente se raspan y centrifugan las células 3 minutos a 200g, se les retira el sobrenadante, y se añade tampón de lisis para congelar apresuradamente con nitrógeno líquido, finalmente se guardan a -80°C hasta el día en el que se procediera a la lisis celular.

II.2.2.4. Lisis celular de RBL-2H3

Las células RBL-2H3 se lisan para proceder al análisis de sus proteínas en *Western-blot*. Las células se descongelan a una concentración aproximada de 50.000 células/μL en hielo en tampón de lisis que contiene: 150 mM de NaCl, 1% NP-40, 10% glicerol, suplementado con inhibidor de proteasas e inhibidor de fosfatasa, tamponado con 50 mM Tris pH 7.4. La mezcla de lisado celular se pasa por una aguja de 26G^{1/2}, 10 veces arriba y abajo para disgregar el lisado completamente. Posteriormente se centrifuga para clarificar a 20.000g durante 15 minutos a 4°C, y se recoge el sobrenadante que contendrá las proteínas y se deshecha el pellet.

II.3. Ensayo de la β -hexosaminidasa

El ensayo de la β -hexosaminidasa tiene como objetivo la cuantificación de la liberación de β -hexosaminidasa al espacio extracelular en un intervalo de tiempo, el resultado se correlaciona como exocitosis vesicular. La enzima β -hexosaminidasa (EC 3.2.1.52) es una enzima que se encuentra en los lisosomas y rompe el enlace β -glicosídico terminal de los residuos N-acetilglucosamina y la N-acetilgalactosamina de un gran número de glicoconjugados. La exocitosis de β -hexosaminidasa es un marcador de liberación vesicular. Usando el sustrato para 4-nitrofenil N-acetil β -D-galactosaminida (p-NAG), la enzima lo romperá liberando 4-nitrofenol que es un compuesto coloreado amarillo que puede ser medido por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 405 nm.

Para ello, se siembran 10.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos, y se dejan creciendo durante toda la noche. Al día siguiente se elimina el medio de cultivo y se lavan las células con tampón de Tyrode que contiene 135 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1.8 mM de CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM de glucosa y 1 mg/mL de BSA tamponado con 20 mM de Hepes a pH 7.4. A continuación se añade al agente estimulador, en nuestro caso DAG y PA, y se deja incubar durante 1 hora a 37°C. A continuación, se traspasa el sobrenadante a una nueva placa, y se lisan las células con 1% de Tritón X-100 para saber la cantidad de β -hexosaminidasa que queda en el interior celular. Para medir la cantidad de β -hexosaminidasa liberada, se cogen 100 μ L de sobrenadante y se mezclan con 100 μ L del sustrato p-NAG a 1 mM diluido en 0.1 M citrato buffer a pH 4.5, se incuba la reacción durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, la reacción se detiene adicionando 0.2 M de glicina a pH 10.7, y se mide la reacción que ha tenido lugar midiendo la absorbancia a 405 nm en el lector de placas FLUOstar Omega (BMG Labtech, Alemania).

II.4. Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos

Para la detección y cuantificación cuantitativa de la presencia de determinadas proteínas en los lisados celulares se usa la técnica de *Western-blot* (Towbin et al., 1979), y para la captación de la localización de las proteínas

endógenas o sobreexpresadas mediante microscopía confocal se realizan inmunofluorescencias o citometría de flujo

II.4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Las proteínas se separan en función de su tamaño en un gel mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Esta técnica permite la separación de una mezcla de proteínas en función de su tamaño e independientemente de su carga gracias a las condiciones desnaturizantes aportadas por el detergente SDS, siguiendo el método desarrollado por Laemmli (Laemmli, 1970). Se usan los equipos de electroforesis de Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell. Los geles de poliacrilamida-SDS se preparan en el laboratorio utilizando una mezcla de acrilamida-bisacrilamida dependiendo del porcentaje de gel a utilizar, disuelta en tampón Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, y 0.1% de SDS, en el caso del gel separador, y disuelta en tampón Tris-HCl 0.130 M pH 6.8 y 0.1% de SDS para el gel concentrador. Como agente polimerizante de la solución de acrilamida-bisacrilamida se usa persulfato amónico (PSA) a 0.1% (p/v), y como catalizador se usa N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) a 0.1% (v/v). El tampón de electroforesis contiene 192 mM de glicina y 0.1% SDS tamponado con 25 mM Tris-Base que no se ajusta el pH porque se queda a 8.3.

Las muestras se diluyen en tampón de Laemmli 5x quedando a una concentración final de 1% de SDS, 5% (v/v) de glicerol, 0.0003% (p/v) de azul de bromofenol tamponado con 40 mM de Tris, pH 6.8. Las muestras se calientan a 95°C durante 5 minutos antes de cargarlas en el gel para conseguir la completa desnaturización de las proteínas. El marcador de peso molecular utilizado es PageRuler Prestained Protein Ladder de ThermoScientific. La electroforesis se realiza a 100 V durante 10 minutos hasta que pase el gel concentrador y 55 minutos a 160 V.

II.4.2. Electrotransferencia de gel de poliacrilamida (*Western-blot*)

Las proteínas separadas en geles de poliacrilamida se transfieren a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m de tamaño de poro (Amersham Protran

0.45 NC de Cytiva). Para ello se utiliza el sistema de transferencia semiseco de Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™ Blotting System en tampón de transferencia, que contiene buffer comercial de transferencia NuPAGE de Invitrogen y metanol al 10% (v/v). La transferencia se realiza a 1.2 amperios y 25 voltios durante 25 minutos.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se bloquea la membrana con BSA al 2% (p/v) en Tris-Buffered Solution with Tween-20 (TBST) que contiene 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) de Tween-20, tamponado con 20 mM de Tris-HCl pH 7.5, durante 2 horas en ligera agitación. A continuación, se añade el anticuerpo primario diluido con 2% (p/v) de BSA en TBST, y se incuba durante 16 horas a 4°C. La dilución del anticuerpo depende de cada anticuerpo y tiene que ser testada empíricamente.

II.4.3. Revelado de la membrana de nitrocelulosa (*Western-blot*)

Como continuación del *Western-blot*, la membrana incubada toda la noche con el anticuerpo primario se lava aplicando tres lavados consecutivos de 10 minutos en agitación con TBST. A continuación, la membrana se incuba durante una hora a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en tampón TBST con 2% (p/v) de BSA. El tipo de anticuerpo secundario depende de la especie de origen del anticuerpo primario utilizado, y el revelado depende de si está conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante o con un marcador fluorescente. Posteriormente, se aplican cuatro lavados de 5 minutos en agitación con TBST para eliminar el exceso de anticuerpo no unido. Finalmente, la membrana se revela y la proteína se localiza en la membrana mediante quimioluminiscencia en caso de añadir anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano picante o fluorescencia en caso de ser marcado con un fluorocromo.

Para detección por quimioluminiscencia, se incuba 2 minutos con el reactivo ECL WesternBright Quantum HRP substrate de la marca Advantisa, en el equipo Amersham Imager 680 provisto de una cámara CCD ubicado en el

servicio de Análisis de Imagen del ACTI. El anticuerpo secundario esta conjugado con peroxidasa de rábano picante, la cual cataliza la oxidación de luminol a 3-aminofalato presente en el reactivo ECL generando una señal quimioluminiscencia, siendo captada a distintos tiempos de exposición. Posteriormente, las bandas pueden ser cuantificadas cuantitativamente mediante densitometría. En cambio, si se usa un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo se revela directamente en el mismo equipo mediante la cámara de fluorescencia.

II.4.4. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína presente en los lisados celulares se determina mediante el método colorimétrico de ácido bicinonínico (BCA) descrito por (Smith et al., 1985). El método consiste en la conocida reacción de Biuret donde se produce la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} en medio alcalino con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso utilizando el ácido bicinonínico. Para ello se usa el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit. En el ensayo se realiza una recta de calibrado con concentraciones crecientes conocidas de BSA. En una placa de 96 pocillos se añaden 25 μL de cada muestra problema por duplicado, diluida 5 veces, y también duplicado de la recta de calibrado. A continuación, se hace una mezcla del reactivo A que contiene el BCA con el reactivo B que contiene sulfato cúprico a una proporción 50:1, y se añaden 200 μL a cada pocillo. Se incuba 30 minutos a 37°C y se mide la absorbancia a 562 nm en un lector de placas. De esta forma se puede correlacionar la concentración conocida de proteína de la recta patrón con la absorbancia detectada de las muestras problemas, y determinar la concentración de proteína de cada muestra.

II.4.5. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica que permite la tinción de proteínas o moléculas particulares mediante anticuerpos específicos. Para ello las células PC12 se siembran sobre un cristal previamente tratado con poly-L-ornitina a 0.0005% para que se adhieran, a una densidad de 20.000 células/ cm^2 . A las 24

horas, las células se lavan tres veces con PBS y posteriormente se fijan con formaldehído al 2% en PBS durante 10 minutos, y se realizan tres lavados con PBS de 5 minutos. A continuación, se procede a la permeabilización de las células con 0.1% (v/v) de Tritón X-100 en PBS durante 10 minutos y se lava una vez con PBS. Consecutivamente, se añade la solución de bloqueo *Image-iT-Fx signal enhancer* de Invitrogen durante 30 minutos. El siguiente paso consiste en incubar las células con el anticuerpo primario correspondiente durante 1 hora a 37°C diluido en 1% de BSA y 0.15% de saponina diluida en PBS. Posteriormente se lava tres veces con PBS para eliminar el anticuerpo sobrante. A continuación, se vuelve a bloquear con BSA al 1% en PBS durante 20 minutos. El penúltimo paso consiste en incubar durante 1 hora en oscuridad con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la sonda fluorescente deseada, para permitir la visualización de la proteína de interés en el microscopio confocal. Finalmente se procede a lavar tres veces con PBS y a montar el cristal sobre un porta añadiendo solución de montaje *DAPI-Prolong Gold antifade reagent* de Invitrogen. Todos los pasos son realizados a temperatura ambiente salvo que se indique expresamente. La muestra puede almacenarse a 4°C y a la mañana siguiente se sella el cristal al porta con laca de uñas, permitiendo su almacenaje a -20°C hasta proceder a su visualización.

II.5. Ensayo de ligación por proximidad in situ (PLA)

El ensayo de ligación por proximidad (PLA) es un método para identificar interacciones proteína-proteína (PPI) *in situ* en células fijadas (Weibrecht et al., 2010). La técnica permite identificar si dos proteínas se encuentran físicamente cerca, y sólo se genera una señal si las dos proteínas se encuentran a menos de 40 nm. Se sigue el protocolo del kit Duolink® Orange PLA in situ (Sigma-Aldrich, DUO92102), y se utilizan los reactivos suministrados

El ensayo se realiza con células PC12, se siembran en cristales de 1 cm², y se fijan con 4% p-formaldehído en PBS durante 10 minutos, tras tres lavados consecutivos con PBS durante 5 minutos. En este paso las células fijadas y lavadas pueden ser guardadas si fuera necesario durante 48 horas a 4°C. Salvo

que se diga lo contrario todos los pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente. El día de realizar la reacción, se procede a la permeabilización con 0.1% de Tritón X-100 diluido en PBS durante 10 minutos, y se lava con PBS. A continuación, las células se bloquean con 1% BSA en PBS durante 30 minutos, para disminuir las interacciones inespecíficas.

A partir de este momento comienza el ensayo de ligación por proximidad. En primer lugar, se añaden sobre el cristal los anticuerpos primarios para los que se desea realizar el ensayo diluidos en 1% de BSA y 0.15% de saponina, y se incuban una hora a 37°C, en una cámara de humedad. En segundo lugar, tras la incubación con el anticuerpo primario del paso anterior, se lava con PBS tres veces. Posteriormente se vuelve a bloquear con 1% BSA en PBS durante 20 minutos, se añaden los anticuerpos secundarios modificados con oligonucleótidos llamados PLA PROBES (AbMinus y AbPLUS) diluidos 1:4 en el tampón anteriormente utilizado para los anticuerpos primarios, y se incuban a 37°C durante una hora (Figura. II.6a). En tercer lugar, se realizan dos lavados con tampón de lavado A durante 5 minutos, se añade la ligasa para proceder a la ligación (Figura. II.6b) y se incuba durante 1 hora a 37°C, posteriormente se procede a lavar con tampón de lavado A dos veces durante 2 minutos. En cuarto lugar, se realiza la amplificación de la señal mediante la técnica de amplificación de círculo rodante añadiendo la polimerasa del kit a una dilución 1:80, junto a la polimerasa van los oligonucleótidos marcados fluorescentemente y se incuba en oscuridad durante 1 hora a 37°C (Figura. II.6c y d). Posteriormente, se realizan

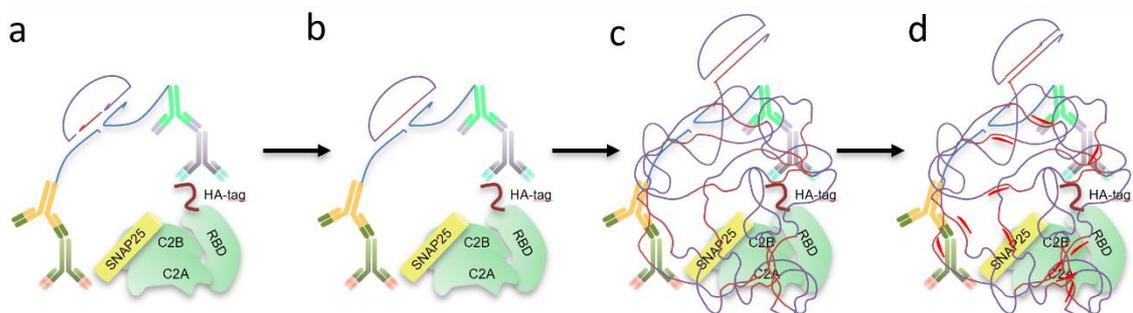


Figura. II.6. Esquema del ensayo de ligación por proximidad (PLA). **A)** Unión de los anticuerpos primarios y los anticuerpos secundarios PLA PROBES (modificados con oligonucleótidos) y otros oligonucleótidos para formar bucle un bucle abierto. **B)** Adición de la ligasa que une los oligonucleótidos que forman el bucle abierto y lo cierran. **C)** Adición de la polimerasa que realiza una amplificación por círculo rodante (RCA) tomando un oligonucleótido de un anticuerpo secundario. **D)** Adición de oligonucleótidos conjugados con sondas fluorescente (Cy3) para poder visualizarlos.

dos lavados con tampón B durante 10 minutos cada uno. Finalmente, tras realizar la reacción de PLA, se procede a inmunotear las proteínas de interés, para ello se lava con tampón de lavado A y se realiza el protocolo de inmunofluorescencia del epígrafe II.4.5 desde la incubación con anticuerpos primarios.

II.6. Anticuerpos utilizados

Tabla II.5. Anticuerpos primarios utilizados. IF: Inmunofluorescencia, WB: Western-blot, CF: citometría de flujo.

Anticuerpo	Referencia	Dilución	Especie
Anti-VAMP2	SYSY104202 (SynapticSystems)	IF: 1:100	Conejo
Anti-STX1A	SYSY110302 (SynapticSystems)	IF: 1:50	Conejo
Anti-Sinaptotagmina1	SYSY105003 (SynapticSystems)	IF: 1:50	Conejo
Anti-SNAP25	ab41455 (Abcam)	IF: 1:200	Conejo
Anti-HA	sc-7392 (SantaCruz)	IF: 1:200	Ratón
Anti-RPH3A	ab59259 (Abcam)	WB: 1:500	Conejo
Anti-myc	ab9106 (Abcam)	WB: 1:2000	Conejo
Anti-myc	16286-1-AP (Proteintech)	WB: 1:4000, IF: 1:100, CF: 1:100	Conejo
Anti-GAPDH	60004-1-Ig (Proteintech)	WB: 1:5000	Ratón
Anti-GAPDH	Ab9485 (Abcam)	WB: 1:2000	Conejo
Anti-STIM1	11565-1-AP (Proteintech)	WB: 1:500	Conejo
Anti-SNAP23	10825-1-AP (Proteintech)	WB: 1:500	Conejo
Anti-VAMP8	ab76021 (Abcam)	WB: 1:2000	Conejo
Anti-STX4	14988-1-AP (Proteintech)	WB: 1:500	Conejo
Anti-CyclinE2	11935-1-AP(Proteintech)	WB: 1:1000	Conejo
Anti-BioID2	ab232733 (Abcam)	WB: 1:1000, IF: 1:200	Ratón

Tabla II.6 Anticuerpos secundarios utilizados. IF: Inmunofluorescencia, WB: Western-blot

Anticuerpo	Referencia	Dilución	Conjugado
Anti-IgG de conejo	ab150081	IF: 1:2000	Alexa Flúor 488
Estreptavidina	Ab7403	WB: 1:40000	Peroxidasa de rábano picante
Anti-IgG de ratón	ab150117	IF: 1:2000, WB: 1:4000	Alexa Flúor 488
Anti- IgG de conejo	ab150083	IF: 1:2000, WB: 1:4000, CF: 1:2000	Alexa Flúor 647
Anti-IgG de ratón	Ab5887	WB: 1:5000	Peroxidasa de rábano picante
Anti-IgG de conejo	Ab6112	WB: 1:5000	Peroxidasa de rábano picante

II.7. BioID2: Estudio proteómico por marcaje dependiente de proximidad.

Las actividades biológicas de la célula son principalmente ejecutadas por proteínas, y en numerosas ocasiones son llevadas a cabo por complejos proteicos asociados o PPI. Para la identificación de PPI se realizó un estudio de marcaje dependiente de proximidad, donde se expresa la proteína de interés fusionada a una enzima que cataliza el marcaje con una molécula a proteínas cercanas a nuestra proteína de interés, de una manera dependiente de la distancia a la que se encuentra (Cheerathodi & Meckes, 2020).

En esta tesis doctoral se utiliza el método BioID2, Identificación de proximidad dependiente de biotina mejorado por *Kyle J. Roux* (Kim et al., 2016). La técnica permite la identificación de proteínas cercanas a una proteína de estudio mediante la construcción de una proteína fusionada a una biotinilasa, que es una enzima que produce el marcaje de biotina a otras proteínas. Esta técnica permite el estudio del historial de proteínas que han interactuado tanto de forma transitoria como estable con una proteína de estudio (cebo), dado que la suplementación por biotina se realiza durante unas 18 horas. Estos

investigadores mejoraron la técnica, utilizando una biotilasa BirA más pequeña, que requiere menos suplementación de biotina que la versión silvestre y la llamaron BioID2, mejorando la eficiencia en la búsqueda de PPI mediante el posterior aislamiento e identificación de proteínas biotiniladas mediante espectrometría de masas.

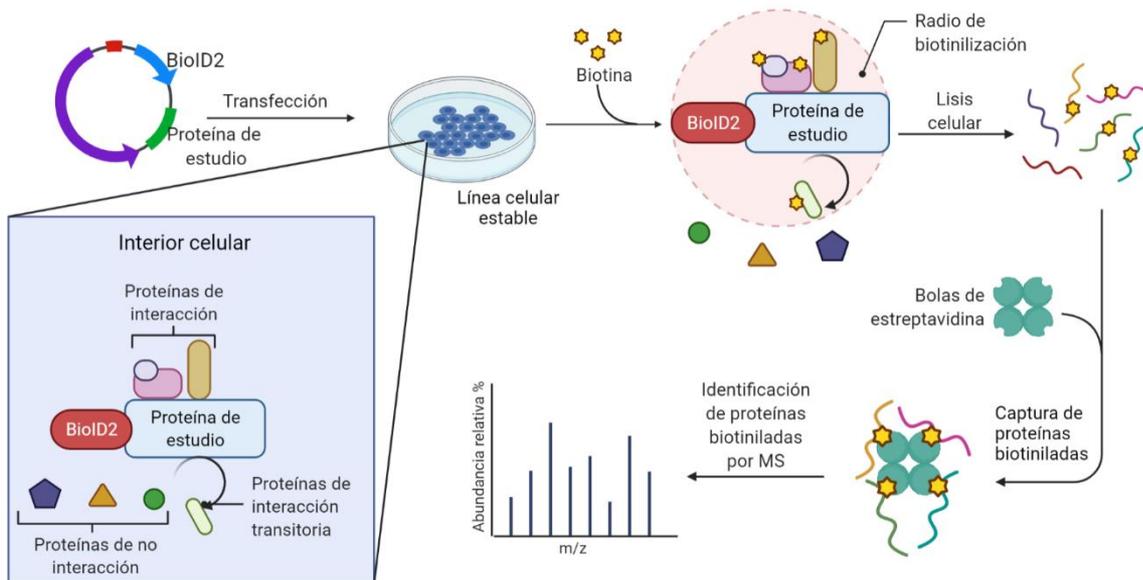


Figura. II.7. Técnica BioID2. Esquema del funcionamiento y flujo de trabajo del ensayo BioID. Se genera una línea estable transfectada con el plásmido que expresa la BioID2 fusionada a la proteína de estudio, al suplementar con biotina el cultivo, las proteínas cercanas a la proteína de fusión serán biotiniladas. Se aíslan y se capturan las proteínas biotiniladas y finalmente se digieren y se identifican por espectrometría de masas. Figura modificada de Cheerathodi & Meckes, 2020.

II.7.1. Captura y aislamiento de proteínas biotiniladas

Las construcciones plasmídicas que contenían la proteína de interés junto a la biotilasa BioID2 se construyeron mediante el método de *Gibson Assembly* (epígrafe Capítulo II). Los plásmidos se expresan en células PC12, y se generan líneas estables que expresan estas construcciones de forma constitutiva. Para inducir el marcaje con biotina de las proteínas, las células son incubadas durante 16 horas con 50 μ M de biotina, y lisadas según el epígrafe II.2.1.5.

500 μ g de proteína del lisado celular se incuban con 150 μ L de Streptavidin Sepharose-beads High Performance de Cytiva durante toda la noche a 4°C en agitación para proceder a la captación de las proteínas

biotiniladas. Posteriormente, la resina se centrifuga 2 minutos a 1000g y se lava 5 veces con RIPA buffer, 5 veces con 1 M de KCl en H₂O, 5 veces con 0.1 M de Na₂CO₃ en H₂O, 5 veces con 2 M urea en 10 mM Tris pH 8, y 5 veces con 50 mM NH₄HCO₃. Finalmente, la resina se resuspende en 200 µL de 50 mM NH₄HCO₃ para realizar la digestión de las proteínas biotiniladas capturadas.

II.7.2. Digestión de las proteínas biotiniladas capturadas

La interacción biotina-estreptavidina es una de las interacciones no covalentes más fuertes que se conocen en la naturaleza, con una $K_d = 10^{-14}$ M. Esta interacción se mantiene incluso en condiciones extremas de pH, temperatura, agentes desnaturalizantes, y detergentes. Para liberar las proteínas capturadas se realiza una digestión con tripsina sobre la resina. Previamente la muestra de 200 µL de resina es reducida, añadiendo 4 µL de 0.2 M de DTT durante 25 minutos a 56°C. La reacción se enfría a temperatura ambiente, y se somete a una alquilación añadiendo 8 µL de 0.2 M yodoacetamida a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos.

Antes de la digestión con tripsina se realiza una digestión con la endoproteinasa Lys-C. Esta enzima es una serin endoproteinasa que rompe el enlace peptídico por el lado carboxílico de las lisinas independientemente del aminoácido que hay a continuación. Esto ayuda a que la digestión de las proteínas se produzca en todos los residuos de lisina, dado que la tripsina corta el enlace peptídico por el lado carboxílico de las lisinas y las argininas, pero tiene una mayor preferencia por las argininas. La proteasa Lys-C se añade a la muestra a una proporción 1:200 (2.5 µg de Lys-C por cada 500 µg de proteína) durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se añade tripsina de pureza apropiada para espectrometría de masas a una proporción 1:100 durante toda la noche a 37°C en agitación a 700 rpm. Los péptidos resultantes cortados en Lys y Arg se recuperan de las bolitas por centrifugación, luego se acidifican con ácido trifluoroacético al 0,5%. Los péptidos trípticos se secan en una centrifuga de vacío y se reconstituyen en ácido fórmico al 0,1%. Finalmente, los péptidos se

desalan mediante una columna en fase reversa y se transfieren a un nuevo tubo para ser analizados por el equipo de UHPLC-MS.

II.8. Detección de proteínas mediante espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica de análisis ultrasensible que permite la identificación de sustancias analizando la relación carga masa de las moléculas problemas. Esta técnica ha progresado considerablemente gracias al desarrollo de distintas modificaciones de equipos, y técnicas acopladas al espectrómetro de masas, que han facilitado que su ámbito de aplicación sea muy extenso. La técnica permite realizar desde estudios físicos, análisis químicos e incluso en el campo de la biología analizando todo tipo de moléculas y macromoléculas como proteínas, lípidos, azúcares o ácidos nucleicos. En los últimos años se ha convertido en una herramienta imprescindible para la biología molecular y la proteómica. La técnica también permite la identificación de modificaciones postraduccionales de las proteínas como fosforilaciones, glicosilaciones, muy importantes en la función y regulación de las proteínas.

La proteómica tiene como objetivo el análisis profundo de las proteínas presentes en muestras biológicas, así como sus modificaciones. Por ello utiliza principalmente la espectrometría de masas como herramienta para su estudio. Es de las únicas técnicas actuales que permite escrutar en la gran complejidad que hay dentro de una célula, y detectar en un único experimento miles de proteínas diferentes. Las mejoras que han permitido este avance han sido el desarrollo de sistemas nanocapilares de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC), conectados con el sistema de espectrometría de masas equipado con un analizador de masas de tipo Orbitrap™ (Savaryn et al., 2016).

II.8.1. Cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC)

Tras la digestión trípica, los péptidos generados se separan por UHPLC. En primer lugar, los péptidos se cargan en una pequeña columna de 2 cm de longitud de fabricación casera (Dr Maisch Reprosil C18, 3 μm , 2 cm \times 100 μm), donde los péptidos quedan atrapados permitiendo que los contaminantes,

tampón y otros compuestos que no interesan sean eliminados. A continuación, comienza un gradiente de acetonitrilo (ACN), y los péptidos pasan a una columna analítica C18 de fase reversa de 50 cm de longitud (Agilent Poroshell EC-C18, 2.7 μm , 50 cm \times 75 μm). Se utiliza el equipo de altas prestaciones Agilent 1290 Infinity con una bomba binaria. El ciclo de cada muestra es de 85 minutos. Se inyecta la muestra durante 5 minutos a una tasa de flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ en tampón A (100% + 0.1% ácido fórmico), posteriormente se cambia el flujo a 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, sin embargo, con un *splitter* de flujo (1:600) se consigue un flujo pasivo de 300 nl/min , con un gradiente consistente de 0-13% B (80% ACN/ 20% agua + 0.1% ácido fórmico) en 6 segundos, 13-44% en 65 minutos, de 44-100% en 5 minutos, finalmente se vuelven a las condiciones iniciales de 100% A durante 10 minutos para inyectar una nueva muestra. Esta técnica permite que los péptidos vayan eluyendo de la columna del UHPLC según su hidrofobicidad, y finalmente pasan a ionizarse mediante la técnica de electroespray (ESI) para entrar en el circuito del espectrómetro de masas.

Los péptidos eluyentes se ionizan al ser introducidos en una fuente de ionización a presión atmosférica (API-ESI). Se forma un aerosol de péptidos con la ayuda de la aplicación de un alto voltaje positivo a presión atmosférica al salir del capilar del cromatógrafo junto a la aplicación de energía térmica. Esto provoca una pulverización y dispersión de los péptidos generando un aerosol de iones positivos al ser desolvatados, donde progresivamente el solvente de las gotitas que transportan los péptidos se va evaporando, dejando cada vez más cargadas las gotitas hasta que exceden el límite de Rayleigh dejando un haz de iones que entran al espectrómetro. El voltaje aplicado en la fuente de ionización fue de 1.9 kV y la temperatura del capilar 275°C.

II.8.2. Espectrometría de masas (MS)

El espectrómetro de masas utilizado para la identificación de los péptidos trípticos fue un Orbitrap™ Exploris 480 (Thermo Scientific, USA) del grupo de espectrometría de masas y proteómica del Profesor Albert Heck, localizado en el Centro Bijvoet para la Investigación Biomolecular de la Universidad de Utrecht

en Países Bajos. Respecto a los componentes del equipo, presenta un cuadrupolo segmentado que permite la selección de iones precursores con un alto rendimiento, una trampa iónica curva (C-trap) para inyectar y dirigir los iones, una celda de disociación inducida por colisión (HCD) para fragmentar los iones seleccionados, y un analizador de masas de tipo Orbitrap™ (Scheltema et al., 2014). Todos estos dispositivos se encuentran en condiciones de ultra alto vacío para tener la mínima influencia de las moléculas del ambiente mediante el uso de bombas de vacío que mantiene el interior del equipo a una presión inferior a $1\text{e-}09$ mBar (Figura. II.8).

Respecto al funcionamiento, los iones desolvatados provenientes de la fuente de ionización entran al espectrómetro a través de un tubo de transferencia de alta capacidad (HCTT). Pasan al embudo de iones electrodinámico donde son enfocados para pasar por un tubo doblado llamado *Advanced Active Beam Guide* (AABG) cuya misión es dirigir los iones cargados y eliminar los neutros al chocar en las paredes, de este modo reducimos el ruido (Figura. II.8). Posteriormente los iones pasan el filtro de masas cuadrupolo, la misión de este dispositivo es seleccionar los iones con una determinada masa y eliminar el resto, este dispositivo está en funcionamiento cuando estamos realizando un análisis MS^2 seleccionando un ion determinado, cuando realizamos un full MS este dispositivo deja pasar todos los iones. El dispositivo consiste en cuatro varas metálicas cilíndricas dispuestas exactamente en paralelo entre ellas. Cada par de varas opuestas se conectan entre si eléctricamente y se aplica una diferencia de voltaje por radiofrecuencia. Esto provoca que a un determinado voltaje de radiofrecuencia sólo los iones que presentan una determinada relación masa/carga llegan al final del cuadrupolo, debido a que tienen una trayectoria más estable mientras oscilan en el campo eléctrico, mientras que los otros iones con diferente masa/carga tendrán trayectorias inestables y chocarán con las barras y serán eliminados. Este dispositivo es capaz de seleccionar casi instantáneamente iones de una determinada masa, permitiendo que estos atraviesen el dispositivo, y los de mayor o menor masa no lo atraviesen, de este modo variando continuamente el voltaje aplicado se va seleccionando un rango

de iones de una determinada masa/carga para posteriormente ser fragmentados y analizados. Después los iones seleccionados son transferidos pasando por el C-trap a la celda de colisión (HCD cell) para producir la fragmentación del ion seleccionado, generando nuevos fragmentos iónicos. El funcionamiento de este dispositivo consiste en acelerar los iones aplicando un potencial eléctrico. Esto incrementa su energía cinética produciendo que estos colisionen con moléculas neutras normalmente gases inertes, y se produce una fragmentación en varios iones.

Los iones fragmentados vuelven al C-trap, la función de este dispositivo es estabilizar y almacenar distintas poblaciones de iones mediante campos eléctricos de radiofrecuencia, estos son enfriados mediante la aplicación de nitrógeno para ser finalmente inyectados de forma secuencial en el analizador Orbitrap™ (Michalski et al., 2011).

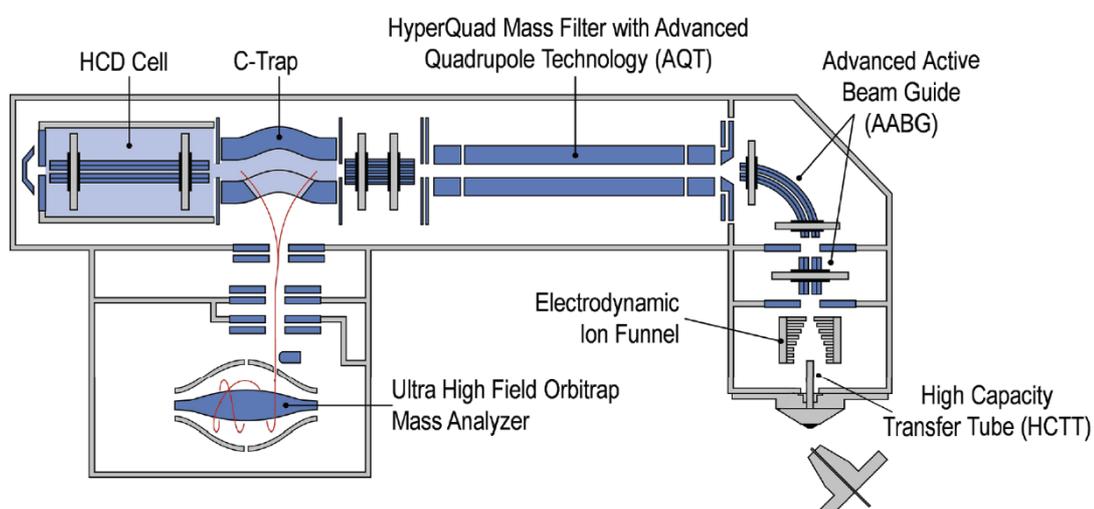


Figura. II.8. Representación esquemática de un espectrómetro de masas Q Exactive HF. Se observan los distintos módulos de un espectrómetro de masas Orbitrap™ Q Exactive HF. Imagen del manual del espectrómetro Q Exactive HF.

El analizador Orbitrap™ fue inventado por Alexander Makarov (Scigelova & Makarov, 2009). Realmente es una modificación del analizador de masas de trampa iónica. Es un pequeño dispositivo, compuesto por un electrodo externo en forma de barril y un electrodo interno en forma de huso que atrapa los iones en un movimiento orbital alrededor de él (Figura. II.9). Los iones estabilizados en la trampa lineal curva (C-trap) entran al Orbitrap™ mediante una rampa de voltaje donde los iones comienzan a orbitar en oscilaciones coherentes axiales que dependen de su masa/carga. Las frecuencias de rotación de los iones se detectan por el electrodo exterior bajo el principio de corriente de imagen inducida, de modo que el analizador es además un detector. Posteriormente mediante la transformada de Fourier se convierte en el espectro de masas de esos iones.

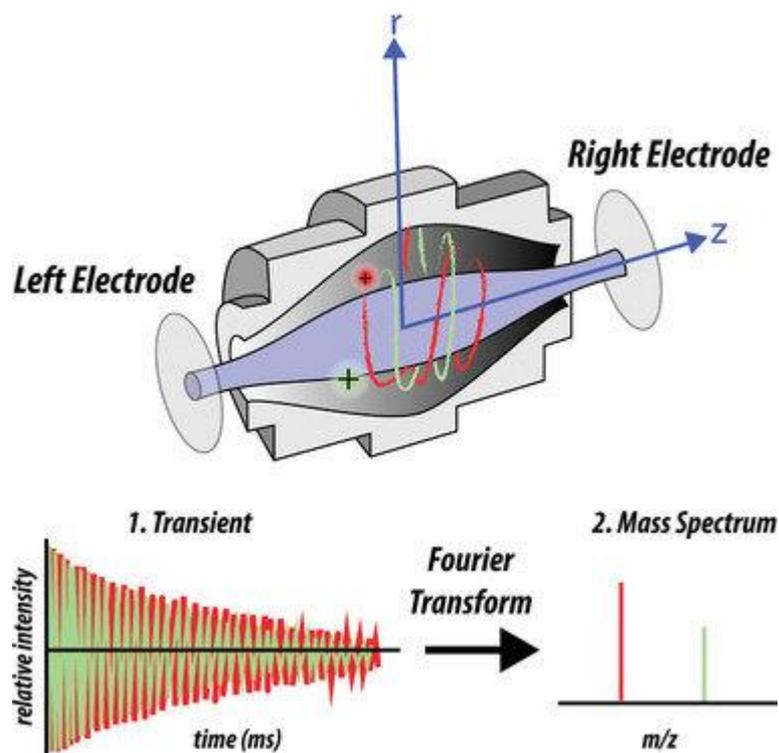


Figura. II.9. Esquema de funcionamiento de un analizador Orbitrap™. Representación esquemática de un analizador de masas de tipo Orbitrap™ en el que se encuentran dos iones orbitando en la dimensión axial dentro del barril con los dos electrodos. La frecuencia de oscilación de cada ion es identificada de forma simultánea y esta oscilación será única para cada m/z que posteriormente se traduce en un espectro de masas mediante la transformación de Fourier. Imagen tomada de Savaryn et al., 2016.

El espectrómetro de masas dispone de dos modos de adquisición de datos. Un modo llamado *data-dependent acquisition (DDA) mode*, también conocido como modo de adquisición dependiente de los datos. En primer lugar, el espectrómetro realiza un escaneo completo (full MS) de los iones que llegan al espectrómetro y son analizados en el Orbitrap, donde ni el cuadrupolo ni la celda HCD están operativos. A continuación, el equipo elige aquellas masas de los iones que han dado una mayor señal, y los vuelve analizar, pero esta vez seleccionándolos y volviéndolos a fragmentar, es decir realiza un análisis MS², de este modo el espectrómetro completa un ciclo, donde por ejemplo si lo configuramos para que seleccione 15 fragmentos, en un ciclo de funcionamiento el equipo genera un espectro de masas completo más 15 espectros de los 15 iones más intensos. El otro modo es llamado *data-independent acquisition (DIA) mode*, en este modo el equipo realiza un escaneo completo en pequeños rangos de tamaño de masa donde todos los iones de una determinada masa/carga son fragmentados y analizados independientemente de su intensidad.

El espectrómetro de masas utilizado es un Orbitrap Exploris 480 (ThermoFisher Scientific), los parámetros de funcionamiento se configuraron de la siguiente forma: El equipo funciona en modo DDA. La radiofrecuencia del embudo es 40. El escaneo completo "full MS" con una resolución de 60000 m/z a 200 m/z. El rango de masas a escanear de 375 a 1600 m/z. El *automatic gain control* (AGF) se configura a 3e6, tiempo de inyección máximo en el Orbitrap es de 45 ms. Para el análisis MS², se configura para que seleccione los 15 iones más intensos (Top15) con una ventana de aislamiento de 1.4 m/z mediante el uso del cuadrupolo, la fragmentación de estos iones se realiza con una energía de colisión normalizada del 28% tras la acumulación a un valor objetivo de 1e5, para que finalmente entren a ser analizados en el Orbitrap™. Para el análisis de los iones fragmentados (MS²) se configura a una resolución de 30000 a 200 m/z. El AGF a 1e5, tiempo de inyección máximo de 50 ms y el rango de masas a escanear de 200 a 2000 m/z. Se habilitó la exclusión dinámica con un ancho de masa de exclusión de 10 ppm y una duración de 16 segundos. Todos los datos se adquieren en modo de polaridad positiva.

II.8.3. Análisis de los datos crudos del espectrómetro de masas

El análisis de la gran cantidad de datos que genera el espectrómetro de masas para la identificación de péptidos, así como la cuantificación de proteínas presentes en la muestra es un desafío importante en proteómica. En esta tesis doctoral los datos brutos obtenidos del espectrómetro se analizan usando el software de análisis de datos de proteómica MaxQuant (www.maxquant.org), versión 1.6.10.43 (Cox & Mann, 2008), equipado con el motor de búsqueda Andromeda (Cox et al., 2011). Este software integra un conjunto de algoritmos para detectar picos e intensidades junto a los tiempos de elución permitiéndole identificar de forma automática más de 4000 proteínas en lisados de células de mamíferos sin marcaje.

Los archivos RAW de cada muestra que contienen los espectros de MS² se cargan en el software MaxQuant para buscar los péptidos identificados con el motor de búsqueda Andromeda. Se enfrentan a la base de datos de proteínas SwissProt de *Rattus Norvegicus* (8135 entradas, descargadas el 29/05/2021) a la que se le añade la versión humana de Rabfilina3A y STIM1, y Tcp1111 de rata de la base de datos TrEMBL, esto se realiza dado que las secuencias de los plásmidos transfectados son humanas, y en una primera aproximación con Rabfilina3A se usó la base de datos de TrEMBL. Los parámetros indicados al software para realizar la búsqueda son los siguientes: *The false discovery rate* (FDR) se programa al 1% a nivel de proteínas y péptidos. Se activa la opción de *label-free quantification* (LFQ), que permite la cuantificación relativa de la cantidad de proteínas presentes en dos o más muestras biológicas sin el uso de isótopos estables. Los péptidos deben tener una longitud mínima de 7 aminoácidos y una masa máxima de 4600 Da. La tolerancia de precursores se fija en 20 ppm en la primera búsqueda usada para la recalibración, seguida de 4,5 ppm para la búsqueda principal y 0,5 Da para los iones de fragmentos de MS/MS. Se indica que los péptidos son digeridos con tripsina permitiendo el corte antes de una prolina, y un máximo de dos cortes no producidos. Las modificaciones variables son acetilación en el N-terminal y oxidación, y las fijas carbamidometilación de cisteínas. La opción de encontrar coincidencias entre

diferentes muestras (*match between runs*) se habilita para transferir identificaciones entre diferentes réplicas del LC-MS/MS, en función de sus masas y tiempo de retención dentro de una ventana de tiempo de coincidencia de 0.7 min, y un alineamiento de ventana de 20 minutos. MaxQuant reporta finalmente la intensidad sumada para cada entrada de proteína referida como valores LFQ.

II.8.4. Análisis estadístico de la espectrometría de masas

El análisis estadístico de los datos crudos obtenidos del espectrómetro de masas se lleva a cabo utilizando la plataforma de software Perseus (Tyanova et al., 2016) (v1.6.10.45), que contiene un amplio abanico de herramientas estadísticas para el análisis de datos ómicos de alta dimensión, que abarca la normalización, el reconocimiento de patrones, las comparaciones y las pruebas de hipótesis múltiples. Las intensidades LFQ se cargan desde el archivo ProteinGroups.txt obtenido de MaxQuant. Las intensidades LFQ son aproximadamente proporcionales a las cantidades molares de las proteínas normalizadas para excluir algunos "valores atípicos" y representar mejor los cambios de proporción de las diferentes muestras. Se descartaron las proteínas marcadas como contaminantes, hits inversos y "sólo identificadas por el sitio". Las proteínas cuantificables se definieron como aquellas detectadas en el 100% de las muestras en al menos una condición. Las intensidades de las proteínas se logarimizan en base 2 para obtener una distribución normal y reducir el efecto de los valores atípicos. Para superar el obstáculo de los valores LFQ ausentes que no se identificaron en las muestras control, se realiza una imputación de estos datos ausentes. Los valores ausentes sólo se imputaron si no se encontraron en al menos 3 o 4 réplicas de control. La imputación se realiza sustituyendo el valor que falta por la intensidad de LFQ más baja de cada réplica para simular las señales de las proteínas poco abundantes utilizando los parámetros por defecto. De este modo, la imputación de los valores perdidos en los controles permite la comparación estadística de proteínas que están presentes sólo en las muestras y no en los controles.

Para determinar si una determinada proteína detectada está específicamente expresada de forma diferencial, se realiza una prueba estadística *t-test* de dos muestras utilizando un FDR basado en permutaciones, controlado a 0,01 y empleando 250 permutaciones. El valor *p-value* se ajusta utilizando un factor de escala s_0 con un valor de 1. Una proteína se considera estadísticamente significativa si su cambio logarítmico respecto al control es $>1,5$ en el fenotipo adrenal y >1 en el fenotipo neuronal, con $FDR < 0,05$. La causa del porqué el umbral mínimo para determinar que el cambio es significativo en el fenotipo neuronal es menor es debido a que la cantidad de suero en el medio de crecimiento se redujo a la mitad en el fenotipo neuronal. Dado que el suero contiene una pequeña cantidad de biotina, el etiquetado por biotina fue ligeramente menor. Todas las proteínas identificadas y expresadas diferencialmente se utilizaron en los análisis de redes o vías proteicas. Cada muestra se compara con sus controles y el análisis diferencial de estos dos valores se representan como diagramas de volcán.

II.8.5. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de proteínas

Los análisis de enriquecimiento de vías y procesos de ontología genética se realizaron con Metascape (<http://metascape.org/gp/index>). Metascape es una herramienta eficaz y eficiente para proporcionar anotaciones completas de listas de genes, y es especialmente relevante en proteómica donde el número de proteínas descubiertas y analizadas es muy grande (Zhou et al., 2019). Los análisis realizados con esta herramienta se hicieron con las siguientes fuentes ontológicas: GO Biological Processes, Reactome Gene Sets, WikiPathways, PANTHER Pathway y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway. La herramienta utiliza todos los genes del genoma como fondo de enriquecimiento. Los términos con un valor $p < 0,01$, un recuento mínimo de 3 y un factor de enriquecimiento $>1,5$ (el factor de enriquecimiento es la relación entre los recuentos observados y los recuentos esperados por azar) se recogen y agrupan en clústeres en función de sus similitudes de pertenencia. Para captar mejor las relaciones entre los términos, se seleccionó un subconjunto de términos enriquecidos y se representó como un gráfico de red, en el que los

términos con una similitud $> 0,3$ se encuentran conectados por líneas. Seleccionamos los términos con los mejores valores p de cada uno de los 20 clústeres, con la restricción de que no haya más de 15 términos por clúster y no más de 250 términos en total. La red se visualiza utilizando Cytoscape (Shannon et al., 2003), donde cada nodo representa un término enriquecido y está coloreado por su ID de clúster.

II.8.6. Construcción de redes de interacción proteína-proteína (PPI) y diagramas de Venn

Para la construcción de las redes que muestran las PPI descritas en la bibliografía o por minería de texto entre las proteínas positivas, se utiliza la base de datos *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes* (STRING, <https://string-db.org/>) (v11.0) (Szklarczyk et al., 2021). Esta base de datos es una herramienta de bases de datos biológicas en línea diseñada para predecir redes de PPI. Una puntuación combinada $>0,4$ se selecciona como significativa. Se utiliza el software Cytoscape (v3.8.2) para visualizar y colorear la red PPI. Los diagramas de Venn muestran el solapamiento de proteínas entre diferentes análisis, y fueron creados con la herramienta proporcionada en <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> a la que se accedió en julio de 2021.

II.9. Ensayo de complementación bimolecular fluorescente (BiFC)

Otra herramienta adicional para estudiar PPI *in vivo*, además de la técnica BiID2 y PLA, es el ensayo de complementación bimolecular fluorescente (BiFC). El ensayo se basa en la reconstitución estructural de dos fragmentos no fluorescentes y complementarios de una proteína fluorescente, de forma que cuando se encuentran lo suficientemente cerca gracias a la fusión de un par de proteínas candidatas de interacción se produce la reconstitución de la proteína fluorescente (Figura. II.10). Por tanto, si las proteínas de análisis interactúan permiten que ambos fragmentos no fluorescentes se reconstituyan y produzcan fluorescencia que puede ser detectada (Lai & Chiang, 2013).

A principios de la década del 2000 comenzó el desarrollo de esta técnica mediante el uso de distintos fragmentos de la proteína GFP y sus variantes espectrales divididas entre el aminoácido 155 y 173 (Hu & Kerppola, 2003). Con los años se ha ido extendiendo su uso, permitiendo la detección de la interacción de un amplio rango de proteínas en distintos organismos, células de mamífero, plantas, bacterias. Sin embargo, el análisis por microscopía de fluorescencia de candidatos individuales no es una tarea fácil, por ello se usó la técnica acoplada a citometría de flujo (Morell et al., 2008).

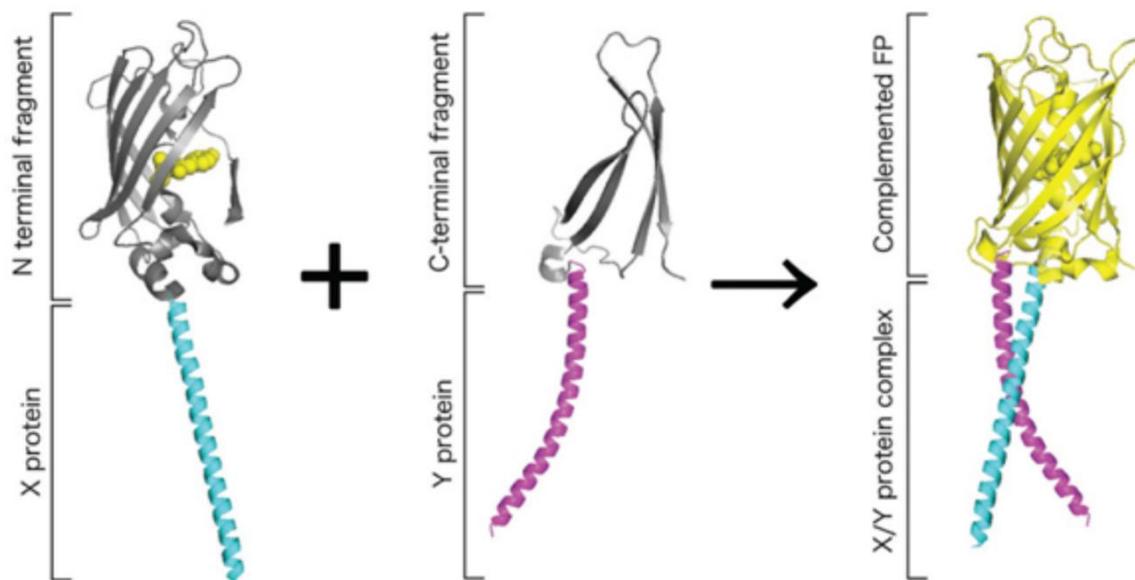


Figura. II.10. Esquema del ensayo de complementación bimolecular fluorescente (BiFC). La proteína de la izquierda representa una proteína de fusión de una α -hélice unida a VN155 y la de la derecha otra compuesta de una α -hélice unida a VC155 cuando ambas α -hélices interactúan se reconstituye la proteína fluorescente Venus y emite fluorescencia. Imagen de Kodama & Hu, 2012.

En esta tesis doctoral se usó el método BiFC con la variante de la proteína fluorescente amarilla llamada mVenus que presenta un mejor rendimiento, estabilidad, es monomérica no produciendo agregación, además presenta una mayor rapidez de plegamiento haciéndola muy útil para BiFC (Kremers et al., 2006; Shyu et al., 2006). El punto de partición entre el extremo N- y C- terminal es el 155. Dado que uno de los problemas de esta técnica es el alto ruido que presenta debido a la interacción inespecífica e irreversible de la proteína fluorescente produciendo fluorescencia, se usó una variante que reduce el incremento de la ratio señal ruido con la mutación I152L (Kodama & Hu, 2010).

Como control positivo se usó el dominio bZIP de c-Jun (llamado bJun residuos 257-313) y el dominio bZip de c-Fos (llamado bFos, residuos 118-211). Como control negativo se usó bFos que presenta una delección de los residuos 179 a 193 y no interacciona con bJun (Gentz et al., 1989). De esta forma se puede discernir la intensidad de fluorescencia que es interacción positiva, y con el control negativo podemos detectar la fluorescencia basal que es debido a las interacciones fortuitas que ocurren en la célula.

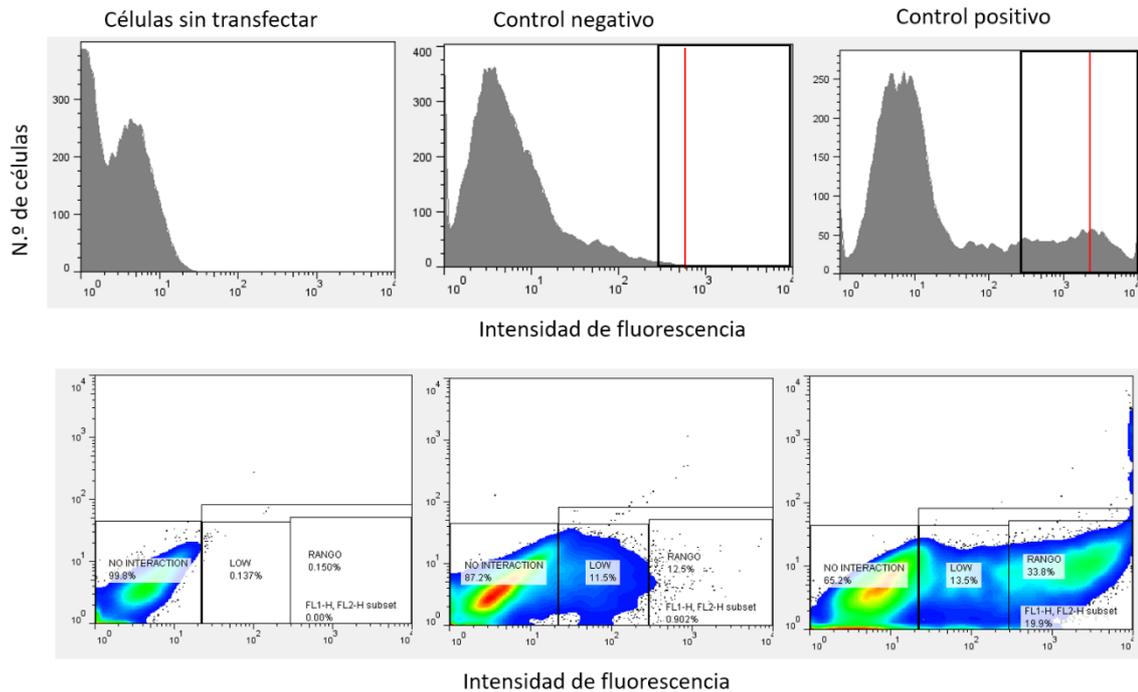


Figura. 11.11. Histogramas de los controles negativos y positivos del ensayo BiFC. Arriba histogramas de la intensidad de fluorescencia frente al número de células. El recuadro es la zona de intensidad de fluorescencia que se tiene en cuenta para la cuantificación, la raya roja es la intensidad media de las células que se encuentran en ese rango. Abajo dot plot de fluorescencia 488 nm (FL1) frente a fluorescencia en 633 nm (FL2) representando la distribución de las células.

El protocolo del ensayo consiste en co-transfectar las células PC12 con las construcciones y a las 48 horas analizar las células vivas en el citómetro de flujo, en concreto la fluorescencia excitada con el láser 488 nm. Posteriormente con el programa FlowJo v7.6.1 (BD Life Sciences) se calcula el umbral a partir del cual la interacción es positiva con los controles, y se determina en qué punto del rango se encuentra cada par analizado. Se pone un control sin transfectar para determinar la fluorescencia intrínseca de la célula y de esta forma poder calibrar el equipo para la toma de datos. En el control negativo transfectado con

las proteínas de fusión con la hélice mutada, se observa que hay cierta fluorescencia de fondo debido a las interacciones azarosas que ocurren dentro de la célula (Figura. II.11), de esta forma, la intensidad de fluorescencia de este nivel no será considerada como interacción y se determina el umbral mínimo de intensidad de fluorescencia para tener en cuenta a la hora de cuantificar. El control positivo sirve para determinar una interacción suficiente. Para analizar los datos de forma cuantitativa, se calcula la intensidad media de fluorescencia (ralla roja Figura. II.11) de todas las células que han superado dicho umbral, ese valor del control negativo lo tomaremos como 0% de interacción. El valor medio de la intensidad de fluorescencia de todas las células del control positivo de las células que han superado el umbral anterior, lo tomaremos como 100% de interacción, de esta forma podemos cuantificar la interacción de cada par de proteínas a analizar (Kodama & Hu, 2012).

II.10. Microscopía confocal y citometría de flujo

II.10.1. Microscopía confocal

La microscopía confocal fue inventada por Marvin Minsky en 1955 que patentó el instrumento *Double focussing stage scanning microscope* en 1957. El instrumento consiste en una modificación del microscopio de epifluorescencia, mediante la introducción de un escáner acoplado a un detector espectral que permite barrer la muestra punto a punto de un único plano focal, gracias al uso de dos “*pinholes*” que seleccionan la luz incidida y emitida de un determinado plano focal de la muestra, y descartan la luz que queda fuera del plano. Sin embargo, el invento no pudo ser explotado completamente hasta la década de los 80, debido a la falta de la tecnología electrónica para reconstruir las imágenes tomadas punto a punto. Actualmente, la microscopía confocal domina el mundo de la microscopía celular permitiendo obtener imágenes de un único plano focal, y la reconstrucción de estructuras de células tridimensionales junto a numerosos avances realizados.

La fuente de luz usada en microscopía confocal es luz laser polarizada que es enfocada gracia a la lente y al “*pinole*” situado delante del espejo dicroico

o en el caso de Leica el sistema AOBS patentado (Figura. II.12). Este tipo de microscopía requiere de un divisor de haz de luz que dirija y refleje sólo la longitud de onda de la luz láser hacia la muestra, y sea transparente al paso de la luz emitida por la muestra hacia el detector. Esto es necesario dado que ambos haces de luz presentan el mismo recorrido. Los espejos dicróicos son un sistema para solventar este problema. Sin embargo, Leica patentó un sistema mucho más versátil llamado AOBS, se trata de un filtro acústico óptico sintonizable (AOTF). Este aparato es un cristal activo de TeO_2 cuyas propiedades de transmisión de fotones cambian al acoplarle una onda acústica permitiendo el reflejo de un determinado ancho de banda mucho más estrecho respecto al de los espejos dicróicos. De este modo se disminuye la pérdida de eficiencia en la transmisión de la luz de emisión de la muestra hacia el detector en las regiones próximas de la banda de excitación del láser. Finalmente, la luz emitida por la muestra que se ha excitado es filtrada por el segundo *pinhole*, permitiendo la

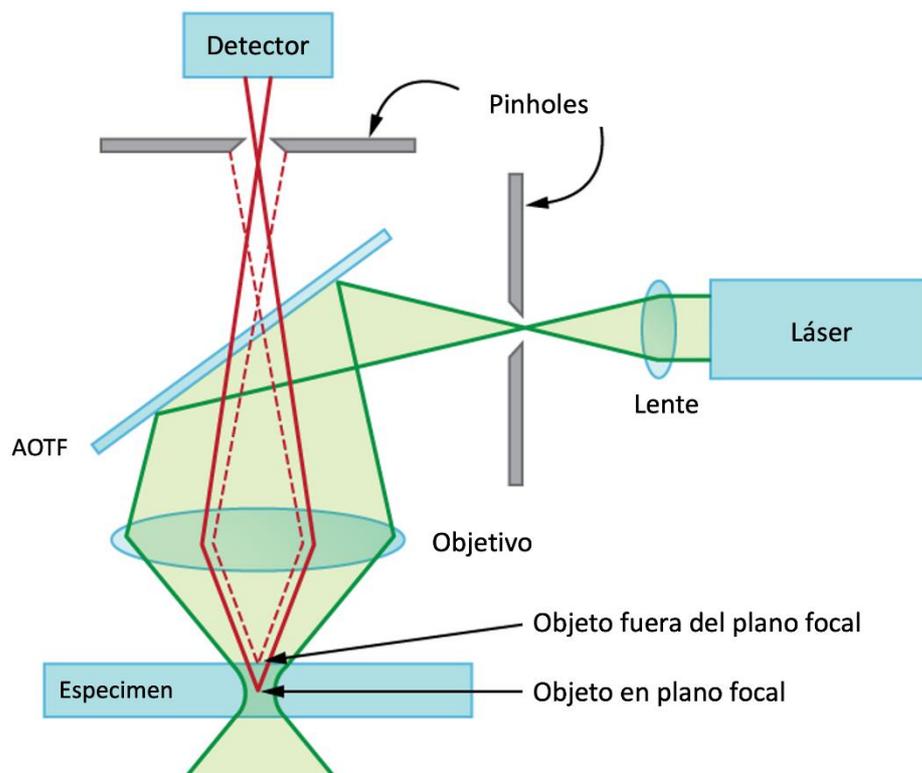


Figura. II.12. Esquema de funcionamiento de un microscopio confocal. La luz láser atraviesa la lente y el pinhole para localizarla en un plano focal de la muestra, previamente se encuentra con el AOTF que es un filtro óptico acústicamente modulable el cual refleja la luz hacia la muestra donde junto con el objetivo llega enfocada hacia la muestra. Los fluoróforos de la muestra se excitan y emiten luz la cual atraviesa el AOTF, y llega enfocada exclusivamente la luz del plano focal gracias al pinhole, localizado justo antes del detector, que impide que entre la luz fluorescente emitida fuera del plano focal. Imagen tomada y traducida de <http://archive.cnx.org/contents/4cfd3c2d-dad1-4133-8dae-0c321a6577a4@1/extended-topic-microscopy-enhanced-by-the-wave-characteristics-of-light>

llegada únicamente de la luz emitida del plano focal al detector, y excluyendo la luz fuera del plano focal (Figura. II.12).

El equipo utilizado en el desarrollo de esta tesis doctoral fue el microscopio de barrido láser confocal Leica TCS SP8 de la casa comercial Leica, ubicado en el Servicio de Microscopía del Laboratorio de Investigación Biosanitaria (LAIB) del ACTI. Este dispositivo está equipado con un láser de onda continua de 405 nm, un láser multilínea de argón permitiendo excitar a 458, 476, 488, 496 y 514 nm, un láser DPSS amarillo a 561 nm, y otro rojo de helio-neón para excitar a 633 nm. El objetivo utilizado fue de inmersión en glicerol PL APO 63x/1.3 AN.

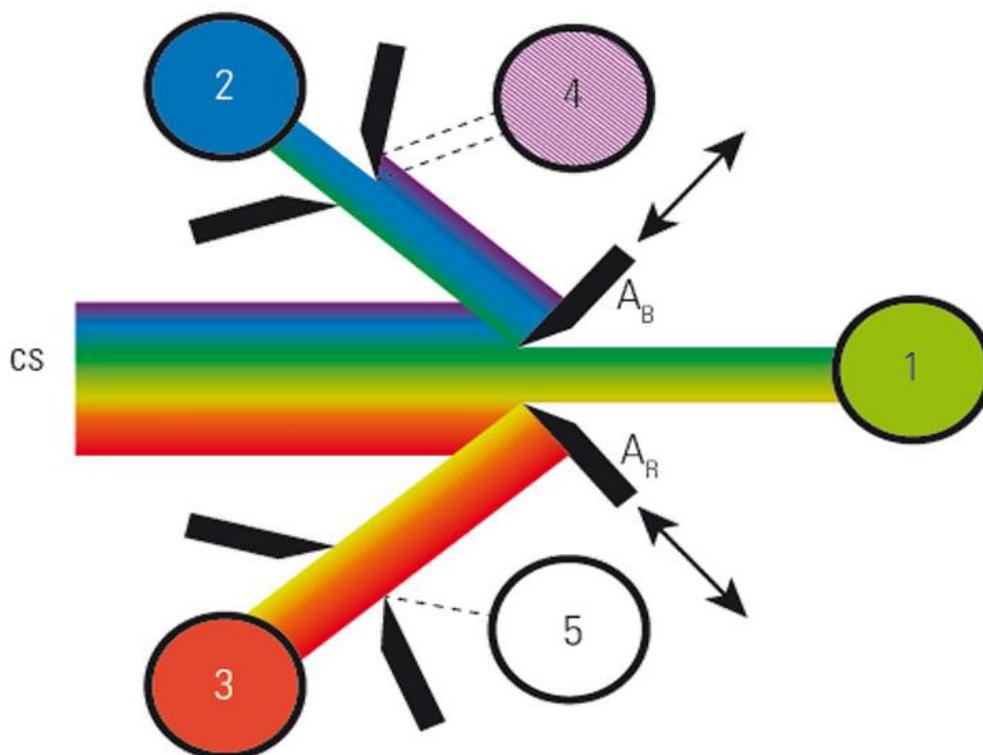


Figura. II.13. Fundamento del sistema de detección multibanda modulable de Leica. La luz espectral llega al sistema de detección y la banda del espectro puede ser seleccionada ajustando las barreras móviles, la región no seleccionada es reflejada y puede ser detectada por otro detector. Imagen tomada de <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/what-is-a-spectral-detector-sp-detector/>.

Este microscopio está equipado con una unidad de detección espectral que permite la detección individual de 4 bandas espectrales individuales y personalizadas, y un detector para visualizar la muestra sin teñir mediante

contraste de interferencia diferencial (DIC). La luz que llega a la unidad de detección es dispersada en un espectro mediante un prisma Pellin-Broca. El espectro de luz llega a los 5 detectores ubicados de forma estratégica, precedidos por barreras que se mueven dependiendo de la banda del espectro que se quiere detectar con ese detector. La banda del espectro que no es detectada por un detector puede ser detectada por otro, al ser reflejada por la barrera que presenta una película de un material altamente reflectante (Figura. II.13). Finalmente, la luz es detectada por sensores de luz, el equipo utilizado presentaba dos fotomultiplicadores (PMT), dos detectores híbridos (HyD) que presentan una mayor eficiencia de detección, y un PMT Trans para DIC.

II.10.2. Citometría de flujo

La citometría de flujo se trata de una técnica muy versátil y ampliamente utilizada en investigación biomédica y también en diagnóstico clínico. Su objetivo es estudiar partículas en suspensión en un medio líquido, en nuestro caso células. La suspensión de células se inyecta en el equipo que es capaz de ordenarlas para que las células pasen de forma ordenadas por un flujo de forma individual y a gran velocidad. Sobre este flujo van células individuales donde inciden distintos láseres para analizar sus características dependiendo de la luz absorbida y reflejada que es detectada por distintos detectores. Por tanto, el citómetro de flujo es capaz de determinar parámetros de la célula que son dependientes del tamaño y complejidad de ella (su contenido, envuelta) así como también fluoróforos para determinar qué cantidad de células presentan una determinada molécula dado que se ha realizado una tinción previamente o fluorescen de forma intrínseca debido a la expresión de una proteína fluorescente.

El citómetro de flujo utilizado para analizar la pureza de las poblaciones, teñidas con anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488, o para analizar el experimento de BiFC fue el citómetro BD FACSCalibur HTS ubicado en el Servicio de Cultivo de Tejidos del ACTI, equipado con un láser azul de argón para excitar a 488 nm y un láser rojo de helio-neón para excitar a 633 nm.

II.10.3. Fluoróforos utilizados

Los fluoróforos utilizados en las técnicas de microscopía confocal y citometría nos permiten detectar moléculas de interés al estar conjugados a ellas y ser emisores de fotones. Son moléculas que presentan una estructura normalmente aromática que les permite absorber energía a una determinada longitud de onda, y emitir en otra determinada de mayor longitud de onda, a esta diferencia se le llama desplazamiento de Stokes.

Para la localización subcelular *in vivo* de proteínas de interés, se expresaron construcciones plasmídicas fusionadas a secuencias de proteínas fluorescentes. Una de ellas es la proteína verde fluorescente (GFP) aislada de la medusa *Aequorea victoria* por Osamu Shimomura en 1962 (Shimomura et al., 1962). Sin embargo, hasta 1992 no fue utilizada como marcador molecular fluorescente por Douglas Prasher (Prasher et al., 1992). Posteriormente, se desarrollaron distintos mutantes de la proteína produciendo distintas variantes de la proteína verde fluorescente (YFP, EGFP, CFP) que presentaban distintas propiedades fisicoquímicas mejorando su fluorescencia, estabilidad o incluso

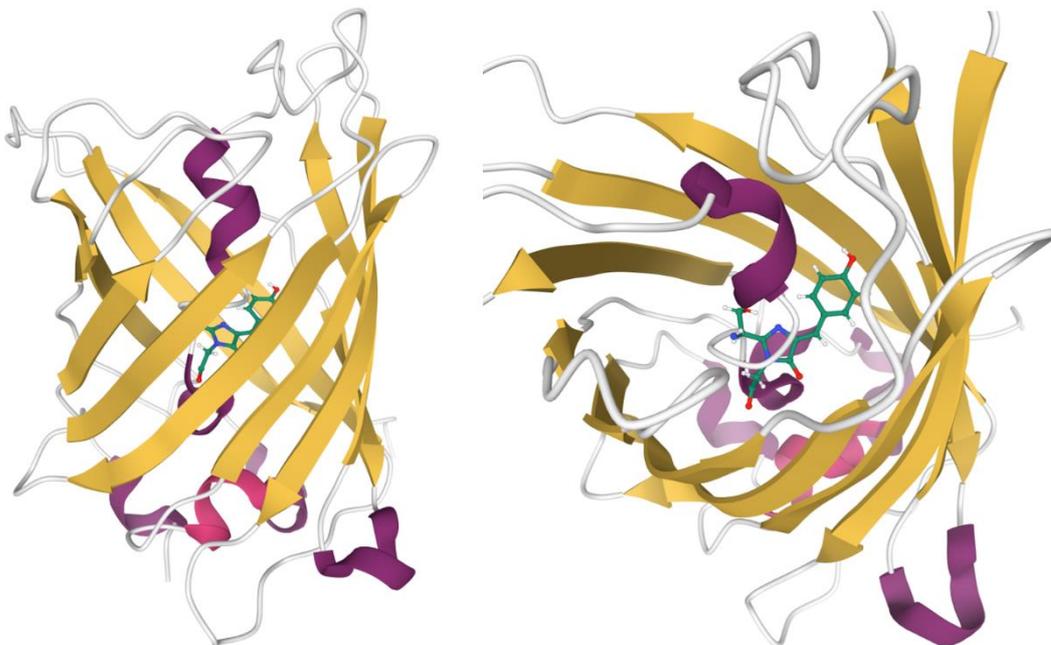


Figura. II.14. Estructura de la proteína verde fluorescente. A la izquierda se muestra la estructura general de la proteína, es un barril β compuesto de 11 hojas β formando las paredes de un cilindro. En el interior se encuentran segmentos de hélices α y justo en la región central se encuentran unos aminoácidos que actúan de fluoróforo (verde). A la derecha se muestra una imagen ampliada para mostrar el fluoróforo, es una secuencia de tres aminoácidos (Ser65-Tyr66-Gly67) que presentan un enlace singular y forman una estructura cíclica. Esta ciclación es crítica para que la proteína absorba y emita luz. PDB: 2WUR1.

cambios en el rango de excitación y emisión. Además, existe otra familia, llamada proteínas rojas fluorescentes (RFP) derivadas de la anemona marina *Discosomona*, que absorben y emiten luz en el rango del rojo (500-650 nm), como mOrange, mStrawberry, mCherry (Shaner et al., 2004). Aunque GFP y RFP son parientes lejanos, los aminoácidos clave para emitir luz son una secuencia de tres aminoácidos: una serina, una tirosina y una glicina que se encuentran en el centro de la proteína y se ciclan formando un enlace especial (Figura. II.14).

Para las inmunofluorescencias se usaron anticuerpos secundarios conjugados con los fluoróforos comerciales Alexa Fluor desarrollados por Molecular Probes. Las longitudes de onda de excitación y emisión de las proteínas fluorescentes y los fluoróforos Alexa Fluor se encuentran en la Tabla II.7.

Tabla II.7. Rango de emisión y excitación de fluoróforos.

Fluoróforo	λ Excitación max (nm)	λ Emisión max (nm)	Rango de emisión (nm)	Brillo
DAPI	360	450	420-550	15.60
ECFP	434	477	475-550	13.0
EYFP	515	527	510-560	44.89
mVenus	515	527	510-560	66.56
mCherry	587	610	600-700	15.84
Alexa Fluor 488	488	530	520-580	66.74
Alexa Fluor 647	650	668	660-720	78.84

II.11. Análisis de imagen y procesamiento de datos

La señal detectada de los *Western-blot* y de las células marcadas fluorescentemente puede ser digitalizada en imágenes, generalmente en escala de grises de 8-bits teniendo 256 posibles valores de gris por píxel. Esto nos permite realizar una cuantificación de las imágenes. En esta tesis doctoral se ha

hecho uso de tres diferentes softwares de análisis de imagen. Para análisis de *Western-blot* se usa ImageQuant TL.8.1 (Cytiva). Para análisis de micrografías de células se usan dos softwares: Leica Application Suite X (LAS X) y Fiji (*Fiji Is Just ImageJ*) (Schindelin et al., 2012). Ambos softwares permiten analizar determinadas áreas de interés de las micrografías, lo que permite determinar la intensidad de gris de cada píxel, el área seleccionada calibrando la imagen, entre muchos otros parámetros.

II.11.1. Análisis cuantitativo de la localización de SNAP25 en la membrana plasmática.

La cuantificación de la relación de SNAP25 localizado en la membrana plasmática respecto a la proteína total de cada célula individual, se realiza trazando una línea a lo largo del citoplasma y la membrana de la célula. Mediante el uso del software Fiji se analiza la intensidad de cada píxel a lo largo de la línea que cruza la membrana y el citoplasma, y se cuantifica siguiendo el método de (Meyer & Oancea, 2000). El método consiste en trazar una línea para cada célula que cruce desde la membrana hasta el citoplasma, y analizar la intensidad de

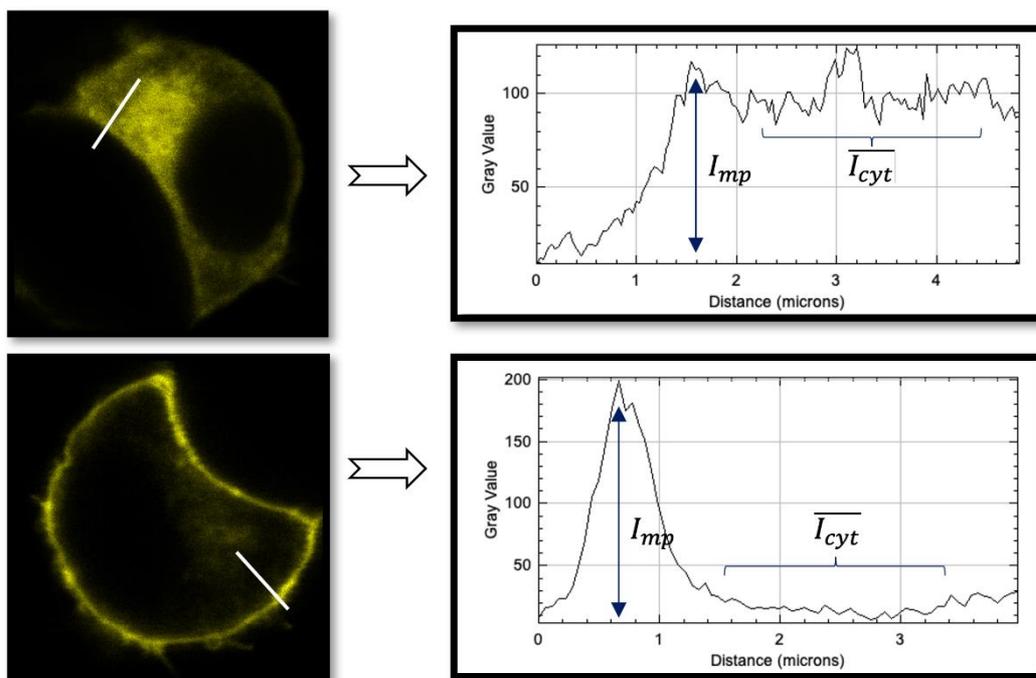


Figura. II.15. Análisis de la localización de SNAP25-YFP en membrana plasmática. Se traza una línea que se extienda desde la membrana plasmática hasta el citoplasma y se analiza la intensidad de cada píxel, siendo el primer máximo la membrana plasmática y el resto el promedio del citoplasma. Posteriormente se aplica la relación R para obtener el porcentaje localizado en membrana plasmática.

cada pixel (Figura. II.15). Posteriormente se calcula la relación en tanto por cien de proteína localizada en la membrana con la siguiente formula:

$$R = \frac{I_{mp} - \overline{I_{cyt}}}{I_{mp} + \overline{I_{cyt}}} \cdot 100$$

Siendo R el porcentaje de proteína SNAP25 localizado en la membrana plasmática, I_{mp} intensidad máxima en la membrana plasmática y $\overline{I_{cyt}}$ el promedio de la intensidad promedio localizada en el citoplasma.

II.11.2. Análisis estadístico y presentación de datos.

El análisis estadístico de los datos recogidos y analizados se evalúa mediante estimación estadística. Se usa el software online Estimation Stats (Ho et al., 2019) (www.estimatestats.com). Este software libre representa los datos mediante un gráfico Gardner-Altman (Gardner & Altman, 1986), donde se observa la distribución de los datos de cada experimento, y adicionalmente a la derecha un segundo eje alineado indicando la media como un hueco, y su intervalo de confianza (95%) como barras de error (Figura. II.16). Para la comparación entre 2 grupos se usa el test “t-test Student's”, y para

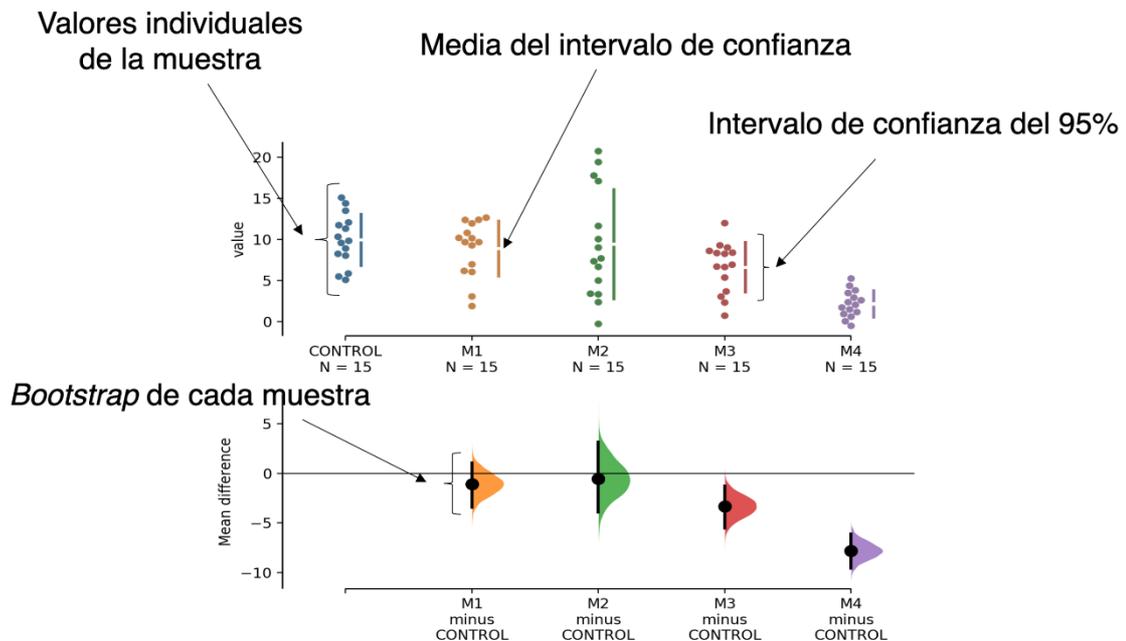


Figura. II.16. Ejemplo de representación de datos y análisis de estimación estadística. En el grafico superior se muestran los datos brutos, y en el inferior se representa la diferencia media junto al bootstrap de cada grupo comparado con la primera. Si está fuera de la línea cero es estadísticamente significativo.

comparaciones entre 3 o más grupos el test ANOVA también realizado con el mismo software.

El programa compara la diferencia media dentro del 95% del intervalo de confianza de cada grupo realizando un *bootstrapping*, y presenta un gráfico adicional abajo donde se presentan las diferencias de cada media entre muestras respecto a la primera como el tamaño del efecto, donde se considera como estadísticamente significativo $p < 0.05$. Es decir, podemos calcular fácilmente la diferencia media en nuestras muestras observadas y de esta forma calculamos la estimación del tamaño del efecto que nos interesa. Por ello, para obtener una medida de precisión y confianza sobre nuestra estimación, y saber cómo se relaciona con la diferencia media de la población, se calcula el intervalo de confianza del 95% de la diferencia media realizando un remuestreo *bootstrap*. Descrito por primera vez por Bradley Efron, el *bootstrap* es una técnica sencilla pero potente. Crea múltiples remuestreos (con reemplazo) a partir de un único conjunto de observaciones, y calcula el tamaño del efecto de interés en cada uno de estos remuestreos. Los remuestreos *bootstrap* del tamaño del efecto pueden utilizarse para determinar el intervalo de confianza del 95%. Con los ordenadores, podemos realizar 5000 remuestreos muy fácilmente. Efron desarrolló el bootstrap corregido por el sesgo y acelerado (*BCa bootstrap*), para tener en cuenta la asimetría mientras se obtiene el 95% de la distribución. En el software www.estmationstats.com, se aplica la corrección BCa al remuestreo de las distribuciones *bootstrap* del tamaño del efecto (Efron & Narasimhan, 2020).

II.12. Cálculo del potencial electrostático

El potencial electrostático de la superficie de los dominios C2B de Rabfilina3A y Sinaptotagmina 1, y los dominios C1 de PKC ϵ y PKC δ se calcularon usando el plug-in Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) (Baker et al., 2001) del programa PyMOL, se programó usando los parámetros que da el programa por defecto. Los dominios se enviaron al servidor PDB2PQR (Dolinsky et al., 2004) y se cambió el pH a 7.0. Se utilizó el campo de fuerzas PARSE (Sitkoff et al., 1994). Para el dominio C1 se introdujo una ligera

modificación para incluir los valores de los iones zinc (carga +2, 0.74 Å) y para modificar los valores de los 8 residuos que coordinan los átomos de zinc, los cuales se le dieron una carga parcial de -0.5 para configurar una carga neta a cada motivo de unión a zinc de cero (Pu et al., 2006). Las constantes dieléctricas de la proteína y el disolvente se establecieron en 2 y 80, respectivamente, el radio iónico del disolvente fue 1.4 Å y el radio iónico de la proteína de 2 Å. La representación gráfica del potencial electrostático calculado de la superficie en 100 mM de iones monovalentes a $\pm 5kT/e$ se mostró usando el programa PyMOL (<http://www.pymol.org>). Para la unión de la molécula de DAG se utilizó el programa SwissDock, donde se programó para que la proteína se mantuviera fija y el ligando pudiera enlazarse libremente.

RESULTADOS

**CAPÍTULO III. RABFILINA3A CONTROLA LA
LOCALIZACIÓN DE SNAP25 A TRAVÉS DE SU
DOMINIO C2B**

III.1. Resumen

La fusión de membranas es esencial en una multitud de procesos biológicos incluida la transmisión sináptica en la que SNAP25 es una de las proteínas clave en la fusión de vesículas sinápticas. Las proteínas que presentan dominios C2 están implicadas en la detección de Ca^{2+} y PIP_2 , como Rabfilina3A y Sinaptotagmina1 que comparten cierta homología, y ambas son proteínas del tráfico de membranas que intervienen en la regulación de la exocitosis de las vesículas secretoras de las neuronas y las células neuroendocrinas. Sin embargo, el mecanismo subyacente de Rabfilina3A sigue siendo poco conocido. En este capítulo se compara la especificidad de Rabfilina3A y Sinaptotagmina1 por SNAP25 mediante comparaciones estructurales, mostrando que ambas proteínas contactan con la misma superficie de SNAP25, pero Rabfilina3A utiliza un elemento estructural único no conservado en Sinaptotagmina1. Además, se valida la interacción de Rabfilina3A por SNAP25 endógeno y con otras proteínas moduladoras de su función mediante ensayo de ligación por proximidad. Se vislumbra también una posible nueva función de Rabfilina3A promocionando e incrementando la localización de SNAP25 en la membrana plasmática de células PC12 *in vivo*, efecto que es dependiente de este motivo estructural de Rabfilina3A y también de la correcta interacción de Rabfilina3A con el PIP_2 .

Este hallazgo revela una nueva función para Rabfilina3A, dependiente de la interacción de una α -hélice del dominio C2B de Rabfilina3A con SNAP25 y con el PIP_2 de la membrana, ayudando a la correcta localización de SNAP25, efecto que es más acentuado en un fenotipo neuronal.

III.2. Introducción

Existe una intrincada y muy coordinada red de interacciones proteína-proteína, y lípido-proteína que controla la liberación de moléculas secretoras y neurotransmisores en las neuronas. El mecanismo de este proceso se ha estudiado en profundidad durante las últimas tres décadas, y está finamente regulado por Ca^{2+} , siendo uno de los principales segundos mensajeros que provoca la fusión y exocitosis de vesículas sinápticas cargadas de neurotransmisores. No obstante, hay muchos pasos del proceso que permanecen sin esclarecer (Cai et al., 2007).

La familia de proteínas SNARE es la responsable directa de la exocitosis y fusión de bicapas de las vesículas con la membrana plasmática (Brunger et al., 2009). En la sinapsis neuronal, el complejo SNARE implicado en la fusión de vesículas sinápticas consta de tres proteínas: Sintaxina1A, la proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa (SNAP25) y la proteína de membrana asociada a la vesícula 2 (VAMP2) o también llamada Sinaptobrevina2 (Sutton et al., 1998). Estas tres proteínas se pliegan en un haz de cuatro α -hélices para formar un *coiled-coil* que impulsa la fusión de las membranas. SNAP25 se une a la membrana plasmática y contribuye con dos α -hélices, y Sintaxina1A y VAMP2 con otras dos hélices. Sin embargo, numerosas proteínas regulan este proceso, como las STXBPs, complexinas, munc18 (Sauvola & Littleton, 2021) y un conjunto de proteínas con dominios C2 (Corbalan-Garcia & Gomez-Fernandez, 2014), que son sensibles Ca^{2+} . Entre ellas se encuentran Sinaptotagmina1, Rabfilina3A, RIMs, Munc13 que presentan dominios C2 y son capaces de detectar Ca^{2+} pero también realizan otras funciones modulando otras etapas del proceso (Jahn & Fasshauer, 2012).

Sinaptotagmina1 (Syt1) se localiza en las vesículas sinápticas y secretoras anclada a ellas través de una hélice transmembrana N-terminal, y se considera el sensor de Ca^{2+} de las neuronas gracias a sus dos dominios C2 (Li et al., 1994). Tiene la capacidad de interactuar a través de su dominio C2B con SNAP25, y con el complejo SNARE (Zhou et al., 2015). Comparativamente

Rabfilina3A tiene una alta homología con Sinaptotagmina1, especialmente en su tándem de dos dominios C2 (Guillen et al., 2013). Rabfilina3A se une a las vesículas secretoras no directamente sino mediante la interacción con proteínas de las vesículas como Rab3 o Rab27, gracias a su dominio de unión a Rab localizado en el extremo N-terminal (Fukuda et al., 2004; McKiernan et al., 1996). Su dominio C-terminal de forma análoga a Sinaptotagmina1 consiste en dos dominios C2 que son responsables de interactuar con Ca^{2+} y fosfolípidos como el PIP_2 y también participan en otras numerosas interacciones proteína-proteína de las neuronas como MyoVa (Brozzi, Diraison, et al., 2012), CASK (Zhang et al., 2001), SNAP25 (Ferrer-Orta et al., 2017), GluN2A/PSD95 (Stanic et al., 2015).

Rabfilina3A (Rph3A) es una proteína del tráfico de membranas tradicionalmente involucrada en la regulación del tráfico de vesículas sinápticas (Burns et al., 1998). Sin embargo, su función no está del todo determinada, a diferencia de sinaptotagmina1 que si es la proteína clave en detectar el Ca^{2+} y desencadenar la fusión sincronizada de vesículas de las terminales sinápticas (Brunger et al., 2018). Estudios estructurales recientes realizados por el laboratorio de Brunger han determinado que el dominio C2B de Sinaptotagmina1 interacciona con el complejo SNARE formado por SNAP25-STX1A-VAMP2 (Zhou et al., 2015) y también acoplada a complexina (Zhou et al., 2017). Nuestro grupo de investigación ha investigado recientemente las interacciones a nivel biofísico de Rabfilina3A, determinando a nivel atómico mediante cristalografía de rayos X, junto al equipo de investigación de la Dra. Nuria Verdaguer, la interacción de los dominios C2A y C2B de Rabfilina3A con Ca^{2+} y PIP_2 (Guillen et al., 2013), y más recientemente como el dominio C2B se coordina para interactuar con SNAP25 (Ferrer-Orta et al., 2017).

Investigaciones realizadas a finales de los años 90 con ratones *knock-out* de Rabfilina3A encontraron que las propiedades sinápticas se observaban inalteradas y eran fértiles sin que se apreciaran alteraciones fisiológicas (Schluter et al., 1999). Sin embargo, ratones *knock-out* de Sinaptotagmina1

mueren a las 48 horas del nacimiento al presentar una fusión no sincronizada de vesículas sinápticas (Geppert et al., 1994). No obstante, en la última década, nuevos estudios sugieren que Rabfilina3A está implicada en enfermedades neurológicas como la neurohipofisitis (Iwama et al., 2015; Yasuda et al., 2018), el Alzheimer (Tan et al., 2014), la diabetes insípida (Sakurai et al., 2017), la enfermedad de Huntington (Smith et al., 2007), y también en la polarización y conducción del tráfico de vesículas (Yuan et al., 2017) y en la retención de los receptores NMDA en la membrana postsináptica (Stanic et al., 2015).

Dada la implicación de Rabfilina3A en numerosas patologías y considerando los resultados previos de nuestro grupo de investigación sobre Rabfilina3A, se trató de comparar mediante el uso de herramientas bioinformáticas el sitio de unión de los dominios C2B de Sinaptotagmina1 y Rabfilina3A con SNAP25, para dilucidar la especificidad y el papel diferenciador de SNAP25 a la hora de interactuar con dos proteínas homólogas como lo son Sinaptotagmina1 y Rabfilina3A. Además, se validó la interacción de Rabfilina3A con SNAP25 endógeno con resolución de una sola molécula en células PC12 mediante la técnica de ensayo de ligación por proximidad (PLA), y también con otras proteínas circundantes a SNAP25 como Sintaxina1A, VAMP2 y Sinaptotagmina1 endógenas. Se encontró un nuevo papel de Rabfilina3A promoviendo el anclaje y/o retención de SNAP25 a la membrana plasmática que es dependiente de la zona de interacción Rph3A-SNAP25 y también dependiente de Rph3A-PIP₂. Estos resultados sugieren una función crítica para Rabfilina3A que regula el transporte y la localización de SNAP25, proteína sináptica esencial, gracias a su interacción con ella y PIP₂. Por tanto, estos datos apuntan a que Rabfilina3A se ha especializado en un papel diferente a Sinaptotagmina1, y no sólo tiene un papel importante en la fusión de vesículas, sino más bien en el transporte de vesículas y su dirección.

III.3. Resultados

III.3.1. El dominio C2B de Rabfilina3A no conserva la zona de interacción de Sinaptotagmina1 con SNAP25.

Sinaptotagmina1 presenta una alta homología estructural con la parte C-terminal de Rabfilina3A. Ambas disponen de dos dominios C2 en tándem que interaccionan con lípidos de membrana de manera dependiente de Ca^{2+} (Guillen et al., 2013).

Si comparamos estructuralmente la región de interacción Rph3A-C2B y Sinaptotagmina1-C2B con SNAP25, observamos que ambas interaccionan por regiones distintas a dos regiones cercanas de SNAP25 (Figura. III.1). Al compararlos de manera general, sólo el dominio C2B de Rabfilina3A interacciona con residuos de la hélice N-terminal de SNAP25, mientras que Sinaptotagmina1 interacciona con ambas hélices incluso con un aminoácido de Sintaxina1A (Figura. III.1). Si analizamos en profundidad la zona de interacción de SNAP25 con Rabfilina3A, principalmente incluye dos regiones separadas, la región I que abarca desde el aminoácido E37 al D41 y la región II que incluye desde el D51 al E55 de SNAP25. Una región central hidrofóbica formada desde I44 a L47

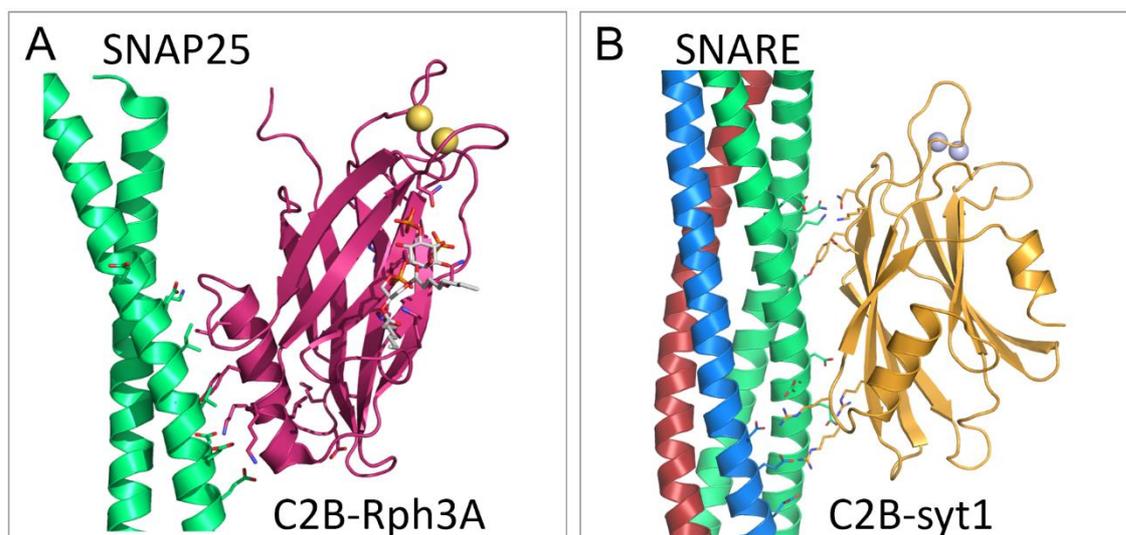


Figura. III.1. Comparación estructural de la interacción de SNAP25 con Rph3A-C2B y con Sinaptotagmina1-C2B. **A)** Vista completa de la interacción entre Rph3A-C2B (fucsia) y la hélice N-terminal de SNAP25 D41-E55 (verde) (PDB: 5LOB), la molécula de PIP_2 unida al clúster rico en lisinas del dominio C2B (varillas) y dos iones de Ca^{2+} (Esferas amarillas) en la región de unión a Ca^{2+} se muestran también (PDB: 5LO8). **B)** Vista completa de Sinaptotagmina1-C2B/complejo SNARE (PDB 5CCG), los dos iones de Ca^{2+} unidos en la región de unión a Ca^{2+} se muestran en púrpura.

queda entre estas dos regiones, ayudando a estabilizar la interacción a través de residuos hidrofóbicos de la hélice 2 del dominio C2B de Rabfilina3A, especialmente el L655 (Figura III.1A y Figura III.2A).

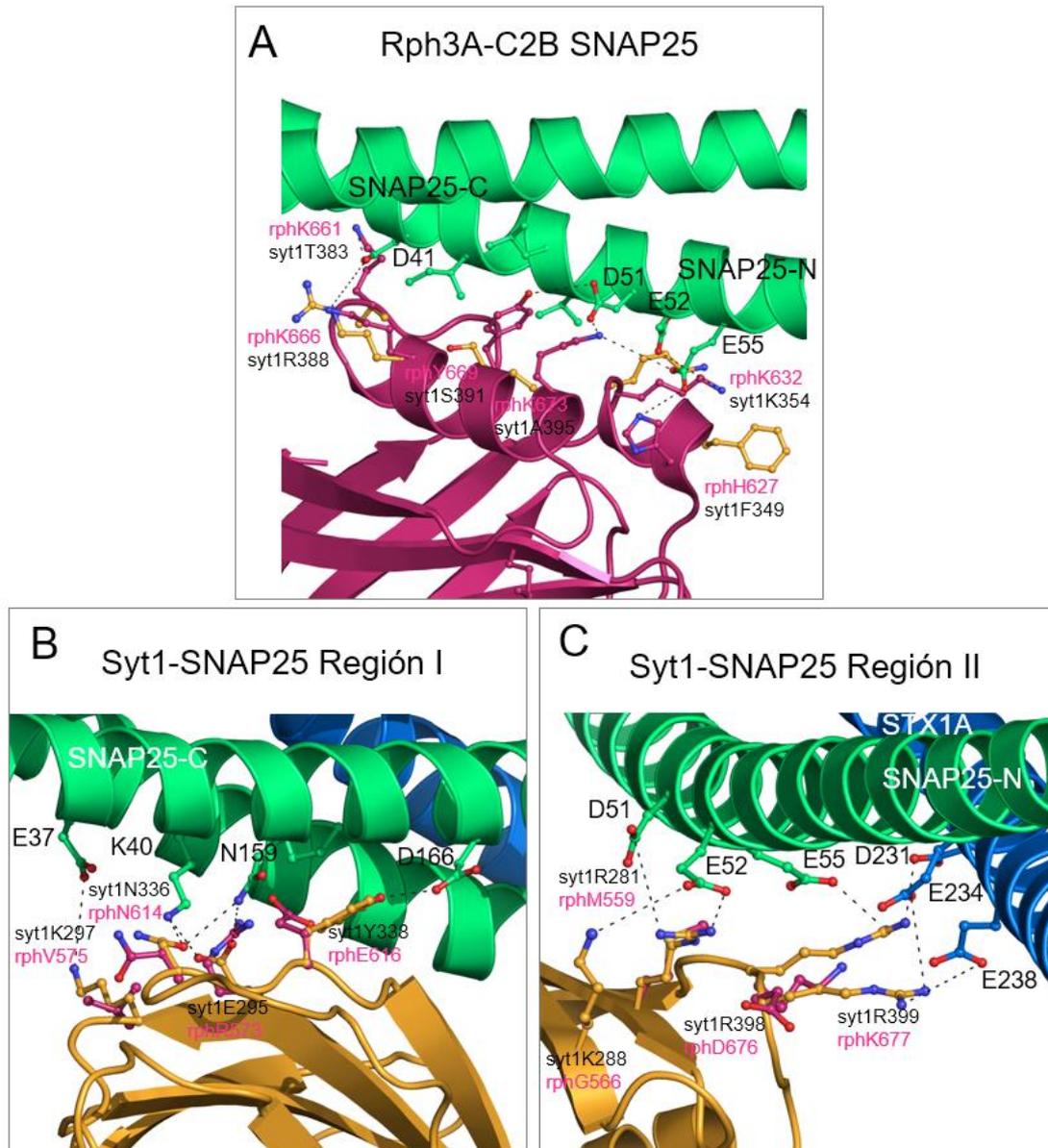


Figura. III.2. Comparación en detalle de la región de interacción SNAP25 con Rabfilina3A y Sinaptotagmina1A. **A)** Vista en detalle de los residuos de Rph3A-C2B (bolas y varillas fucsia) H627, K632 y K673 interaccionando con los residuos de SNAP25 D51, E52 y E55 (bolas y varillas verdes), por otro lado, el segundo grupo del dominio C2B donde los aminoácidos K661 y K666 interaccionan con los aminoácidos de SNAP25 E38 K40 y D41. El solapamiento con el dominio C2B de Sinaptotagmina 1 se muestra en amarillo donde no se observa que haya una conservación evolutiva de estos residuos clave H627, K673 y K661 de Rph3A. **B)** Vista en detalle de la región I de Sinaptotagmina1 E295, K297, N336 y Y338 que correspondería en Rph3A con R573, V575, N614 y E616, sólo N614 y E616 serían capaces de interaccionar con SNAP25. **C)** Vista en detalle de la Region II de Sinaptotagmina1: R281, K288, R398, R399 solapan con M559, G566, D676 y K677 de Rph3A, ninguno de estos residuos sería capaz de interaccionar con el complejo SNARE

No obstante, las interacciones de Sinaptotagmina1-C2B con SNARE involucran a la misma zona de SNAP25 en la hélice N-terminal que interacciona con Rph3A-C2B, salvo que además incluye residuos de la hélice C-terminal de SNAP25 y Sintaxina1A (Figura. III.2B y Figura. III.2C).

Curiosamente, cada dominio C2B de las dos proteínas interacciona con SNAP25 mediante motivos diferentes, pero ambas proteínas interaccionan con la misma región de SNAP25 (Figura. III.1). Rabfilina3A usa dos hélices α localizadas al final del dominio (Figura. III.2A), la hélice $\alpha 1$ para la región II de SNAP25 y la hélice $\alpha 2$ para la región I de SNAP25, la interacción es antiparalela. Por el contrario, Sinaptotagmina1 usa residuos localizados en diferentes regiones. La región I de SNAP25 interacciona con el final de la $\beta 2$ y el *loop* que da comienzo a $\beta 5$ (Figura. III.2B y marcado en rojo en el alineamiento de la Figura. III.3), la región II de SNAP25 interacciona con los residuos del final de la $\beta 1$, principios de $\beta 2$, y $\beta 8$ de Sinaptotagmina1-C2B (en alineamiento estructural en Figura. III.2B, y marcado en rojo en alineamiento de secuencia Figura. III.3).

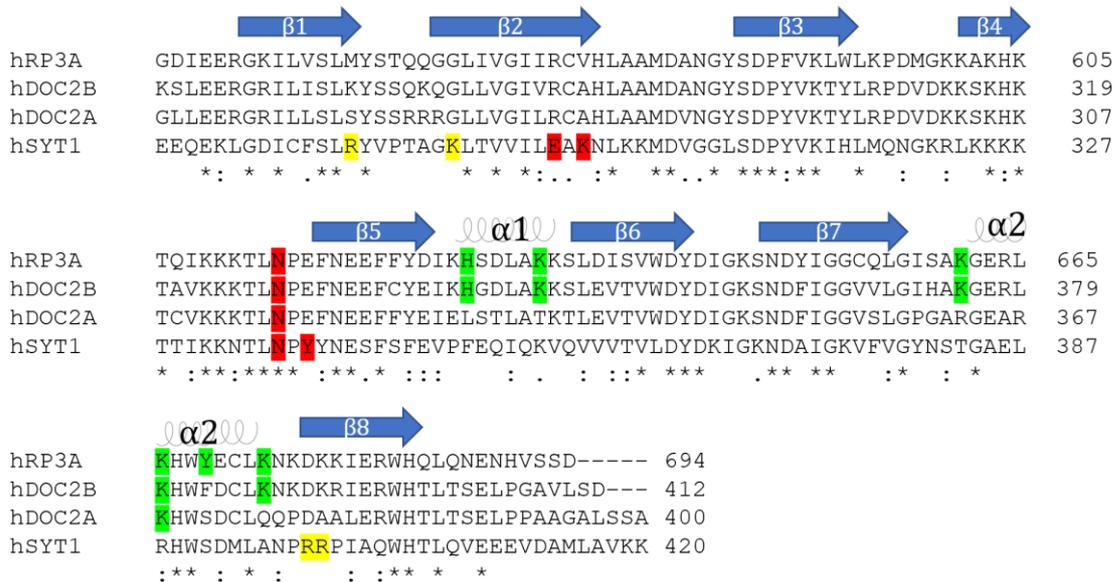


Figura. III.3. Alineamiento de secuencia de los dominios C2B de Sinaptotagmina1 y Rabfilina3A. Marcadas en azul las hebras β de los dominios, y con una espiral las α -hélices. En rojo están marcados los aminoácidos de Sinaptotagmina1-C2B que interaccionan con la región I de SNAP25. En amarillo están marcados los aminoácidos de Sinaptotagmina1-C2B que interaccionan con la región II de SNAP25. En verde se indican los residuos de Rph3A-C2B que SNAP25 ($\alpha 1$ interacciona con la región II de SNAP25, y la $\alpha 2$ interacciona con la región I de SNAP25).

Por ende, tanto el alineamiento de secuencia como el alineamiento estructural de los dos dominios C2B demuestra que los residuos clave de Sinaptotagmina1-C2B que interaccionan con SNAP25/STX1A en el complejo SNARE no se encuentran conservados en el dominio C2B de Rabfilina3A, ni viceversa para los residuos de Rph3A-C2B que interaccionan con SNAP25, tampoco se conservan en Sinaptotagmina1-C2B, siendo además dos zonas totalmente distintas en los dominios.

Además, se realizó un análisis del potencial electrostático de la superficie final de las α -hélices que es la región de interacción con SNAP25 del dominio C2B de Rabfilina3A. El dominio C2B de Rabfilina3A presenta un potencial electropositivo mucho más alto que el dominio C2B de Sinaptotagmina1 (Figura. III.4), que presenta una carga más neutra, donde los aminoácidos cargados positivamente se encuentran en la parte lateral. Esto refuerza la idea que la zona de interacción con Rabfilina3A es altamente específica y cada proteína a pesar de tener una homología estructural se ha especializado en interaccionar con SNAP25 y el complejo SNARE a través de diferentes regiones específicas.

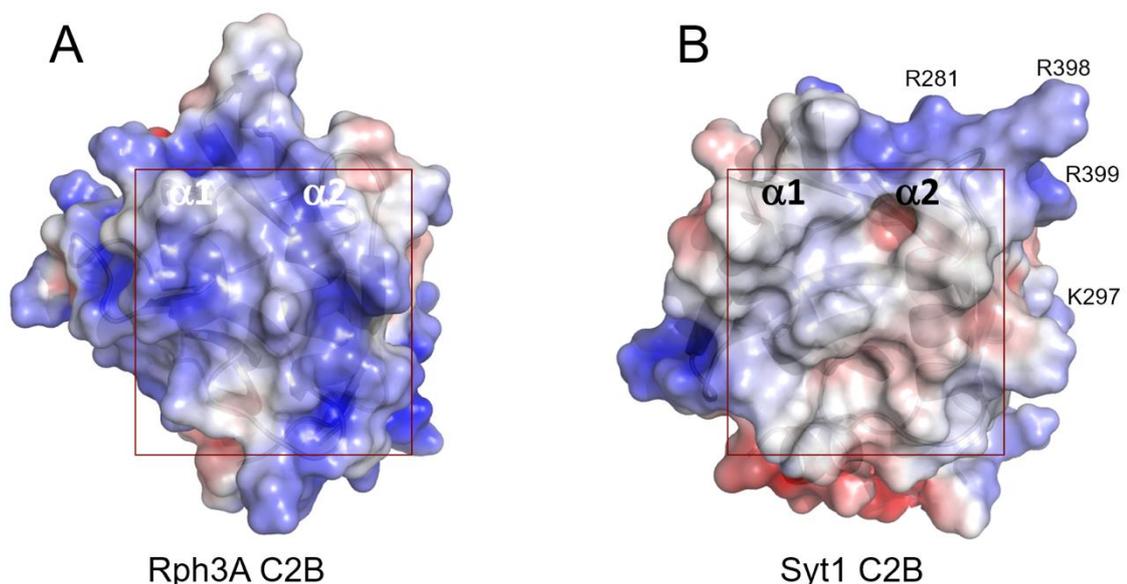


Figura. III.4. Comparación del potencial electrostático del final de los dominios C2B de Rph3A y Sinaptotagmina1. **A)** Potencial electrostático de las hélices finales del dominio C2B de Rph3A. **B)** Potencial electrostático de la hélice final del dominio C2B de Sinaptotagmina1.

III.3.2. Caracterización de la interacción mediante ensayo de ligación por proximidad de Rabfilina3A con proteínas endógenas de fusión de vesículas.

Estudios preliminares aún sin publicar, pero presentados en la tesis doctoral de la Dra. María Teresa Coronado Parra, describen la interacción entre Rph3A-HA y SNAP25-myc sobreexpresadas en células PC12 mediante ensayo de ligación por proximidad (PLA), junto a mutantes de la zona de interacción descrita en el epígrafe anterior. En la presente tesis doctoral se llevó a cabo un enfoque más fisiológico sobreexpresando sólo Rph3A-HA para determinar si interacciona con proteínas endógenas.

Se realizaron ensayos de ligación por proximidad *in situ* (PLA) (Koos et al., 2014) en células PC12 transfectadas con Rph3A-HA para evaluar si Rabfilina3A también interacciona con proteínas donde ya está descrita la interacción con SNAP25, y en que compartimentos celulares. En concreto, se analizaron las proteínas involucradas en la fusión de vesículas sinápticas, el complejo SNARE (Y.A Chen & R.H Scheller, 2001): SNAP25, VAMP2 y STX1A, y la proteína señalizadora de la fusión a través de Ca^{2+} : Synaptotagmina1 (Syt1) (Zhou et al., 2015).

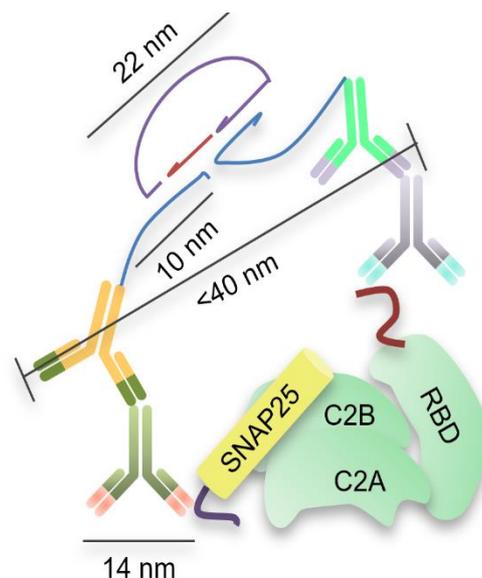


Figura. III.5. Esquema molecular de la reacción de PLA. Esquema de la interacción entre SNAP25 y Rph3A (verde) detectada mediante PLA, los anticuerpos primarios estarían detectando los tallos de cada proteína. Los anticuerpos secundarios si están a menos de 40 nm darían una reacción positiva dado que permitirían la hibridación de los oligonucleotidos.

Los ensayos de ligación por proximidad (PLA) permiten detectar interacciones individuales entre dos proteínas *in situ* en células fijadas, observando un punto individual. Cada punto es una interacción entre las proteínas para las que se ha hecho el ensayo donde el reportero es una molécula de ADN marcada con fluoróforos (Ver materiales y métodos II.5).

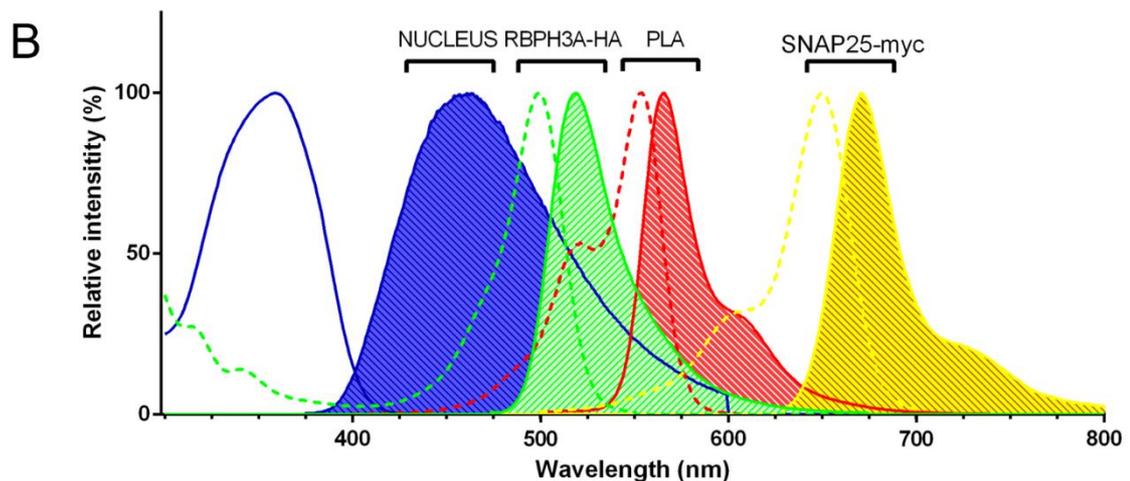
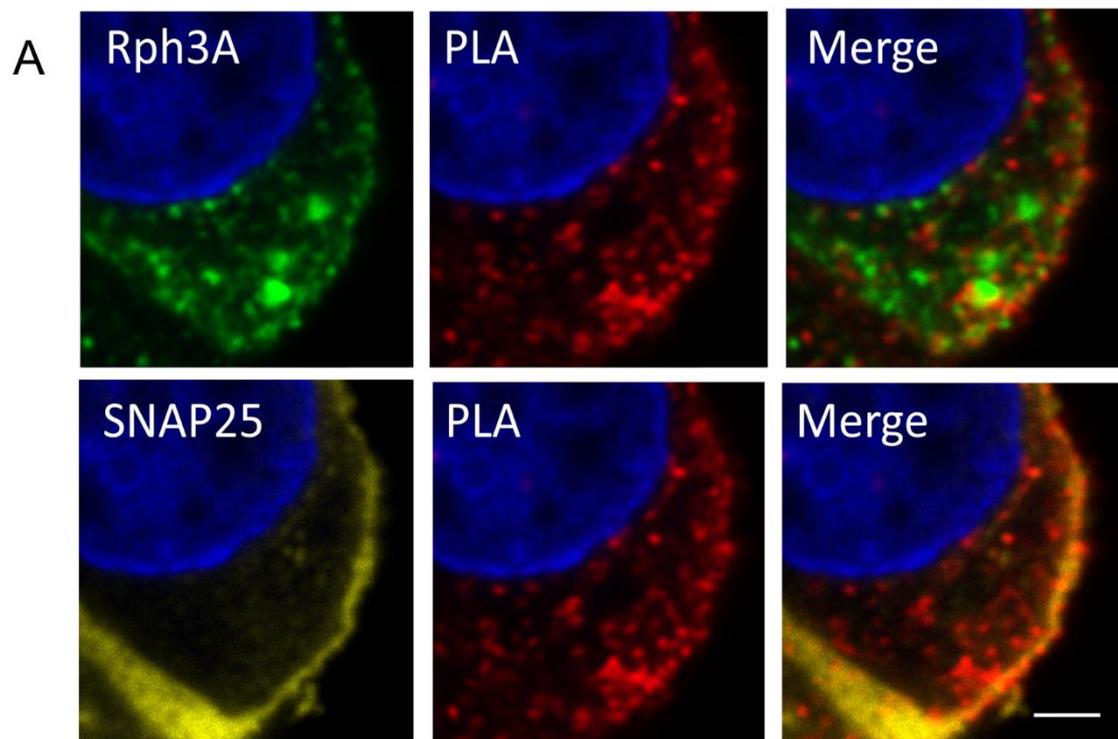


Figura. III.6. Detalle de célula de microscopía confocal con cuatro sondas fluorescentes. **A)** Imágenes ampliadas de célula PC12 de inmunofluorescencia junto a ensayo PLA, en azul el núcleo teñido con DAPI, en verde Rph3A teñido con el fluoróforo Alexa-Fluor 488, en amarillo SNAP25 teñido con Alexa Fluor 647, y en rojo ensayo PLA teñido con fluoróforo Cy3. Barra de escala en blanco de 2 μm . **B)** Espectro de los fluoróforos utilizados en el ensayo. Aunque existe solapamiento espectral, las señales son detectadas en modo secuencial por distintos detectores del microscopio confocal.

Es importante comprender a nivel molecular la reacción que está ocurriendo en el ensayo de ligación por proximidad (Weibrecht et al., 2010). Consiste en utilizar anticuerpos primarios frente a las proteínas que deseamos saber si interaccionan, posteriormente se añaden anticuerpos secundarios modificados con oligonucleótidos como sondas de proximidad. Si estos anticuerpos están lo suficientemente cerca a una distancia inferior a 40 nm, los oligonucleótidos serán capaces de hibridar con otros oligonucleótidos y se formará un bucle de ADN. Mediante la adición de una ligasa se creará una molécula de ADN circular con los oligonucleótidos que hibridan en cada interacción de proteína (Figura. III.5). Finalmente, el ADN circular ligado se amplificará mediante la técnica de la replicación en círculo rodante, en inglés *rolling circle amplification* (RCA), usando uno de los oligonucleótidos de un anticuerpo como cebador. El ADN se amplificará más de 1000 veces, generando una enorme cadena simple de ADN muy compactada (Clausson et al., 2015). Finalmente, la señal será visible mediante la adición e hibridación con unos oligonucleótidos marcados fluorescentemente, complementarios al concatémero del producto de RCA. Esta reacción genera un enorme producto de ADN de alrededor de 90.000 kDa y el tamaño es de alrededor de 0.1 μm (Raykova et al., 2016).

Consecutivamente a la reacción de PLA, se realizan ensayos de inmunofluorescencia para demostrar la localización y expresión de Rph3A-HA. En la Figura. III.6A observamos que se generan puntos PLA que indican que ha ocurrido la interacción entre Rph3A-HA y SNAP25, sin embargo, no existe colocalización entre la tinción con las proteínas y los puntos PLA. Observando con detenimiento el solapamiento (*merge*) entre Rabfilina3A y PLA (Figura. III.6A), vemos que los puntos PLA parecen serpentear las señales de Rabfilina3A y no colocalizan, del mismo modo ocurre con SNAP25 cerca de la membrana.

Esta observación podría deberse a una transferencia de energía, dado que si analizamos el espectro de los fluoróforos utilizados en este ensayo (Figura. III.6B), podríamos especular que podría deberse a una transferencia de

energía entre la señal de Rph3A-HA (Alexa Fluor 488) a la señal PLA (Cy3), y estaría ocultando la señal de Rabfilina3A en las zonas donde hay PLA positivo. Sin embargo, experimentos realizados con el equipo confocal en el modo FRET *acceptor-photobleaching* (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012), donde se fotoquemó la señal de Cy3, para devolver la señal verde de Rabfilina3A (Alexa Fluor 488), esta no aparecía. Por tanto, podíamos concluir que esta suposición no estaba ocurriendo.

Otra hipótesis posible para ver este efecto podría ser debido a la enorme cantidad de ADN generada durante la reacción de PLA, que estaría bloqueando el acceso a los anticuerpos para realizar la posterior tinción. Por tanto, la tinción de las proteínas que estamos analizando con anticuerpos secundarios fluorescentes sólo nos mostraría la localización de la parte de proteínas que no están interaccionando, la parte que interacciona la estaríamos viendo en señales de PLA.

Se caracterizaron si existían interacciones entre Rph3A-HA sobreexpresada con SNAP25 endógena, y con aquellas proteínas que se ha demostrado su interacción con SNAP25 (VAMP2, Sintaxina1A y Sinaptotagmina1), para evaluar el entorno más cercano a SNAP25 junto a Rabfilina3A. En la Figura. III.7 observamos la localización de estas proteínas: Rabfilina3A sobreexpresada presenta un patrón de localización propio de su naturaleza, observándose en acúmulos vesiculares. VAMP2 presenta un patrón de localización vesicular por el citoplasma, sin embargo, fue detectada también en el interior del núcleo celular incluso con una mayor intensidad. Este efecto podría ser debido a que VAMP2 esté actuando como factor transcripcional, al igual que sus proteínas homólogas realizan gracias al *splicing* alternativo: Sintaxina1B (Pereira et al., 2008) y Sintaxina3 (Giovannone et al., 2018). Otra hipótesis podría ser debido a una interacción inespecífica del anticuerpo primario, dado que VAMP2 no ha sido descrita nunca en el núcleo. Sintaxina1A presenta una distribución vesicular homogénea dispersa por todo el citoplasma, no apreciándose en la membrana plasmática. Sinaptotagmina1 presenta un

patrón de localización vesicular característico dado que se encuentra anclada a las vesículas *dense core* (Wegrzyn et al., 2010).

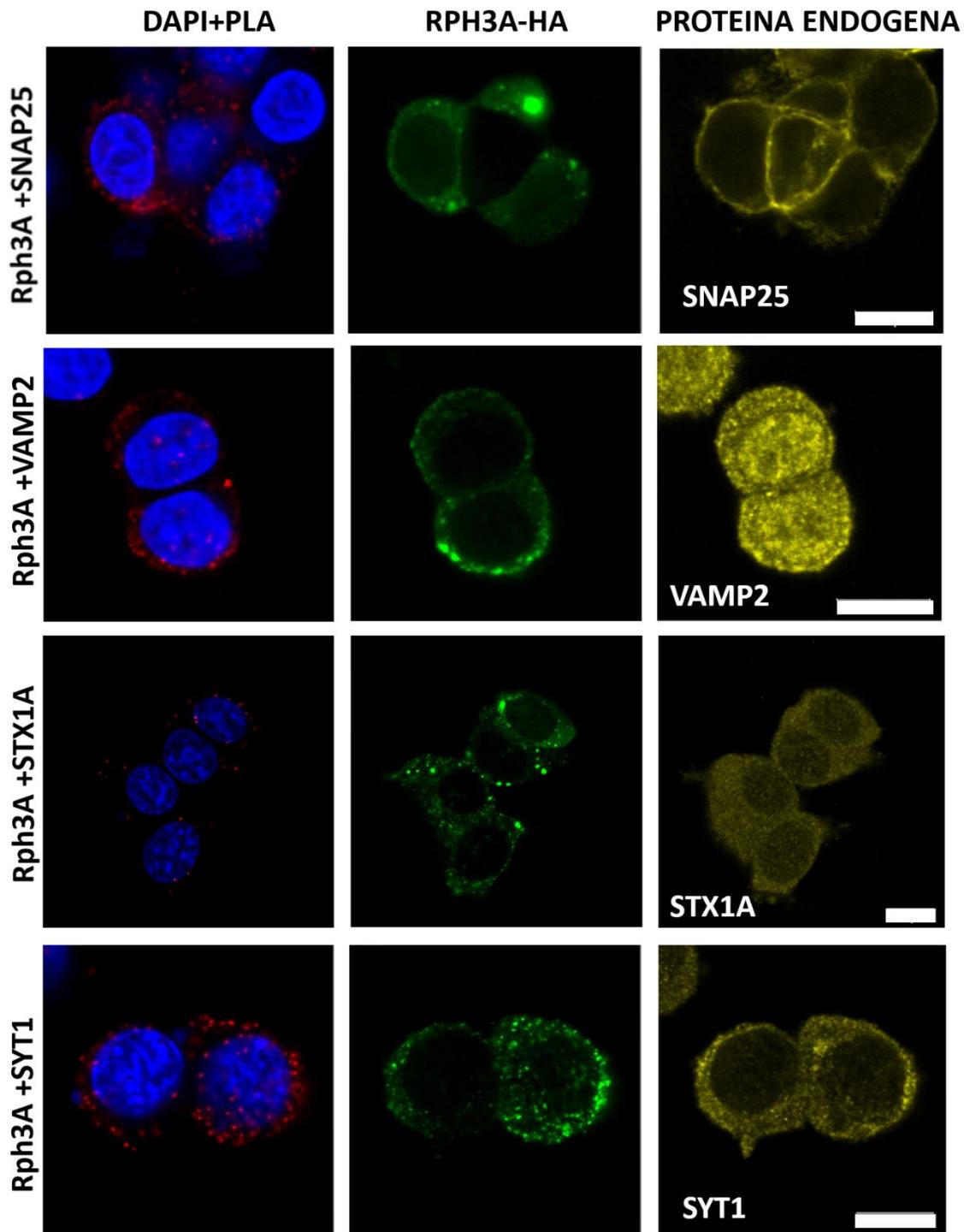


Figura. III.7. Imágenes de inmunofluorescencia en confocal del ensayo de PLA en células PC12. En la primera columna se muestran las señales de PLA (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul). En la segunda columna se muestra en verde Rph3A-HA (Rph3A) transfectada y teñida con anti-HA. En la tercera columna se muestra la proteína endógena teñida con su anticuerpo correspondiente, se observa cómo no todas las células están transfectadas. La primera fila es el experimento Rph3A – SNAP25 endógeno. La segunda fila Rph3A – VAMP2 endógena. La tercera fila Rph3A – Sintaxina1A (STX1A) endógena. La cuarta fila es Rph3A – Sinaptotagmina1 (Syt1) endógena. Las barras de escala miden 10 μ m.

Para la valoración de determinar si el ensayo PLA es positivo, se tomó como umbral el número de señales positivas que genera el PLA del par Rph3A-HA - SNAP25 endógeno como umbral de control positivo de interacción, dado que esta interacción está ampliamente demostrada (Lee et al., 2008; Tsuboi & Fukuda, 2005). Rabfilina3A, VAMP2 y Sinaptotagmina1 se encuentran presentes en vesículas *dense core* de PC12 (Wegrzyn et al., 2010). En la Figura. III.7, observamos una cantidad considerable de señales PLA de VAMP2 y Sinaptotagmina1 con Rabfilina3A a nivel de citosol, en el gráfico A de la Figura. III.8, se observa que no hay diferencia significativa entre VAMP2 comparado con SNAP25 ni con Sinaptotagmina1 comparado con SNAP25, por lo que la interacción está ocurriendo al mismo nivel que con SNAP25, y se debe a interacciones significativas.

Por tanto, Rabfilina3A parece interactuar tanto en las vesículas del citoplasma como en la membrana plasmática con SNAP25 y Sinaptotagmina1 endógenas, mientras que con VAMP2 interactúa exclusivamente a nivel de vesículas citoplasmáticas, y no se detecta interacción con Sintaxina1A.

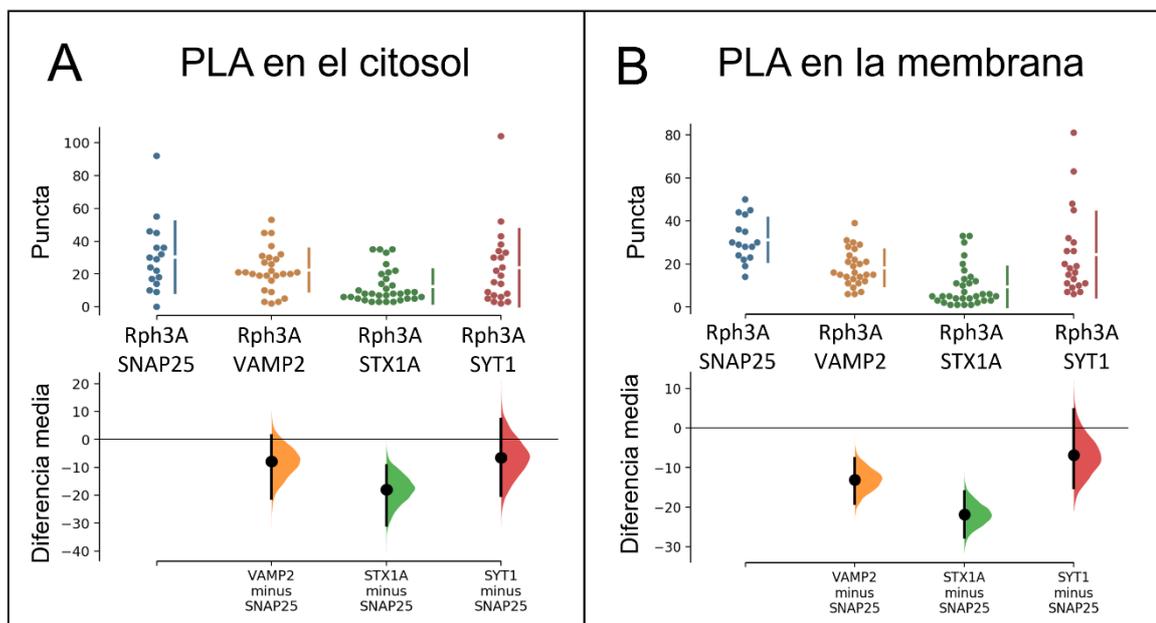


Figura. III.8. Gráficos de la distribución de eventos de PLA en la membrana y citosol de cada célula. Células PC12 transfectadas con HA-Rph3A-WT en las que se hicieron ensayos de PLA frente a SNAP25 (control positivo), VAMP2, STX1A y Syt1 endógenas. Se contaron los eventos de PLA en el citosol (A) y en la membrana (B) de cada célula. El gráfico superior muestra la distribución de eventos de cada célula, y grupo. En el gráfico inferior se muestran la diferencia media como un punto, la distribución bootstrap, y el intervalo de confianza del 95% como barras de error.

III.3.3. Rabfilina3A involucrada en la localización de SNAP25

Rabfilina3A parece interactuar con SNAP25 tanto a nivel vesicular en el citosol como en la membrana plasmática según demostramos en la anterior sección. SNAP25 es una proteína tipo SNARE localizada en la cara interna de la membrana plasmática, su función principal es actuar en la fusión de vesículas con la membrana plasmática de una manera dependiente de Ca^{2+} en células neuroendocrinas (Jahn & Fasshauer, 2012). Sin embargo, una pequeña parte de SNAP25 se encuentra y se mantiene en el citosol vía endocitosis, actuando en la ruta de tráfico y reciclaje del endosoma (Aikawa et al., 2006).

SNAP25 no tiene ninguna región transmembrana, sino que es sintetizada en el citosol celular donde inicialmente queda flotando libremente en el líquido intracelular hasta que se acerca a la membrana plasmática y la palmitoil aciltransferasa DHHC2 (Greaves et al., 2010), la palmitoila y la ancla a la membrana plasmática. Se han determinado que la zona de palmitoilación se encuentra en el *linker* central entre las dos α -hélices, donde existe un pequeño grupo de aminoácidos cargados positivamente que permiten su acercamiento a la membrana plasmática, y su posterior palmitoilación en residuos de cisteína por la DHHC2. No obstante, el acercamiento a través de los residuos cargados positivamente es meramente una ayuda dado que tras su depalmitoilación la proteína no queda anclada a la membrana (Weber et al., 2017).

Dado que Rabfilina3A se ha demostrado que interactúa con SNAP25, pero no se le ha asociado una función fisiológica concreta. Se evaluó si

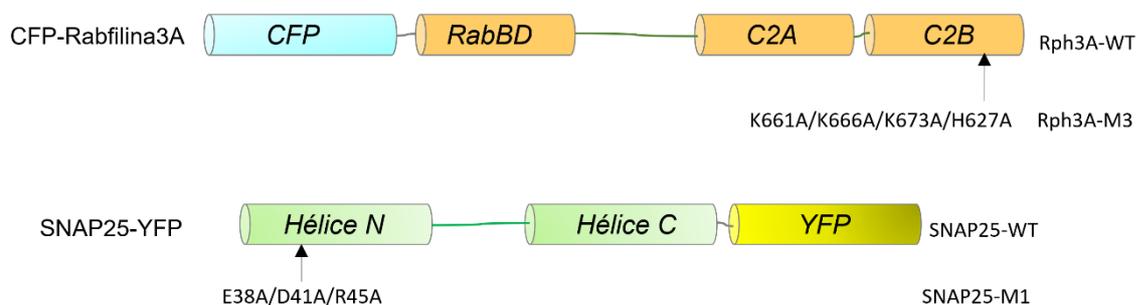


Figura. III.9. Esquema de los dominios de las proteínas de fusión fluorescentes utilizadas. Se muestran los dominios principales de cada proteína, y también las mutaciones y localización orientativa dentro cada dominio.

Rabfilina3A podía favorecer la localización en la membrana plasmática en un modelo fisiológico *in vivo*. Para ello se utilizó la línea celular PC12 como modelo para estudiar la localización de SNAP25 bajo la influencia de Rabfilina3A usando construcciones fluorescentes con el par de proteínas fluorescentes: CFP-Rph3A y SNAP25-YFP, así como los mutantes en la zona de interacción (Figura. III.9).

En primer lugar, como control de las proteínas fluorescentes se comprobó que estas eran totalmente solubles, y se localizaban de forma homogénea por toda la célula sin presentar ningún patrón de localización característico o agregación. En la Figura. III.10 se observa que el patrón y localización de las proteínas es totalmente correcto tanto para la versión eCFP como para eYFP, en los fenotipos adrenal y neuronal de las células PC12 transfectadas.

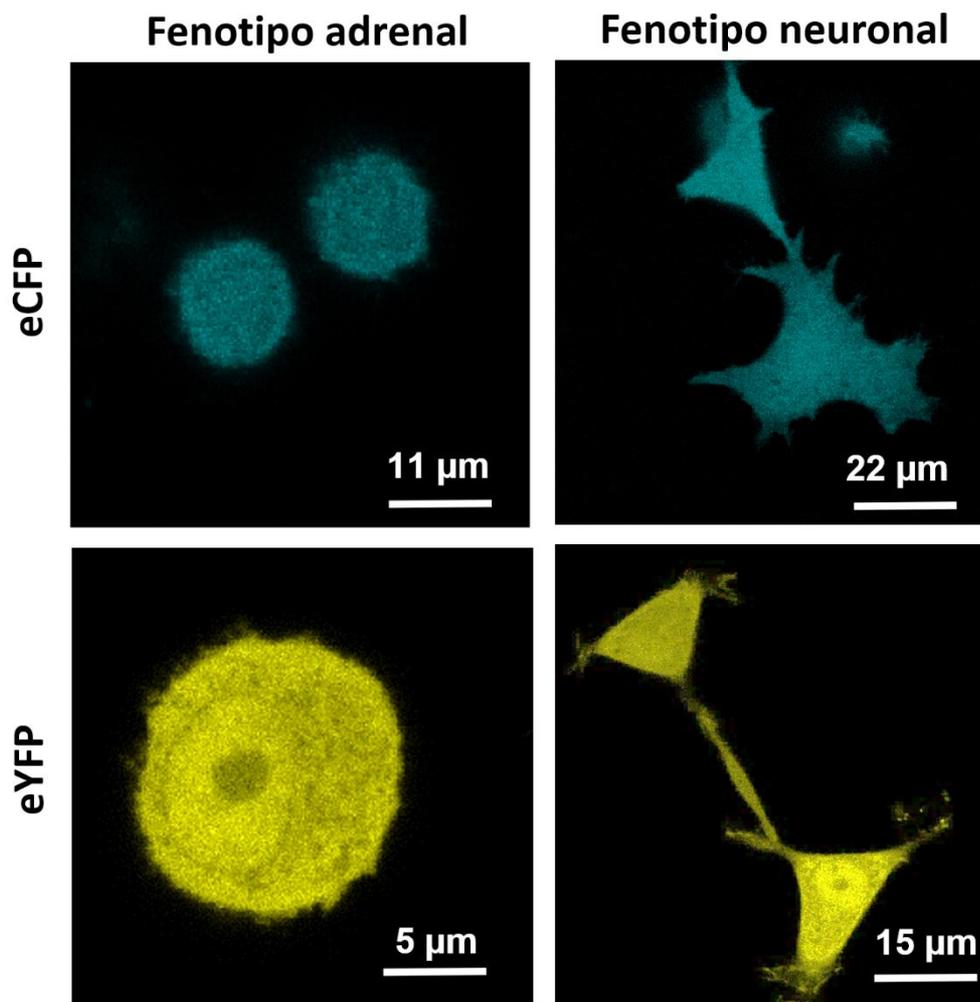


Figura. III.10. Imágenes de microscopía confocal de PC12 expresando eCFP y eYFP. En la columna izquierda células de fenotipo adrenal, y en la columna derecha células PC12 con fenotipo neuronal

III.3.3.1. Implicación de la parte final del dominio C2B-Rph3A en fenotipo adrenal.

En primer lugar, se transfectaron las células con las construcciones *wild-type*, y se comprobó que el patrón de localización era el característico de la naturaleza de cada proteína (Figura. III.11). Rph3A-eCFP, se observó localizada por todo el citoplasma en acúmulos que corresponden con el transporte de vesículas. SNAP25-eYFP, se observó localizada intensamente en la membrana plasmática, y una menor parte dispersa por el citoplasma y regiones celulares que podrían corresponder con el aparato de Golgi y los endosomas.

A continuación, se analizó cuantitativamente el porcentaje de SNAP25-YFP *wild-type* que se encontraba anclado a la membrana plasmática, sin la influencia de Rabfilina3A, se determinó que un 50% de SNAP25 se encontraba localizado en la membrana plasmática (Figura. III.11B). Sin embargo, al transfectar con el mutante de la región N-terminal de SNAP25 que se determinó por estudios estructurales que interacciona con Rabfilina3A (Ferrer-Orta et al., 2017) y también con Sinaptotagmina1 (Zhou et al., 2017). Se observó que la localización en membrana plasmática disminuía considerablemente (Figura. III.11B). Este hecho sugiere que esta región de SNAP25 es determinante para su correcta localización y anclaje a la membrana plasmática.

Para evaluar si este efecto depende de la interacción de Rabfilina3A con SNAP25, se realizó la misma aproximación doble transfectando y combinando versiones *wild-type* mutantes de las proteínas de fusión fluorescentes. Al transfectar SNAP25 *wild-type* junto a Rabfilina3A *wild-type* (Figura. III.11A), la cantidad de SNAP25 localizado en la membrana plasmática era similar a cuando se transfecta sin Rabfilina3A (Figura. III.11B), presentando un 50% de proteína localizada en membrana plasmática. En cambio, al transfectar SNAP25 *wild-type* junto al mutante de Rabfilina3A en la α -hélice del final del dominio C2B, la localización cae cerca de un 15% frente al *wild-type*. Al testar la combinación inversa, Rabfilina3A *wild-type* junto a SNAP25 mutante, se recupera ligeramente la localización de este mutante en un 20% respecto al SNAP25 mutante sin

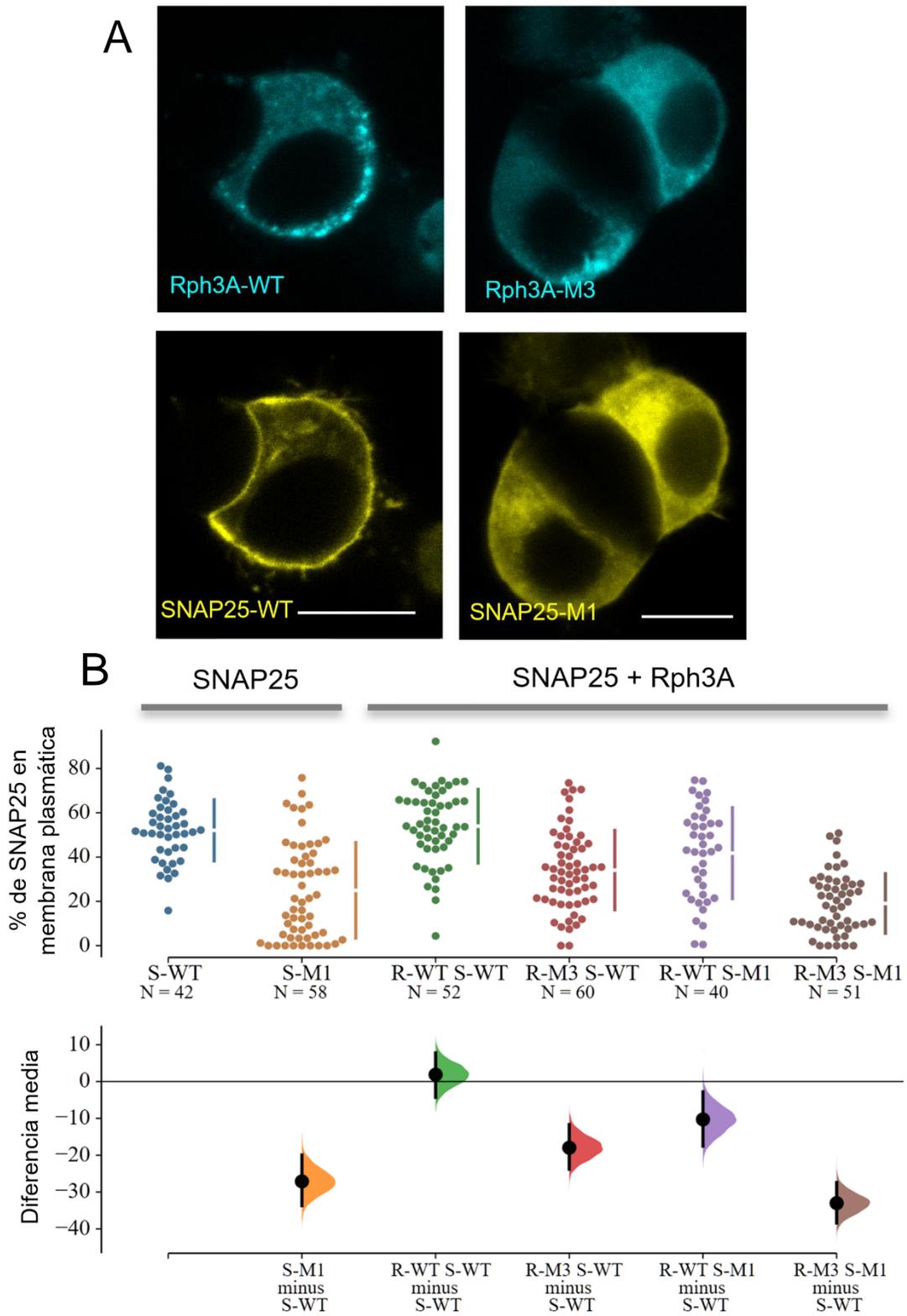


Figura. III.11. Influencia de la parte final del dominio C2B de Rph3A en SNAP25. **A)** Imágenes de microscopía confocal de células PC12 en fenotipo adrenal, expresando Rph3A-CFP y SNAP25-YFP en la columna izquierda construcciones wild-type y en la columna derecha distintos mutantes. Las barras de escala miden 10 μ m. **B)** El gráfico superior muestra la distribución del porcentaje de SNAP25 y su mutante localizado en membrana plasmática de cada célula, con y sin la influencia de Rph3A y su mutante. El gráfico inferior muestra la diferencia media de cada condición frente a SNAP25 wild-type.

Rabfilina3A, pero sin llegar al nivel de SNAP25-*wild-type*. En cambio, al transfectar con los mutantes de ambas proteínas, la localización cayó un 35% respecto al SNAP25, obteniendo un valor cercano a tan sólo un 15% de localización de SNAP25 en la membrana plasmática (Figura. III.11B).

III.3.3.2. Implicación de la región rica en lisinas del dominio C2A y C2B en fenotipo adrenal.

El PIP₂ es un fosfolípido de tipo fosfoinosítido que representa menos del 1% de los lípidos de membrana, está localizado en microdominios de la cara interna de la membrana plasmática y es muy importante dado que permite el

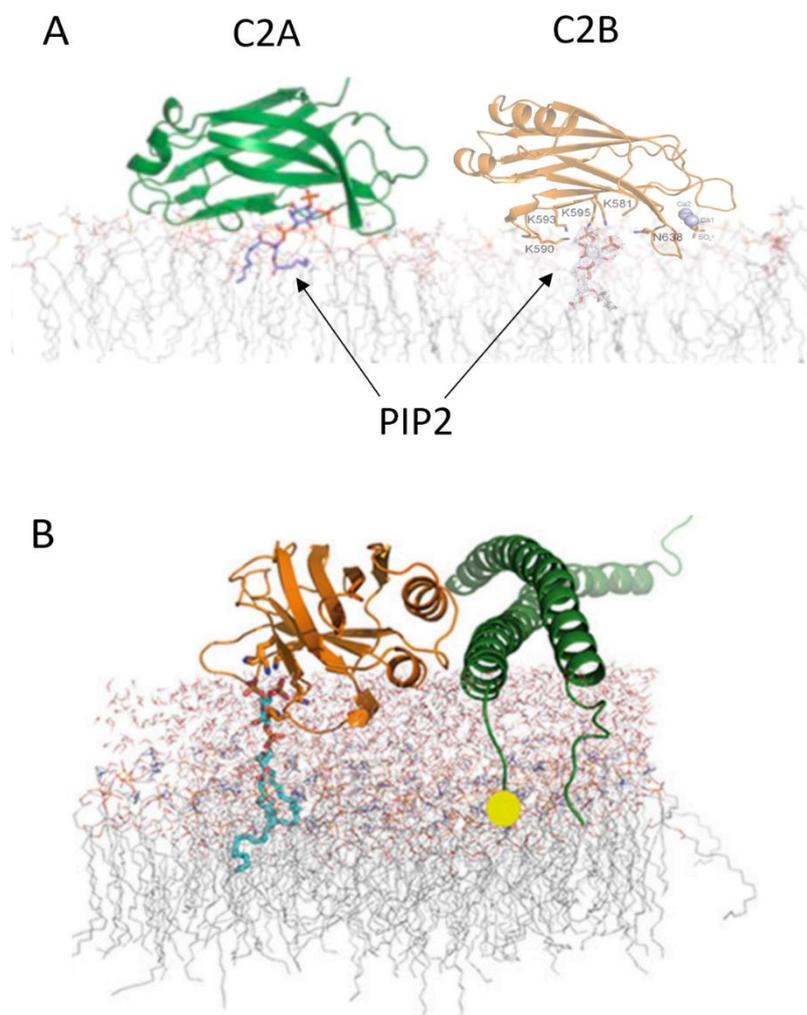


Figura. III.12. Modelo molecular de los dominios C2 de Rph3A con PIP₂. **A)** Representación del dominio C2A y C2B sobre una membrana plasmática y dos moléculas de PIP₂. Imagen de (Ferrer-Orta et al., 2017; Guillen et al., 2013) **B)** Representación del dominio C2B de Rph3A en interacción con SNAP25 y también con el PIP₂ de la membrana plasmática. Imagen de Ferrer-Orta et al., 2017

reclutamiento de proteínas para modular eventos de señalización, especialmente en los eventos de liberación de neurotransmisores (Hamilton et al., 2014). Rabfilina3A, presenta dos dominios C2 en tándem capaces de interactuar con fosfolípidos de membrana de una manera dependiente de Ca^{2+} como la PS, y también con el importante fosfoinosítido PIP_2 a través de otra región del dominio C2 llamada *Lysine Rich Cluster* (LRC) que no depende de la coordinación con Ca^{2+} . Esta región fue determinada por nuestro grupo de investigación, ellos identificaron los aminoácidos clave de ambos dominios C2 de Rabfilina3A involucrados en la interacción con PIP_2 , para ello resolvieron la estructura cristalina del dominio C2A y C2B en complejo con este fosfoinosítido (Ferrer-Orta et al., 2017; Guillen et al., 2013). El bolsillo del dominio que permite la unión con PIP_2 es una región rica en aminoácidos cargados positivamente, lisinas principalmente. Están localizadas en la hebra $\beta 3$ y $\beta 4$ formando una cavidad electropositiva debido a las cadenas laterales de las lisinas que permiten interactuar con los grupos fosfato de la cabeza del fosfolípido PIP_2 . En la Figura. III.12A vemos la configuración espacial de los dos dominios interaccionando con PIP_2 que quedarían acostados sobre la membrana. La α -hélice de la parte final del dominio C2B quedaría disponible para interactuar con SNAP25 por lo que sería factible que esta región rica en lisinas fuera necesaria para la localización correcta de SNAP25 en la membrana plasmática (Figura. III.12B).

Dado que se conocen los residuos de lisinas exactos de interacción con PIP_2 de cada dominio, se realizó mutagénesis dirigida para sustituirlos por el aminoácido alanina sin carga. Simplemente mutando dos aminoácidos de cada

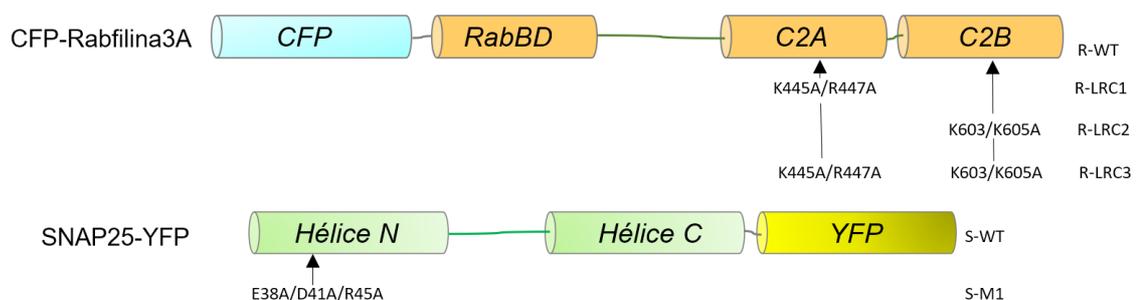


Figura. III.13. Esquema de las proteínas de fusión fluorescente Rph3A y SNAP25 y los mutantes de interacción con PIP_2 .

dominio es suficiente para abolir su interacción (Guillen et al., 2013). En concreto se realizaron tres mutantes de Rabfilina3A: un mutante del dominio C2A llamado R-LRC1 donde se mutó la lisina 445 por alanina (K445A), y la arginina 447 por alanina (R447A), otro mutante del dominio C2B llamado R-LRC2, donde se mutó la lisina 603 por alanina (K603A) y la lisina 605 por alanina (K605A), y también se utilizó el mutante de SNAP25 involucrado en la interacción con Rabfilina3A (Figura. III.13)

Se generaron los mutantes y se transfectó con ellos la línea PC12. En la Figura. III.14A se observa localización tanto del mutante LRC1 como el LRC3, ambos seguían manteniendo un patrón de localización similar a Rabfilina3A *wild-type*, observándose en acúmulos por el citosol probablemente siendo vesículas de transporte donde se unen a ellas a través de las proteínas Rabs que están ancladas a las vesículas. El efecto de la mutación en el PIP₂ no se observa en la localización de Rabfilina3A debido a que esta interacción es transitoria y la concentración de PIP₂ en la membrana es muy baja. Sin embargo, la localización de SNAP25 *wild-type* se ve muy afectada al cotransfectar con cualquier mutante de Rabfilina3A que afecta a su interacción con el PIP₂.

En la Figura. III.14B observamos el gráfico con la cuantificación de la localización de SNAP25. La localización de SNAP25 *wild-type* en membrana plasmática disminuía un 20% al cotransfectar tanto con el mutante LRC1 del dominio C2A (verde) como el mutante LRC2 del dominio C2B (rojo), siendo ligeramente menos acusada con el dominio C2B con una diferencia negativa del 18% al comparar el *wild-type*. Al cotransfectar con el doble mutante para ambos dominios C2 (LRC3) la localización caía aún más (lila), en concreto un 25% menos de localización al comparar con el *wild-type*. Al cotransfectar estos mutantes con el mutante de SNAP25 vemos que la caída es aún más acusada. Es lógico dado que el mutante de SNAP25 con Rabfilina3A *wild-type* (amarillo) presentaba ya una diferencia negativa del 10% respecto al *wild-type*. Sin embargo, al cotransfectar SNAP25 mutante con los mutantes del PIP₂ estos disminuían casi un 30% respecto al *wild-type*, presentando el doble mutante de

Rabfilina3A (LRC3) con SNAP25 mutante (M1) un valor del 25% de SNAP25 en membrana plasmática, cuando SNAP25 *wild-type* junto a Rabfilina3A *wild-type* presenta un 50% de SNAP25 localizado en membrana plasmática.

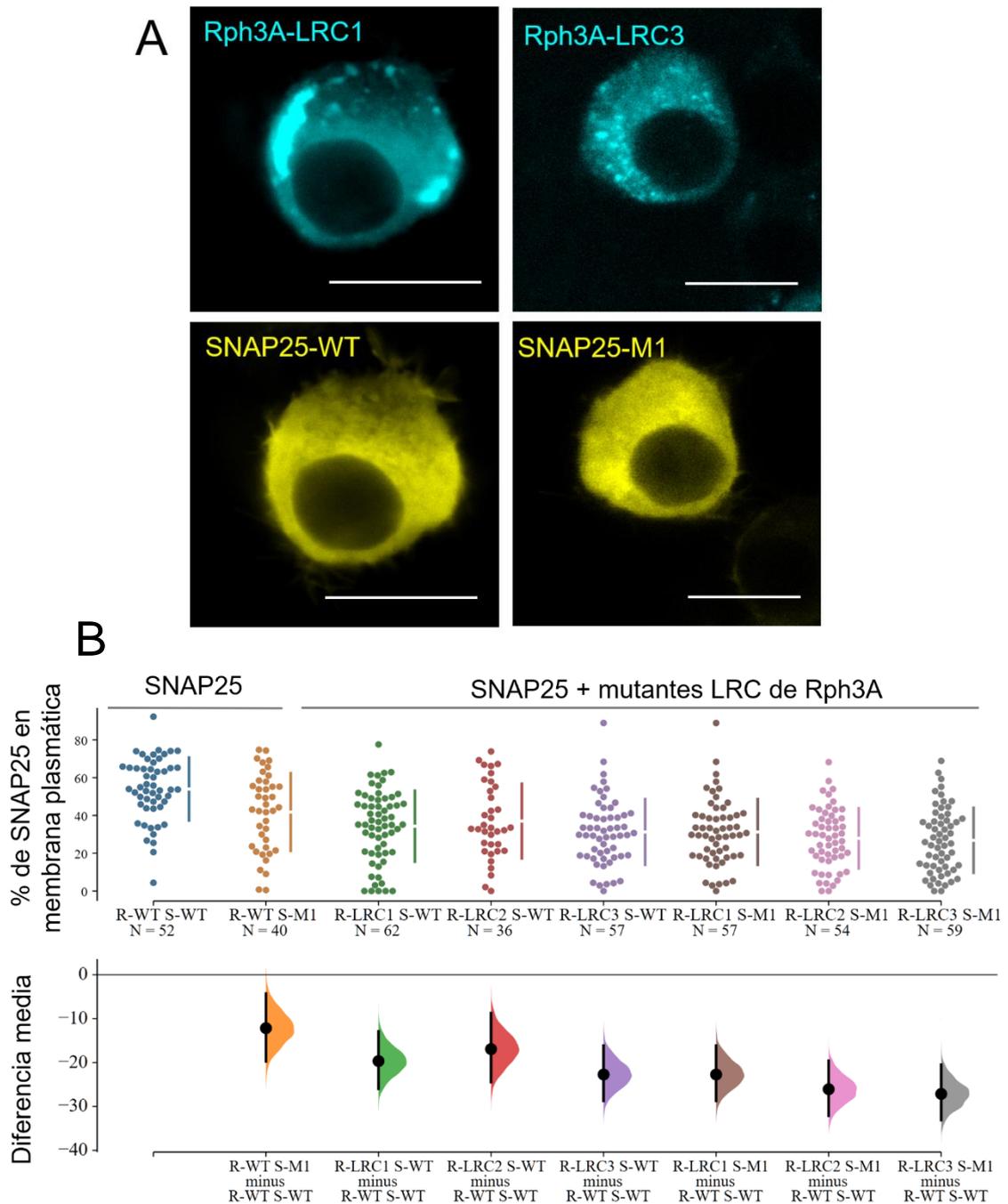


Figura. III.14. Influencia de la región de interacción Rph3A-PIP₂ en SNAP25. **A)** Imágenes de microscopía confocal de células PC12 cotransfectadas en la columna de la izquierda con el mutante LRC1 de Rph3A y SNAP25-WT, y en la columna de la derecha con mutante LRC3 y SNAP25 mutante. Las barras de escala miden 10 μm. **B)** El gráfico superior muestra la distribución del porcentaje de SNAP25 y su mutante localizado en membrana plasmática de cada célula, con y sin la influencia de distintos mutantes de los dominios C2 de Rph3A con el PIP₂. El gráfico inferior muestra la diferencia media de cada condición frente

III.3.3.3. Implicación de la parte final del dominio C2B-Rph3A en fenotipo neuronal

La línea celular PC12 que usamos como modelo biológico en esta tesis doctoral, es muy oportuna dado que presenta una gran cantidad de vesículas pequeñas, y ha sido usada ampliamente como modelo de estudio de la exocitosis y fusión vesicular. Además, al tener un origen embrionario procedente de la cresta neuronal pueden diferenciarse a un fenotipo neuronal al añadirle NGF, donde desarrollan características propias de las neuronas como la liberación de vesículas cargadas de neurotransmisores (Westerink & Ewing, 2008).

Teniendo en cuenta que nuestras proteínas de estudio: SNAP25 está más involucrada en el sistema nervioso en concreto en la fusión de vesículas sinápticas en neuronas (Kádková et al., 2019; Rizo & Xu, 2015), y Rabfilina3A también tiene un papel más relevante aunque menos conocido en las sinapsis neuronales (Brozzi, Diraison, et al., 2012; Deak et al., 2006), por ello se analizó si Rabfilina3A promocionaba y ayudaba a la localización de SNAP25 bajo un fenotipo neuronal siguiendo el mismo enfoque que en los apartados anteriores con células PC12 *in vivo*.

A nivel fenotípico las células aumentan de tamaño y desarrollan neuritas y axones. El patrón de localización tanto de Rabfilina3A *wild-type* como mutante era mucho más vesicular que con el fenotipo adrenal, presentando un incremento de acúmulos de la proteína al comienzo de las neuritas y axones, pero no estando presente en ellos (Figura. III.15). SNAP25 se encontraba presente predominantemente en la membrana plasmática y en las neuritas desarrolladas en la versión *wild-type*, sin embargo, la localización de la versión mutante de SNAP25 presentaba una presencia menor en la membrana plasmática como veíamos en el fenotipo adrenal (Figura. III.15A).

Analizando de forma cuantitativa la presencia de SNAP25 en membrana plasmática en la Figura. III.15B se observa que, bajo ninguna influencia, un 55%

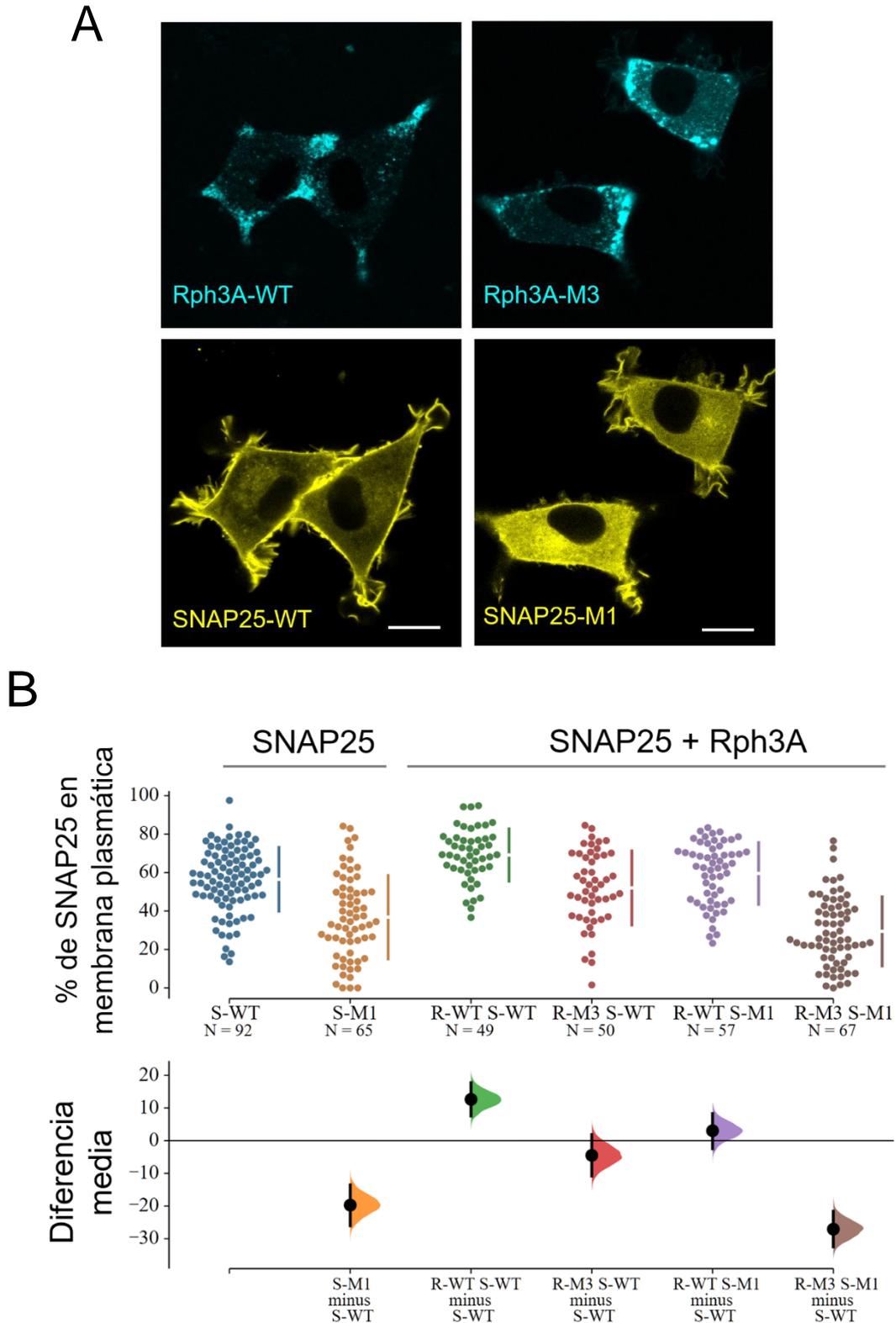


Figura. III.15. Influencia de Rph3A en SNAP25 bajo un fenotipo neuronal. **A)** Imágenes de microscopía confocal de células PC12 en fenotipo adrenal, co transfectadas en la columna de la izquierda Rph3A-CFP y SNAP25-YFP en su versión wild-type y en la columna derecha en sus versiones mutantes. Las barras de escala miden 10 μ m. **B)** El gráfico superior muestra la distribución del porcentaje de SNAP25 y su mutante localizado en membrana plasmática de cada célula, con y sin la influencia de Rph3A y su mutante. El gráfico inferior muestra la diferencia media de cada condición frente a SNAP25 wild-type.

de la proteína estaba localizada en la membrana (azul), ligeramente superior al valor del fenotipo adrenal en las mismas condiciones. De igual modo, la versión mutante de SNAP25 presentaba una menor localización con una localización del 35% (amarillo), en este caso al comparar con el fenotipo adrenal la caída es más acusada, en el fenotipo adrenal caía casi un 15% y en el fenotipo neuronal un 20%.

En la parte derecha de la Figura. III.15B vemos que bajo la influencia de Rabfilina3A, SNAP25 incrementa su localización en un 10% alcanzando valores de casi el 70% de la proteína total localizada en la membrana plasmática (verde). Bajo la influencia del mutante de Rabfilina3A este efecto no se observaba, presentando el mismo nivel de localización que sin ella (rojo). De igual forma que bajo el fenotipo adrenal, Rabfilina3A permitía la recuperación de la localización del SNAP25 mutante a valores similares a la versión *wild-type* (lila). Sin embargo, al cotransfectar con ambos mutantes la localización de SNAP25 mutante caía un 30% respecto a SNAP25 *wild-type* (marrón) de forma análoga a como ocurre con en el fenotipo adrenal.

III.4. Discusión y conclusiones

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen hoy en día una gran morbilidad sobre todo en la edad adulta y avanzada, que conllevan en último término la pérdida de células neuronales, produciendo principalmente una merma de las facultades cognitivas y motoras (Dugger & Dickson, 2017). La enfermedad de Alzheimer, Párkinson son las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes, y actualmente se desconocen las causas exactas que provocan su aparición (Goedert, 2015). Rabfilina3A y SNAP25 se han visto implicadas en estas enfermedades (Dalfó et al., 2004; Smith et al., 2007; Tan et al., 2014).

Dada la gran falta de información sobre la función fisiológica de Rabfilina3A, y la importancia de SNAP25 en la transmisión sináptica, en este capítulo de esta tesis doctoral, se comparó mediante estructuras tridimensionales y análisis del potencial electrostático la especialización de una

región del dominio C2B de Rabfilina3A, se analizó mediante ensayo de ligación por proximidad las interacciones fisiológicas que tiene Rabfilina3A con las proteínas SNARE y Sinaptotagmina1. Además, se elucidó las posibles implicaciones fisiológicas que podría tener esta región con la localización de SNAP25 en células vivas PC12 tanto en un fenotipo adrenal como neuronal.

Rabfilina3A y Sinaptotagmina1 son dos proteínas localizadas en las vesículas que comparten cierta homología de secuencia y una gran homología estructural, especialmente en el extremo C-terminal (Guillen et al., 2013). Ambas tienen la capacidad de interactuar con la misma región de SNAP25 (los residuos de E38 a E55) (Ferrer-Orta et al., 2017; Zhou et al., 2015), sin embargo, sus áreas de interacción no están conservadas ni en una ni en otra proteína, por lo que el origen evolutivo de la interacción no fue una duplicación sino una especialización separada de ambas proteínas. Sorprendentemente cada proteína interactúa a través de su dominio C2B, pero por regiones distintas. Las comparaciones estructurales demuestran que las posiciones de los aminoácidos no se conservan (Figura. III.2) y el potencial electrostático de superficie de Rabfilina3A señala que la hélice α evolucionó dado que tiene un alto poder electropositivo que le permite interactuar con SNAP25 y no está conservado en Sinaptotagmina1 (Figura. III.4).

Curiosamente, dado que Rabfilina3A comparte una gran homología de secuencia con Doc2A y Doc2B (Verhage et al., 1997), el alineamiento de secuencia de las cuatro proteínas determina que Rabfilina3A y Doc2B conservan los aminoácidos que le permiten interactuar con SNAP25 (Figura. III.3). Sin embargo, Doc2A que es muy homóloga a Doc2B, y comparten una gran homología de secuencia no los conserva. Es extraordinario que lo más probable es que Doc2A y Doc2B surgieran de una duplicación de un gen ancestral (Figura. III.16), y no conserve los residuos que le permiten

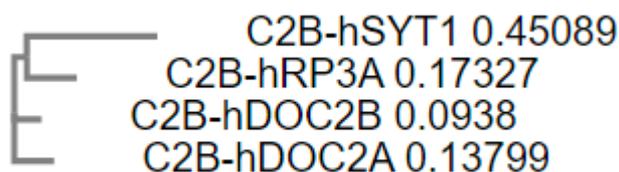


Figura. III.16. Árbol filogenético de los dominios C2B de Sinaptotagmina 1, Rph3A, Doc2A y Doc2B humanas.

interaccionar con SNAP25. Esto refuerza la hipótesis que ha sido una posible especialización de ambas proteínas por separado, o que por alguna causa Doc2A haya mutado para perder esta capacidad, aunque esto a priori es menos probable. Sinaptotagmina1 evolucionó de un modo diferente a estas proteínas, de un ancestro común a ellas especializándose en interaccionar con SNAP25, pero de distinta manera. De este modo, Sinaptotagmina1 y Rabfilina3A son proteínas que no compiten ni tienen la misma función, sino que actúan en distintos pasos del proceso de la fusión de vesículas, posicionando y orquestando la posición de SNAP25 (Chang et al., 2018). En cambio, Rabfilina3A si conserva cierta redundancia de función con Doc2B y ambas se expresan en tejido nervioso, donde se ha visto que Doc2B participa en la liberación de vesículas no coordinada y asíncrona (Gaffaney et al., 2014). Por ello su función sea más difícil de discernir, y los ratones *knockouts* de estas proteínas no tenga alterado su fenotipo dado que una reemplaza la falta de otra (Ramalingam et al., 2012; Schluter et al., 1999).

El ensayo de ligación por proximidad (PLA) permite demostrar *in vivo* mediante microscopía confocal qué proteínas interaccionan y dónde. Gracias a la localización de SNAP25 en membrana plasmática se pudo discernir si las interacciones ocurren en la membrana plasmática o en el citosol. Se demuestra que Rabfilina3A interacciona con SNAP25, VAMP2 y Sinaptotagmina1 en el citosol (Figura. III.8), probablemente la interacción podría estar ocurriendo en vesículas de transporte únicas teniendo en cuenta que la máxima distancia resuelta por la técnica PLA es 40 nm y el diámetro de las vesículas puede oscilar entre 90 y 500 nm (Martin & Grishanin, 2003). No obstante, resulta curioso que aparezcan gran cantidad de señales PLA en el citosol para SNAP25 pese a ser una proteína eminentemente de membrana, esto podría deberse a una población de vesículas de reciclaje donde Rabfilina3A y SNAP25 convergen a nivel de vesículas en el citoplasma (Aikawa et al., 2006). Las señales PLA que aparecen en la membrana plasmática podrían ser asociaciones de vesículas ancladas a la membrana, pero sólo con SNAP25 y Sinaptotagmina1, dado que con VAMP2 y Sintaxina1A no parecen interaccionar a este nivel, donde se

observa una diferencia media significativa negativa (Figura. III.8B). Este efecto observado en Sinaptotagmina1 y SNAP25 de interacción con Rabfilina3A a nivel de la membrana plasmática, podría ser debido a una actuación de Rabfilina3A en el reciclado y *re-priming* de ambas proteínas (Deak et al., 2006).

Los datos de la cuantificación de la localización de SNAP25 bajo la influencia de Rabfilina3A en células *in vivo* sugiere que Rabfilina3A está colaborando en la localización o permanencia de SNAP25 en la membrana plasmática, quizás ayudando a su palmitoilación al trasladarla y acompañarla a la membrana, o reteniéndola cuando Rabfilina3A se encuentra en la membrana plasmática unida gracias al PIP₂. La zona de interacción entre ambas proteínas determinada por métodos estructurales parecen ser claves. En concreto la hélice N-terminal de SNAP25 es completamente necesaria para su localización, donde el mutante es incapaz de localizarse con normalidad, incluso sin ninguna influencia (Figura. III.11).

Para determinar con rotundidad si esta región de SNAP25 donde interacciona con Rabfilina3A es totalmente dependiente de ella para la localización en membrana, deberíamos de haber hecho los mismos experimentos sin la presencia de Rabfilina3A endógena, silenciando la expresión de Rabfilina3A endógena o realizando un *knock-out*, sin embargo, dado que su expresión es muy baja en células PC12 fue difícil de determinar si el efecto de silenciamiento estaba funcionando o no. No obstante, se observan diferencias significativas donde la α -hélice del final del dominio C2B de Rabfilina3A rescata e incrementa la presencia de SNAP25 mutante en la membrana plasmática, dado que al transfectar con el mutante de Rabfilina3A este efecto no se observaba y la localización de SNAP25 mutante caía a valores incluso más bajos que sin la influencia de Rabfilina3A sobreexpresada (Figura. III.11). Este efecto de rescate podría ser observado porque SNAP25 únicamente presenta 3 aminoácidos mutados y podría estar interaccionando con otros residuos con Rabfilina3A (Figura. III.9). Además, el PIP₂ parece desempeñar un papel clave, los mutantes incapaces de interaccionar con PIP₂ no podían rescatar la

localización de SNAP25 e incluso perjudicaban su correcta localización (Figura III.14). Rabfilina3A es incapaz de interactuar con el PIP₂ de la membrana plasmática, y podría interactuar con SNAP25, pero de forma anómala fuera de la membrana plasmática. Este efecto observado propone que este fosfoinosítido es necesario para la correcta localización y permanencia de SNAP25 en la membrana plasmática a través de la interacción con Rabfilina3A. Tanto el dominio C2A como el dominio C2B son necesarios para que Rabfilina3A se encuentre cerca de la membrana plasmática en microdominios ricos en PIP₂ y SNAP25 pueda ser anclada y probablemente palmitoilada (Greaves et al., 2010).

En conclusión, Rabfilina3A parece promocionar y mantener correctamente localizada a SNAP25 en la membrana plasmática, además este descubrimiento es mucho más acusado en un fenotipo neuronal. Esta averiguación en un fenotipo neuronal además de validar los efectos observados sugiere que bajo un fenotipo neuronal diversas proteínas que se expresan en mayor medida en un modelo neuronal fomentan la función fisiológica de Rabfilina3A y SNAP25 en un ambiente más adecuado. Con los datos disponibles, la hipótesis más probable es que la localización de Rabfilina3A en la membrana plasmática gracias al PIP₂, este generando la conformación adecuada para que SNAP25 este correctamente posicionado y reclutado en la membrana plasmática gracias a su interacción específica. Se debería continuar investigando en esta área para determinar si estos efectos están correlacionados con un incremento o deterioro de la fusión asíncrona de vesículas sinápticas.

**CAPÍTULO IV. INTERACTOMA DE RABFILINA3A
Y SUS PROTEINAS MODULADORAS EN
FENOTIPO ADRENAL**

IV.1. Resumen

Rabfilina3A es una proteína de tráfico de membrana que participa en la regulación dependiente de Ca^{2+} de la exocitosis de vesículas secretoras en neuronas y células neuroendocrinas. Anteriormente hemos demostrado que Rabfilina3A favorece la correcta localización de SNAP25. Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular que podría desencadenar este efecto. La técnica de etiquetado por proximidad (BioID2) permite capturar interacciones proteína-proteína débiles y transitorias, incluyendo proteínas que residen en las proximidades. Por lo tanto, en el presente capítulo, investigamos el interactoma de Rabfilina3A utilizando la técnica BioID2. Se fusionó una biotina ligasa promiscua al extremo N-terminal de Rabfilina3A y se expresó de forma estable en la línea celular PC12. En un primer cribado se identificaron como proteínas dianas biotiniladas a STIM1, y Tcp1111 con un valor altamente significativo. Posteriormente, para una mejor comprensión del entorno cercano de Rabfilina3A se realizó la misma estrategia, pero fusionando la biotinilasa con STIM1, Tcp1111 y SNAP25. Además, se analizó el mutante de Rabfilina3A incapaz de interactuar con SNAP25. Los resultados indican que STIM1, proteína que reside en el RE donde detecta los niveles intraluminales de Ca^{2+} , y Tcp1111 proteína de función totalmente desconocida, forman parte del interactoma de Rabfilina3A. Este trabajo aporta una información muy completa sobre el interactoma de Rabfilina3A, destacando el papel de Tcp1111 y STIM1 en la función del citoesqueleto, y el transporte de vesículas junto a Rabfilina3A y SNAP25.

IV.2. Introducción

En el tráfico de vesículas están implicadas numerosas proteínas que interaccionan unas con otras, encargadas de dirigir y entregar las cargas que transportan dentro de las vesículas (Bonifacino & Glick, 2004). Durante los últimos 25 años se han realizado importantes esfuerzos para caracterizar la fusión de vesículas, especialmente de las vesículas sinápticas (Brunger et al., 2019).

Rabfilina3A es la proteína central de estudio de esta tesis doctoral, es una proteína de tráfico de membrana que participa en la regulación dependiente de Ca^{2+} de la exocitosis de vesículas secretoras en neuronas y células neuroendocrinas (McKiernan et al., 1996). La proteína se acopla en las vesículas mediante la interacción con las pequeñas proteínas G, Rab3A o Rab27, a través de su dominio N-terminal de unión a Rab (Fukuda et al., 2004; Li et al., 1994). Su dominio C-terminal consta de dos dominios C2 en tándem que son responsables de su especificidad con la membrana plasmática de forma dependiente de Ca^{2+} y de fosfoinosítidos (Guillen et al., 2013). Rabfilina3A se ha visto implicada en la interacción con proteínas Rab y con SNAP25 (Ferrer-Orta et al., 2017), sin embargo también parece interactuar con otras proteínas de forma más transitoria, como CASK (Zhang et al., 2001), PSD-95 (Stanic et al., 2015), CAND1 (Nakashima et al., 2018). Estos descubrimientos se han realizado mediante estudios con técnicas de fraccionamiento celular, o co-inmunoprecipitación tras una lisis celular, técnicas que son agresivas y dificultan el aislamiento y purificación de las proteínas de interacción.

Para eludir estos límites, y descubrir el interactoma completo de Rabfilina3A llevamos a cabo una técnica con la ayuda del experto grupo de proteómica de la Universidad de Utrecht del Profesor Albert Heck, con el objetivo de detectar las interacciones proteína-proteína relevantes que ocurren con nuestra proteína de estudio, dentro de las células vivas. Esta técnica está basada en el ensayo de biotilación dependiente de proximidad llamado BioID, acoplado al análisis mediante espectrometría de masas (Sears et al., 2019). La técnica

consiste en usar una ligasa de biotina promiscua, llamada BirA, para biotilar proteínas en función de la proximidad. La ligasa se fusiona con una proteína de interés y se expresa en las células. En presencia de biotina, la proteína de fusión con BirA biotila *in situ* las proteínas endógenas próximas a ella, en un determinado tipo celular. Posteriormente estas proteínas biotiniladas pueden ser aisladas mediante captura por afinidad con estreptavidina e identificadas por espectrometría de masas (May & Roux, 2019).

Con frecuencia se publican nuevas variaciones del sistema BioID. Aquí, utilizamos una ligasa de biotina mejorada, la BioID2 (Kim et al., 2016) para identificar y detectar proteínas próximas a Rabfilina3A, SNAP25, Tcp1111 y STIM1. Este sistema tiene la ventaja de que detecta las interacciones débiles o transitorias que se producen *in vivo* y es apropiado para el estudio de proteínas insolubles, como las proteínas de membrana, que son más complicadas de identificar mediante enfoques más tradicionales, como el fraccionamiento celular y la purificación por afinidad. El resultado final de la técnica es una lista de proteínas identificadas por espectrometría de masas que interactúan con la proteína de estudio fusionada a BioID2 comparándolas con la proteína BioID2 y/o con la construcción completa sin ser suplementada con biotina (control) durante todo el periodo de vida de la proteína (Gingras et al., 2019).

El objetivo era averiguar si la técnica BioID2 podía ayudar a caracterizar Rabfilina3A a nivel molecular, e ir un paso más allá para conocer la función de Rabfilina3A junto a sus proteínas moduladoras. Para ello, en una primera aproximación se usó Rabfilina3A fusionada a BioID2, se obtuvieron líneas estables que expresaban Rabfilina3A fusionada a BioID2, y también BioID2 sola, y se verificó que inducía una biotinilación selectiva dependiente de biotina. Posteriormente se analizó por espectrometría de masas y se obtuvo que las proteínas que más significativamente interactuaban con Rabfilina3A eran STIM1, y Tcp1111. STIM1 es una proteína del RE que participa como sensor de Ca^{2+} y activa el canal iónico de Ca^{2+} ORAI1 en la membrana plasmática (Soboloff et al., 2012). Tcp1111 es una proteína de función desconocida, posiblemente

relacionada con los microtúbulos. Como el objetivo principal era la identificación exhaustiva del interactoma que rodea a Rabfilina3A y de las proteínas moduladoras de su función, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el interactoma de Rabfilina3A, se llevó a cabo posteriormente la misma aproximación BioID2, pero con Tcp1111, STIM1 y SNAP25 en células PC12 en un fenotipo adrenal.

En definitiva, el experimento BioID2 de Rabfilina3A, SNAP25, Tcp1111, STIM1 y el mutante de Rabfilina3A se realizó en células PC12 bajo un fenotipo adrenal para entender la función de las proteínas que subyacen a la fusión de vesículas como SNAP25, Rabfilina3A y sus nuevas proteínas de interacción. Las células PC12 son un buen sistema biológico para el estudio de estas proteínas porque tienen un gran número de pequeñas vesículas que contienen catecolaminas (Taupenot, 2007). Por lo tanto, este estudio aporta información novedosa mediante el uso de técnicas de vanguardia para comprender la función que Rabfilina3A podría estar llevando a cabo junto a sus proteínas moduladoras.

IV.3. Resultados

IV.3.1. Verificación de la biotilación selectiva de proteínas mediante la construcción BioID2-Rabfilina3A

Para obtener un conocimiento más profundo de las interacciones que realiza Rabfilina3A con proteínas moduladoras de su función, se decidió realizar un estudio de PPI mediante el método BioID2. Se usó un plásmido que contenía la biotilasa mejorada BioID2 junto a una etiqueta myc, y sobre este se clonó Rabfilina3A, aguas abajo a la biotilasa (Figura. IV.1).

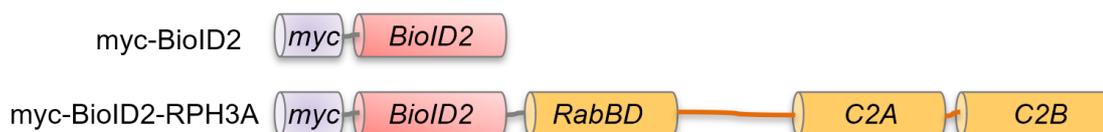


Figura. IV.1. Representación esquemática de las proteínas de fusión BioID2 con Rph3A. En lila el tag *myc* en el extremo N-terminal, en rojo la biotilasa *BioID2*, y en naranja *Rph3A* representada en sus distintos dominios: el dominio de unión a *Rab*, y sus dos dominios *C2* en el extremo C-terminal.

Se transfectaron las construcciones en células PC12: BioID2-Rph3A como proteína de estudio, y BioID2 sola como control para la identificación de la biotinilación inespecífica. Se obtuvieron clones por dilución y selección con antibiótico G418, gracias a que el plásmido confería resistencia a ese antibiótico, de este modo obtuvimos líneas celulares que expresaban la construcción de forma constitutiva. Se comprobó por *Western-blot* que las células de las dos líneas celulares expresaban la construcción. El análisis por *Western-blot* revela que el anticuerpo anti-myc presenta una banda inespecífica en 100 kDa, no obstante, aparece una banda inferior a 25 kDa, en la línea celular que expresa BioID2 y que corresponde con la biotinilasa sola (Figura. IV.2A). En la calle de BioID2-Rph3A aparece una tenue banda superior a 100 kDa, esta misma banda de más de 100 kDa también aparece al detectar con anti-Rph3A, esto confirma que se trata de BioID2-Rph3A, y por tanto ambas líneas expresan la proteína con su tamaño correcto (Figura. IV.2A). BioID2-Rph3A se expresa mucho

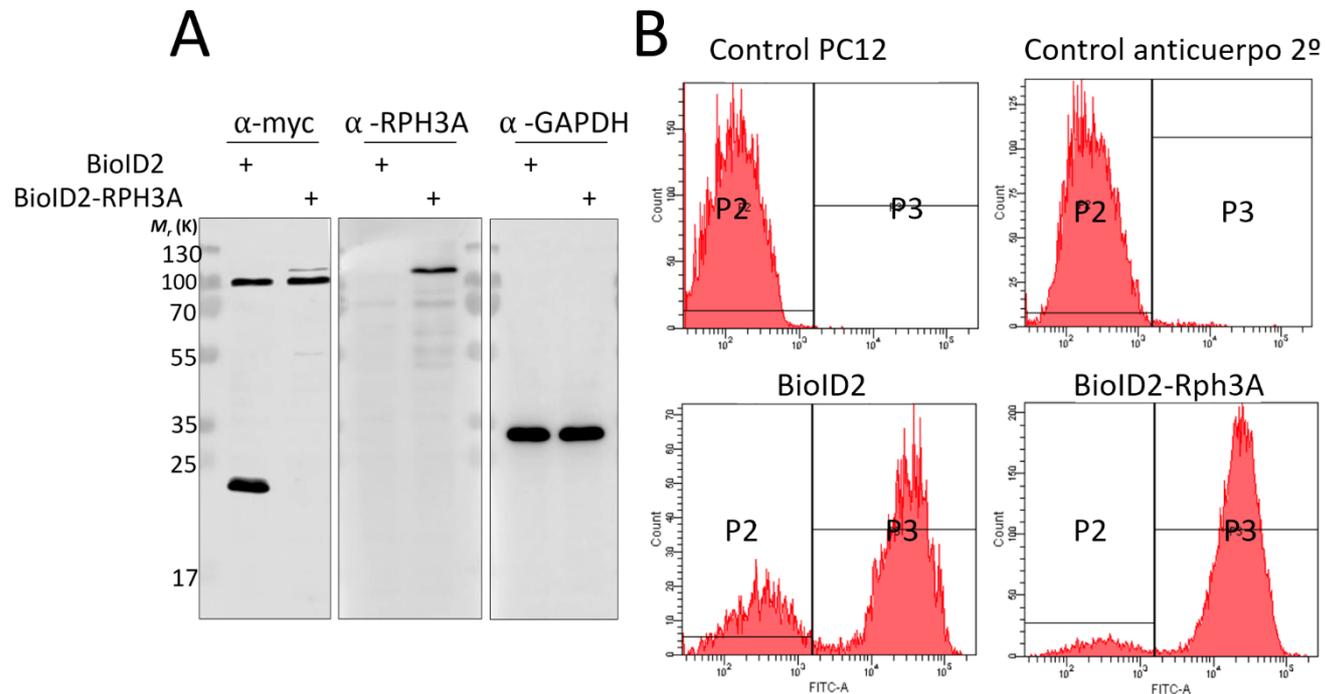


Figura. IV.2. Niveles de expresión de las proteínas de fusión con BioID2 en células PC12. **A)** Se evaluó la expresión de BioID2 y BioID2-Rph3A mediante western-blot utilizando tres anticuerpos: anti-myc, anti-Rph3A, y anti-GAPDH como marcador de control de carga. **B)** Se analizó la pureza de las líneas que expresan la proteína de fusión BioID2. Histogramas representativos de citometría de flujo, los dos histogramas superiores muestran dos controles. A la izquierda arriba las células sin transfectar PC12, a la derecha arriba inmunoteñidas sólo con el anticuerpo secundario fluorescente (control), esto nos define las células que no expresan la construcción (P2). Abajo las líneas BioID2 y BioID2-Rph3A inmunoteñidas con anti-myc muestran el gran grado de pureza de ambas líneas celulares (población P3).

menos, dado que la proteína de control de carga GAPDH es similar en ambas muestras (Figura. IV.2A).

Para evaluar que las líneas se habían seleccionado con el antibiótico G418 y presentaban un porcentaje de transfección estable superior al 50%, se evaluó mediante citometría de flujo, inmuno-tiñendo con el anticuerpo anti-myc, revelando que la línea BioID2 y BioID2-Rph3A tiene un 70% y un 91% de pureza respectivamente (Figura. IV.2B). La última validación de las líneas que expresaban las proteínas de fusión fue mediante microscopía confocal, para comprobar que la proteína de fusión se localizaba correctamente. Como control se usó HA-Rph3A que presenta un patrón vesicular, siendo más intenso cercano a la membrana, al transfectar con BioID2-Rph3A el patrón era totalmente similar, confirmando que esta construcción es funcional, y al transfectar sólo con BioID2, se observa que la proteína está localizada de manera uniforme por toda la célula, incluido el núcleo (Figura. IV.3). Hay que tener en cuenta que pese a que el anticuerpo anti-myc presenta una banda inespecífica cercana a 100 kDa en el *Western blot*, al estar las células fijadas para las técnicas de citometría de flujo e inmunofluorescencia este artefacto no se observa.

El siguiente paso era comprobar si la construcción inducía una biotinylación dependiente de biotina. Para ello se añadieron distintas concentraciones crecientes de biotina a las células, y se observó que la saturación de la biotinylación de proteínas ocurría a una concentración de 50 μ M

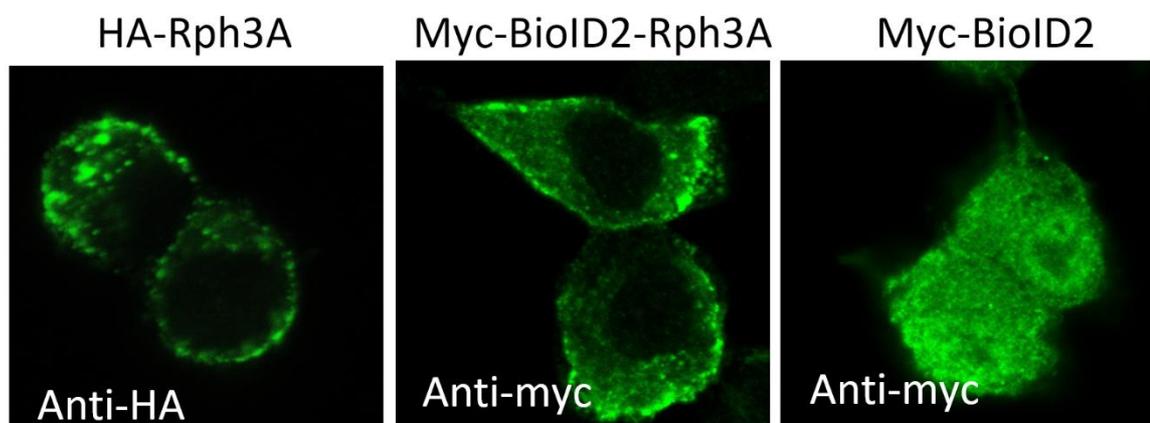


Figura. IV.3. Imágenes de microscopía confocal de Rph3A y BioID2. A la izquierda, células PC12 control expresando HA-Rph3A, en el centro células PC12 expresando BioID2-Rph3A, y a la derecha células PC12 expresando BioID2.

de biotina, tanto en la construcción BioID2, como BioID2-Rph3A (Figura. IV.4). También se testaron los tiempos de incubación con biotina, y se comprobó que la biotilación máxima parecía ocurrir a las 16 horas (Figura. IV.4).

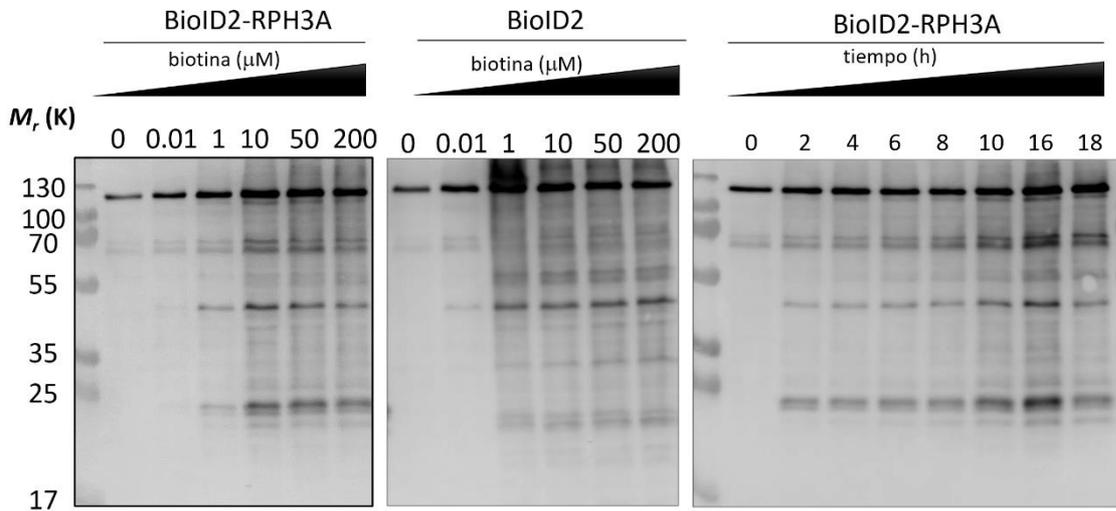


Figura. IV.4. Western-blot testando la biotinylación por BioID2. Se analizó la biotinylación celular a concentraciones variables de biotina utilizando células que expresan de forma estable BioID-Rph3A (izquierda) y BioID2 sola (centro), la biotinylación se midió tras la incubación con la concentración indicada de biotina durante 16 h. A la derecha se analizó la biotinylación celular a diferentes tiempos utilizando células que expresaban de forma estable BioID-Rph3A a una concentración fija de 50 μM . La membrana fue revelada con estreptavidina-HRP para detectar todas las proteínas biotiniladas.

En último lugar para verificar que la construcción era funcional, se realizó un ensayo de BioID2. Tras realizar la correcta inducción con biotina, se recogieron las células y se capturaron las proteínas biotiniladas mediante una resina derivatizada con estreptavidina, posteriormente se analizó mediante *Western-blot* si SNAP25 (23 kDa) había sido biotinilada y por tanto capturada, y efectivamente se verificó que esta proteína había sido biotinilada por BioID2-Rph3A y como control se analizó la ciclina E2 (44 kDa), que no fue biotinilada ni por BioID2 ni por BioID2-Rph3A dado que no es una proteína que interaccione

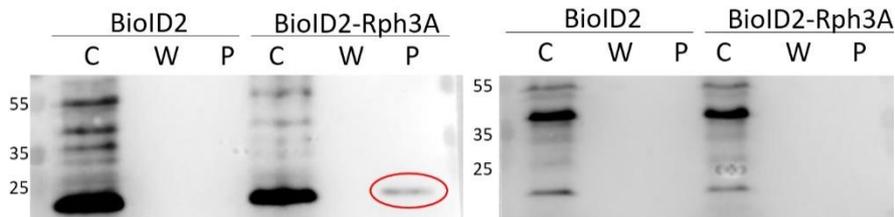


Figura. IV.5. SNAP25 es biotinilado por Rph3A-BioID2. Se realizó una captura de las proteínas biotiniladas y se analizó por Western-blot. C) Lisado celular, W) Lavado de la resina de captura, P) proteínas biotiniladas capturadas. A la izquierda membrana revelada con anti-SNAP25, a la derecha con anti-Ciclina E2. Sólo se observa SNAP25 capturada con la resina de estreptavidina.

con Rabfilina3A (Figura. IV.5). Por tanto, se concluyó que esta construcción era apropiada para detectar nuevas interacciones de Rabfilina3A.

IV.3.2. Detección de las interacciones de Rabfilina3A mediante BioID2 en un fenotipo adrenal.

Para realizar un escrutinio masivo de todas las proteínas con las que interacciona Rabfilina3A a lo largo de su vida en células PC12 con fenotipo adrenal, se usó la técnica BioID2 acoplada a espectrometría de masas. Se analizó por espectrometría de masas las proteínas biotiniladas capturadas por afinidad a una resina derivatizada con estreptavidina, de células que expresaban la construcción BioID2-Rph3A suplementada con biotina, y como controles para comparar el ensayo, la misma construcción sin ser suplementada con biotina, y también células transfectadas con BioID2 solamente. Se analizó por espectrometría de masas mediante el método de cuantificación libre de etiquetas (LFQ) basado en la intensidad relativa de cada péptido identificado. Comparando la muestra BioID2-Rph3A con los controles BioID2 y BioID2-Rph3A pero sin suplementar con biotina se identificaron 173 proteínas significativamente enriquecidas, con un valor de enriquecimiento (*fold change*) superior a 1.5.

El diagrama de volcán de la Figura. IV.6 muestra las proteínas más significativas. Los resultados más significativos fueron Stim1, Tcp1111, Gpam y Usp4. Stim1 es una proteína del RE que interviene como sensor de Ca^{2+} y activa el canal iónico de Ca^{2+} ORA11 en la membrana plasmática (Zhou et al., 2013). Tcp1111 es una proteína de función desconocida, posiblemente relacionada con los microtúbulos, Gpam es una enzima llamada glicerol-3-fosfato aciltransferasa 1 mitocondrial encargada de la biosíntesis de triglicéridos, ácidos fosfatídicos y lisofosfatídicos (Chen et al., 2008). Usp4 es otra enzima implicada en la ubiquitinación de determinadas proteínas (Clerici et al., 2014). Rabfilina3A aparece como la proteína más significativamente biotinilada, esto es un control de que la estrategia ha funcionado correctamente dado que la biotinilasa se encuentra físicamente fusionada a Rabfilina3A y puede autobiotinilarse. Además aparecen otras proteínas que han sido previamente descritas en la bibliografía

que interactúan con Rabfilina3A como Rab3b, isoenzima de su proteína de interacción por excelencia a la que le debe su nombre (Shirataki et al., 1993), o las subunidades activadoras de la Rab3 como Rab3gap1 y Rab3gap2 (Barr & Lambright, 2010), o Rab8a también descrita que interactúa con Rabfilina3A (Fukuda, 2003).

Dos proteínas localizadas en el núcleo han aparecido con un valor estadístico considerablemente alto, estas son Nibrina (Nbn) implicada en la reparación del daño del ADN (Wang et al., 2013) y un factor transcripcional

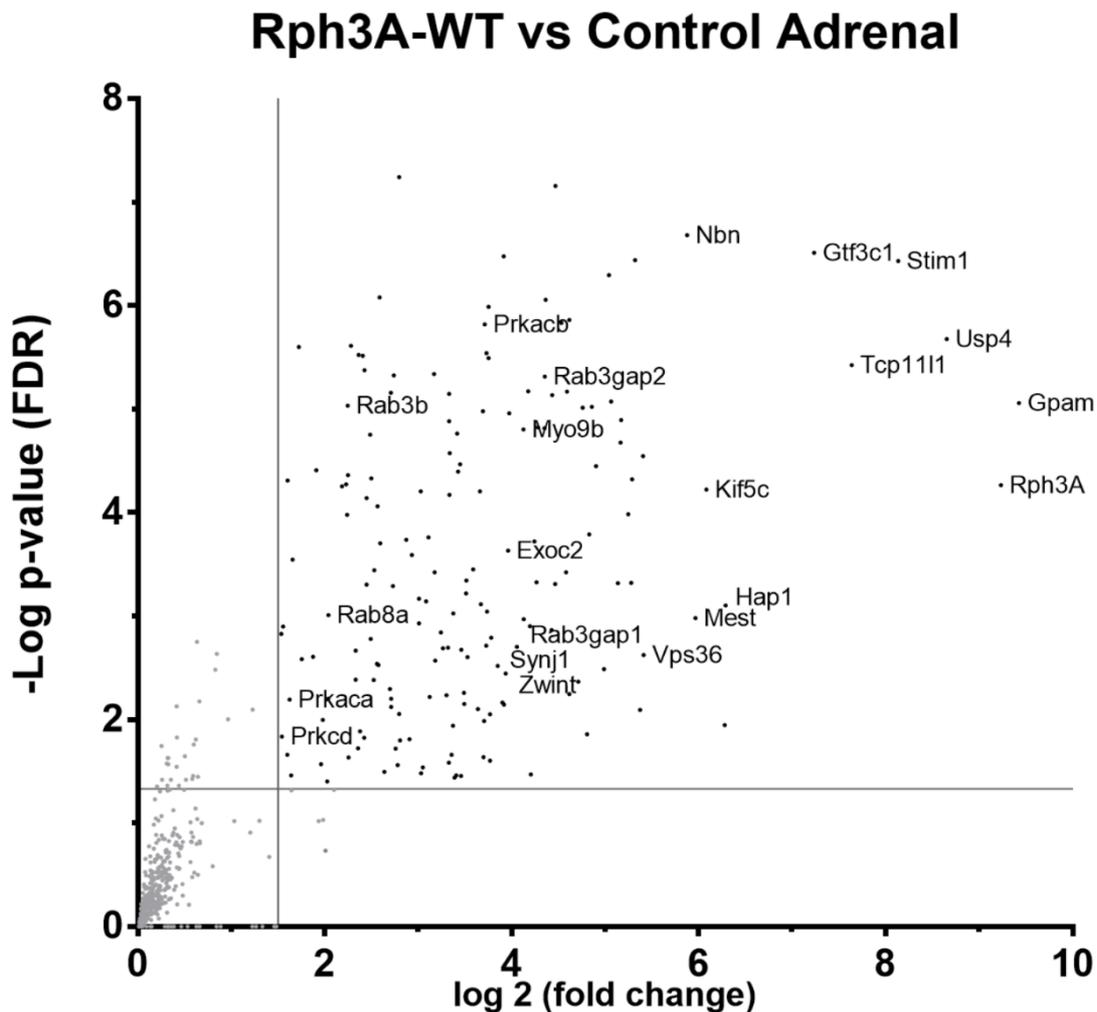


Figura. IV.6. Diagrama de volcán de las proteínas que interactúan con Rph3A en el fenotipo adrenal. El diagrama ilustra la significancia de la prueba estadística t-test como $-\text{Log}_{10}$ p-valor frente a la intensidad de LFQ (Log_2) como valor de enriquecimiento de BioID2-Rph3A comparado con BioID2 y BioID2-Rph3A sin biotina. Datos obtenidos de cuatro réplicas diferentes de cada condición. Las 173 proteínas significativamente positivas se muestran como puntos negros con un valor de p-value $<0,05$ y un valor de enriquecimiento logarítmico $>1,5$.

llamado Gtf3c1 (Crepaldi et al., 2013). No obstante, hay otras proteínas algunas importantes de mencionar dada su implicación con el tráfico vesicular o por aparecer posteriormente en otros análisis. Por ejemplo proteínas motoras como Kif5c de la familia de las quinesinas (Willemsen et al., 2014) o myo9b de la familia de las miosinas (Hanley et al., 2020); Exoc2, es un componente del complejo *exocyst* implicado en el anclaje de vesículas a la membrana plasmática (Hsu et al., 2004); Vps36 es un componente del complejo ESCRT-II implicado en la formación y clasificación de los cuerpos multivesiculares (Worst et al., 2017) Hap1 (proteína 1 asociada a la Huntingtina), fue la primera proteína que se descubrió que interacciona con la Huntingtina y regula el transporte de vesículas interaccionando con proteínas motoras accesorias (Engelender et al., 1997; Wu & Zhou, 2009); Sinaptojanina1 (Synj1) es una fosfatasa que actúa sobre varios fosfoinosítidos y está implicada en la endocitosis (Choudhry et al., 2021), proteína que aparece en otros ensayos posteriores; o la proteína homóloga a la transcripción específica del mesodermo (Mest) es otra proteína que aparece posteriormente y también en el fenotipo neuronal, tiene actividad hidrolasa y se localiza en la membrana del RE (Kobayashi et al., 1997).

Se ha constatado que Rabfilina3A es fosforilada por PKA (Brozzi, Lajus, et al., 2012; Fykse et al., 1995), esto es confirmado en este ensayo dado que aparecen dos subunidades catalíticas de la PKA, la Prkaca (subunidad catalítica α), y la Prkacb (subunidad catalítica β) como proteínas significativamente biotiniladas. Además, aparece otra quinasa diferente, la PKC δ siendo posible la fosforilación de Rabfilina3A y su regulación por esta quinasa.

Curiosamente SNAP25 no ha aparecido como proteína significativamente biotinilada, sin embargo, sí apareció en el ensayo que se realizó mediante *Western-blot*, y han aparecido distintas proteínas implicadas en el tráfico vesicular, incluso una proteína que se describió su interacción con SNAP25, llamada Zwint necesaria para la formación del cinetocoro (Lee et al., 2002). La causa podría ser debido a su interacción transitoria o a las múltiples

interacciones que lleva a cabo SNAP25 que no dejan libre ninguna lisina para ser biotinilada, o a un problema de identificación del espectrómetro de masas.

Para investigar las vías moleculares asociadas al conjunto de proteínas identificadas que interactúan con Rabfilina3A, se llevó a cabo un análisis de ontología genética en inglés *Gene Ontology* (GO), utilizando Metascape con las 173 proteínas significativamente enriquecidas de BioID2-Rph3A. Se encontró que el término más enriquecido era el transporte intracelular de proteínas (-log p-value = 9,59), seguido de un término relacionado con la Enfermedad de Alzheimer, llamado regulación negativa del proceso catabólico de la proteína precursora amiloide (- log p-value = 9,17). Los siguientes términos de GO más

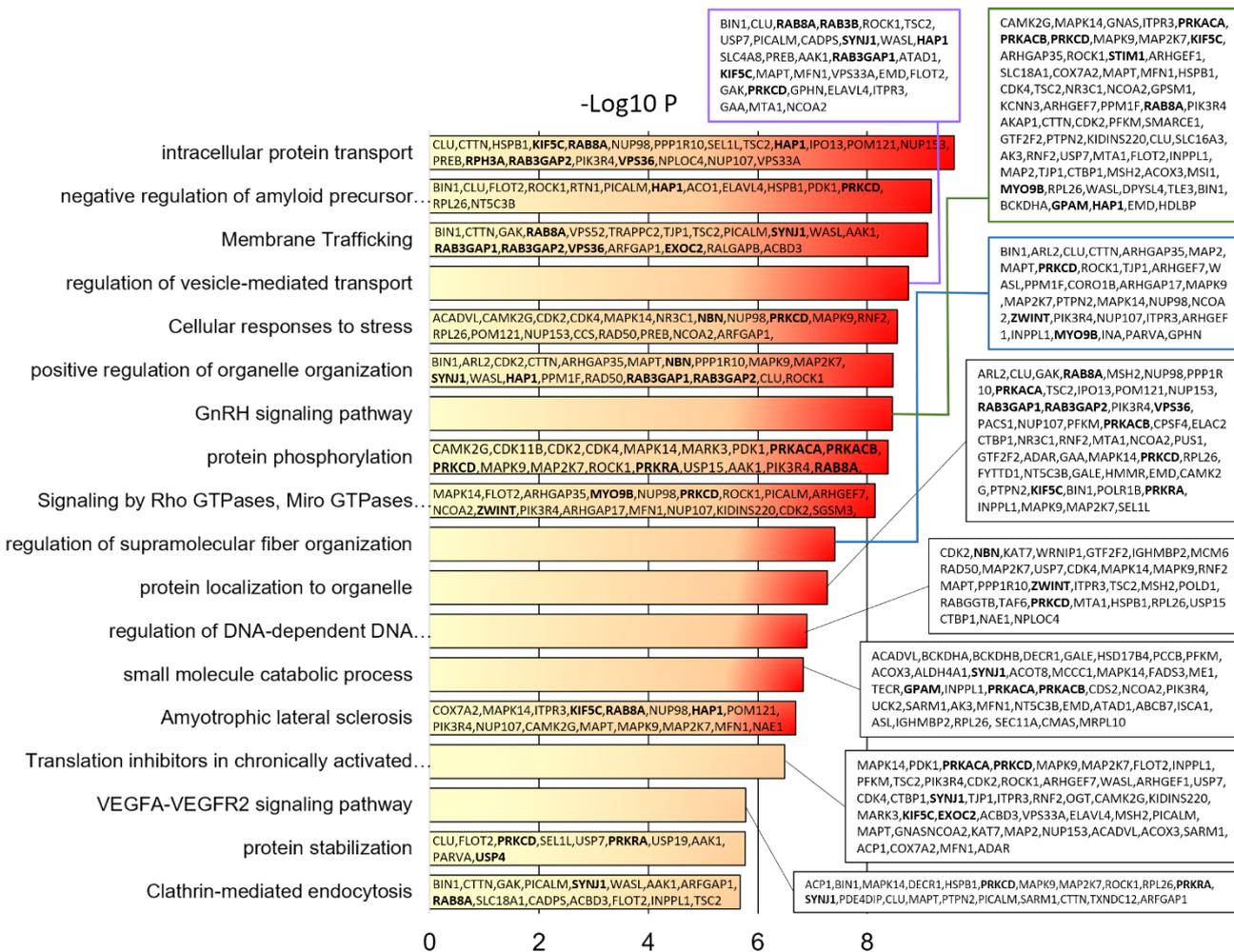


Figura. IV.7. Gráfico de barras del análisis de ontología genética de las proteínas biotiniladas por BioID2-Rph3AWT en fenotipo adrenal. Se muestra el análisis de términos GO de las 173 proteínas biotiniladas en BioID2-Rph3AWT utilizando metascape. La significancia del enriquecimiento de un término particular se muestra con el log10 del valor p-value, y dentro de cada barra se muestran los genes enriquecidos de ese término.

significativamente enriquecidos estaban relacionados con la función canónica de Rabfilina3A como es el tráfico de membranas, la regulación del transporte de vesículas (Figura. IV.7).

IV.3.3. Verificación de la biotinylación selectiva de proteínas mediante la construcción BioID2-SNAP25, BioID2-Tcp1111, BioID2-STIM1 y BioID2-Rph3A-M3

Teniendo en cuenta los resultados del epígrafe IV.3.2, en los que se observa que Rabfilina3A interacciona con STIM1 y Tcp1111, se decidió realizar la estrategia de estudiar el interactoma de las proteínas SNAP25, Tcp1111, y STIM1 con BioID2. No se usaron las proteínas Usp4 y Gpm dado que eran enzimas que se conoce en profundidad su función. El objetivo era comprender mejor el interactoma que rodea a Rabfilina3A, y las proteínas moduladoras de su función. Además, se realizó también la aproximación con el mutante de Rph3A-M3 para evaluar que influencia tenía la α -hélice del dominio C2B sobre la funcionalidad de Rabfilina3A.

Por tanto, se obtuvieron los cDNAs de SNAP25, y Tcp1111 de células PC12, y se adquirió la versión humana de STIM1 por la imposibilidad de obtener su cDNA de estas células. Se clonaron los genes agua abajo a la secuencia de la BioID2 del plásmido (Figura. IV.8), para obtener las proteínas de interés fusionadas a BioID2, y se transfectaron en células PC12 para proceder a la selección de las distintas líneas mediante el antibiótico G418.

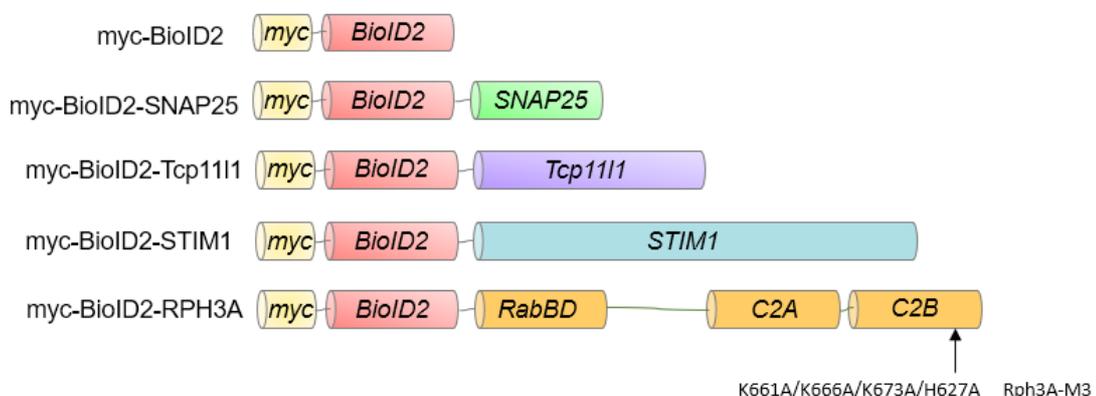


Figura. IV.8. Esquema de las proteínas de fusión con BioID2. Representación esquemática de las proteínas SNAP25, Tcp1111 y STIM1 fusionadas a la biotinylase BioID2 para transfectar las líneas PC12.

Se comprobó mediante *Western-blot* que las proteínas se expresaban en las líneas celulares y tenían el tamaño adecuado. Los tamaños moleculares de las proteínas de fusión son los correctos, aunque la expresión de Tcp1111 y Rph3A-M3 es bastante baja con respecto a BioID2 y SNAP25 que se expresan en mayor medida, aunque eso no es ningún inconveniente para el estudio, (Figura. IV.9). El anticuerpo anti-myc es diferente al usado en la Figura. IV.2A, y este no presenta de forma tan intensa la banda inespecífica a 100 kDa. Inexplicablemente, la proteína BioID2-STIM1 no era detectada por el anticuerpo anti-myc por alguna extraña razón, sin embargo, por inmunofluorescencia si era detectada, y al añadir el anticuerpo anti-STIM1 si fue detectada junto a la proteína endógena (Figura. IV.9).

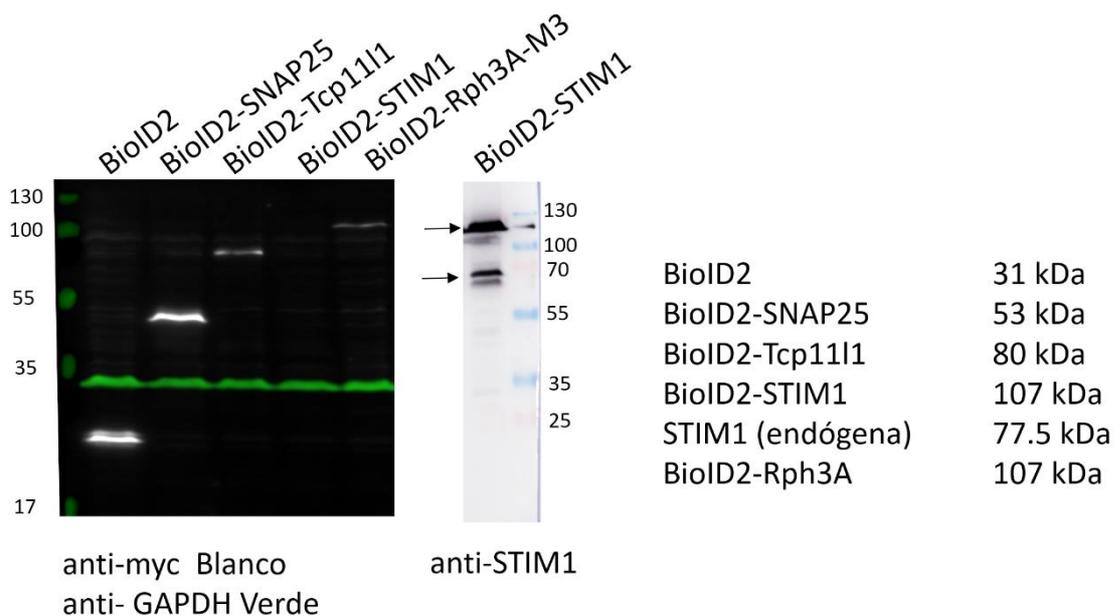


Figura. IV.9. *Western-blot* para testar los niveles de expresión de las nuevas proteínas de fusión con BioID2 en células PC12. Se evaluó la expresión de BioID2-SNAP25, BioID2-Tcp1111, BioID2-STIM1 y BioID2-Rph3A-M3 mediante *Western-blot* utilizando el anticuerpo anti-myc en blanco, y anti-GAPDH como control de carga en verde. Para detectar STIM1 se utilizó anti-STIM1 dado que no era detectado por anti-myc por alguna razón desconocida.

Para demostrar que las líneas celulares expresaban correctamente la construcción, y la localización de las proteínas era la adecuada dependiendo de su naturaleza, se realizaron inmunofluorescencias con el anticuerpo anti-myc, para además comprobar que el porcentaje de transfección y selección de las líneas celulares era adecuado (Figura. IV.10).

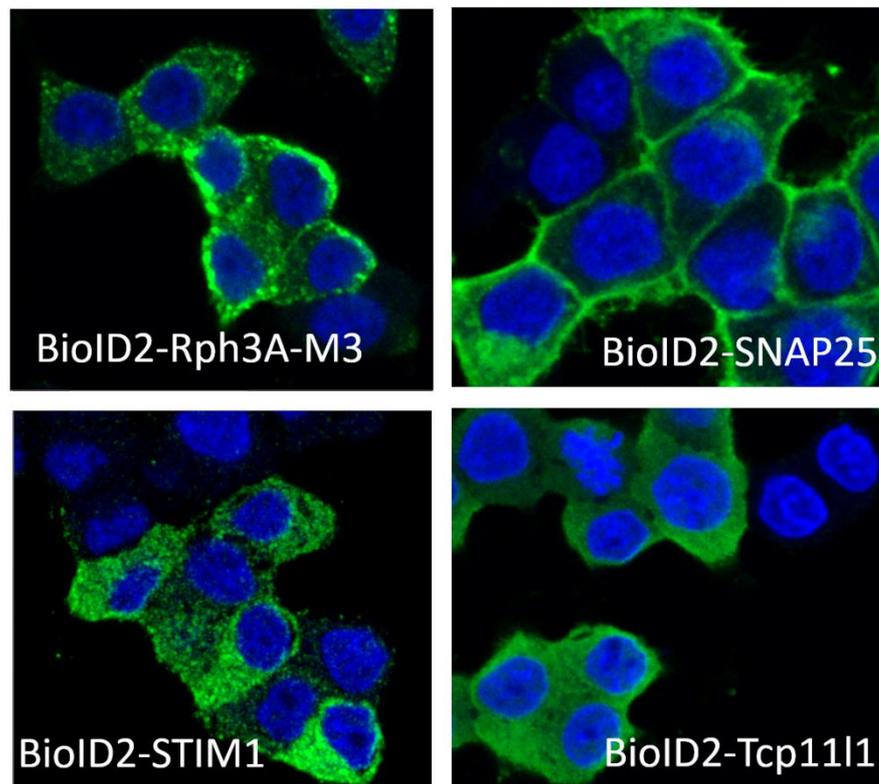


Figura. IV.10. Imágenes de microscopía confocal de las proteínas de fusión Rph3A-M3, SNAP25, STIM1 y Tcp1111 fusionadas a BioID2. Células PC12 transfectadas con la construcción indicada, inmunoteñidas con anticuerpo anti-myc, se observa que hay células no transfectadas y el patrón de localización de cada proteína es particular.

El mutante M3 de Rabfilina3A presentaba un patrón de expresión similar a Rabfilina3A *wild-type* con vesículas mayormente acumuladas en la periferia. SNAP25 presentaba su patrón de localización en la membrana plasmática debido a su naturaleza. STIM1 presentaba un patrón reticulado dado que se encuentra anclada a la membrana del RE. Tcp1111 presentaba un patrón difuso uniforme por todo el citoplasma salvo en el núcleo (Figura. IV.10). El porcentaje de células transfectadas era adecuado, no obstante, se observan núcleos de células que no presentan el citoplasma teñido indicando que la tinción es específica y sólo estamos observando las proteínas de fusión.

Para testar que las construcciones funcionan y bajo suplementación con biotina producen una biotinilación selectiva de proteínas, se realizaron distintos ensayos incubando células PC12 con concentraciones crecientes de biotina durante 16 horas para todos los clones. Se realizaron *Western-Blot* con

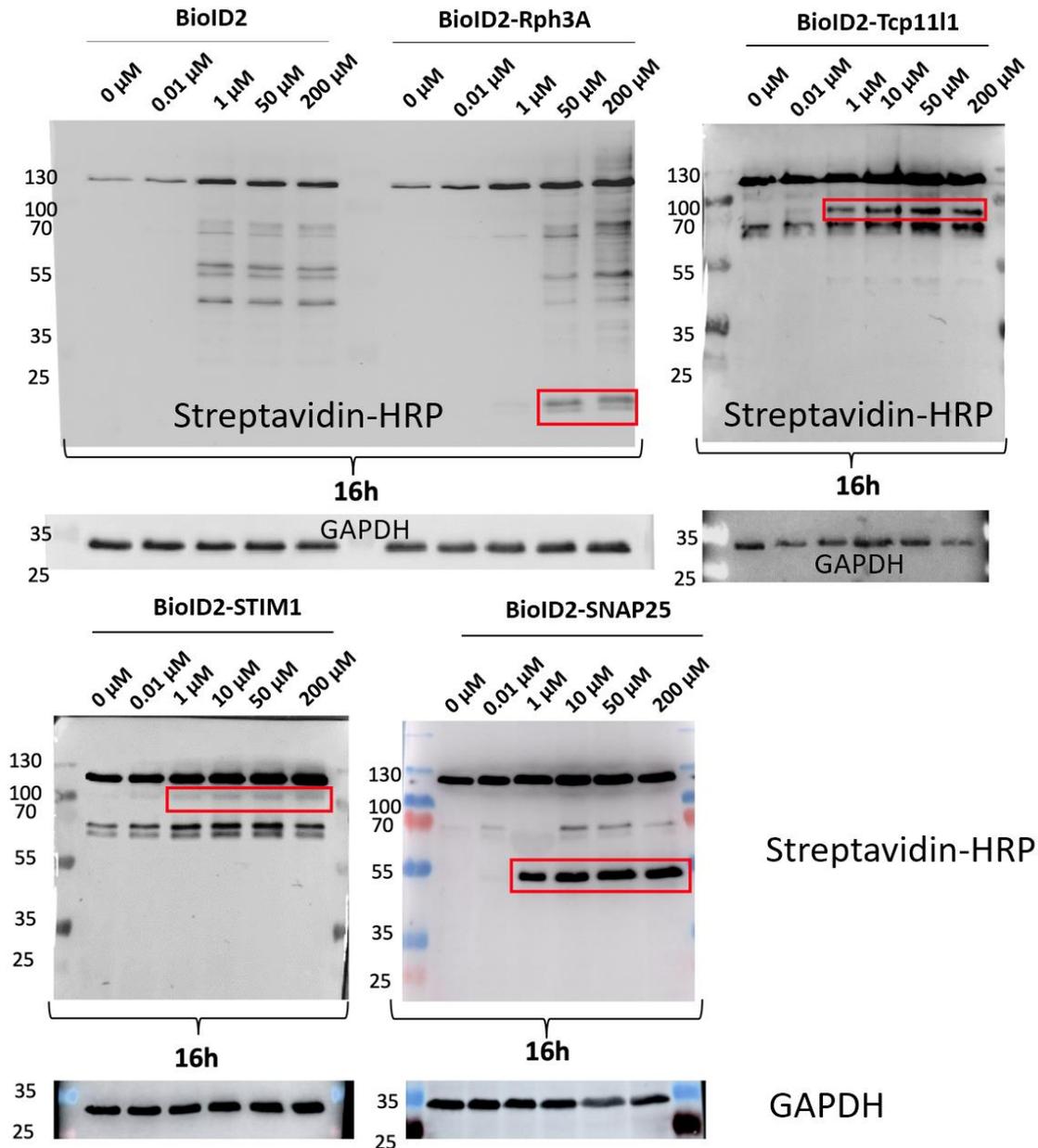


Figura. IV.11. Western-blot de la biotinilación de las proteínas con BioID2. Las membranas grandes muestran el patrón de proteínas biotiniladas por las distintas células expresando la construcción indicada arriba, al ser suplementadas con concentraciones crecientes de biotina, reveladas con estreptavidina-HRP. La membrana recortada indica la proteína de control de carga GAPDH, indicando que todas las calles tienen aproximadamente la misma cantidad de proteína. En rojo se marca la banda más específica de esa línea celular.

estreptavidina-HRP para testar que las construcciones producían un patrón de biotinilación específico. Se observó que todas ellas presentaban un incremento de la biotinilación al ser suplementada con biotina, siendo 50 μM una adecuada concentración (Figura. IV.11). Las bandas más específicas de la construcción están marcadas en rojo, en Rph3A-M3 es un par cercano a 25 kDa, que podría corresponderse con la Rab27 o Rab3. En BioID2-Tcp1111 se observa una banda

cercana a 70 kDa que podría ser la propia autobiotinilación de Tcp1111. En BioID2-STIM1 se observa una banda cercana a 100 kDa que podría corresponderse con la propia BioID2-STIM1, y en SNAP25 se observa una intensa banda inferior a 55 kDa que podrían ser Sintaxina1A o la propia BioID2-SNAP25. Estos datos indican que las construcciones funcionan y al menos están biotinilando proteínas de forma dependiente de la construcción y biotina.

IV.3.4. Proteínas que interaccionan con BioID2-SNAP25 en un fenotipo adrenal

El análisis de las proteínas biotiniladas por BioID2-SNAP25 en células PC12 bajo un fenotipo adrenal se realizó mediante espectrometría de masas, y generó 138 proteínas significativamente enriquecidas al comparar con los controles. Las proteínas más significativamente enriquecidas fueron distintas proteínas SNARE (Figura. IV.12), resultado que es esperable dado que SNAP25 interacciona de forma estable con proteínas de esta familia, validando que el sistema funciona correctamente.

Las proteínas SNARE son el motor molecular para llevar a cabo la fusión de membranas mediante el ensamblaje entre ellas permitiendo juntar las bicapas lipídicas opuestas para inducir la fusión (Wang et al., 2017). Se pueden dividir en dos familias dependiendo de dónde residan: proteínas SNARE de vesículas (v-SNAREs) o localizadas en la membrana diana (t-SNAREs). Las proteínas de la familia SNAP25 y Sintaxinas están ancladas a la membrana diana (Koike & Jahn, 2022). Las proteínas significativamente enriquecidas de la familia Sintaxina fueron: STX1A, STX4, STX5, STX7 y STX12. STX1A y STX4 están ancladas a la membrana plasmática, Sintaxina1A media la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática presináptica (Lerman et al., 2000) y STX4 media el acoplamiento de las vesículas de transporte a la membrana plasmática (Puri & Roche, 2006). Las otras isoformas de STX intervienen en el transporte intracelular: La STX5 media en el transporte del RE al cis-Golgi (Hay et al., 1997). STX7 media el tráfico endocítico desde la endosoma temprano al endosoma tardío (Nakamura et al., 2000). STX12 regula

el transporte de proteínas entre los endosomas tardíos y la red trans-Golgi (Teng et al., 2001). SNAP25 la proteína con mayor valor estadístico esto confirma que el experimento ha funcionado adecuadamente, aunque su valor de enriquecimiento no es el mayor de la lista-

Las proteínas sinaptobrevinas (también conocidas como VAMP) se encuentran ancladas a las vesículas (Rossi et al., 2004). Las proteínas significativamente enriquecidas de la familia VAMP fueron: VAMP3 que participa en el transporte vesicular desde los endosomas tardíos hasta el trans-Golgi (Li

SNAP25 vs Ctrl Adrenal

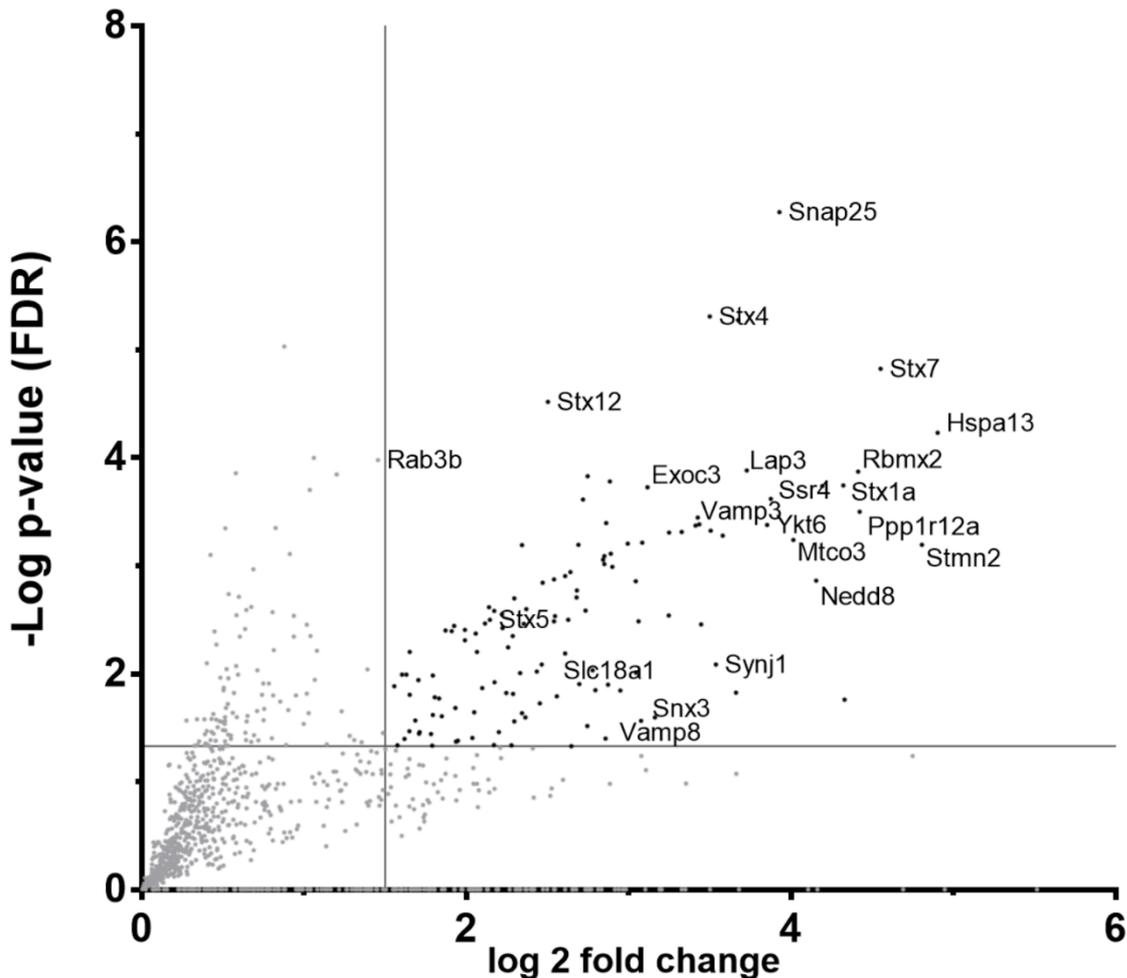


Figura. IV.12. Diagrama de volcán de las proteínas que interactúan con SNAP25 en el fenotipo adrenal. El diagrama ilustra la significancia de la prueba estadística t-test como $-\text{Log}_{10}$ p-valor frente a la intensidad de LFQ (Log_2) como valor de enriquecimiento en SNAP25-BioID2 al comparar con los dos controles BioID2 y BioID2-Rph3A sin biotina. Datos obtenidos de cuatro réplicas diferentes de cada condición. Las 138 proteínas significativamente positivas se muestran como puntos negros con un valor de p-valor $< 0,05$ y un valor de enriquecimiento logarítmico $> 1,5$.

et al., 2015); VAMP8 que es esencial para la fusión de las membranas celulares que participan en la autofagia y la secreción de enzimas (Behrendorff et al., 2011); Ykt6, denominada homóloga de la sinaptobrevina YKT6, es una proteína v-SNARE que media en el acoplamiento y la fusión de vesículas en el transporte del RE al Golgi e interactúa con STX5 (Tai et al., 2004).

Además, hay proteínas significativamente enriquecidas que participan en el transporte de vesículas, como el componente 3 del complejo Exocyst (Exoc3), que participa en el acoplamiento de las vesículas exocíticas con los sitios de fusión en la membrana plasmática (Inoue et al., 2006). La nexina clasificadora 3 (Snx3) es necesaria para la formación de multivesículas y en el transporte de proteínas e interactúa con los fosfoinosítidos (Pons et al., 2008). El transportador de aminas de los gránulos cromafines (Slc18a1) participa en el transporte de monoaminas biógenas desde el citoplasma hasta las vesículas secretoras de las células neuroendocrinas (Erickson et al., 1996). La subunidad delta de la proteína asociada al translocon (Ssr4) regula la retención de las proteínas residentes en el RE mediante la unión del Ca^{2+} a la membrana del RE (Skach, 2007). Synj1 es otra proteína significativa que hidroliza el PIP_2 unido a las proteínas reguladoras de la actina, lo que da lugar a la reorganización de los filamentos de actina (Sakisaka et al., 1997).

Entre las proteínas más significativamente biotiniladas se encuentran algunas proteínas que participan en la regulación de las proteínas del citoesqueleto como la Estatmina-2 (Stmn2) es un regulador de la estabilidad de los microtúbulos, y cuando es fosforilada por MAPK8 estabiliza los microtúbulos y controla la longitud de las neuritas en las neuronas corticales (Klim et al., 2019). La subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1 12A (Ppp1r12A), es un regulador clave de la proteína fosfatasa y media la unión a la miosina (Yamashiro et al., 2008). Entre las Sintaxinas que presentan un valor más alto de enriquecimiento se encuentran STX1A, y STX7.

Para investigar las vías moleculares asociadas al conjunto de proteínas identificadas que interactúan con SNAP25 se llevó a cabo un análisis de ontología genética realizado por Metascape utilizando las 138 proteínas significativamente enriquecidas de SNAP25. Se reveló que los términos GO más significativamente enriquecidos son la localización de orgánulos (valor $p = -\log 11,78$), la exocitosis (valor $p = -\log 9,58$) y el tráfico de membranas (valor $p = -\log 7,81$) (Figura. IV.13). Estos resultados son esperados dado que estos términos se relacionan con las funciones conocidas de SNAP25. No obstante hay aparecen otros con un valor de enriquecimiento inferior que están relacionados con la regulación de la actina del citoesqueleto (valor $p = -\log 4,87$) o metabolismo de lípidos (valor $p = -\log 4,24$) (Figura. IV.13).

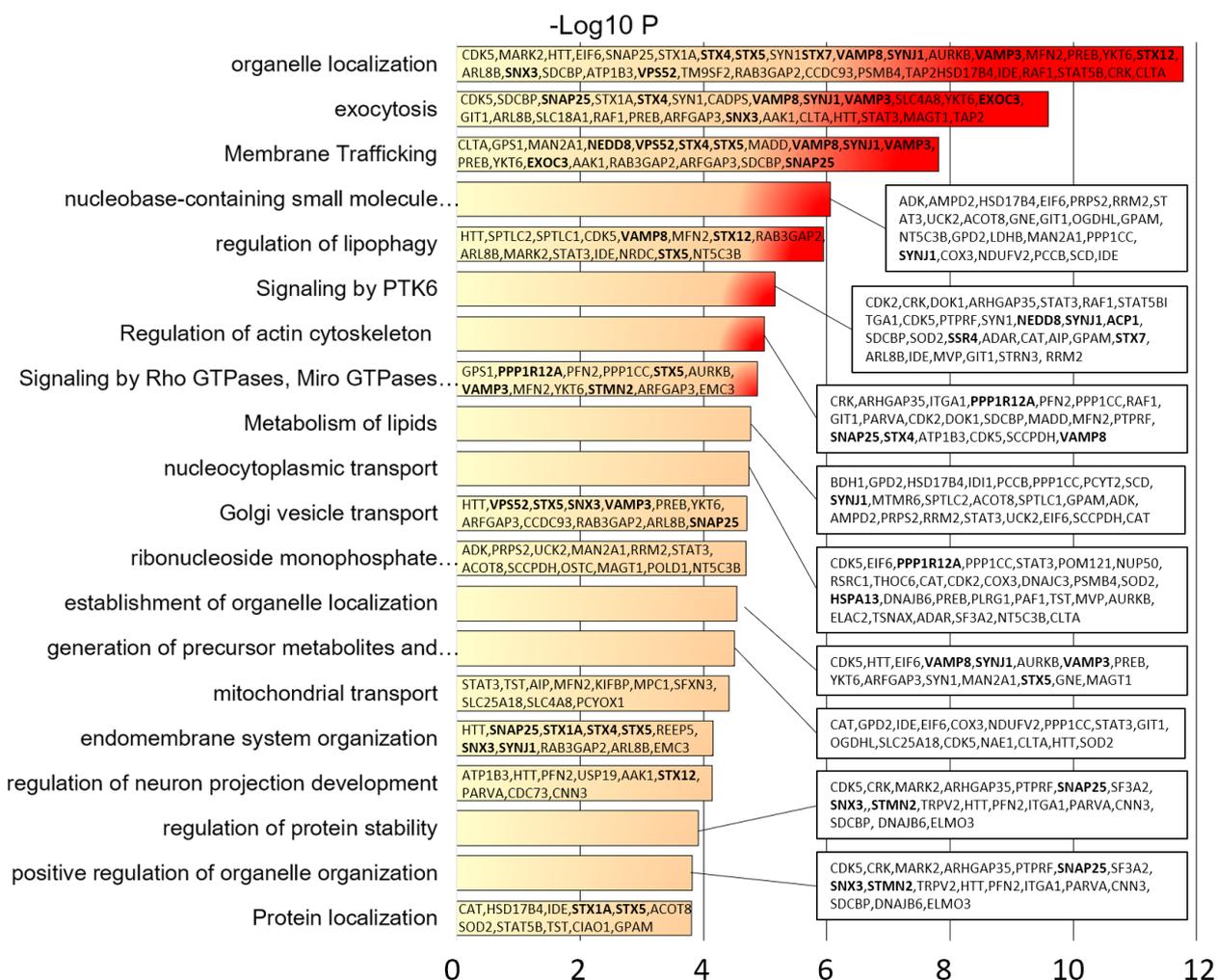


Figura. IV.13. Gráfico de barras del análisis de ontología genética del ensayo BioID2-SNAP25 en fenotipo adrenal. Se muestra el análisis de términos GO de las 138 proteínas biotiniladas en BioID2-SNAP25 utilizando metascape. La significancia del enriquecimiento de un término particular se muestra con el log₁₀ del valor p -value, y dentro de cada barra se muestran los genes enriquecidos de ese término.

IV.3.5. Proteínas que interaccionan con BioID2-Rabfilina3A-M3 en fenotipo adrenal

El mutante M3 de Rabfilina3A (Rph3A-M3) está mutado en la α -hélice de la parte inferior del dominio C2B, localizado en el extremo C-terminal de la proteína. Este mutante es incapaz de interactuar con SNAP25 (Ferrer-Orta et al., 2017). El análisis se realizó con el objetivo de averiguar si había diferencias con Rabfilina3A *wild-type*. El análisis de BioID2 de este mutante realizado por espectrometría de masas produjo 63 proteínas significativamente biotiniladas con un valor de enriquecimiento superior a 1,5 (Figura. IV.14). Rabfilina3A fue la proteína biotinilada más enriquecida, resultado que la construcción funciona

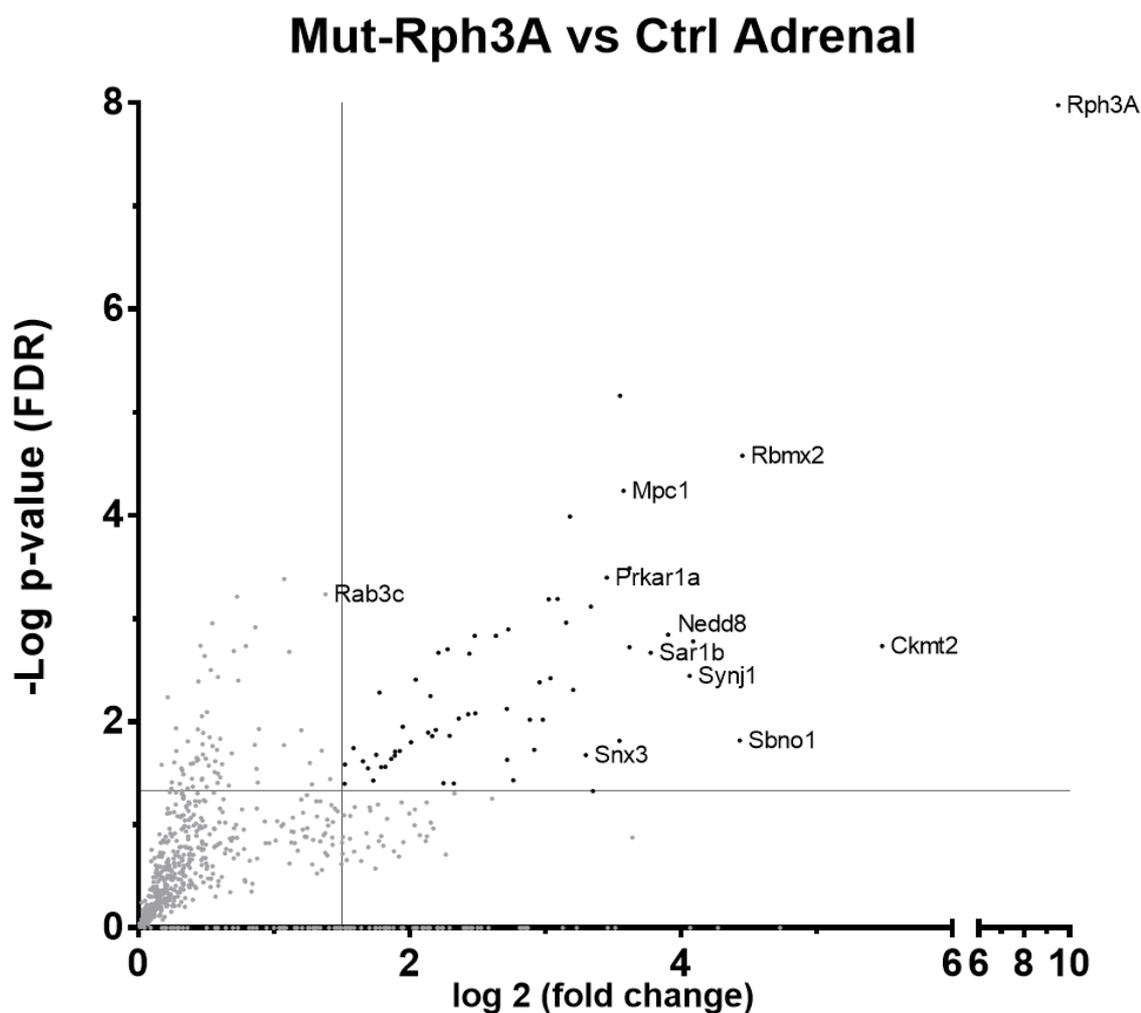


Figura. IV.14. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con Rph3A-M3 en el fenotipo adrenal. El diagrama ilustra la significancia de la prueba estadística *t*-test, como $-\text{Log}_{10}$ p-valor frente a la intensidad de LFQ (Log_2) como valor de enriquecimiento en SNAP25-BioID2 al comparar con los dos controles BioID2 y BioID2-Rph3A sin biotina. Datos obtenidos de cuatro réplicas diferentes de cada condición. Las proteínas significativamente positivas se muestran como puntos negros con un valor de *p*-value < 0,05 y un valor de enriquecimiento logarítmico > 1,5.

correctamente dado que la BioID2 está fusionada a ella y puede autobiotinilarse. Además, hay algunas proteínas identificadas que están descritas en la literatura como proteínas que interactúan con Rabfilina3A como Nedd8 (Nakashima et al., 2018), Prkar1a, que es la subunidad reguladora de la proteína quinasa dependiente de AMPc tipo I- α , está descrito que PKA puede fosforilar a Rabfilina3A (Fykse et al., 1995) apoyando que el experimento funcionó correctamente.

Hay tres proteínas significativamente enriquecidas que podrían estar asociadas a la función canónica de Rabfilina3A. Una de ellas es la Sinaptojanina-1 (Synj1), es una fosfatasa que actúa sobre varios fosfoinosítidos, hidroliza el PIP₂ unido a las proteínas reguladoras de la actina dando lugar a la reordenación de los filamentos de actina, y tiene un papel en la endocitosis mediada por clatrina (Choudhry et al., 2021). Otra es la proteína de unión a GTP SAR1b (SAR1B) implicada también en el transporte desde el RE al aparato de Golgi y participa en la selección de la carga proteica y el ensamblaje del complejo de la cubierta COPII, y está regulada por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina PREB, estando relacionada con las proteínas rab (Wang et al., 2021). La última es la nexina clasificadora-3 (Snx3), que es una proteína de unión a fosfoinosítidos necesaria para la formación de cuerpos multivesiculares (Pons et al., 2008).

Otras proteínas descubiertas no están relacionadas con la función canónica de Rabfilina3A. Hay 4 proteínas que se pueden dividir en dos grupos: proteínas relacionadas con la transcripción y con la mitocondria. La proteína *Strawberry notch homolog 1* (Sbno1), y la *RNA-binding motif X-linked 2* (Rbmx2) están implicadas en la transcripción y en el *splicing* del pre-mRNA como componentes del espliceosoma activado (X. Zhang et al., 2018). Ckmt2 y Mpc1 se localizan en el interior de las mitocondrias y participan en la catalización del ATP y median en la captación de piruvato en las mitocondrias (Schlattner et al., 2004).

Si comparamos la cantidad de proteínas compartidas del mutante del dominio C2B de Rabfilina3A con la versión silvestre de la proteína, observamos que el mutante comparte un 25% de sus proteínas con Rabfilina3A *wild-type*. Además, el número total de proteínas obtenidas en la versión mutante (63) es considerablemente inferior al obtenido en la versión silvestre (173), siendo la diferencia de proteínas superior a 100 (Figura. IV.15). Se concluye que la mutación está afectando a su funcionalidad, aunque se conservan ciertas proteínas como Sinaptojanina1, Sbno1 o incluso aparece Rab3c, aunque no llega a entrar en el límite de proteínas estadísticamente enriquecidas (Figura. IV.14).

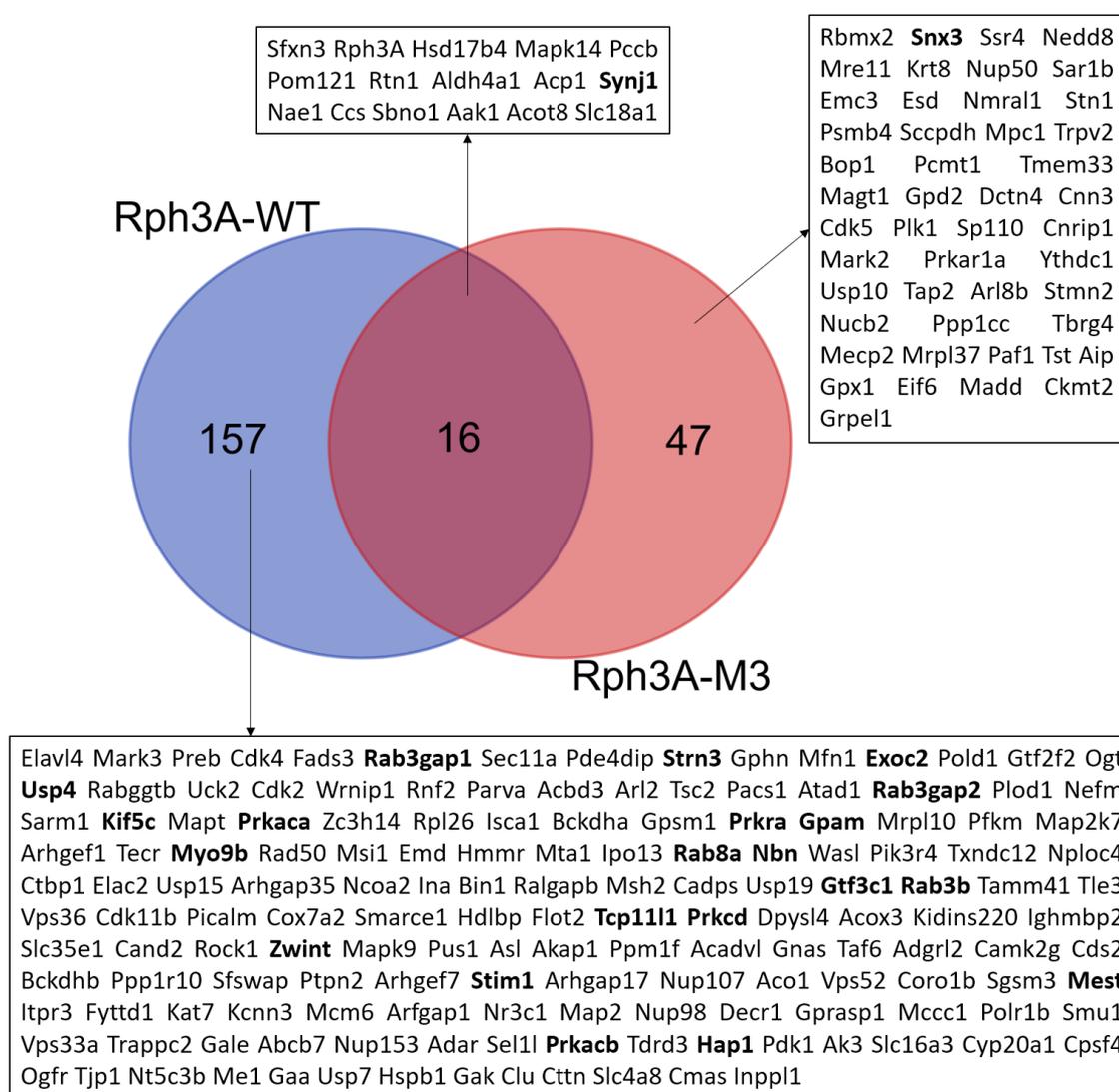


Figura. IV.15. Diagrama de Venn que muestra las proteínas compartidas entre Rph3A-M3 y Rph3A *wild-type* en el fenotipo adrenal.

El análisis de términos de ontología de genética utilizando Metascape con las 63 proteínas significativamente biotiniladas reveló un enriquecimiento de las proteínas que forman parte del proceso catabólico de moléculas pequeñas (valor $p = -\log 5,7$) y del transporte nucleocitoplásmico (valor $p = -\log 5,31$) (Figura. IV.16), estos términos no están relacionados con la función canónica de Rabfilina3A. Los términos más relacionados con su función están al final de la lista, como el sistema de endomembranas (valor $p = -\log 2,90$), o el tráfico de

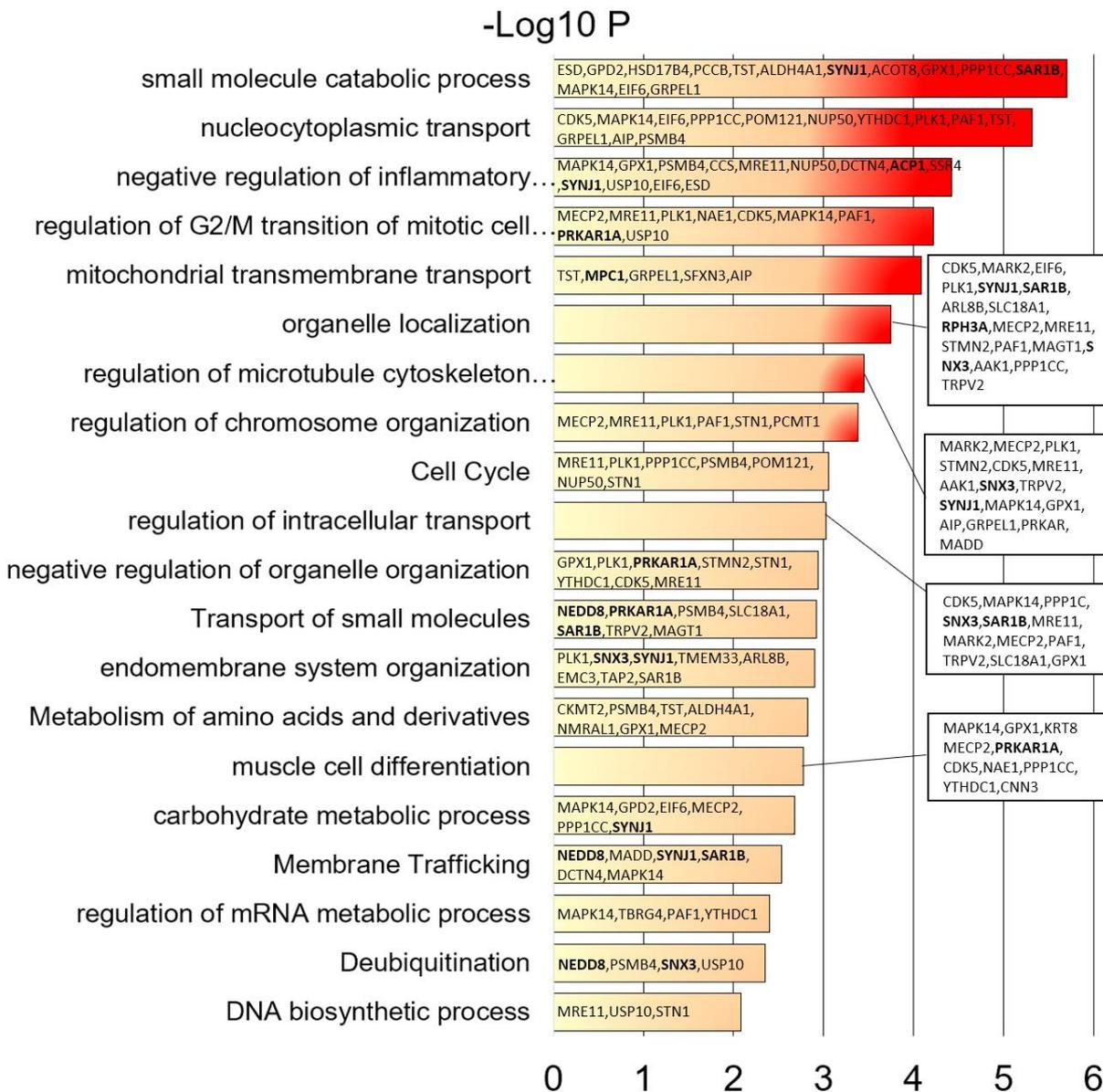


Figura. IV.16. Gráfico de barras del análisis de ontología genética de las proteínas biotiniladas por BioID2-Rph3A-M3 en fenotipo adrenal. Se muestra el análisis de términos GO de las 63 proteínas biotiniladas en BioID2-Rph3A-M3 utilizando metascape. La significancia del enriquecimiento de un término particular se muestra con el \log_{10} del valor p -value, y dentro de cada barra se muestran los genes enriquecidos de ese término.

membranas (valor $p = -\log 2,53$), siendo sus valores p -value no muy elevados sugiriendo que la funcionalidad de la proteína mutante está alterada, constatando que la mutación está alterando la función regular de Rabfilina3A.

IV.3.6. Proteínas que interaccionan con BioID2-STIM1 en fenotipo adrenal

STIM1 es una proteína anclada a la membrana del RE, con una región citoplasmática y otra endoplasmática (Figura. IV.17). La proteína BioID2 se fusionó con el extremo N-terminal de STIM1. El análisis estadístico de la prueba *t-Student* que compara las 4 réplicas de BioID2-STIM1 con los controles del análisis de MS proporcionó 31 proteínas significativamente enriquecidas. Sorprendentemente, la proteína más enriquecida fue Tcp1111, uno de los nuevos candidatos que interaccionarían con Rabfilina3A como se muestra en el epígrafe IV.3.2. Sin embargo, STIM1 mostró un valor de enriquecimiento (*fold change*) más bajo, mientras que se esperaba que fuera una de las proteínas más enriquecidas.

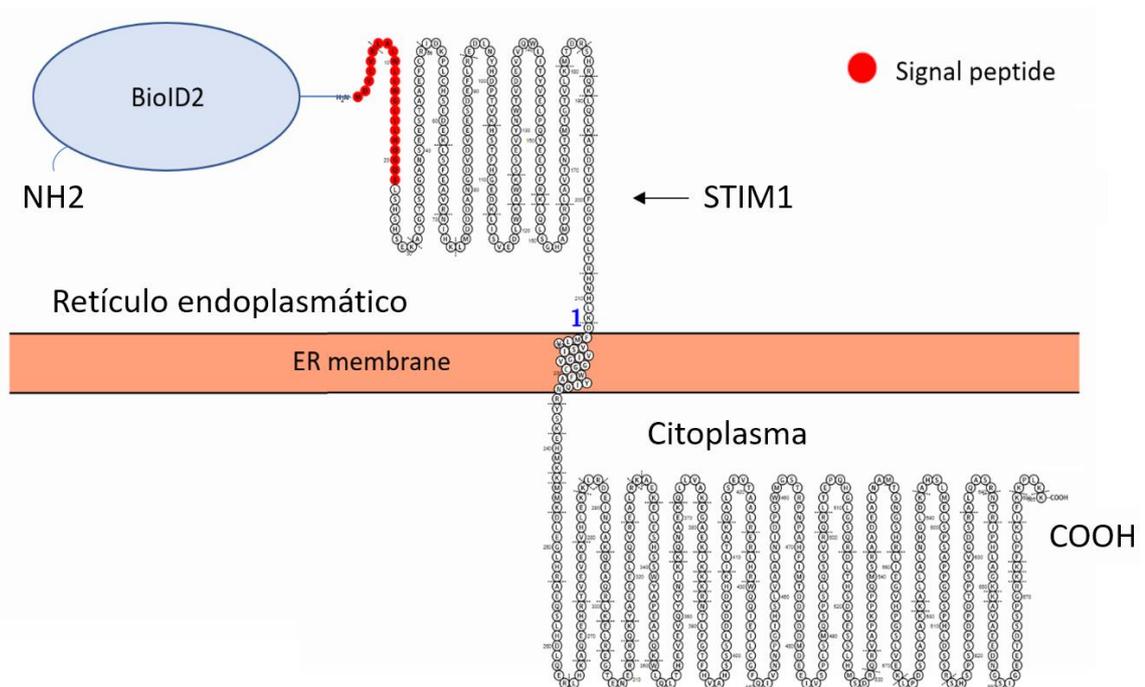


Figura. IV.17. Esquema proteico de la proteína de fusión BioID2-STIM1. En el N-terminal se encuentra la BioID2 en la región del RE. El C-terminal está expuesto al citoplasma

Solamente la proteína Atp1b3 llamada subunidad $\beta 3$ de la ATPasa transportadora de sodio/potasio que es el componente no catalítico de la enzima activa, es la única proteína detectada que esta descrita según la base de datos STRING (Szkłarczyk et al., 2021) que interacciona con STIM1. Atp1b3 cataliza la hidrólisis de ATP junto con el intercambio de iones Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática, la subunidad $\beta 3$ parece estar implicada en la regulación de la activación de las células T (Chruewkamlow et al., 2015).

Es importante resaltar que la construcción BioID2-STIM1, posee el péptido señal de inserción en la membrana (tipo I) (Figura. IV.17). El péptido señal contiene una secuencia consenso y un sitio de corte, donde la proteína recién sintetizada es reconocida por el canal Sec61, comúnmente denominado translocón, que ayuda a insertar la proteína en el RE (Hegde & Keenan, 2021). La naturaleza hidrofóbica del péptido señal permite la inserción del péptido en la membrana del RE, seguido de su escisión por la peptidasa señal liberando a la proteína correctamente insertada (Blobel & Dobberstein, 1975).

Teniendo en cuenta esto, la proteína BioID2 podría ser escindida de STIM1 una vez que esta se ha localizado correctamente en la membrana, por lo tanto, las proteínas biotiniladas que encontramos podrían corresponder solamente a interacciones de STIM1 desde su síntesis hasta que se localiza en la membrana del RE. Sin embargo, la microscopía confocal que se muestra en la Figura. IV.10 indica un patrón de distribución de la proteína BioID2-STIM1 típico de localización en el RE. Si consideramos que la inmunofluorescencia se ha realizado con anticuerpo anti-myc, y que este tallo está localizado en el extremo N-terminal de BioID2, esto significaría que la proteína está correctamente localizada y que no ha habido una escisión posterior del péptido por parte de la proteasa. Mas experimentos de doble marcaje myc y STIM1 serán necesarios para demostrar el estado del ciclo celular de localización de la proteína.

Las proteínas más significativas enriquecidas son proteínas implicadas en la regulación de la actina (Figura. IV.18): El factor de barrera a la autointegración (Banf1), desempeña un papel fundamental en el ensamblaje nuclear y la organización de la cromatina, comprime la estructura de la cromatina y participa en el reclutamiento de la membrana (Kobayashi et al., 2015); La miotrofina (Mtpn) desempeña un papel en la regulación del crecimiento de los filamentos de actina, y también inhibe la actividad del complejo de recubrimiento de la actina formada por el heterodímero CAPZA1 y CAPZB (Takeda et al., 2010); La proteína profilina-2 (Pfn2) se une a la actina y afecta a la estructura del citoesqueleto, impidiendo así la polimerización de la actina. Además, Pfn2 inhibe

STIM1 vs Ctrl Adrenal

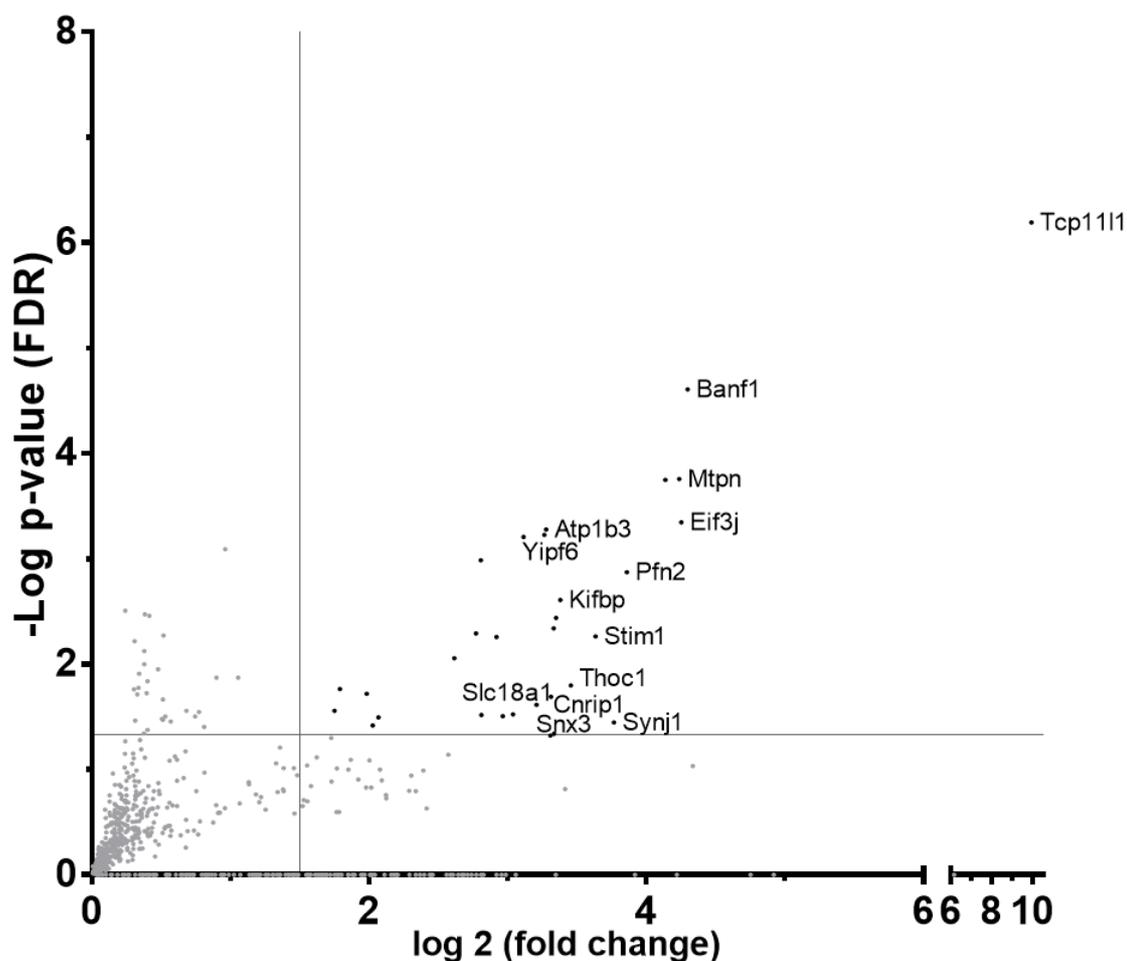


Figura. IV.18. Diagrama de volcán de las proteínas que interactúan con STIM1 en fenotipo adrenal. El diagrama ilustra la significancia de la prueba estadística t-test como $-\text{Log}_{10}$ p-valor frente a la intensidad de LFQ (Log_2) como valor de enriquecimiento, en STIM1-BioID2 al comparar con los dos controles BioID2 y BioID2-Rph3A sin biotina. Datos obtenidos de cuatro réplicas diferentes. Las proteínas significativamente positivas se muestran como puntos negros con un valor de p-value $< 0,05$ y un valor de enriquecimiento logarítmico superior a 1,5.

la formación de IP₃ y DAG al unirse a PIP₂ (Kursula et al., 2008). Synj1 es también una proteína significativamente enriquecida en los análisis BioID2 de STIM1, Rph3A y SNAP25.

Hay otras proteínas significativamente enriquecidas que están relacionadas con la función de las neuronas y las vesículas. Un ejemplo es la proteína de unión a KIF (Kifbp) requerida para la organización de los microtúbulos axonales, el crecimiento axonal y el mantenimiento durante el desarrollo del sistema nervioso periférico y central (Alves et al., 2010). Otra es la proteína que interacciona con el receptor cannabinoide CB1 (Cnrip1), que suprime la inhibición de los canales de Ca²⁺ activados por voltaje mediada por el receptor cannabinoide CNR1 (Niehaus et al., 2007). Además, el transportador de aminas de gránulos cromafines (Slc18a1), y Snx3 son proteínas significativas también presentes los análisis de STIM1, Mut-Rph3A y SNAP25.

Otras proteínas significativas están implicadas en procesos no relacionados con la función putativa de STIM1 y que, por tanto, son vías interesantes para explorar funciones desconocidas de STIM1. Por ejemplo, la subunidad J del factor de iniciación de la traducción eucariota 3 (Eif3j) es un componente del complejo del factor de iniciación de la traducción eucariota 3, necesario para la iniciación de la síntesis de proteínas (Lee et al., 2016). La subunidad 1 del complejo THO (Thoc1) es necesaria para la exportación eficiente del ARN poliadenilado (Cheng et al., 2006).

Sorprendentemente, el análisis de Ontología Genética (GO) realizado con Metascape utilizando las 31 proteínas significativamente biotiniladas de STIM1 (Figura. IV.19) descubrió que el término GO más significativamente enriquecido es la importación nuclear del complejo de pre-integración (PIC) mediada por la proteína viral R (Vpr) (valor p = -log 5,19). Otro término que no es una función canónica relacionada con STIM1, es la degradación de proteínas del ciclo celular mediada por APC/C (valor p = -log 3,90). APC/C es el Complejo Promotor de la Anafase o Ciclosoma y se sabe que promueve la separación de las cromátidas

hermanas, y la salida mitótica a través de la degradación de las ciclinas mitóticas. Estos resultados apoyan un nuevo papel para STIM1, reorganizando las membranas durante la división celular. Los otros términos GO enriquecidos están relacionados con la regulación de la organización de las proyecciones celulares delimitadas por la membrana plasmática (valor $p = -\log 3,16$), la regulación de la polimerización de los filamentos de actina (valor $p = -\log 3,05$) y el ciclo de las vesículas sinápticas (valor $p = -\log 2,97$). Estas funciones están relacionadas con la reorganización de las membranas y todas ellas están relacionadas entre sí.

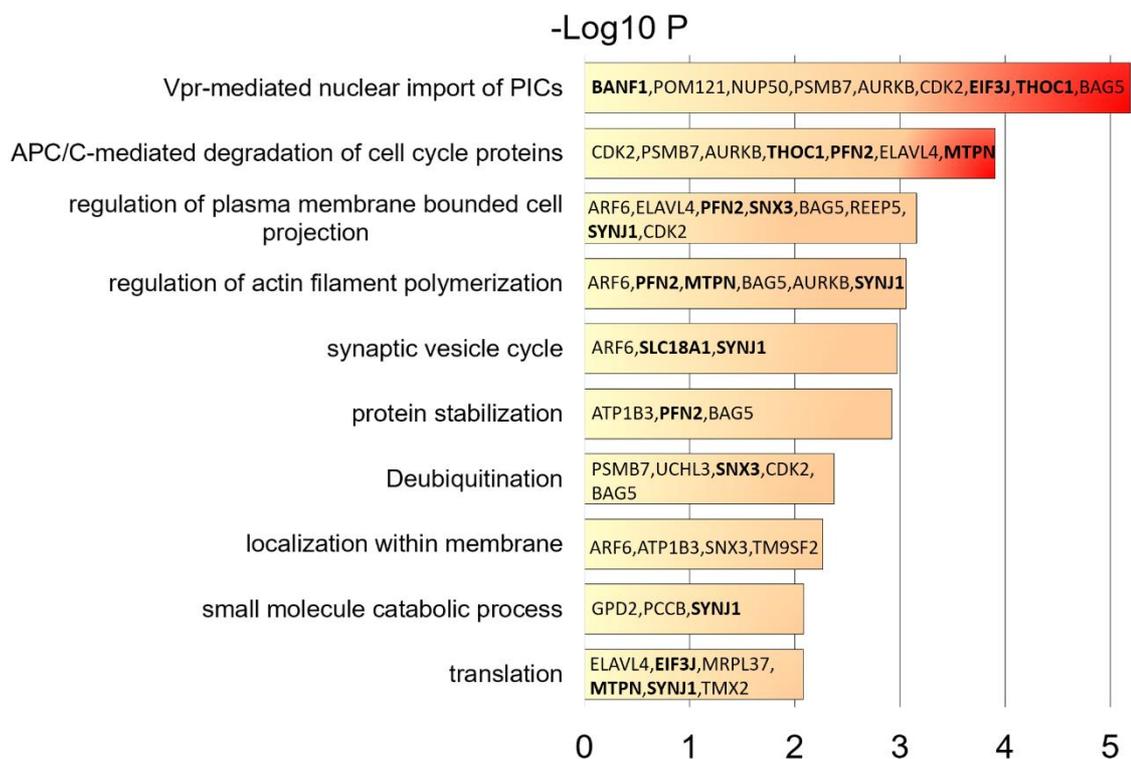


Figura. IV.19. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-STIM1 en fenotipo adrenal. Se muestra el análisis de términos GO de las 31 proteínas biotiniladas en BioID2-STIM1 utilizando metascap. La significancia del enriquecimiento de un término particular se muestra con el \log_{10} del valor p -value, y dentro de cada barra se muestran los genes enriquecidos de ese término.

IV.3.7. Proteínas que interactúan con BioID2-Tcp111 en un fenotipo adrenal

Tcp111 es una proteína de función desconocida que no se ha investigado en profundidad. Hasta ahora sólo se ha encontrado como presa en análisis proteómicos relacionados con el citoesqueleto (Huttlin et al., 2017; N. Yu et al., 2016). En el presente experimento, Tcp111 actúa como cebo, por lo que los resultados que se muestran aquí son proteínas de interacción completamente nuevas.

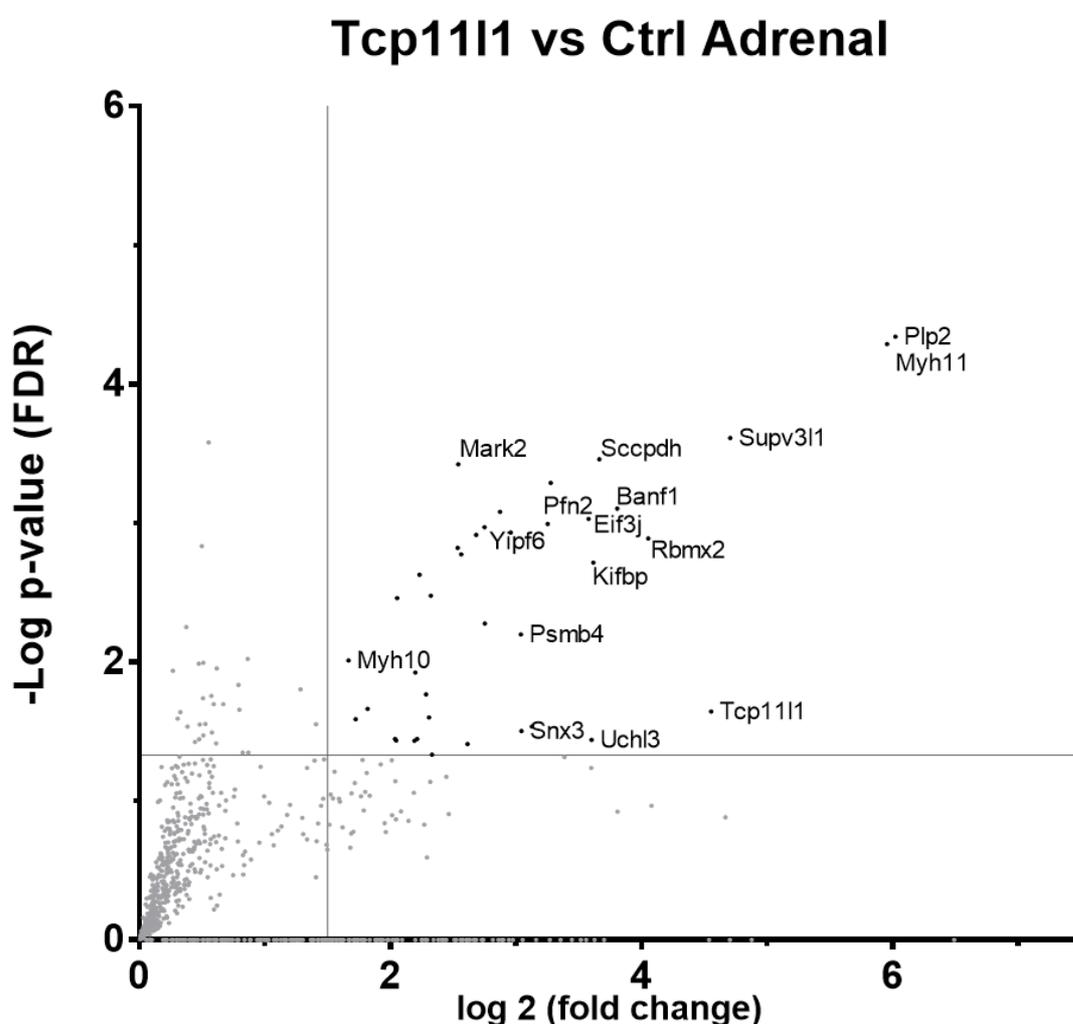


Figura. IV.20. Diagrama de volcán de las proteínas que interactúan con Tcp111 en el fenotipo adrenal. El diagrama ilustra la significancia de la prueba estadística t-test de cómo $-\text{Log}_{10}$ del valor p frente a la intensidad LFQ (Log_2) como valor de enriquecimiento, de las distintas proteínas de Tcp111-BioID2 al comparar con los dos controles BioID2 y BioID2-Rph3A sin biotina. Datos obtenidos de cuatro réplicas diferentes por cada condición. Las proteínas significativamente positivas se muestran como puntos negros con un valor de p-value < 0,05 y un valor de enriquecimiento logarítmico superior a 1,5.

El análisis proteómico de BioID2-Tcp1111 en fenotipo adrenal proporcionó como resultado 38 proteínas significativamente enriquecidas, al comparar BioID2-Tcp1111 con los controles (Figura. IV.20). Las dos proteínas más enriquecidas son la proteína proteolipídica 2 (Plp2) y la miosina-11 (Myh11). Plp2 es una proteína de membrana localizada en la membrana plasmática y en la membrana del RE y se ha descubierto que interactúa con Tpd52 y Rab5c (Shahheydari et al., 2014). La otra proteína más enriquecida es Myh11 y participa en la contracción muscular (Landrette et al., 2005). La tercera proteína más significativamente enriquecida es la ARN helicasa mitocondrial SUPV3L1 dependiente de ATP (Supv311), es la principal helicasa en el metabolismo del ARN mitocondrial y está localizada en el núcleo y en la mitocondria (Khidr et al., 2008). Tcp1111 es la cuarta proteína más biotinilada, lo que confirma que el experimento funciona correctamente.

Hay un subconjunto de proteínas que están presentes en los análisis de STIM1 y Tcp1111 como: Eif3j, que participa en la iniciación de la traducción; Yipf6, que participa en el aparato de Golgi (Lee et al., 2016); Pfn2 se une a la actina y afecta a la estructura del citoesqueleto (Kursula et al., 2008); Banf1, que desempeña un papel en el ensamblaje nuclear comprimiendo la estructura de la cromatina y participa en el reclutamiento de membranas (Kobayashi et al., 2015); Kifbp, necesaria para la organización de los microtúbulos axonales, el crecimiento y el mantenimiento de los axones durante el desarrollo del sistema nervioso periférico y central (Alves et al., 2010); Slc18a1, que participa en el transporte de monoaminas biogénicas en vesículas (Erickson et al., 1996). La mayoría de estas proteínas están relacionadas con las vesículas, lo que sugiere que Tcp1111 desempeña un papel en el tráfico de vesículas junto con STIM1. Además, Snx3 también es una proteína enriquecida en el análisis de STIM1, Mut-Rph3A y SNAP25 y también está implicada en el transporte de vesículas.

Hay dos proteínas biotiniladas implicadas en la dinámica celular: MARK2 y Myh10. La serina/treonina-proteína quinasa MARK2 (Mark2) es una quinasa implicada en la regulación de la polaridad celular y de la dinámica de los

microtúbulos, regula la axogénesis mediante la fosforilación de Kif13b, y es necesaria para el crecimiento de las neuritas (Biernat et al., 2002). Myh10 es una miosina no muscular y desempeña un papel en la citocinesis, la forma de la célula y funciones especializadas como la secreción (Cai et al., 2010).

Otras proteínas positivas no están relacionadas entre sí. Por ejemplo, la Sacaropina deshidrogenasa-oxidorreductasa (Sccpdh) que está implicada en la degranulación de las plaquetas, y tiene actividad oxidorreductasa (Hendrickson et al., 2010); la Ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa UCHL3 (Uchl3), que es una tiolproteasa que reconoce e hidroliza un enlace peptídico en la glicina C-terminal de la ubiquitina o de la NEDD8 (Setsuie et al., 2009); y la subunidad β tipo-4 del proteasoma (Psmb4) que es un componente del complejo 20S del proteasoma central (Yano et al., 2004).

Teniendo en cuenta las 38 proteínas del interactoma de Tcp111 se realizó un análisis GO, y los resultados muestran cinco términos con un valor p similar:

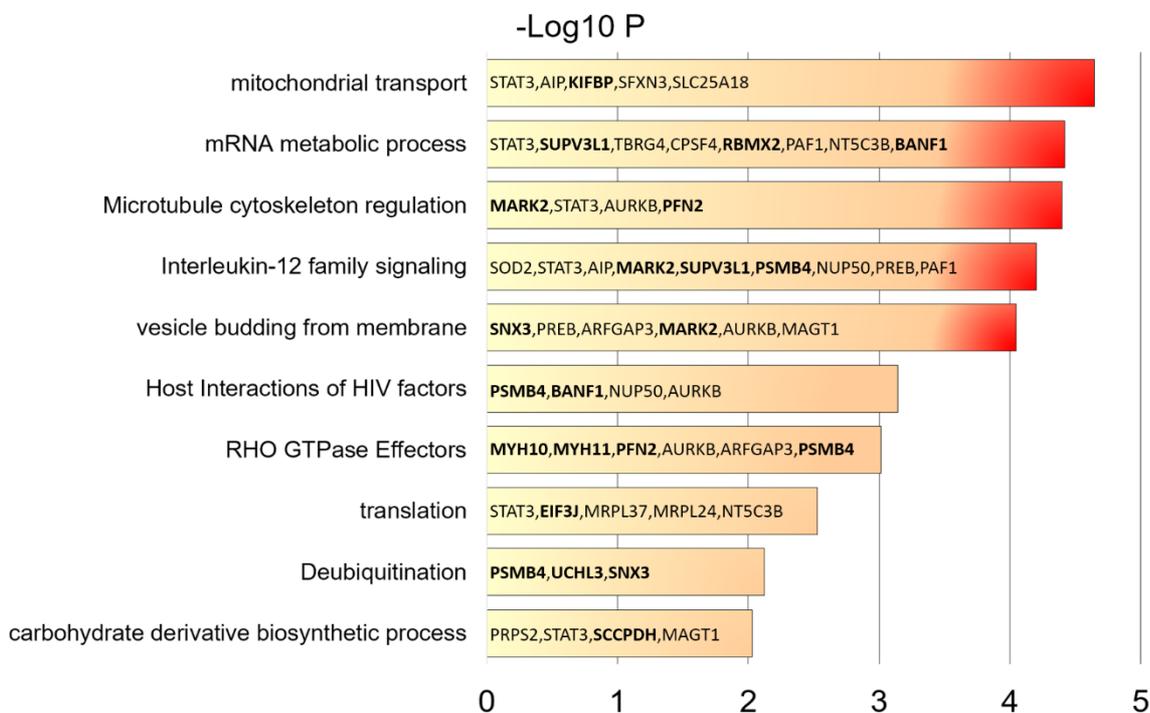


Figura. IV.21. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BiolD2-Tcp111 en fenotipo adrenal. Se muestra el análisis de términos GO de las 38 proteínas biotiniladas en BiolD2-Tcp111 utilizando Metascape. La significancia del enriquecimiento de un término particular se muestra con el \log_{10} del valor p-value, y dentro de cada barra se muestran los genes enriquecidos de ese término.

transporte mitocondrial (valor $p = -\log 4,64$), metabolismo del ARNm (valor $p = -\log 4,41$), regulación del citoesqueleto microtubular (valor $p = -\log 4,39$), señalización de la familia interleukin-12 (valor $p = -\log 4,2$) y gemación de vesículas de la membrana (valor $p = -\log 4,04$) (Figura. IV.21). Estos resultados refuerzan la idea de que Tcp1111 es una proteína que podría estar implicada en la regulación de la dinámica celular, y la regulación entre las mitocondrias, el RE y las vesículas que surgen de la membrana a través del citoesqueleto.

IV.3.8. Interacciones mutuas entre Rabfilina3A, SNAP25, STIM1 y Tcp1111 en el fenotipo adrenal

SNAP25 es una proteína conocida y bien caracterizada que interacciona con Rabfilina3A (Ferrer-Orta et al., 2017; Tsuboi & Fukuda, 2005). STIM1 y Tcp1111 son nuevos candidatos para interaccionar con Rabfilina3A determinados por el análisis de BioID2-Rph3A. Para vislumbrar mejor en conjunto el interactoma de todas las proteínas en un fenotipo adrenal, se compararon las proteínas obtenidas de los cuatro interactomas BioID2 de las proteínas analizadas en este capítulo.

El diagrama de Venn de la Figura. IV.22 muestra las proteínas compartidas entre los interactomas de Rabfilina3A, SNAP25, Tcp1111 y STIM1. Solo la proteína Slc18a1 es común a los cuatro interactomas, se trata de un transportador de monoaminas encargado de transportar serotonina desde el citoplasma hasta las vesículas secretoras (Erickson et al., 1996). Las proteínas que se comparten entre tres análisis son 16 proteínas. 4 proteínas se comparten entre STIM1, SNAP25 y Rabfilina3A, destaca Sinaptojanina1 (Synj1), proteína que se une a actina e hidroliza el PIP₂. 8 proteínas se comparten entre SNAP25, STIM1 y Tcp1111 destaca Snx3, Pfn2 y Kifbp proteínas implicadas en el tráfico de membranas (Figura. IV.22).

Las proteínas compartidas entre 2 o más ensayos son 62 proteínas. El análisis de GO de las 62 proteínas procedentes de las comunes entre todas ellas, junto al resto de proteínas comunes a dos condiciones, muestra que la función

que realizan Rabfilina3A, SNAP25, STIM1 y Tcp1111 conjuntamente son principalmente regulación de las membranas, orgánulos y funciones neuronales (Figura. IV.23). En la Figura. IV.23 El término con mayor puntuación es la estabilización de proteínas (valor $p = -\log 4,33$), los relacionados con las neuronas son la regulación de los niveles de neurotransmisores (valor $p = -\log 4,12$), regulación positiva del desarrollo de las neuronas (valor $p = -\log 3,58$), niveles de neurotransmisores. Los términos relacionados con las membranas son la organización de membranas (valor $p = -\log 3,74$), regulación positiva de la organización de orgánulos (valor $p = -\log 3,31$), y localización dentro de la membrana (valor $p = -\log 2,38$).

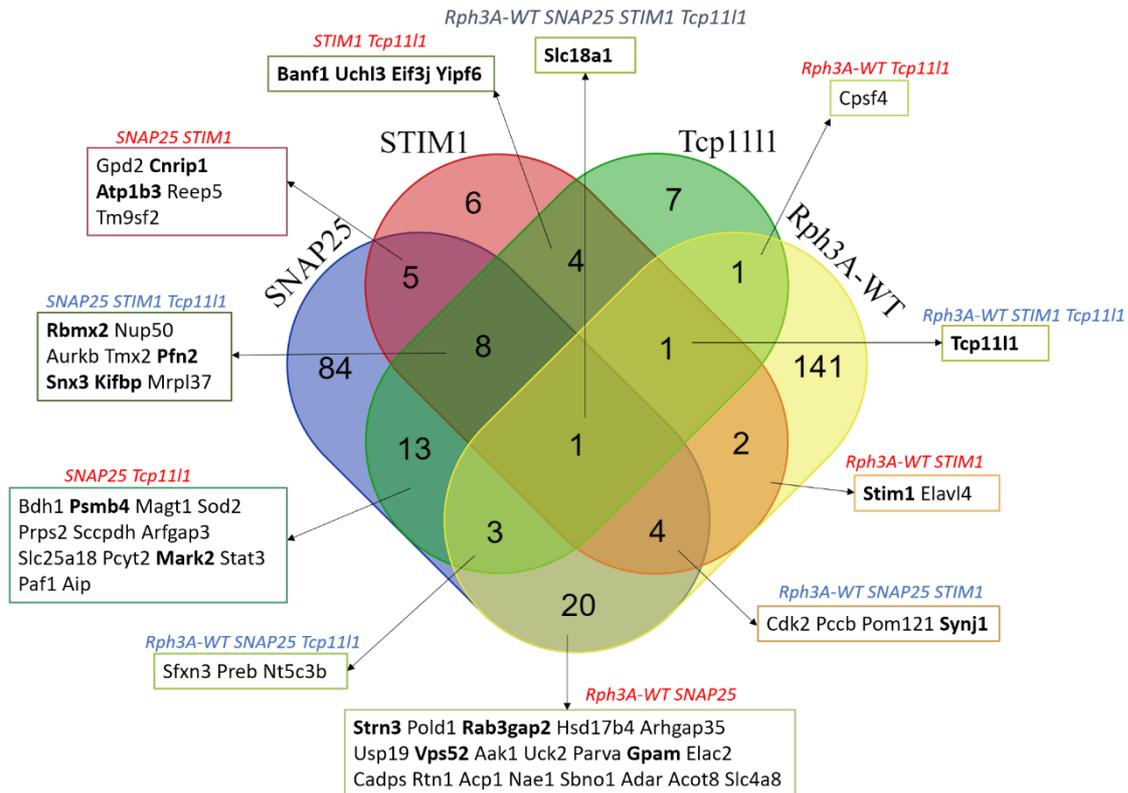


Figura. IV.22. Diagrama de Venn de las proteínas compartidas entre Rph3A, SNAP25, STIM1 y Tcp1111 en fenotipo adrenal.

Para una mejor comprensión de los términos de GO obtenidos, se representa un gráfico de redes de los términos con una similitud >0.3 , conectados entre ellos y representados por clústeres de un mismo color los que están relacionados con los términos mostrados en el gráfico de la Figura. IV.23. Se observa que los términos organización de las membranas, localización dentro de la membrana y regulación de los niveles de neurotransmisores forman una red junto con la regulación del ciclo viral. El resto de los términos se encuentran desapareados (Figura. IV.24).

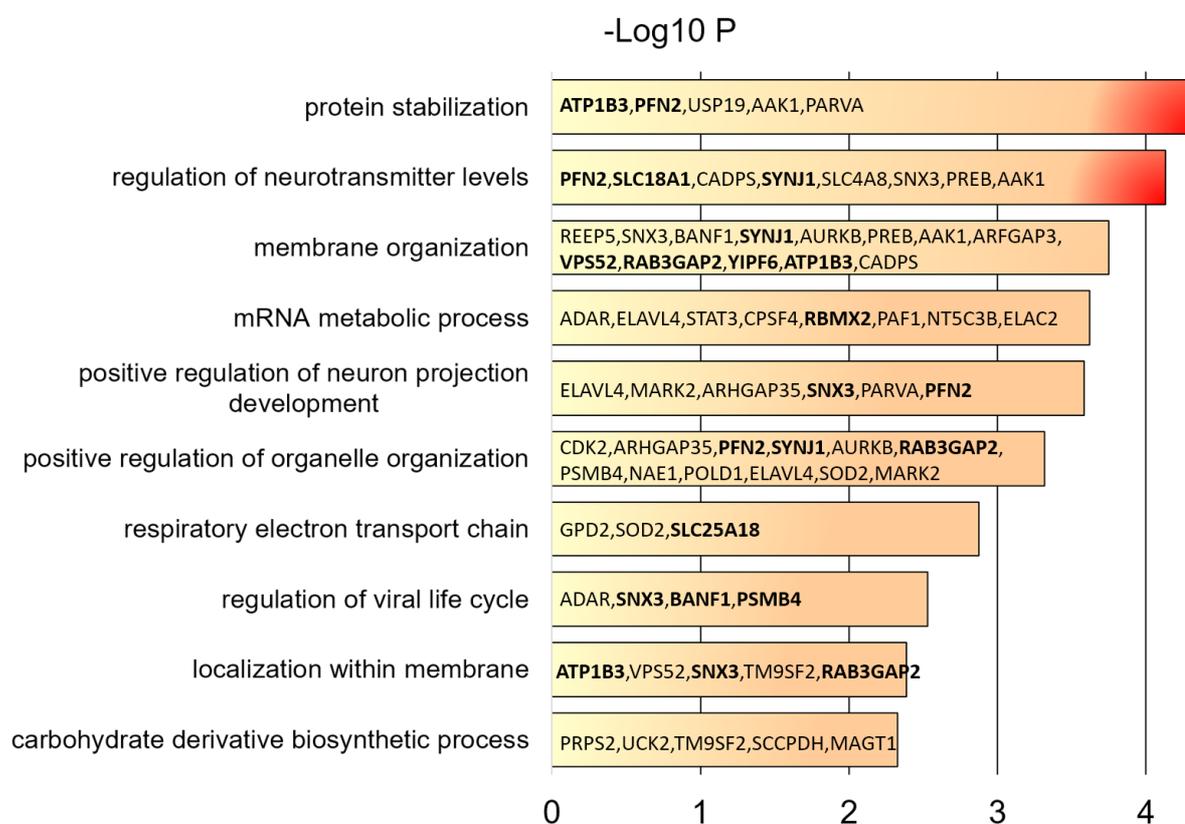


Figura. IV.23. Gráfico de barras del análisis GO de las 62 proteínas comunes entre Rph3A, STIM1, SNAP25 y Tcp1111 en fenotipo adrenal. La significancia del enriquecimiento de un término particular se muestra con el \log_{10} del valor p-value, y dentro de cada barra se muestran los genes enriquecidos de ese término.

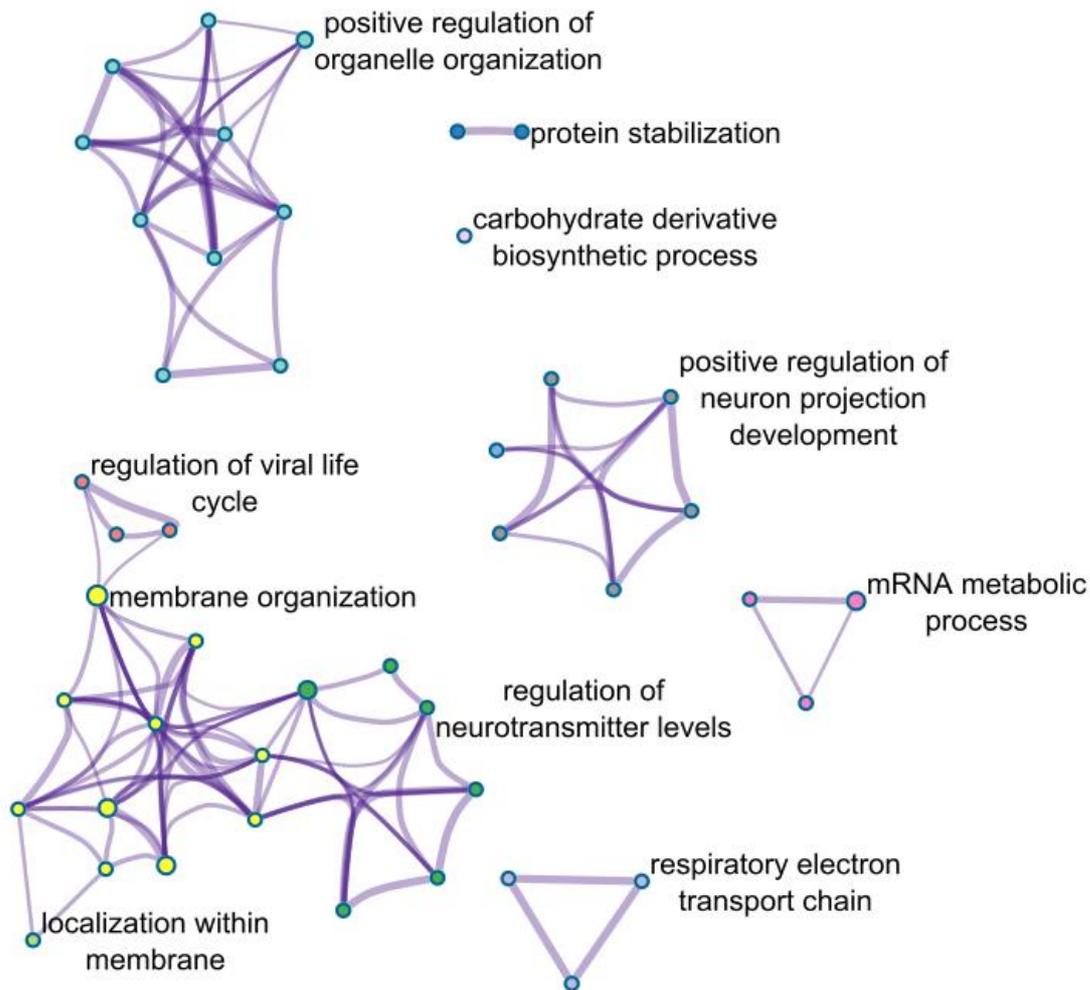


Figura. IV.24. Red de términos enriquecidos de las 62 proteínas comunes entre dos o más condiciones de los análisis de BioID2 en fenotipo adrenal. Con el objetivo de captar mejor las relaciones entre los términos, se representan como un gráfico de redes los términos con una similitud >0.3, red realizada con Metascape y visualizada con Cytoscape donde cada nodo representa un término, y están agrupados por clústeres de un mismo color y solo se muestra un término por clúster.

Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de las redes de interacción proteína-proteína utilizando STRING, con el fin de visualizar las interacciones proteína-proteína caracterizadas y conocidas en la literatura utilizando Cytoscape. Se utilizaron las 39 proteínas comunes para el análisis, que informó de una gran red en la que no están presentes Rabfilina3A, SNAP25, Tcp1111 y STIM1 (Figura. IV.25). Además, hay tres pequeñas redes, una que contiene SNAP25 y Rabfilina3A y otra con STIM1 y ATP1B3. Por lo tanto, estas proteínas podrían ser el enlace a la red más grande mostrada en la Figura. IV.25. Como es lógico, Tcp1111 no forma parte de ninguna red porque es una proteína poco caracterizada en la literatura, pero teniendo en cuenta los resultados

obtenidos anteriormente, es probable que esté vinculada a Rabfilina3A, STIM1, así como a otras proteínas.

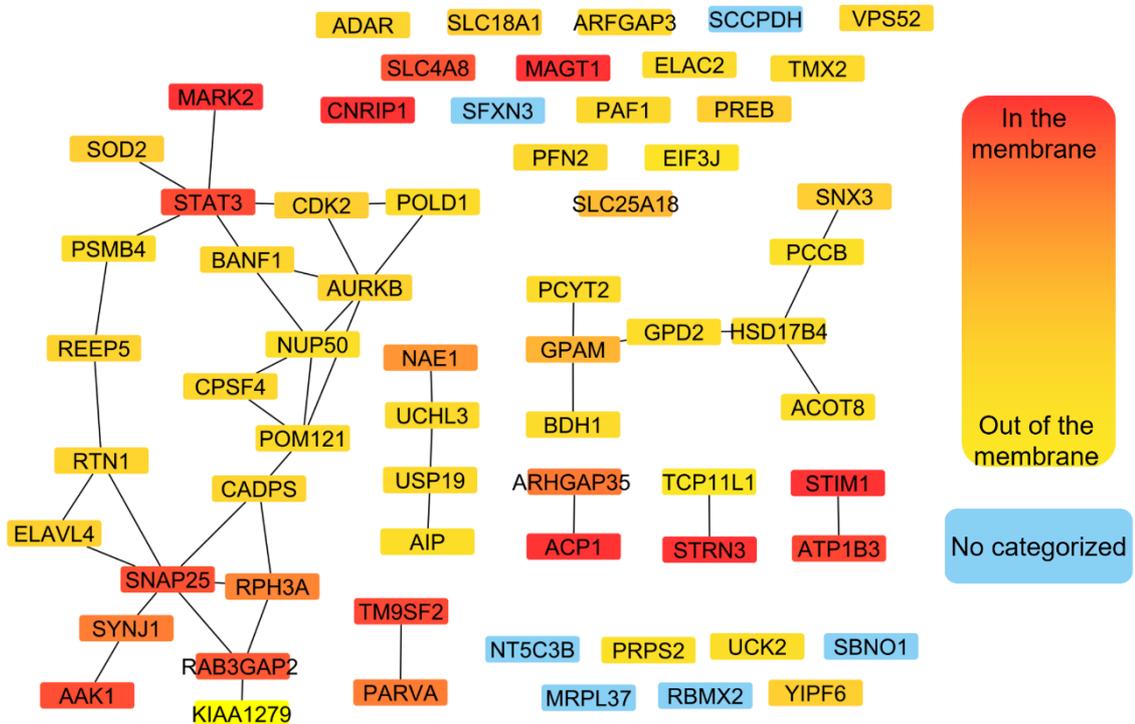


Figura. IV.25. Red de interacción proteína-proteína de las proteínas de los 4 interactomas en fenotipo adrenal. Red realizada con las 62 proteínas comunes entre BioID2-Rph3A, -SNAP25, Tcp1111, -STIM1 mediante Cytoscape con la base de datos de STRING. Gradiente de color: en rojo las proteínas de membrana y en amarillo las proteínas fuera de la membrana plasmática. En azul la proteína no está categorizada.

IV.3.9. Ensayo de complementación bimolecular fluorescente

Con el objetivo de validar las interacciones detectadas mediante la técnica BioID2, se trató de poner a punto el ensayo de complementación bimolecular fluorescente (BiFC). Este ensayo permite detectar PPI *in vivo* mediante la fusión de cada mitad de una proteína fluorescente a un par de proteínas candidatas a interactuar. Si las dos proteínas de análisis interactúan, las dos mitades de la proteína fluorescente estarán lo suficientemente cerca y habrá una reconstitución de la proteína fluorescente generando fluorescencia permanente, la reconstitución de la proteína es irreversible. El ensayo se realizó de manera masiva mediante citometría de flujo, que permite analizar de manera rápida las

distintas combinaciones (Morell et al., 2008). Lo tedioso es realizar la librería de construcciones de las distintas proteínas de fusión fluorescente.

Como control positivo y negativo de interacción para poder calibrar y cuantificar el ensayo se usó el par de las hélices de los factores de transcripción bJun y bFos que está descrito que interaccionan como control positivo, y como control negativo el mismo par, pero delecionada parte de la hélice de bFos (Nakagawa et al., 2011). Se fusionó la proteína Rabfilina3A a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente mVenus (VN), se realizaron dos construcciones una fusionada al extremo C-terminal de Rabfilina3A, llamada Rph3A-VN, y otra al extremo N-terminal de Rabfilina3A, llamada VN-Rph3A. Esto se realizó por si alguna construcción impedía la correcta interacción dado que los dominios funcionales de Rabfilina3A se encuentran en los extremos de la proteína. El resto de las proteínas candidatas se fusionó por el lado C-terminal a la porción C-terminal de mVenus, llamándose X-VC.

El ensayo no se pudo concluir completamente para la redacción de esta tesis doctoral, por ello se muestra únicamente como un primer ensayo preliminar con ciertas proteínas de fusión construidas, aunque están proyectadas más para realizar. Además, sólo se realizó un ensayo sin repeticiones, por ello no presenta barras de error, no obstante, el ensayo parece funcionar correctamente.

En la Figura. IV.26 se muestran los resultados del ensayo, Rabfilina3A y SNAP25 parecen interaccionar fuertemente (barra azul), curiosamente mejor con la construcción Rph3A-VN (54%) aunque el dominio de interacción que es el C2B localizado en el C-terminal de la proteína esta fusionado a mVenus, aunque eso quizás haga que las mitades de las proteínas fluorescentes estén más cerca. Rabfilina3A con Rab27 (84%) su proteína de interacción por excelencia es la que más señal de interacción produce de todas las analizadas (barra verde). Rabfilina3A con Tcp1111 (71%) parece interaccionar mejor incluso que con SNAP25 (barra roja). Este resultado valida que Tcp1111 es una proteína de interacción de Rabfilina3A. El resto de las proteínas analizadas parecen

interaccionar con menor intensidad con Rabfilina3A, como es el caso de Zwint (17%), presentando similar intensidad que SNAP25 con Zwint (16%), y ligeramente mayor SNAP25 con Rab27 (23%). La proteína Cops6 no parece interaccionar con Rabfilina3A, dando un resultado negativo, esta proteína se clonó como un control negativo adicional.

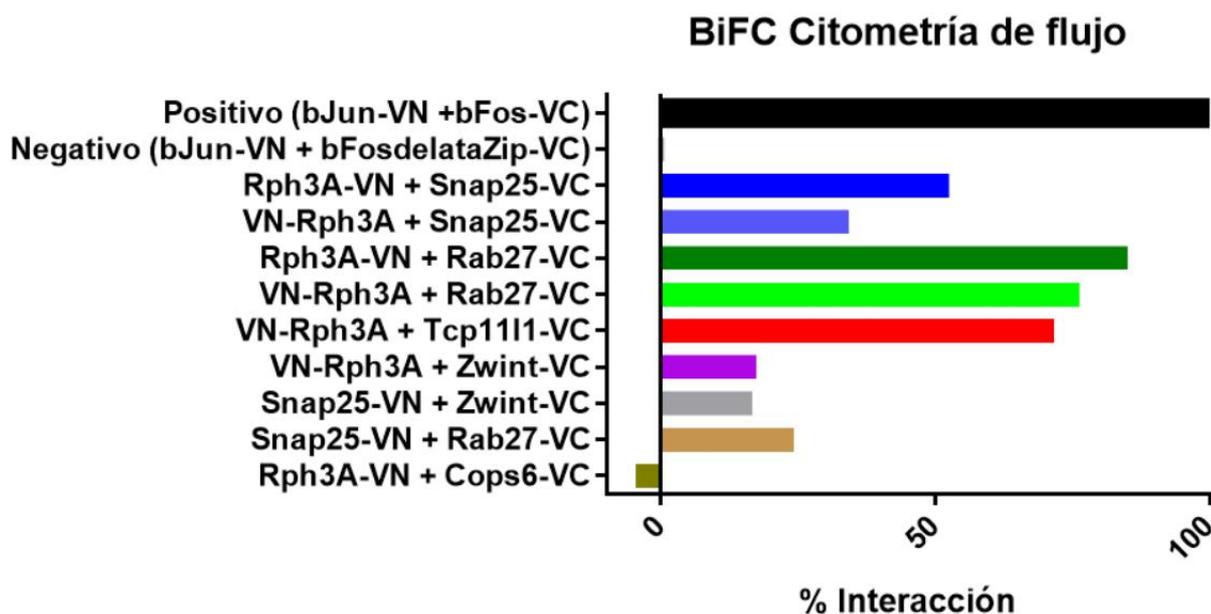


Figura. IV.26. Gráfico del porcentaje de interacción mediante BiFC. Gráfico del porcentaje de interacción de distintos pares de proteínas mediante BiFC, analizado por citometría de flujo (10.000 células). Calibrado con el par bJUN + bFos como 100% de interacción y bJun + BFosdelataZip como 0% de interacción.

IV.4. Discusión

Rabfilina3A es una proteína efectora de Rabs implicada en la liberación de neurotransmisores, su conformación y actividad están reguladas por la presencia Ca^{2+} y PIP_2 , a través de sus dominios C2 (Guillen et al., 2013; Montaville et al., 2008). Sin embargo la función específica de Rabfilina3A no se ha determinado completamente en la actualidad, y aunque se ha relacionado con procesos de transporte de vesículas de células neuronales y enfermedades neuronales, estudios muy recientes están observando que esta proteína también está implicada en la reacción acrosómica que ocurre en el espermatozoide humano al

fertilizar un ovulo (Quevedo et al., 2019), y también en el daño renal producido por la hipertensión y la diabetes (Martinez-Arroyo et al., 2020). En el anterior capítulo de esta tesis doctoral, se determinó el mecanismo molecular por el que Rabfilina3A retiene o mantiene a SNAP25 en la membrana plasmática que podría ser similar a como lo hace en la terminal postsináptica donde interacciona y promueve la retención de los receptores NMDA (Stanic et al., 2015).

En el presente capítulo, con el fin de obtener información acerca del entorno molecular de Rabfilina3A, en un primer lugar se determinó el interactoma de Rabfilina3A mediante un enfoque masivo mejorado llamado BioID2 basado en el etiquetado por biotina dependiente de proximidad. BioID es una potente técnica que se ha utilizado como herramienta para identificar interacciones proteína-proteína o la proximidad proteína-proteína en células vivas antes de la lisis celular. A diferencia de los enfoques más clásicos, BioID2 permite identificar PPI en condiciones fisiológicamente más relevantes, PPI de baja afinidad y/o transitorias dado que el marcaje se realiza durante al menos 16 horas, además es apropiado para el estudio de proteínas insolubles, como las proteínas de membrana, sin mucha influencia en la solubilidad de las proteínas (Gingras et al., 2019).

Se optó por fusionar Rabfilina3A con la biotina ligasa promiscua mejorada BioID2. La fusión de BioID2 a Rabfilina3A no afectó a su función: estaba localizada cerca de la membrana y en acúmulos vesiculares (Figura. IV.3). Se supone que la biotinilación se produce en un rango estimado de 10 nm (Kim et al., 2014). Por lo tanto, BioID2-Rph3A debería biotinilar principalmente a los efectores directos de Rabfilina3A, y a las proteínas que pertenecen al ambiente cercano de Rabfilina3A que están en un diámetro estimado de 0,05 μm . En una primera aproximación se encontró que STIM1, proteína sensible a Ca^{2+} , y Tcp1111, proteína de función desconocida, eran dos de las proteínas más fuertemente biotiniladas por BioID2-Rph3A bajo un fenotipo adrenal (Figura. IV.6). Hay que tener en consideración que los enfoques proteómicos clásicos capturan una instantánea de la composición proteica de alrededor de la proteína,

en cambio, este ensayo de biotilación de proximidad captura las proteínas efectoras de Rabfilina3A durante un período prolongado (16 h), lo que revela todas las interacciones que establece Rabfilina3A durante su vida media. Por tanto, Tcp1111 y STIM1 parecen ser potentes proteínas efectoras de Rabfilina3A.

Para evaluar mejor el interactoma circundante a Rabfilina3A, se realizó la misma estrategia, pero con las proteínas que interactúan con ella, en concreto BioID2-SNAP25, -Tcp1111 y -STIM1. En el interactoma de SNAP25 en fenotipo adrenal aparecen varias proteínas STX, la que obtiene un valor mayor es STX7 constatando que el experimento funciona debidamente (Nakamura et al., 2000). La segunda proteína más biotilada del ensayo es la estatmina-2 (Stmn2) es un regulador de la estabilidad de los microtúbulos, y cuando es fosforilada por MAPK8 estabiliza los microtúbulos y controla la longitud de las neuritas en las neuronas corticales (Klim et al., 2019). Sin embargo, Rabfilina3A no es devuelta como proteína de interacción de BioID2-SNAP25, ni SNAP25 aparece como proteína biotilada de BioID2-Rph3A, resultados que son extraños, pero podría deberse a la naturaleza propia de estas proteínas y el método usado, dado que por otras estrategias de PPI como el ensayo BiFC o el PLA si parecen interactuar correctamente.

El interactoma de STIM1 en fenotipo adrenal, reportó 31 proteínas en el fenotipo adrenal. Principalmente aparecen proteínas reguladoras de actina como la miotrofina (Mtpn) que desempeña un papel en la regulación del crecimiento de los filamentos de actina (Takeda et al., 2010), también la proteína profilina-2 (Pfn2) que se une a la actina y afecta a la estructura del citoesqueleto, impidiendo así la polimerización de la actina (Sakisaka et al., 1997). Existe un estudio previo de STIM1-BioID realizado en la línea celular MEF que ha sido recientemente publicado donde descubren que STIM1 interactúa con Gelsolina una proteína clave en el ensamblaje y desensamblaje de actina (Gammons et al., 2021). SynJ también es una proteína que regula a las proteínas moduladoras de actina (Verstreken et al., 2003). Es extraño que aparezca Tcp1111 muy enriquecida en el fenotipo adrenal de BioID2-STIM1, este resultado debería de tomarse con

cautela, por si se debe a alguna contaminación en el proceso. No obstante, estos resultados validan los resultados obtenidos por los otros investigadores, indicando que STIM1 es una proteína implicada en la regulación del citoesqueleto a través de actina.

La proteína Tcp1111 se encuentra prácticamente sin estudiar. La información bibliográfica disponible hasta el momento sobre Tcp1111, sólo establece que se ha descubierto que interactúa con la tubulina en un ensayo proteómico masivo (Huttlin et al., 2017), por lo que posiblemente esté relacionada con los microtúbulos. En esta tesis doctoral se demuestra que la interacción de esta proteína con Rabfilina3A es específica, validada con el ensayo de BiFC y BioID2. La proteína presenta cierta homología de secuencia con la proteína Tcp11, con la que tiene un 30% de homología de secuencia. Tcp11 desempeña un papel en el proceso de capacitación de los espermatozoides y en las reacciones del acrosoma, y es un probable receptor del péptido promotor de la fertilización (FPP) de la membrana de los espermatozoides (Castaneda et al., 2020). Sin embargo, Tcp1111 es una proteína diferente a Tcp11, y no se obtiene información bibliográfica sobre ella, por lo que su función es aún indeterminada. Aunque existe evidencia científica que han visto a Rabfilina3A implicada en la reacción acrosómica de los espermatozoides (Quevedo et al., 2019) puede que Tcp1111, al igual que su homólogo Tcp11 también colabore en esta función junto con Rabfilina3A.

Los datos obtenidos en este capítulo sobre Tcp1111, indican que la función más probable de esta proteína parece estar relacionada con el RE, las mitocondrias y las vesículas. En el fenotipo adrenal las proteínas más significativamente enriquecidas son la proteolipídica 2 (Plp2) y la miosina-11 (Myh11). Plp2 es una proteína localizada en la membrana plasmática y también del RE y se ha descubierto que interactúa con Tpd52 y Rab5c (Shahheydari et al., 2014). Myh11 participa en la contracción muscular a través de su unión con actina (Landrette et al., 2005). La tercera proteína más significativamente enriquecida es la ARN helicasa mitocondrial SUPV3L1 dependiente de ATP

(Supv3l1), es la principal helicasa en el metabolismo del ARN mitocondrial y está localizada en el núcleo y en la mitocondria (Khidr et al., 2008).

Teóricamente, Rabfilina3A debería aparecer también en los análisis de BioID2-SNAP25, -STIM1 o -Tcp1111, sin embargo, la proteína no se encuentra en estos análisis. Esto podría explicarse porque el nivel de expresión de Rabfilina3A en las células PC12 no es lo suficientemente alto y, por tanto, no es lo suficientemente biotinilado como para ser capturado y detectado por el espectrómetro de masas, no obstante, la interacción con Tcp1111 si está validada mediante el ensayo BiFC, faltaría por validar y contrastar la interacción con STIM1.

Se realizó también el ensayo BioID2 con Rph3A-M3 (el mutante de Rabfilina3A incapaz de interactuar con SNAP25) para evaluar la influencia de SNAP25 sobre Rabfilina3A. Los resultados obtenidos no eran muy dispares a Rabfilina3A *wild-type*, donde más del 25% de proteínas obtenidas en Rph3A-M3 están presentes en Rph3A *wild-type* (Figura. IV.15). Sin embargo, el número de proteínas significativas fue menor en la condición mutante, indicando que el número de interacciones es menor y la proteína está alterada. En la versión mutante no aparece Tcp1111, ni SNAP25, ni Zwint ni STIM1, indicando que la mutación está alterando la interacción con estas proteínas. Además, resulta interesante que aparezca la proteína NEDD8 en el mutante de Rph3A dado que se ha determinado que Rph3A es neddilada y esto altera su funcionalidad (Nakashima et al., 2018). Estos datos sugieren que la mutación podría provocar cambios en las modificaciones postraduccionales, dado que estas proteínas no estaban tan enriquecidas en la condición *wild-type*.

Teniendo en cuenta los resultados de las cuatro proteínas caracterizadas con la técnica BioID2 en conjunto, se observa que, en el fenotipo adrenal, el transportador de monoaminas (Slc18a1), es una proteína que aparece en los cuatro interactomas, esta proteína es responsable de la carga de monoaminas en las vesículas sinápticas (Erickson & Eiden, 1993), y se ha visto implicado en

distintas patologías neuronales como la depresión (Sato & Kawata, 2018). Sinaptojanina1 (Synj1) aparece en los interactomas de Rph3A, SNAP25 y STIM1. Es una proteína altamente expresada en el cerebro que desempeña un papel destacado en la dinámica de las vesículas sinápticas. Se trata de una fosfatasa que hidroliza el PIP₂ unido a las proteínas reguladoras de la actina, lo que provoca la reorganización de los filamentos de actina (Choudhry et al., 2021). Además, su pérdida conduce a enfermedades neurológicas como el Parkinson (Hardies et al., 2016). Es una proteína que, aunque no se ha determinado su interacción con Rabfilina3A previamente, parece tener gran relación con ella dado que está regulada por PIP₂, y se encuentra en las vesículas de fusión.

Estos experimentos nos dan una amplia visión general donde las complejas redes de membrana bajo el control de proteínas interconectadas, como STIM1, SNAP25, Rabfilina3A y Tcp1111, podrían regular la dinámica celular, especialmente en el fenotipo neuronal que necesita ser estudiado en profundidad para entender su implicación en las enfermedades neurológicas. La función que podrían estar realizando las cuatro proteínas de estudio se divide en dos áreas: Tcp1111 y STIM1 regulan el citoesqueleto y el transporte de orgánulos, respectivamente; SNAP25 ejecuta la fusión de vesículas. Por lo tanto, Rabfilina3A sería el enlace potencial entre ellos, una proteína multifuncional que está orquestando la regulación del tráfico de membranas a través de la regulación de las proteínas del citoesqueleto y del movimiento de los orgánulos.

**CAPÍTULO V. INTERACTOMA DE RABFILINA3A Y
SUS PROTEÍNAS MODULADORAS EN FENOTIPO
NEURONAL**

V.1. Resumen

La técnica BioID2 permite obtener el interactoma de una proteína de estudio. Anteriormente hemos revelado el interactoma de Rabfilina3A, SNAP25, Tcp1111, STIM1, y el mutante de Rabfilina3A incapaz de interactuar con SNAP25 en un fenotipo adrenal de células PC12. Aquí, realizamos un nuevo ensayo BioID2 de las mismas proteínas, pero bajo un fenotipo neuronal, con el objetivo de validar las interacciones anteriores, y también descubrir nuevas PPI con el fin de comprender mejor la fisiopatología de las enfermedades neuronales y el mecanismo molecular que podrían desencadenarlas. En el interactoma de Rabfilina3A *wild-type* aparecen de nuevo las proteínas STIM1, Tcp1111, y Zwint como proteínas significativamente enriquecidas. El interactoma de Rabfilina3A mutante incapaz de interactuar con SNAP25, muestra que sólo la versión mutante interactúa con la Corticoliberina (Crh), pudiendo esta proteína estar implicada junto con Rabfilina3A en la infundíbulo neurohipofisis. El interactoma de Tcp1111 revela que es una proteína implicada en el citoesqueleto que interactúa principalmente con la β -actina, la tubulina de los microtúbulos, y también con proteínas motoras como miosinas, quinesinas y dineínas, siendo probablemente una proteína adaptadora del transporte de vesículas. Los resultados sugieren un modelo donde Rabfilina3A fomenta la evaginación y transporte de las vesículas en el interior celular junto con Tcp1111, ayudando a transportar a SNAP25 entre otras proteínas a la membrana plasmática. Este trabajo aporta una información muy completa en un fenotipo neuronal sobre el interactoma de Rabfilina3A, destacando el papel de Tcp1111 y STIM1 en la función del citoesqueleto y el transporte de vesículas junto a Rabfilina3A y SNAP25.

V.2. Introducción

Rabfilina3A es una proteína expresada en neuronas y células neuroendocrinas, estando implicada en el transporte de vesículas junto a las proteínas Rab3 y Rab27 (Fukuda et al., 2004). Se ha descrito que también interacciona con SNAP25 estando implicada en el anclaje de las vesículas a la membrana y su reciclaje (Tsuboi, 2009; Tsuboi & Fukuda, 2005). La sincronización y rapidez de la fusión vesicular que ocurre en la sinapsis debe de estar perfectamente orquestada por distintas proteínas para el correcto funcionamiento del cerebro (Wilhelm et al., 2014). Sin embargo, cada vez hay más enfermedades neurodegenerativas, y es importante descifrar los mecanismos moleculares que regulan cada proteína, para tener un mejor conocimiento de su biología y sus características moleculares. De este modo, en un futuro se podrán identificar marcadores tempranos de la enfermedad o posibles dianas terapéuticas.

Rabfilina3A se ha visto implicada en diversas patologías neurodegenerativas: En la enfermedad de Huntington se ha visto una reducción de las proteínas Rabfilina3A y SNAP25 en el neocórtex de los pacientes afectados por esta enfermedad (Smith et al., 2007); En la enfermedad de Parkinson, el acumulamiento anormal de α -sinucleína observado en los cuerpos de Lewy desplaza la formación del complejo Rab3a-Rph3A, por interacción con Rab3A (Dalfó et al., 2004); En la enfermedad de Alzheimer se ha demostrado una reducción de los niveles de Rabfilina3A con un aumento de la concentración de la proteína β -amiloide (Tan et al., 2014); Se han documentado alteraciones en la unión de los receptores NMDA a PSD95 y Rabfilina3A en ratas parkinsonianas (Stanic et al., 2017); Rabfilina3A también se ha visto implicada en la enfermedad infundíbulo-neurohipofisitis linfocítica, donde esta proteína parece ser un desencadenante patogénico de esta enfermedad autoinmune (Yasuda et al., 2018). Estas investigaciones apoyan el papel de Rabfilina3A en enfermedades neurodegenerativas, pero también se ha visto involucrada en enfermedades renales en humanos y modelos de ratón, estando la expresión de Rabfilina3A alterada (Rastaldi et al., 2003). Recientemente se ha informado de

cómo el silenciamiento de la expresión de Rabfilina3A en los podocitos afecta al sistema cardíaco (Selma-Soriano et al., 2020).

El objetivo de este capítulo fue realizar la misma aproximación que en el capítulo anterior, analizando el interactoma de Rabfilina3A, Tcp1111, Stim1 y SNAP25 con la técnica BioID2 anteriormente validada, pero en este caso bajo un fenotipo neuronal con la meta de comprender mejor el papel de Rabfilina3A y sus proteínas moduladoras en la fisiopatología neuronal. Tomando la línea celular PC12 como modelo fisiológico diferenciada con factor de crecimiento neuronal (NGF) a un modelo neuronal, dado que son células derivadas de un feocromocitoma de la médula adrenal de rata, que se han utilizado para obtener información sobre el tráfico de vesículas y enfermedades del cerebro, aprovechando su fenotipo dual en función de la suplementación con NGF, que produce un fenotipo neuronal (Greene & Tischler, 1976). Igualmente se analizó el mutante de Rabfilina3A incapaz de interactuar con SNAP25 para entender su asociación con SNAP25 en un fenotipo neuronal. El experimento se realizó bajo un fenotipo neuronal porque Rabfilina3A, SNAP25 y Tcp1111 son proteínas altamente expresadas en tejido neuronal (Sjöstedt et al., 2020). Al mismo tiempo, en el fenotipo neuronal, las células expresan proteínas que no se expresan en el fenotipo adrenal, y podrían interactuar con nuestras proteínas de estudio involucradas en las neuronas y el cerebro. De esta manera, se obtuvo una imagen más completa del complejo interactoma de estas proteínas bajo un entorno fisiológico más similar a las neuronas.

Dado que las líneas celulares eran las mismas que en el anterior capítulo no fue necesario volver a validar las proteínas de fusión con BioID2 dado que la única diferencia era añadiendo NGF al cultivo de células PC12 durante tres días para inducir una diferenciación neuronal, donde las células desarrollan neuritas y largos axones. Este capítulo contribuye con una información muy completa sobre el interactoma de Rabfilina3A en un ambiente neuronal, destacando el papel de Tcp1111 y STIM1 en la función del citoesqueleto y el transporte de moléculas y vesículas junto a Rabfilina3A y SNAP25. Estos resultados sugieren

un modelo de trabajo para Rabfilina3A junto con Tcp1111 y STIM1, para trasladar a SNAP25 a la membrana plasmática. Además, se aporta información sobre Tcp1111 que es una proteína prácticamente desconocida, que se expresa de forma ubicua, aunque con una expresión incrementada en cerebro sin que se le asocie función y estructura. Los datos que se han generado muestran que esta proteína interactúa con proteínas del citoesqueleto, tanto con β -actina de los filamentos de actina, como con la tubulina de los microtúbulos y también con proteínas motoras como miosinas, quinesinas y dineínas, siendo probablemente una proteína adaptadora del transporte de vesículas.

V.3. Resultados

V.3.1. Proteínas que interaccionan con BioID2-Rph3A en un fenotipo neuronal

Rabfilina3A es la proteína central de esta tesis doctoral, y en el estudio proteómico anterior de Rabfilina3A *wild-type* realizado bajo un fenotipo adrenal comentado en el epígrafe IV.3.2, las proteínas biotiniladas más enriquecidas fueron STIM1 y Tcp1111. Aquí, se realizó el mismo ensayo, pero con células PC12 en un fenotipo neuronal, este ensayo proteómico de BioID2-Rph3A produjo 142 proteínas significativamente enriquecidas, donde STIM1 y Tcp1111 también aparecen como candidatos de interacción (Figura. V.1). Este resultado valida que estas dos proteínas interaccionan con Rabfilina3A de forma muy significativa. Además, otras proteínas también aparecen biotiniladas de forma significativa como Zwint, Hap1, Mest, Prkacb, Strn3 entre otras, muy similar al fenotipo adrenal.

Han aparecido nuevas proteínas de posible interacción con Rabfilina3A en el fenotipo neuronal, donde la proteína más enriquecida es Rabfilina3A validando que el ensayo es correcto, y la segunda es el homólogo de Ist1 (Ist1), implicado en la maquinaria ESCRT (complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte) y requerido para la abscisión eficiente durante la citocinesis y que regula la tubulación endosomal temprana junto con el complejo ESCRT-III (Bajorek et al., 2009).

Otras proteínas altamente enriquecidas en biotina son las siguientes: la tirosina-proteína fosfatasa no receptora tipo 23 (Ptpn23) es una fosfatasa que desempeña un papel en la clasificación de cargas ubiquitinadas endocíticas de cuerpos multivesiculares y desempeña un papel en la ciliogénesis (Doyotte et al., 2008). Nedd8 es una pequeña proteína similar a la ubiquitina de 9 kDa, que lleva a cabo un papel importante en el ciclo celular, se ha demostrado que Rabfilina3A está neddilada (Nakashima et al., 2018). Curiosamente, la proteína similar a la sinaptotagmina 4 (Syt14) que tiene dos dominios C2 como Rabfilina3A y modula la exocitosis de los gránulos *dense-core* e interacciona con vesículas que contienen fosfolípidos cargados negativamente de forma independiente de Ca^{2+} también aparece como proteína biotinilada (Vogel et al., 2015). La

Rph3A vs Ctrl Neuronal

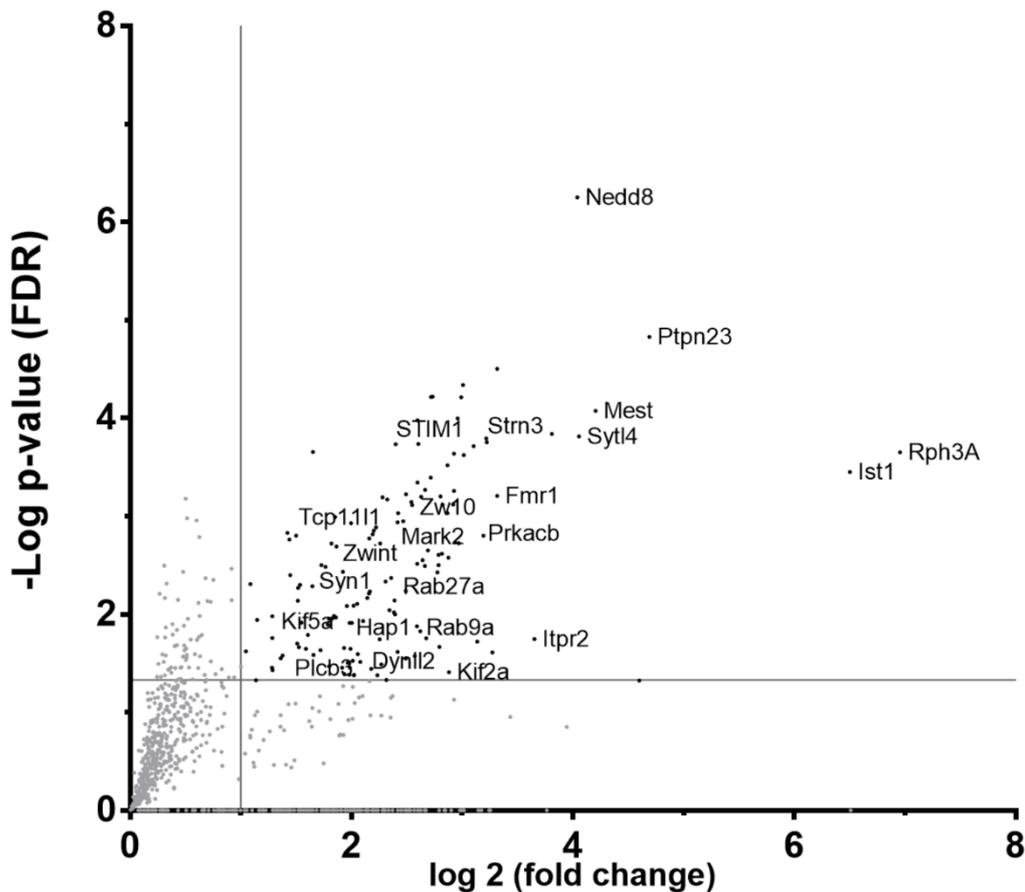


Figura. V.1. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con Rph3A en el fenotipo neuronal. El diagrama ilustra la significancia de la prueba estadística t-test cómo $-\text{Log}_{10}$ del valor p frente a la intensidad LFQ (Log_2) como valor de enriquecimiento BioID2-Rph3A al comparar con los dos controles BioID2 y BioID2-Rph3A sin biotina. Datos obtenidos de cuatro réplicas diferentes por condición. Las proteínas significativamente positivas se muestran como puntos negros con un valor de p-value $< 0,05$ y un valor de enriquecimiento logarítmico superior a 1.

estriatina-3 (Strn3) es una proteína que se une a la calmodulina de forma dependiente del Ca^{2+} , y puede funcionar como proteína de andamiaje o de señalización, (Soni et al., 2018), y apareció previamente en el fenotipo adrenal de BioID2-Rph3AWT.

En general, las proteínas más significativamente biotiniladas están relacionadas con la función canónica de Rabfilina3A, pero hay otras proteínas implicadas en la ciliogénesis y la citocinesis junto a Ist1, como Zw10 y Zwint que son dos proteínas que interactúan entre sí y que son necesarias para la formación del cinetocoro (Lin et al., 2006). Zw10 es un componente esencial del punto de control mitótico y también participa en la regulación del tráfico de membranas entre el Golgi y el RE (Hirose et al., 2004). Se ha propuesto que su función depende de su asociación con el complejo NRZ, que se cree que desempeña un papel en el ensamblaje de SNAREs en el RE (Xu et al., 2018). Zwint forma parte del complejo MIS12, necesario para la formación del cinetocoro y el control del huso. Es necesario para dirigir ZW10 al cinetocoro en la prometáfase (Obuse et al., 2004). Además, hay investigaciones anteriores que describen la interacción entre Zwint y SNAP25 (Lee et al., 2002), y también apareció como proteína biotinilada en el fenotipo adrenal de Rabfilina3A. El receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 2 (Itpr2), un receptor de IP_3 es otra proteína significativa (Ziegler et al., 2021) y además el IP_3 es producido por otra proteína significativa, la fosfatidilinositol 4,5, -bisfosfato fosfodiesterasa $\beta 3$ (Plcb3), que produce DAG e IP_3 (Lyon & Tesmer, 2013).

El regulador funcional sináptico FMR1 (Fmr1) es una proteína biotinilada, que actúa como proteína multifuncional de unión a ARN asociado a polirribosomas y desempeña un papel central en el desarrollo neuronal y la plasticidad sináptica, además, hay más proteínas significativamente enriquecidas implicadas en la regulación del ARNm (Y. Zhang et al., 1995).

Se han detectado dos proteínas quinasas que aparecen como proteínas significativamente reguladas. La serina/treonina-proteína quinasa MARK2 (Mark2) que también aparece en el análisis proteómico de Tcp111-Adrenal. Esta quinasa regula la axogénesis y está implicada en la regulación de la migración

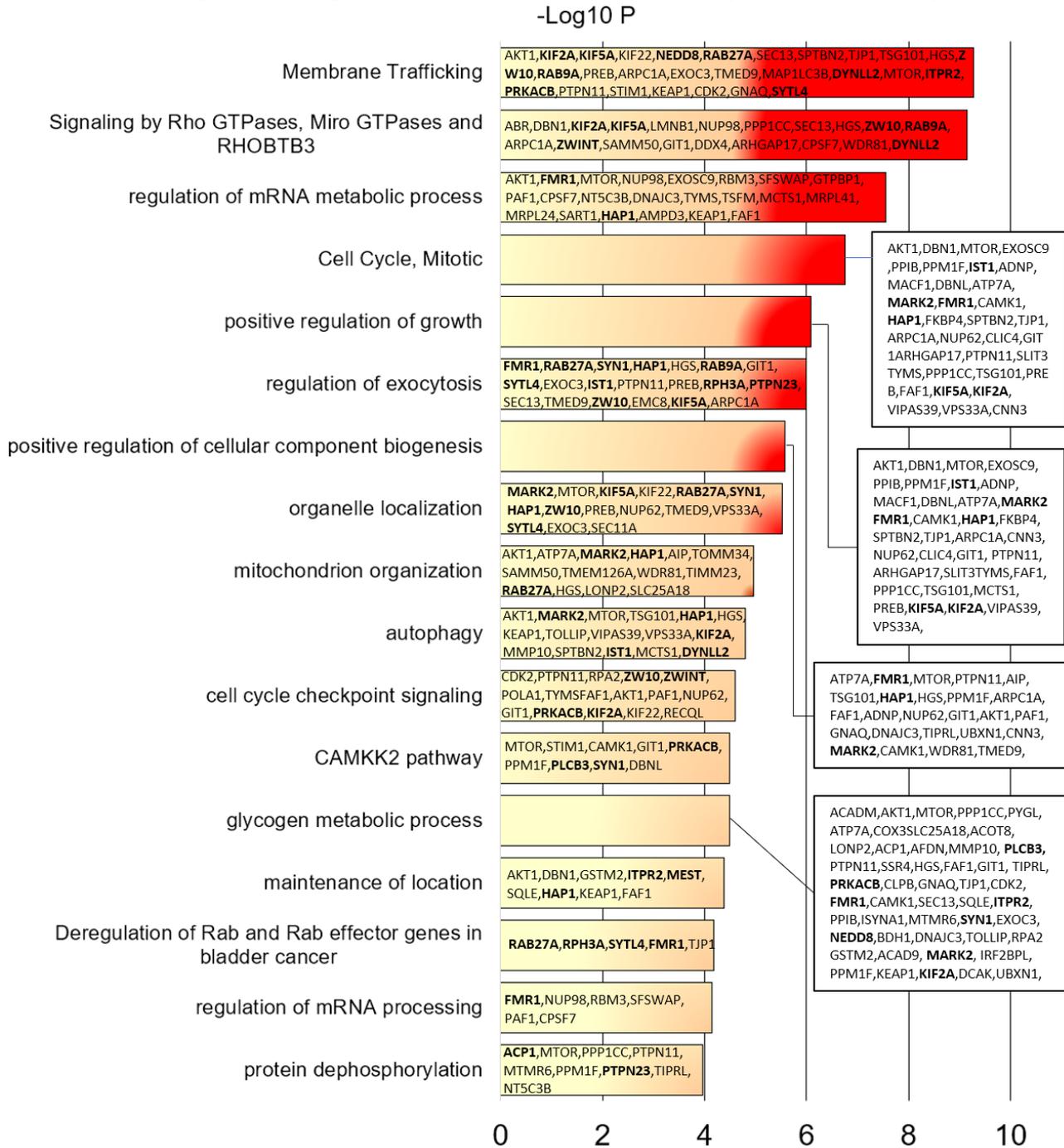


Figura. V.2. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-Rph3A en fenotipo neuronal. Se muestra el análisis de los términos de GO de las 142 proteínas significativamente enriquecidas en BioID2-Rph3A utilizando metascap. La importancia del enriquecimiento de un término particular se muestra con el log₁₀ del valor p-value y dentro de cada barra se muestran los genes enriquecidos de ese término.

neuronal a través de su doble actividad en la regulación de la polaridad celular y la dinámica de los microtúbulos (Biernat et al., 2002). La otra quinasa es la subunidad catalítica β de la proteína quinasa dependiente de AMPc (Prkacb) que regula una gran cantidad de procesos celulares y es activada por la unión de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Rabfilina3A es fosforilada por esta quinasa PKA (Brozzi, Lajus, et al., 2012).

El análisis de términos GO con las 142 proteínas significativas de Rabfilina3A en el fenotipo neuronal muestra términos con un valor p muy alto (Figura. V.2), lo que sugiere un fuerte enriquecimiento para estos términos. Los términos principales son el tráfico de membranas (valor p = $-\log 9,27$) y la señalización por GTPasas (valor p = $-\log 9,15$), dos términos que están relacionados con la función canónica de Rabfilina3A. Sin embargo, hay otros términos principales como la regulación del proceso metabólico del ARNm (valor p $-\log 7,55$) o el ciclo celular (valor p = $-\log 6,76$) que no están incluidos en las funciones canónicas de Rabfilina3A. Este resultado sugiere que Rabfilina3A podría estar implicada en otros procesos relacionados con la división celular, en particular a través de la citocinesis, como muestra su interacción con Zwint y Zw10. Además, hay otros términos que también apoyan que Rabfilina3A puede estar implicada en la citocinesis, como la regulación positiva del crecimiento (valor p = $-\log 6,07$), la señalización del punto de control del ciclo celular (valor p = $-\log 4,60$) y la regulación del procesamiento del ARNm (valor p = $-\log 4,15$). Otros términos apoyan la función canónica de Rabfilina3A: regulación de la exocitosis (valor p = $-\log 5,99$), localización de orgánulos (valor p = $-\log 5,52$), mantenimiento de la localización (valor p = $-\log 4,37$) y desregulación de los genes Rab y efectores Rab en el cáncer de vejiga (valor p = $-\log 4,17$).

V.3.2. Proteínas que interaccionan con el mutante BiOLD2-Rph3A-M3 en un fenotipo neuronal

El análisis proteómico BiOLD2 del mutante de Rabfilina3A en la interacción con SNAP25 bajo un fenotipo neuronal muestra 65 proteínas significativamente enriquecidas, lo que supone una reducción considerable del número de

proteínas significativas en comparación con Rabfilina3A *wild-type* (142 proteínas).

Realizando una comparación del número de proteínas que se comparten con Rabfilina3A *wild-type*, se observa que el número de proteínas significativas compartidas es más de la mitad (Figura. V.3). El 52% de las proteínas más significativamente enriquecidas (34) se comparten con Rabfilina3A *wild-type*, sugiriendo que la mutación afecta sólo a parte de las interacciones más relevantes. Las proteínas compartidas más relevantes son Ist1, Ptpn23, Nedd8, Atp7a, Sytl4, Rab27a, Itpr2, Mark2, Zw10, Tcpl111 y Slc25a18, y esto indica que su interacción con Rabfilina3A es independiente del dominio C2B. Sorprendentemente, los resultados obtenidos con la variante que contiene la mutación en el dominio C2B de Rabfilina3A indican que este es necesario para la interacción con STIM1, SNAP25, Fmr1, Zwint, Syn1, Hap1, Strn3, Mest entre otras.

No obstante, hay algunas proteínas significativas que sólo están presentes en Rabfilina3A mutante (Figura. V.3). Algunas de ellas presentan un alto valor p (Figura. V.4), como la Corticoliberina (Crh) que es una hormona

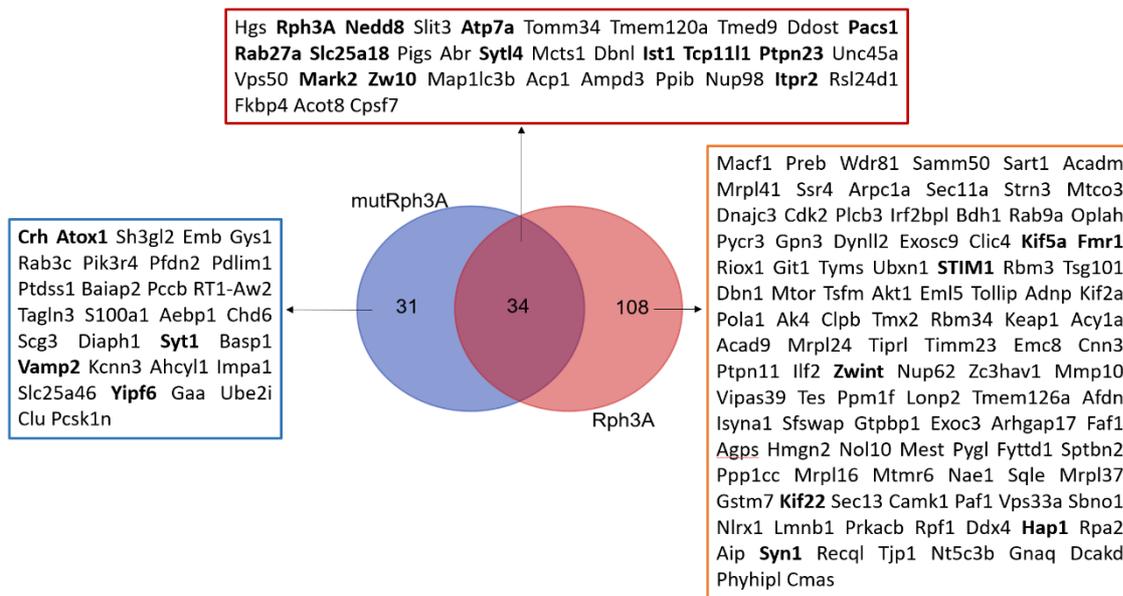


Figura. V.3. Diagrama de Venn que muestra las proteínas compartidas entre Rph3A-M3 y Rph3A *wild-type* en el fenotipo neuronal.

implicada en la regulación de la liberación de corticotropina de la glándula pituitaria (On et al., 2019). Hay varios estudios que relacionan la neurohipofisis con Rabfilina3A (Yasuda et al., 2018). Además, la corticoliberina también podría ser una proteína implicada en la enfermedad. Otra proteína es la proteína transportadora de cobre ATOX1 (Atox1) que se une y entrega cobre citosólico a las proteínas ATPasas de cobre (Muller & Klomp, 2009). Curiosamente, VAMP2 y Sinaptotagmina1, proteínas que interactúan con SNAP25, aparecen como proteínas significativamente enriquecidas, aunque tienen un valor p y un valor de enriquecimiento bajos (Figura. V.4), no obstante, es interesante resaltar que no aparecen en la versión silvestre.

Hay 108 proteínas que no aparecen en el mutante y sí en el análisis de Rabfilina3A *wild-type*. Las más relevantes son Zwint (proteína de interacción con

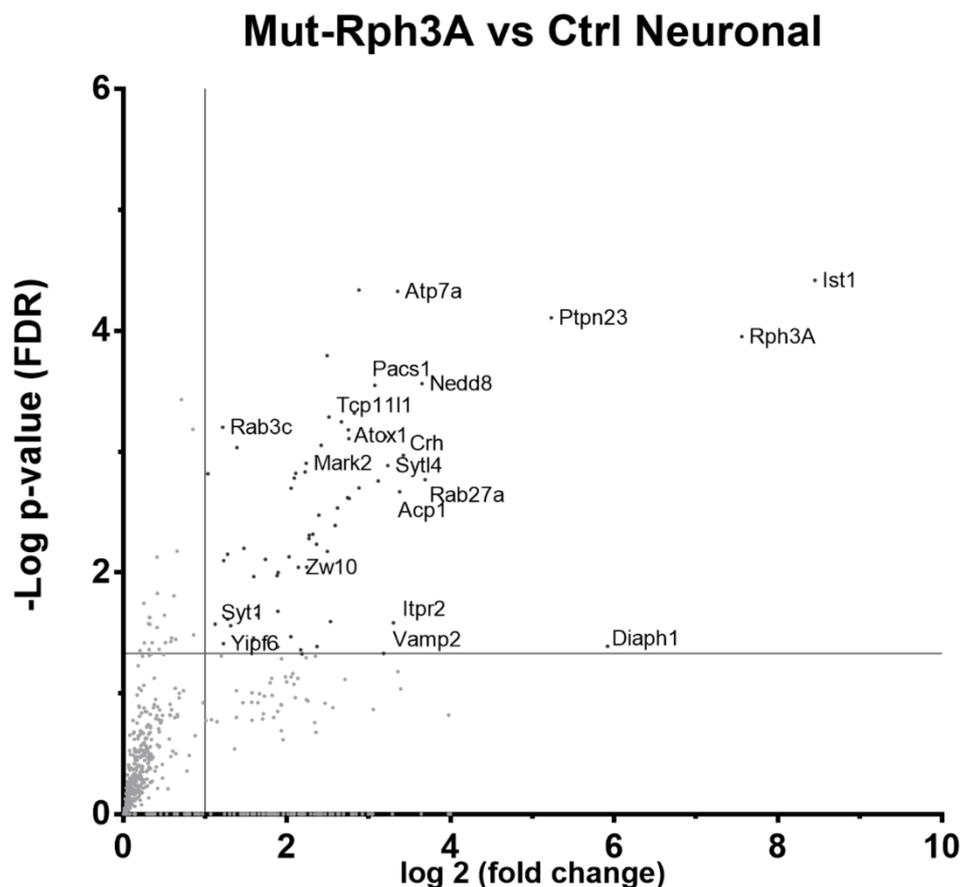


Figura. V.4. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con Rph3A-M3 en el fenotipo neuronal. El diagrama ilustra la significancia de la prueba estadística *t*-test como $-\text{Log}_{10}$ del valor *p* frente a la intensidad LFQ (Log_2) como valor de enriquecimiento, de las distintas proteínas de BiolD2-Rph3A-M3 al comparar con los dos controles BiolD2 y BiolD2-Rph3A sin biotina. Datos obtenidos de cuatro réplicas diferentes. Las proteínas significativamente positivas se muestran como puntos negros con un valor de *p*-value $< 0,05$ y un valor de enriquecimiento logarítmico superior a 1.

SNAP25), STIM1, Fmr1, Hap1, Mest, Strn3 y quinesinas. Estas proteínas aparecen en el análisis de Rabfilina3A *wild-type* con fenotipo tanto adrenal como neuronal, indicando que la mutación está afectando a algunas de las interacciones de Rabfilina3A y no a otras como ocurre con Rab27a y Rab3c; siendo estos últimos resultados una doble confirmación dado que estas pequeñas GTPasas interactúan con Rabfilina3A a través de su dominio amino-terminal (Fukuda et al., 2004; Shirataki et al., 1993)

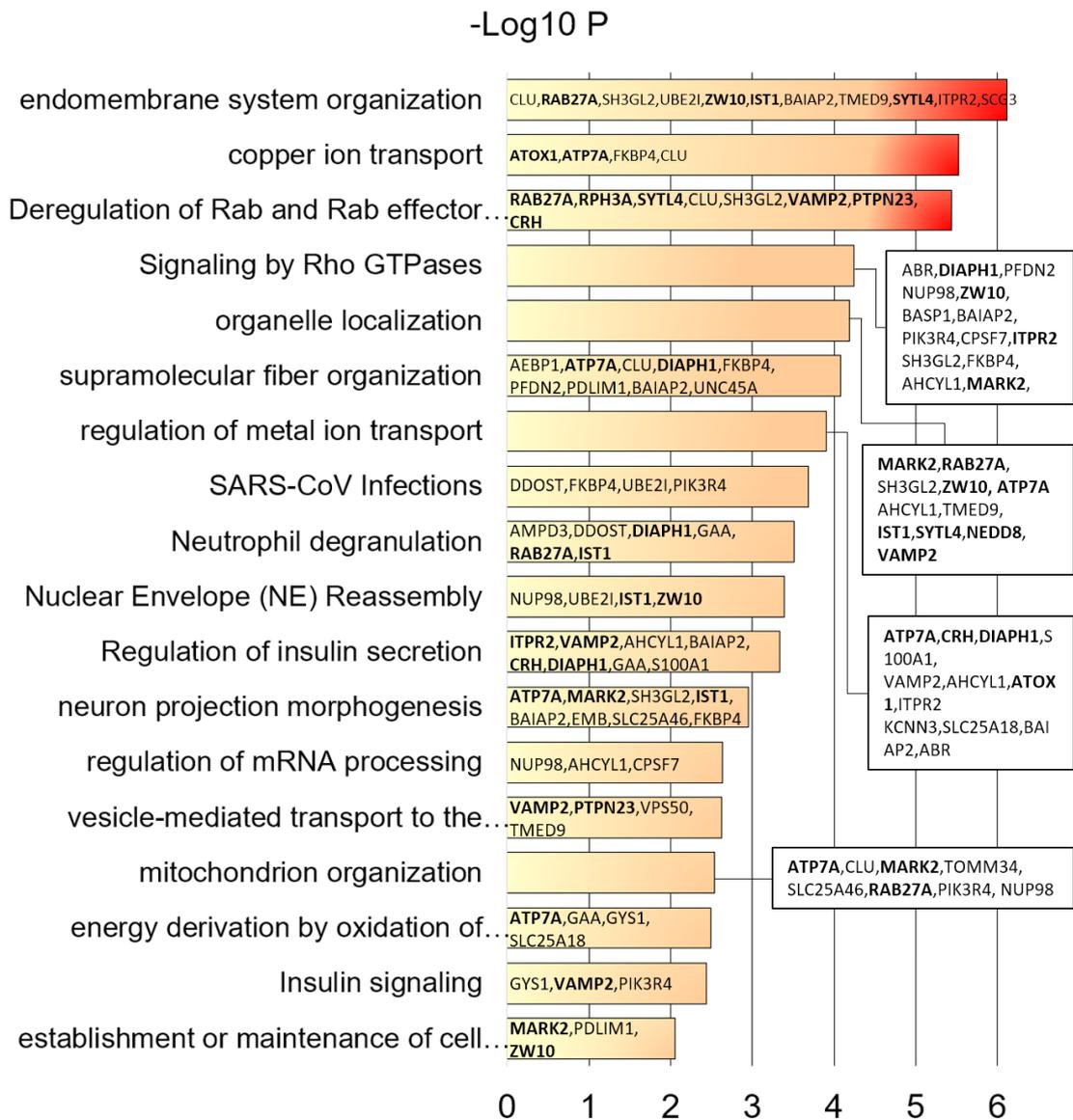


Figura. V.5. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-Rph3A-M3 en fenotipo neuronal. Se muestra el análisis de los términos de GO de las 65 proteínas significativamente enriquecidas en BioID2-Rph3A-M3 utilizando metaspice. La importancia del enriquecimiento de un término particular se muestra con el log₁₀ del valor p-value y dentro de cada barra se muestran los genes enriquecidos de ese término.

El análisis de términos GO de las 65 proteínas significativas del análisis de Rabfilina3A mutante en fenotipo neuronal constatan que la función canónica de Rabfilina3A mutante no está completamente abolida, dado que los términos más enriquecidos son la organización del sistema de endomembranas (valor $p = -\log 6,11$), y otros términos relacionados con la función canónica de Rabfilina3A, aunque con un valor p menor que en Rabfilina3A *wild-type*. Curiosamente, el transporte de iones de cobre (valor $p = -\log 5,52$) aparece como el segundo término más importante. La regulación del transporte de iones metálicos (valor $p = -\log 3,90$) apoya esta función que es completamente desconocida para Rabfilina3A (Figura. V.5).

V.3.3. Proteínas que interaccionan con BiOLD2-SNAP25 en un fenotipo neuronal

El análisis proteómico de BiOLD2-SNAP25 en fenotipo neuronal produjo 110 proteínas significativamente biotiniladas (Figura. V.6). Extrañamente, ninguna proteína de la familia de Sintaxina aparece como ocurre en el análisis de SNAP25 en el fenotipo adrenal. Sin embargo, VAMP2 si aparece al igual que otras proteínas como Ptpn23, Rab27, Rab3b, Exoc2, Exoc3, Zw10 y Sytl4 que son proteínas descritas que interaccionan con SNAP25.

SNAP25 es una proteína significativamente enriquecida, pero no es la más enriquecida. La proteína más enriquecida es Ist1, como se observó en el análisis de Rabfilina3A en el fenotipo neuronal. Otras proteínas significativas están relacionadas con los cationes: la proteína transportadora mitocondrial de unión a Ca^{2+} S $CaMC$ -2 (Slc25a25) que es un transportador de solutos mitocondrial dependiente de Ca^{2+} que transporta metabolitos, nucleótidos y cofactores a través de la membrana mitocondrial (Hofherr et al., 2018); la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina tipo IV (Camk4) es una quinasa que opera en la cascada de señalización CaMKK-CaMK4 activada por Ca^{2+} ; La ATPasa 1 transportadora de cobre (ATP7A) es una bomba de iones de cobre (Cu^+) impulsada por ATP que desempeña un importante papel en la

homeostasis intracelular de los iones de cobre (Sabbir, 2020); La fosfatidilinositol 4-quinasa alfa (Pi4ka) actúa sobre el fosfatidilinositol (PtdIns) en el primer paso comprometido en la producción del segundo mensajero IP₃ (Burke, 2018). Además, Ptpn23, Sytl4, Syn1 y VAMP2 también tienen una alta puntuación y son proteínas significativamente enriquecidas, como se ve también en el análisis de Rabfilina3A.

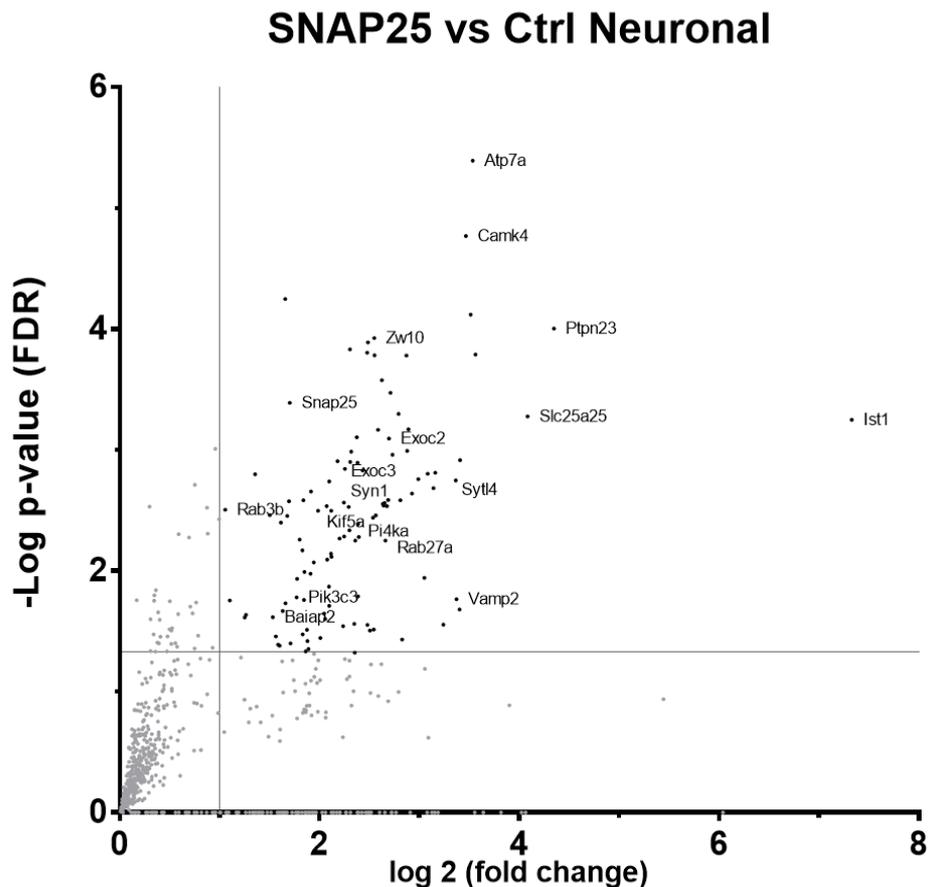


Figura. V.6. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con SNAP25 en el fenotipo neuronal. El diagrama ilustra la significancia de la prueba estadística t-test como $-\text{Log}_{10}$ del valor p frente a la intensidad LFQ (Log_2) como valor de enriquecimiento, de las distintas proteínas de BioID2-SNAP25 al comparar con los dos controles BioID2 y BioID2-Rph3A sin biotina. Datos obtenidos de cuatro réplicas diferentes por condición. Las 110 proteínas significativamente positivas se muestran como puntos negros con un valor de $p\text{-value} < 0,05$ y un valor de enriquecimiento logarítmico superior a 1.

El análisis de los términos GO indica que los cuatro términos principales son: la localización de proteínas en la sinapsis (valor $p = -\log 6,67$), la organización de las mitocondrias (valor $p = -\log 6,12$), la localización de orgánulos (valor $p = -\log 5,94$) y la regulación del desarrollo de la proyección de las neuronas (valor $p = -\log 5,84$). Estas funciones están relacionadas con el correcto desarrollo y mantenimiento de las neuronas. Otras funciones están

relacionadas con el tráfico de membranas como la organización del sistema de endomembranas (valor $p = -\log 5,07$) y el transporte mediado por vesículas hacia la membrana plasmática (valor $p = -\log 4,75$) (Figura. V.7). Todas las funciones están relacionadas con la función canónica de SNAP25.

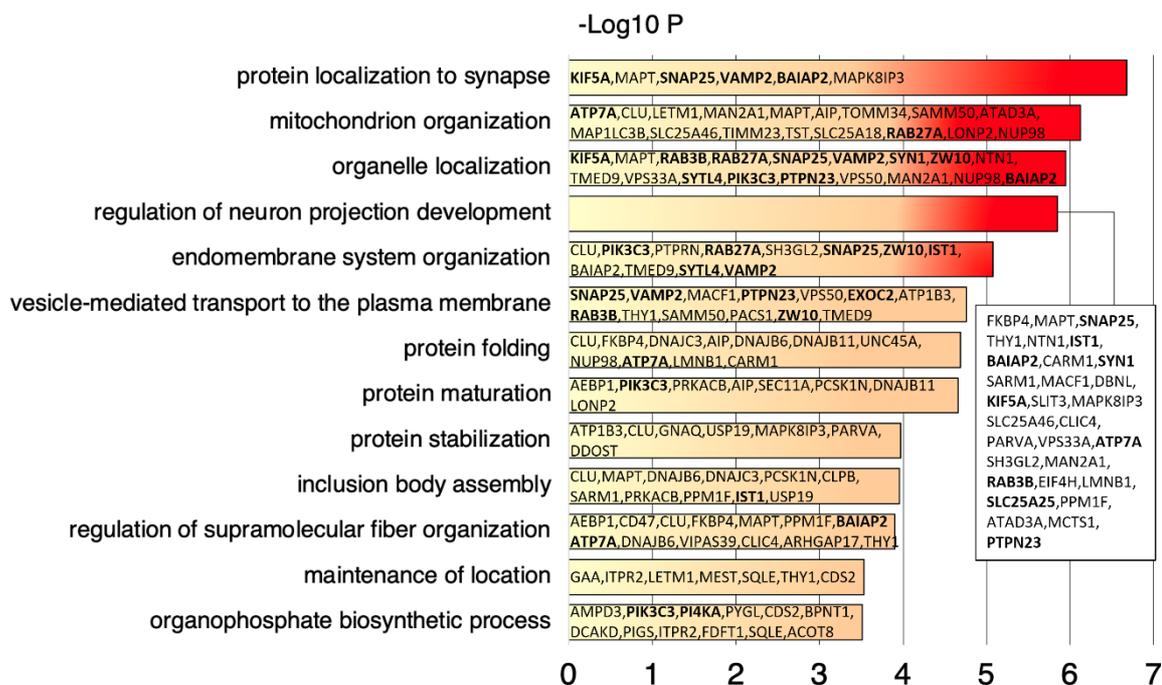


Figura. V.7. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-SNAP25 en fenotipo neuronal. Se muestra el análisis de los términos de GO de las 110 proteínas significativamente enriquecidas en BioID2-SNAP25 utilizando metascape. La importancia del enriquecimiento de un término particular se muestra con el \log_{10} del valor p -value y dentro de cada barra se muestran los genes enriquecidos de ese término.

V.3.4. Proteínas que interactúan con BioID2-STIM1 en un fenotipo neuronal

STIM1 es una de las nuevas proteínas que interactúan con Rabfilina3A confirmado por los dos análisis proteómicos de BioID2-Rph3A *wild-type* tanto en el fenotipo neuronal como adrenal realizados en esta tesis doctoral.

El análisis proteómico de BioID2-STIM1 en fenotipo neuronal proporciona 45 proteínas significativas que podrían estar interactuando con STIM1 (Figura. V.8). Las proteínas más significativamente enriquecidas son Ist1, proteína que aparece en los análisis de SNAP25 y Rabfilina3A, apoyando que esta proteína es importante en el interactoma de Rabfilina3A sólo en el fenotipo neuronal.

Además, hay otras proteínas significativamente enriquecidas que se comparten con los análisis neuronales anteriores, como Crh, Vamp2, Sytl4 o ATP7a.

Las proteínas significativamente biotiniladas nuevas y que no se comparten son: Neurofibromina 1 (Nf1) que estimula la actividad GTPasa de Ras, esta proteína muestra mayor afinidad por Ras GAP, y puede ser un regulador de la actividad de Ras (Rasmussen & Friedman, 2000); la estromelina-2 (Mmp10), una proteína que puede degradar la fibronectina, gelatina y activa la procollagenasa (McMahan et al., 2016); ProSAAS (Pcsk1n), que puede funcionar como antiagregante de la proteína β -amiloide (Hoshino et al., 2014); La proteína del canal intracelular de cloruro (Clic4), proteína que puede insertarse en la membrana y regular el endosoma tardío (Hsu et al., 2019).

STIM1 vs Ctrl Neuronal

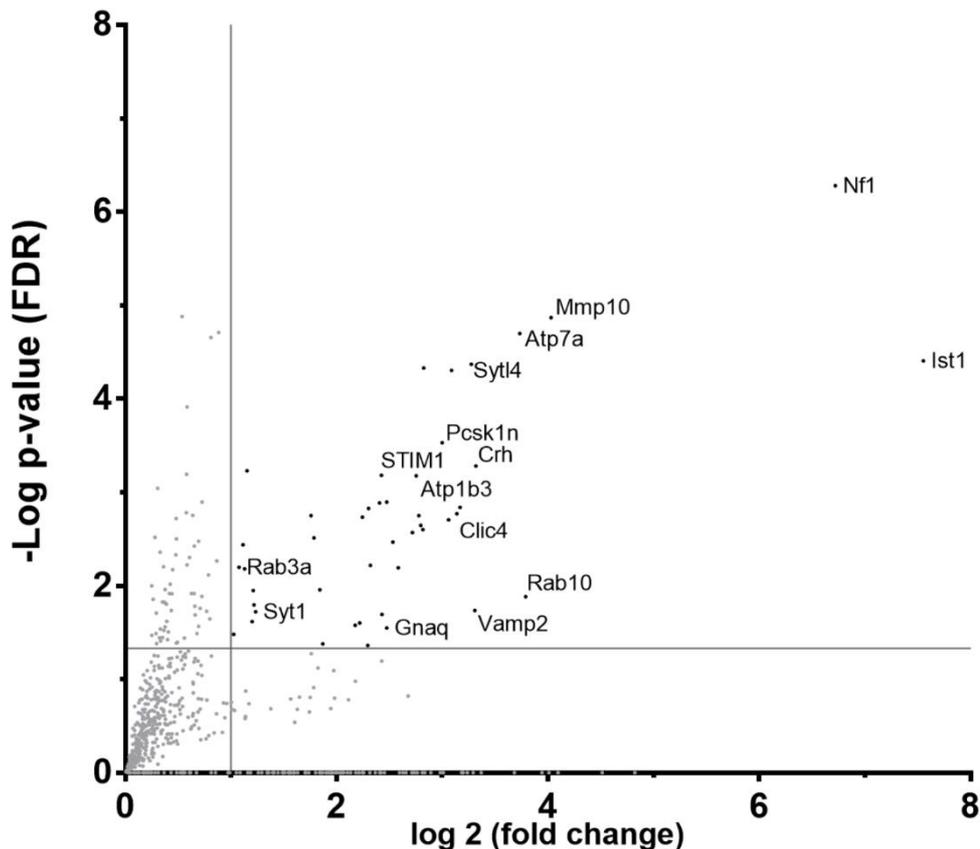


Figura. V.8. Diagrama de volcán de las proteínas que interaccionan con STIM1 en el fenotipo neuronal. El diagrama ilustra la significancia de la prueba estadística *t*-test como $-\text{Log}_{10}$ del valor *p* frente a la intensidad LFQ (Log_2) como valor de enriquecimiento, de las distintas proteínas de BioID2-STIM1 al comparar con los dos controles BioID2 y BioID2-Rph3A sin biotina. Datos obtenidos de cuatro réplicas diferentes por condición. Las 45 proteínas significativamente positivas se muestran como puntos negros con un valor de *p*-value $< 0,05$ y un valor de enriquecimiento logarítmico superior a 1.

Como se esperaba, STIM1 es también una proteína significativamente enriquecida. Aunque no es la más enriquecida, es la misma situación que en el fenotipo adrenal. Sin embargo, hay una proteína significativa que se describe como interactora de STIM1, que es ATP1b3, que también se observó en el fenotipo adrenal. Hay proteínas significativas, pero con un valor de enriquecimiento más bajo como la subunidad α de la proteína de unión a nucleótidos de guanina G(q) (Gnaq) que está implicada en varios sistemas de señalización transmembrana (Sánchez-Fernández et al., 2014); la Sinaptotagmina1 y Rab3a.

El análisis de los términos GO de las 45 proteínas significativamente biotiniladas de STIM1 muestra tres términos bastante enriquecidos: regulación del transporte de iones (valor $p = -\log 5,88$), transporte de iones de cobre (valor $p = -\log 5,76$) y desarrollo cerebral (valor $p = -\log 5,60$) (Figura. V.9). La primera función está relacionada directamente con la función canónica de STIM1, que está implicada en la regulación de Ca^{2+} . Sin embargo, estos resultados sugieren

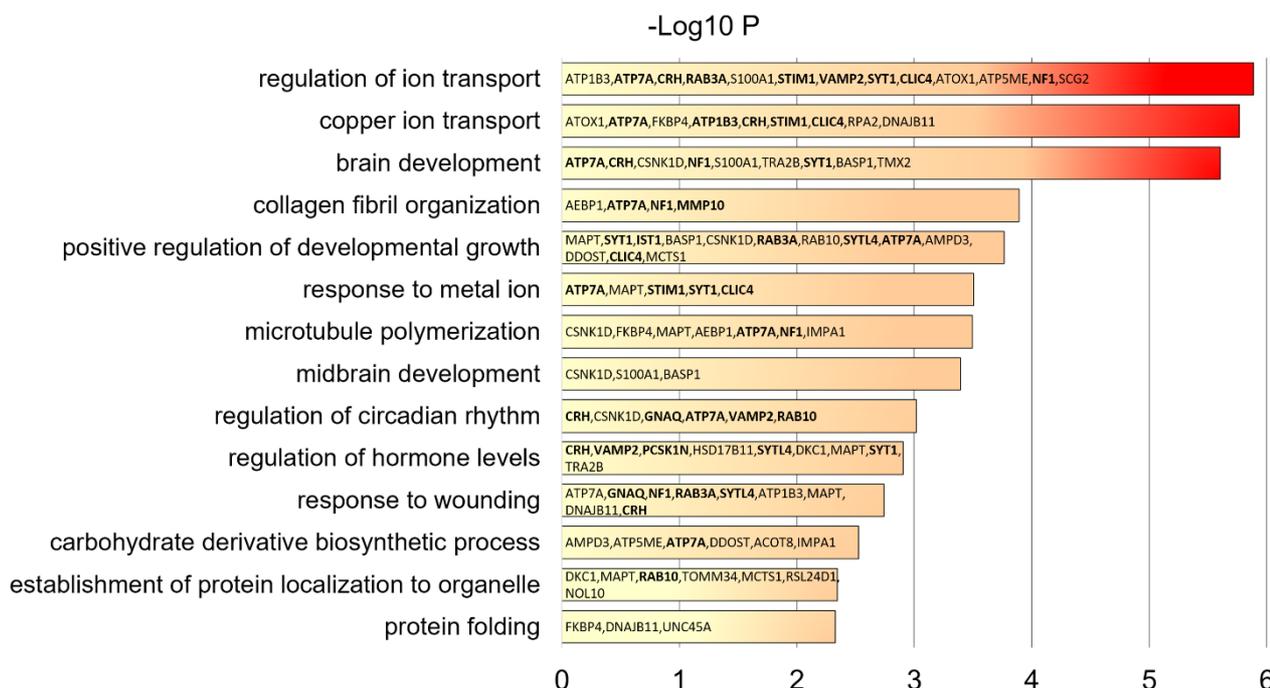


Figura. V.9. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BiOD2-STIM1 en fenotipo neuronal. Se muestra el análisis de los términos de GO de las 45 proteínas significativamente enriquecidas en BiOD2-STIM1 utilizando metascap. La importancia del enriquecimiento de un término particular se muestra con el \log_{10} del valor p -value y dentro de cada barra se muestran los genes enriquecidos de ese término.

que STIM1 podría estar regulando otros tipos de iones como el cobre e incluso el desarrollo del cerebro (Figura. V.9).

V.3.5. Proteínas que interactúan con BioID2-Tcp1111 en un fenotipo neuronal

El análisis de BioID2-Tcp1111 en el fenotipo neuronal arrojó 92 proteínas significativamente enriquecidas. La proteína más enriquecida es Tcp1111, lo que valida que el experimento funcionó correctamente (Figura. V.10). Las proteínas Ist1, Mmp10, Ptpn23 y Styl4 son compartidas con los experimentos neuronales anteriores, lo que refuerza la idea de que estas proteínas son importantes para el interactoma circundante a Rabfilina3A.

Los principales proteínas que han resultado significativas para interactuar con Tcp1111 son proteínas relacionadas con el citoesqueleto como:

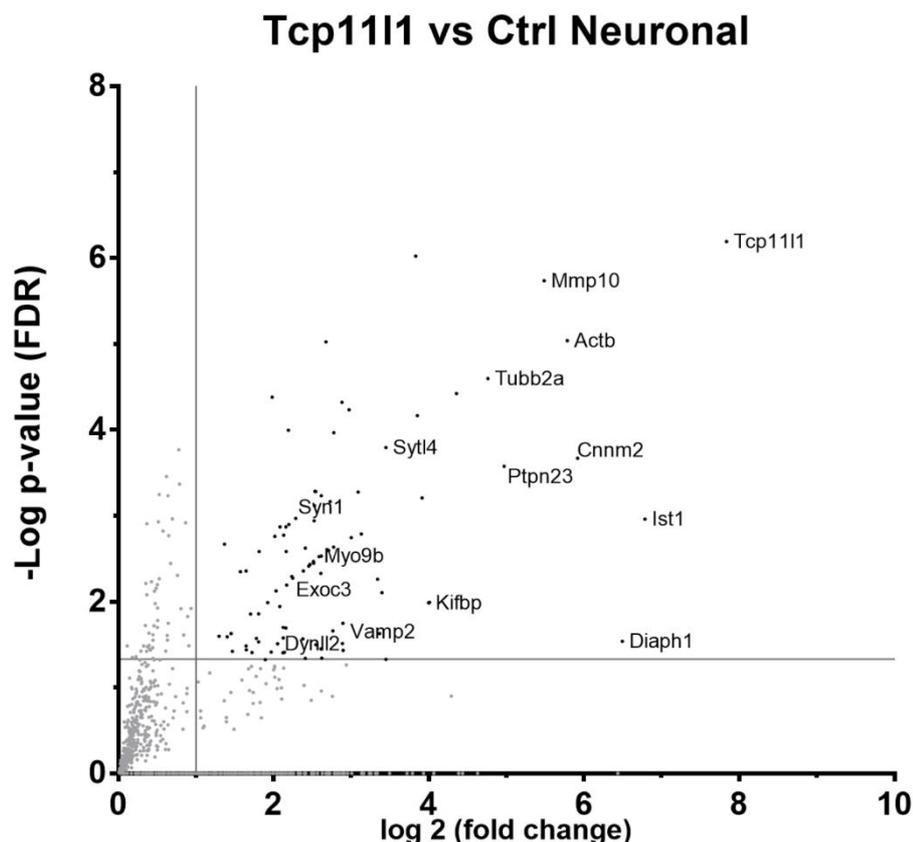


Figura. V.10. Diagrama de volcán de las proteínas que interactúan con Tcp1111 en el fenotipo neuronal. El diagrama ilustra la significancia de la prueba estadística t-test como $-\text{Log}_{10}$ del valor p frente a la intensidad LFQ (Log_2) como valor de enriquecimiento, de las distintas proteínas de BioID2-Tcp1111 al comparar con los dos controles BioID2 y BioID2-Rph3A sin biotina. Datos obtenidos de cuatro réplicas diferentes por condición. Las 92 proteínas significativamente positivas se muestran como puntos negros con un valor de p-value $< 0,05$ y un valor de enriquecimiento logarítmico superior a 1.

la β -actina (Actb) es una proteína muy conservada que polimeriza para producir filamentos que forman redes reticuladas en el citoplasma de las células (Gunning et al., 2015); la proteína diáfana homóloga 1 (Diaph1) es un factor de nucleación y elongación de actina necesario para el ensamblaje de estructuras de F-actina, como los filamentos de actina (Zaoui et al., 2010); Tubb2a, llamada cadena de tubulina β 2A, es el principal constituyente de los microtúbulos (Gudimchuk & McIntosh, 2021); la proteína de unión a Kif (Kifbp), es también una proteína significativa en los análisis de SNAP25, STIM1 y Tcpl111 en fenotipo adrenal, y es necesaria para la organización de los microtúbulos axonales.

Además, hay algunas proteínas significativas implicadas en el movimiento dentro de la célula, especialmente relacionadas con las vesículas, como la miosina-IXb no convencional (Myo9b) que se une a la actina con gran afinidad tanto en ausencia como en presencia de ATP y cuya actividad es inhibida por los iones de Ca^{2+} (Hanley et al., 2020). La cadena ligera 2 de la dineína (Dylnl2) actúa como uno de los diversos componentes accesorios no catalíticos del complejo citoplasmático de la dineína 1, y participan en la unión de la dineína a

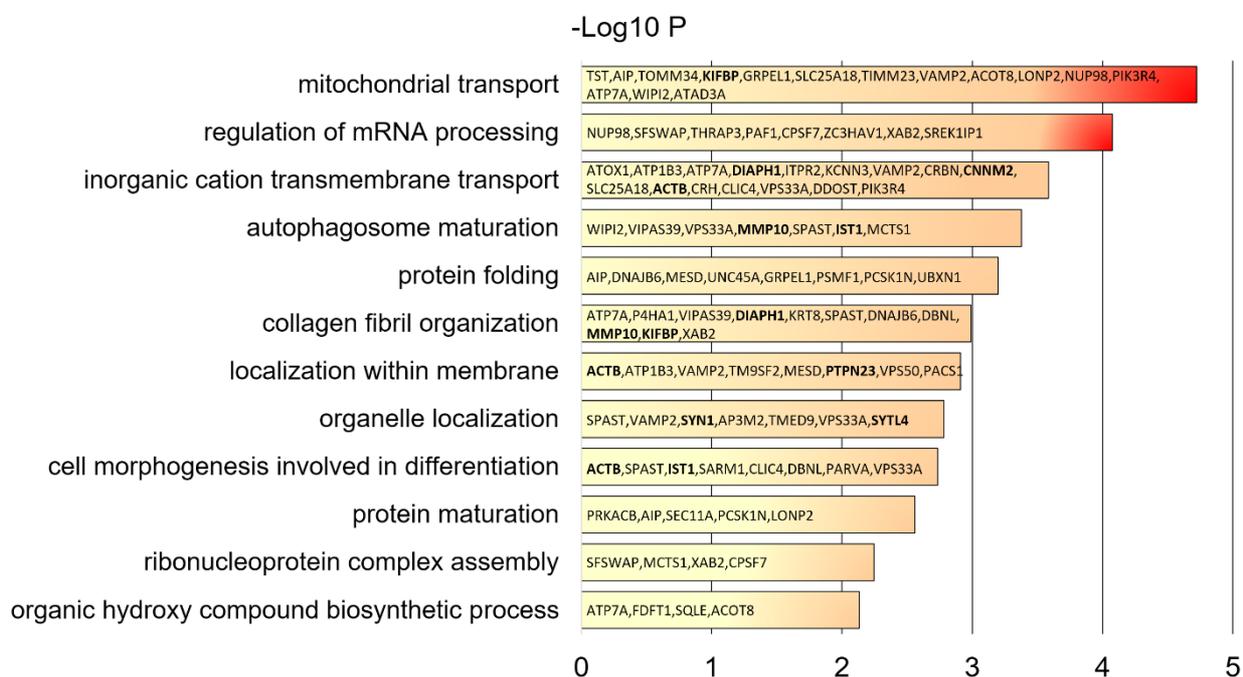


Figura. V.11. Gráfico de barras del análisis de ontología génica de las proteínas biotiniladas por BioID2-Tcp1111 en fenotipo neuronal. Se muestra el análisis de los términos de GO de las 92 proteínas significativamente enriquecidas en BioID2-Tcp1111 utilizando metascap. La importancia del enriquecimiento de un término particular se muestra con el log₁₀ del valor p-value y dentro de cada barra se muestran los genes enriquecidos de ese término.

las cargas y a las proteínas adaptadoras que regulan la función de la dineína (Rapali et al., 2011). La sinapsina-1 (Syn1) es también una proteína significativa en el análisis de Rabfilina3A en fenotipo neuronal, se trata de una proteína que recubre las vesículas sinápticas, se une al citoesqueleto y se cree que participa en la regulación de la liberación de neurotransmisores (Gerth et al., 2017). El transportador de metales CNNM2 (Cnm2) es una proteína importante no relacionada con las proteínas comentadas anteriormente, y es un transportador de membrana celular que media el transporte de cationes metálicos divalentes (Sponder et al., 2016). En resumen, estas proteínas pueden desempeñar un papel en el cambio o el mantenimiento de la distribución espacial de las estructuras del citoesqueleto o las vesículas con la acción de Tcp1111.

El análisis de los términos GO muestra la misma función principal que en el análisis de Tcp1111 en fenotipo adrenal como el transporte mitocondrial (valor $p = -\log 4,72$), y regulación del procesamiento de ARNm (valor $p = -\log 4,07$). Los otros términos son transporte transmembrana de cationes inorgánicos (valor $p = -\log 3,58$), maduración de autofagosomas (valor $p = -\log 3,37$) (Figura. V.11).

V.3.6. Interacciones mutuas entre Rabfilina3A, SNAP25, STIM1 y Tcp1111 en fenotipo neuronal

El interactoma que rodea a Rabfilina3A, STIM1, SNAP25 y Tcp1111 en el fenotipo neuronal implicó a 231 proteínas en total, incluyendo los cuatro ensayos (Figura. V.12). 13 proteínas se comparten entre todas ellas, siendo Sytl4, Ist1, Acp1, Atp7a y Clic4 las proteínas más significativamente enriquecidas. Atp7a y Clic4 son transportadores de iones en la membrana plasmática, Ist1 y Sytl4 son proteínas vesiculares, y Acp1 es una fosfatasa. 36 proteínas se comparten entre tres análisis diferentes (Figura. V.12). De estas 36, 27 proteínas se comparten entre los análisis SNAP25, Rabfilina3A y Tcp1111. Estas proteínas están implicadas en diversas funciones, pero la mayoría de las proteínas están relacionadas con las vesículas, las proteínas de membrana y el citoesqueleto. Cuando se incluye STIM1 aparecen pocas proteínas compartidas sugiriendo que esta proteína se encuentra más alejada del interactoma de Rabfilina3A. El grupo

de proteínas compartidas entre SNAP25 y Rabfilina3A es muy numeroso y diverso. Por ejemplo, destacan algunas proteínas asociadas a los microtúbulos (Macf1, Map1lc3b, Kif5a), con la mitocondria (Clpb, Samm50, Mrpl41, Tsfm) y otras relacionadas con el metabolismo.

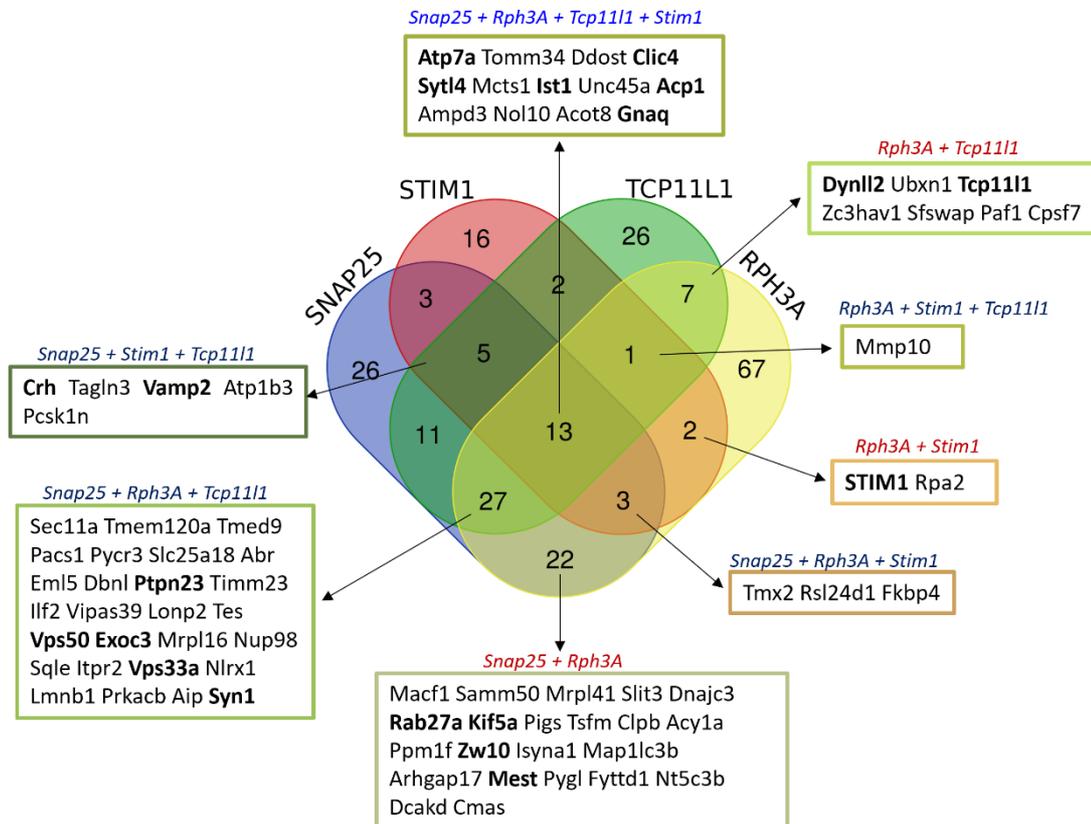


Figura. V.12. Diagrama de Venn de las proteínas compartidas entre Rph3A, SNAP25, STIM1 y Tcp1111.

El análisis de GO de las 96 proteínas compartidas entre al menos dos o más análisis de BiLD2, muestra un gran número de términos debido al gran número de proteínas (Figura. V.13). El término con mayor puntuación es transporte de proteínas intracelulares (valor $p = -\log 6,74$), seguido de procesamiento de insulina (valor $p = -\log 5,8$) y secreción de insulina (valor $p = -\log 5,08$). Hay otros términos implicados en la función neuronal como sistema neuronal (valor $p = -\log 3,46$) y regulación positiva de la axogénesis (valor $p = -\log 3,98$). Destacan también el transporte de cobre (valor $p = -\log 4,77$) y otro relacionado con ello es la homeostasis de iones (valor $p = -\log 3,11$).

Para una mejor comprensión de los términos de GO obtenidos, se representa en la Figura. V.14 un gráfico de redes de los términos con una similitud >0.3 , conectados entre ellos y representados por clústeres de un mismo color los que están relacionados con los términos mostrados en el gráfico de la Figura. V.13. Sólo se muestran los nombres de los 20 con mayor puntuación de la Figura. V.13. Los términos que más podrían estar relacionados con las proteínas de estudio se encuentran interconectados, como sistema neuronal, regulación positiva de la axogénesis, transporte de iones metálicos, secreción de insulina, o ruta de señalización del glucagón.

Al menos 96 proteínas se comparten entre dos o más análisis de BioID2. Estas 96 proteínas compartidas, junto con SNAP25 y Rph3A, se sometieron a

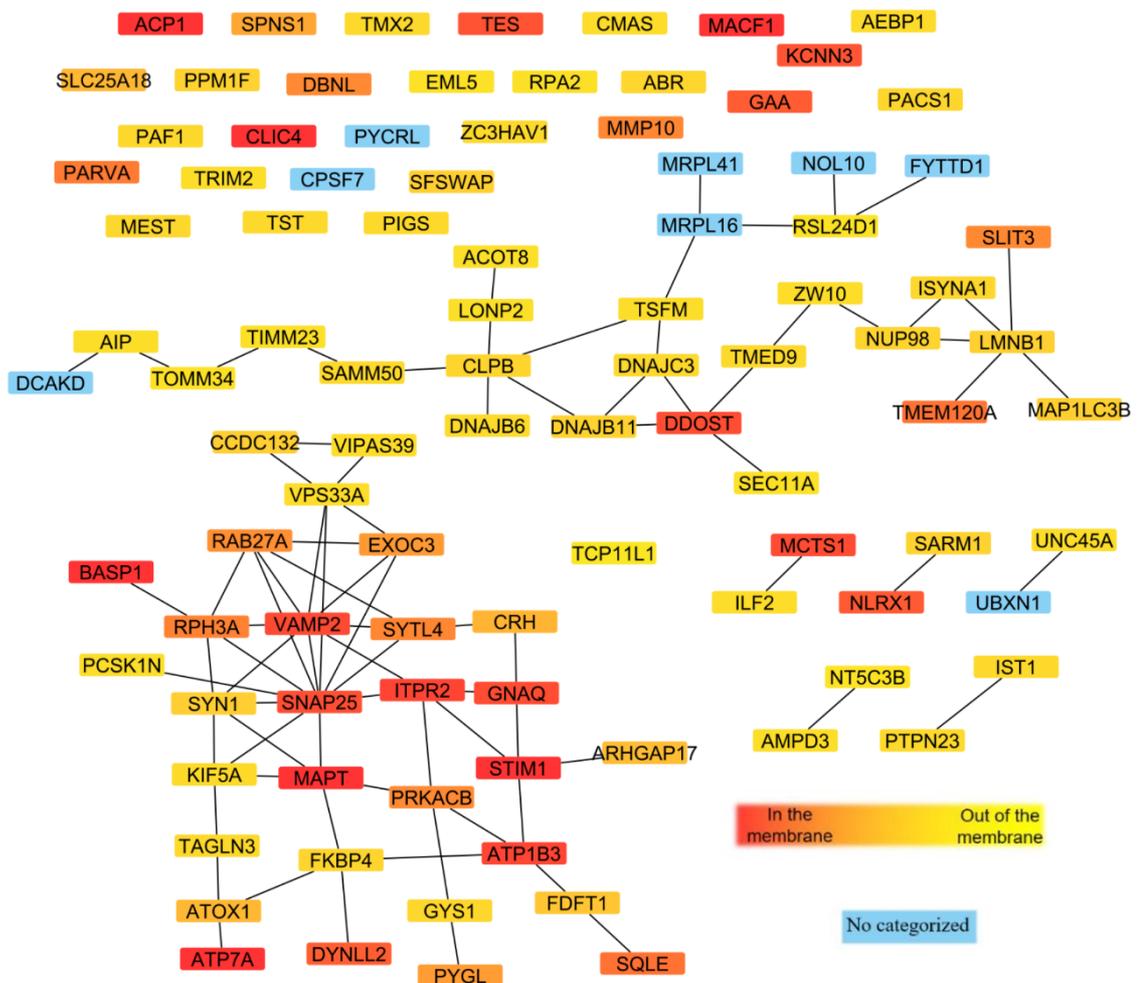


Figura. V.15. Red de interacción proteína-proteína del interactoma de Rph3A, SNAP25, STIM1 y Tpc111 en fenotipo neuronal. Red realizada mediante Cytoscape con la base de datos STRING. Gradiente de color: en rojo las proteínas de membrana y en amarillo las proteínas fuera de la membrana plasmática. En azul la proteína no está categorizada.

un análisis de enriquecimiento funcional de redes de interacción proteína-proteína utilizando STRING, y los resultados muestran dos redes claramente diferenciadas (Figura. V.15). La red inferior de la Figura. V.15 está formada por SNAP25 y VAMP2 como nodo principal rodeado de proteínas de tráfico de membrana, con Rabfilina3A y STIM1. Por otro lado, se encuentra la red superior considerablemente grande, aunque estas proteínas no son tan relacionadas con la función canónica de nuestras proteínas de estudio, se tratan de proteínas de transporte mitocondrial, chaperonas, o factores transcripcionales. Sin embargo, Tcp1111, Ptpn23 e Irf1 que fueron las proteínas más fuertemente enriquecidas se encuentran solas, y estas podrían ser los enlaces entre estas dos grandes redes, aunque habría que realizar más experimentos para confirmarlo.

V.4. Discusión

El ensayo BioID2 permite la obtención del interactoma completo de una determinada proteína de estudio a lo largo de su vida, es decir, descubrir las proteínas con las que interacciona o se encuentran cercanas a ella incluso aunque la interacción sea transitoria (Kim et al., 2016). En este capítulo se realizó el ensayo BioID2 en un fenotipo neuronal de células PC12 para tener una visión más amplia del interactoma de las cuatro proteínas de estudio (Rabfilina3A, SNAP25, STIM1, y Tcp1111), en un ambiente neuronal.

SNAP25 y Rabfilina3A son proteínas eminentemente expresadas en tejido neuronal (Smith et al., 2007). Rabfilina3A se ha visto implicada en el tráfico de membranas en las neuronas (Burns et al., 1998), y SNAP25 en la fusión de vesículas sinápticas cargadas de neurotransmisores (Sutton et al., 1998). STIM1 presenta una expresión ubicua y está ampliamente expresada por todos los tejidos, actuando como sensor de Ca^{2+} del RE y ayudando a su recarga (Wu et al., 2006). Tcp1111 presenta un patrón de expresión ubicuo aunque ligeramente incrementado en tejido neuronal (Karlsson et al., 2021).

En el interactoma de Rabfilina3A en fenotipo neuronal han aparecido STIM1 y Tcp1111 como proteínas candidatas de interacción con Rabfilina3A en

fenotipo neuronal, validando los datos obtenidos en el capítulo anterior donde se realizó la misma aproximación pero con células PC12 en un fenotipo adrenal, y se determinó también a Tcpl1l1, STIM1 como proteínas significativamente enriquecidas junto a Hap1 y Zwint, proteínas que también aparecieron fuertemente biotiniladas en el fenotipo neuronal. Esto apoya que estas Tcpl1l1, STIM1, Hap1, y Zwint son candidatos de interactuar con Rabfilina3A. La proteína Hap1 está expresada fuertemente en tejido cerebral, se vio que interactúa con la versión mutante de Huntingtina de forma incrementada en proporción al número de repeticiones de glutamina presente (Li et al., 1995), a su vez SNAP25 y Rabfilina3A se vieron implicadas también en la Enfermedad de Huntington (Smith et al., 2007).

El interactoma de SNAP25 en el fenotipo neuronal, no aporta ninguna interacción relevante que mencionar, dado que es una proteína ampliamente estudiada, aunque resulta curioso que no aparezcan las proteínas de la familia STX. Sin embargo, surgen proteínas típicas ya determinadas previamente como Exoc2, Exoc3, Vamp2, y Rabs detectadas en un interactoma tradicional de pacientes con esquizofrenia (Ramos-Miguel et al., 2019). Al realizar el análisis de términos de GO, aparecen términos similares a los obtenidos en el fenotipo adrenal del anterior capítulo como exocitosis y proteínas localizadas en la sinapsis validando los resultados.

En el análisis del interactoma de STIM1 en fenotipo neuronal aparecen proteínas significativamente enriquecidas que se comparten con los análisis neuronales anteriores, como Crh, Vamp2, Sytl4 o ATP7a, y otras menos enriquecidas como Sinaptotagmina1 y Rab3a, pero todas ellas implicadas en las sinapsis y el funcionamiento del sistema nervioso. Los datos del análisis GO determina que las proteínas obtenidas se encuentran principalmente implicadas en el transporte de iones, resultado esperado dada la implicación de STIM1 en la homeostasis de Ca²⁺.

El interactoma realizado de Tcp1111 en fenotipo neuronal, aporta valiosa información novedosa, las proteínas más significativamente biotiniladas se encuentran relacionadas con la actina, en concreto la β -actina (Actb) que se trata de una proteína muy conservada que polimeriza para producir filamentos que forman redes reticuladas en el citoplasma de las células (Gunning et al., 2015), otra proteína es la proteína diáfana homóloga 1 (Diaph1) es un factor de nucleación y elongación de actina necesario para el ensamblaje de estructuras de F-actina (Zaoui et al., 2010). Otra proteína biotinilada es la cadena de tubulina β 2A (Tubb2a), se trata del principal constituyente de los microtúbulos, esta proteína fue el cebo de un interactoma donde apareció Tcp1111 como proteína presa de Tubb2a (Huttlin et al., 2021). Junto a estas proteínas estructurales, aparecen proteínas motoras encargadas del movimiento de vesículas y orgánulos en concreto quinesinas, dineínas y miosinas como Myo11, Myo10, Myo9b, Kifbp, Dynll2. Una explicación es que Tcp1111 podría estar actuando como proteína adaptadora o regulando los componentes del citoesqueleto tanto la actina y los microtúbulos como las proteínas motoras, orquestando la organización de las mitocondrias, vesículas y el RE. Esta hipótesis se confirma con el análisis de GO que muestra términos como transporte mitocondrial, regulación del citoesqueleto, o regulación del procesamiento del ARNm.

Analizando en conjunto los cuatro interactomas en fenotipo neuronal, los resultados muestran que Sytl4 es una proteína común a las cuatro proteínas analizadas en este capítulo, siendo una proteína que también presenta dos dominios C2 en tándem al igual que Rabfilina3A y ambas están implicadas en el tráfico de vesículas (H. Yu et al., 2016). Atpb3, es una proteína que apareció en tres interactomas como candidata a interactuar con SNAP25, STIM1 y Tcp1111, resultado que también se obtuvo en el fenotipo adrenal, lo que refuerza la idea de que esta proteína está implicada en algún grado con nuestras proteínas de estudio, pero sin llegar a interactuar con Rabfilina3A.

Rabfilina3A se ha visto implicada en la infundíbulo neurohipofisis (Yasuda et al., 2018), a nivel patológico hay dos proteínas candidatas que

parecen estar implicadas en el hipotálamo y la glándula pituitaria, dos estructuras cerebrales estrechamente conectadas con la hipófisis. Estas dos candidatas son la sinaptotagmina similar 4 (Sytl4) que está altamente expresada en la hipófisis (Coppola et al., 2002), y la hormona liberadora de corticotropina (Crh), que se encuentra sobreexpresada en el hipotálamo (On et al., 2019), y aparece en todos los análisis, pero sólo en el interactoma de Rabfilina3A mutante y no en Rabfilina3A *wild-type*. Por lo que sería valioso obtener más información sobre estas proteínas junto con Rabfilina3A en la patología. Además, resulta curioso que aparezca Sinaptotagmina1 y VAMP2 en el interactoma de la versión mutante de Rabfilina3A y no en el *wild-type* resultado que podría deberse a una función anormal de la liberación de vesículas sinápticas y a una acumulación que haga que Rabfilina3A se acerque demasiado a estas proteínas de la fusión sináptica.

**CAPÍTULO VI. PKC ϵ INDUCE LA LIBERACIÓN DE
VESICULAS Y FOSFORILACIÓN DE SNAP23, A
TRAVES DEL DOMINIO C1B QUE RESPONDE A
ÁCIDO FOSFATÍDICO**

VI.1. Resumen

Las PKCs son una familia de quinasas implicadas en la transducción de señales relacionadas con los eventos de membrana. En este capítulo de esta tesis doctoral, se estudió el papel que podría tener el ácido fosfatídico (PA), segundo mensajero de la PKCε, en la fusión de vesículas.

PKCε se expresa en los mastocitos y juega un papel fundamental en la activación de estas células que están implicadas en la alergia y liberan sustancias tras ser activadas por antígenos. Se realizaron estudios de modelado molecular para comprender el mecanismo molecular que explicara la selectividad del dominio C1B del dominio de PKCε por PA, y por qué es tan importante en este tipo de PKC nueva y no en otras. Se usó la línea celular RBL-2H3 como modelo de mastocitos y se creó una línea estable que sobreexpresó PKCε-GFP, y otra con la versión mutante del sitio del PA modelado. Se observó que la activación de PKCε por PA y Ca²⁺ incrementaba la desgranulación y esto se correlacionó con un incremento de la fosforilación de SNAP23. Este efecto observado podría atribuirse al efecto estabilizador que la fosforilación ejerce en la formación del complejo SNARE para liberar el contenido de las vesículas tras la llegada del Ca²⁺.

Este descubrimiento avala que la ruta de señalización por PA a través de PKCε, podría ser un importante objetivo para inhibir las respuestas alérgicas exacerbadas.

VI.2. Introducción

Los mastocitos o células cebadas son las células responsables de los procesos de alergia. El mecanismo molecular de activación implica la unión múltiple del receptor FcεRI acoplado a IgE tras detectar un antígeno (Morita et al., 2016). Esto induce la activación de una cascada de señalización que conlleva la liberación de sustancias proinflamatorias (Kraft & Kinet, 2007). La regulación de esta señalización por segundos mensajeros lipídicos permanece sin resolver.

El PA está catalogado como un mensajero muy importante en la función normal de los mastocitos, una disminución de su presencia debido al silenciamiento de la PLD bloquea la translocación de varias isoenzimas de PKC a la membrana además de un descenso de la liberación de vesículas (Peng & Beaven, 2005). Los niveles de PA están delicadamente regulados por varias enzimas como la PLD, la diacilglicerol quinasa, y la PA-fosfatasa entre otras (Liu et al., 2013). A día de hoy se han determinado una variedad de proteínas que responden a PA, todas ellas comparten un motivo de unión compuesto por un conjunto de residuos básicos que interaccionan con el grupo fosfato de la cabeza del fosfolípido que está cargado negativamente (Zhukovsky et al., 2019).

Mi grupo de investigación tiene una larga trayectoria caracterizando la familia de PKCs. Por ejemplo, ha determinado que PKCε exhibe una prominente afinidad para unirse a membranas ricas en PA y DAG a través de su dominio C1B (Sánchez-Bautista et al., 2009) y también de su dominio C2 (García-García et al., 2001), estableciendo una nueva ruta de control de la funcionalidad de esta enzima. Además, investigaciones realizadas con células RBL-2H3 han demostrado que ambos dominios presentan afinidad por localizarse en la membrana plasmática de manera dependiente de PA, afirmando que PKCε es un sensor de la señalización de PA (Egea-Jiménez et al., 2014; Jose Lopez-Andreo et al., 2003).

Hasta la fecha, se ha determinado la estructura 3D para el dominio C2ε en complejo con PA, lo que ha ayudado a definir los residuos involucrados en la

interacción (Jose Lopez-Andreo et al., 2003). Sin embargo, la falta de información de estructuras 3D del dominio C1Bε o de la enzima completa ha dificultado la comprensión del mecanismo molecular de traslocación a la membrana y la consecuente activación de la isoenzima. Además, cómo la activación de PKCε dependiente de PA produce la fosforilación de sus sustratos es totalmente desconocida.

Los mastocitos secretan sustancias proinflamatorias mediante la degranulación de vesículas o gránulos citosólicos que surgen del aparato de Golgi. Estudios en ratones *knock-out* y experimentos de silenciamiento génico con siRNA han demostrado que el complejo SNARE, formado por SNAP23/STX4/VAMP8, es el encargado de producir la desgranulación de vesículas en células RBL-2H3 (Woska & Gillespie, 2011). Estas proteínas presentan regiones que son susceptibles de sufrir modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, regulando su funcionamiento. Por ejemplo, la fosforilación de SNAP23 en la serina 95 y la serina 120 es importante para la regulación de la fusión de las vesículas y la secreción controlando la localización de SNAP23 en la membrana plasmática y otras membranas citoplasmáticas (Hepp et al., 2005). Un reciente estudio fosfoproteómico identificó que PKCβ fosforila a VAMP8, produciendo una supresión de la secreción de vesículas en mastocitos aunque favorece el anclaje de ellas a la membrana plasmática (Malmersjö et al., 2016). Varios estudios indican que PKCα y β están implicadas en la degranulación y producción de IL-6 en células RBL-2H3 (Li et al., 2005; Nechushtan et al., 2000). Al menos 5 isoenzimas de las PKCs han sido identificadas como reguladoras en células RBL-2H3 (Chang et al., 1997). Todos estos estudios apuntan a que la familia de las PKCs es importante en el control de la secreción de mastocitos. Además, otros estudios donde utilizan ratones *knock-out* muestran que PKCβ y ε produce la activación de la expresión de *c-fos* y *c-jun* (Razin et al., 1994). PLCα y θ produce la secreción de IL-6 tras la estimulación por antígenos, sin embargo, PKCβ y ε provocan un efecto inverso en mastocitos derivados de la médula ósea (Bell et al., 2015).

Dada la falta de información sobre la señalización por PA en las células RBL-2H3, y teniendo en cuenta los resultados anteriores de nuestro grupo de investigación. Se trató de estudiar la señalización de PKC ϵ de un modo dependiente de PA y DAG. Se focalizó en determinar los aminoácidos del dominio C1B implicados en la interacción con el PA de la membrana plasmática y la estructura 3D de unión a PA por modelado molecular, y si esto podría afectar a la secreción de vesículas en células RBL-2H3. Se observó un incremento en la secreción de vesículas al ser activadas por Ca²⁺, PA y DAG. Por tanto, se contempló la posibilidad de que PKC ϵ fosforilara algún componente de la maquinaria implicada en la fusión de vesículas, determinando la posibilidad de la fosforilación de SNAP23 en la membrana plasmática permitiendo un anclaje de vesículas más favorable y estable.

VI.3. Resultados

VI.3.1. Identificación de un área electropositiva alrededor del sitio de unión a DAG del dominio C1B de PKC ϵ

Para tratar de comprender por qué el dominio C1B de PKC ϵ presenta una alta afinidad por PA y baja por DAG, se realizó un modelado de la estructura tridimensional del dominio C1B de PKC ϵ con el programa Phyre2 (Kelley et al., 2015), y se acopló la molécula de 1,2-diacetyl-*sn*-glycerol (DAG) en el bolsillo de unión del DAG mediante la herramienta SwissDock (Grosdidier et al., 2011). Los resultados arrojaron la estructura típica del dominio C1B con dos largas hojas- β formando un bolsillo en forma de V y una pequeña hélice α en el extremo C-terminal (Figura. VI.1A). El plegamiento de la estructura se estabiliza por los dos paquetes de tres residuos de cisteínas y una histidina que permiten la coordinación con dos átomos de Zn²⁺ en el final de las hojas β (G. Zhang et al., 1995). El bolsillo de unión al activador del dominio C1B ϵ está formado por T254, L262, y L263 en el fondo del bolsillo hidrofóbico y V252, P253, G265, L266, y L267 en la entrada del bolsillo (Figura. VI.1A). El acoplamiento del 1,2-diacetil-*sn*-glycerol arrojó 256 posiciones agrupadas en 48 grupos, la mayoría de ellos encajaban en el bolsillo de unión a DAG (Figura. VI.1A). Las posiciones más probables del modelado se unen a través interacciones hidrofóbicas, y sólo

el C1, así como los aminoácidos que forman parte de la oquedad para unir PA se encuentran conservados.

Para intentar comprender exactamente cuál era el mecanismo molecular que pudiera estar facilitando la interacción del dominio C1B ϵ a la membrana plasmática rica en PA. Se comparó el potencial electrostático del modelado del dominio C1B ϵ calculado usando APBS y la estructura del dominio C1B δ (PDB: 1PTR)(G. Zhang et al., 1995)(Figura. VI.2AB). En la superficie de la entrada del bolsillo del dominio C1B ϵ se encuentra un borde básico con una gran área electropositiva, formada por las cadenas laterales de los aminoácidos K251/R268/R282/R283. Por el contrario, el dominio C1B δ presenta un área electropositiva mucho más pequeña, formada por los aminoácidos K256/H270/K271 (Figura. VI.2B). Estos resultados sugieren que el mayor

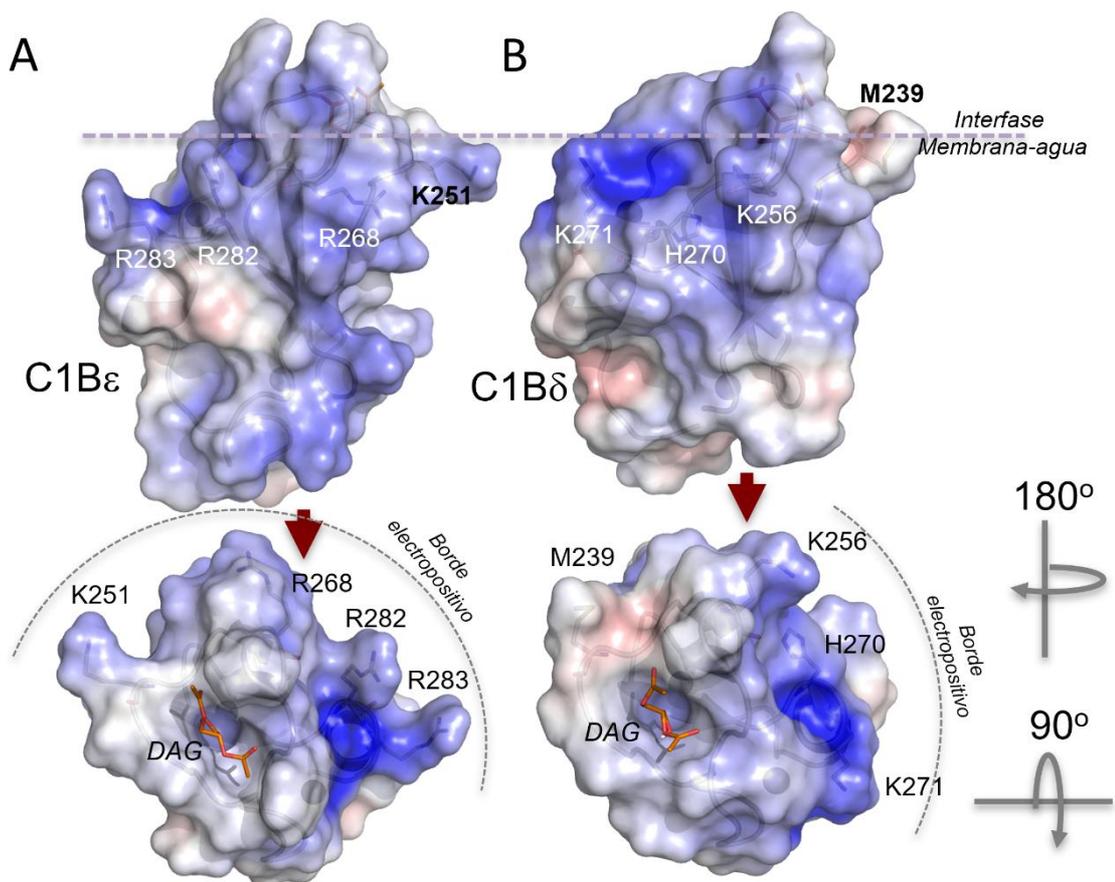


Figura. VI.2. Mapa de la distribución de cargas de los dominios C1. C1B ϵ **A**) y C1B δ **B**) con la superficie coloreada según el potencial electrostático en 100 mM de iones monovalentes de -5 kT/e en rojo a $+5$ kT/e en azul. La vista superior de los dominios muestra la región que interactúa con la membrana y con la molécula de DAG representada como varillas naranjas. La amplitud del borde electropositivo es indicada por la línea de puntos, la estructura del dominio del dominio C1B δ (1PTR).

potencial electropositivo del dominio de PKCε, junto a la longitud y forma de los residuos de arginina, podrían estar contribuyendo a una mayor afinidad de este dominio por membranas ricas en PA. El alineamiento de la secuencia primaria de estos residuos confirma estos resultados de la estructura en 3D, indicando que K251/R268/R282/R283 del dominio C1Bε podrían ser residuos potenciales para interactuar con las cargas negativas de los fosfolípidos como el PA en la membrana plasmática que en C1Bδ están sustituidos por M239/K256/H270/R271 (Figura. VI.1B). Por tanto, este análisis sugiere que el mayor potencial electropositivo en el C1B de PKCε junto con la longitud y las conformaciones de los residuos R podrían contribuir a la mayor afinidad de este dominio para interactuar con membranas enriquecidas con PA.

VI.3.2. Efecto de la interacción y activación de PKCε dependiente de PA sobre la degranulación de vesículas en células RBL-2H3

Para estudiar el efecto de los posibles aminoácidos identificados en la unión a PA del dominio C1B de PKCε, se realizó mutagénesis dirigida para sustituir los residuos de K/R por el aminoácido hidrofóbico A. Estudios realizados por mi compañero de laboratorio el Dr. Antonio Luis Egea y publicados en su tesis doctoral y en Serrano-López et al., 2021, caracterizaron la traslocación de PKCε-eGFP a la membrana plasmática en células RBL-2H3 transfectadas, tras ser estimuladas por DAG y PA o activadas con un antígeno, viendo este efecto mediante microscopía confocal. Sus resultados concluyeron que cuanto mayor era el número de aminoácidos K/R sustituidos por A, mayor era la inhibición de la traslocación de la proteína a la membrana plasmática, demostrando la importancia del área electropositiva de aminoácidos del dominio C1Bε en trasladar a PKCε a la membrana, manteniendo su capacidad catalítica aún incluso con las mutaciones (Serrano-López et al., 2021).

Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó un cuádruple mutante que tenía anulada su interacción con la membrana plasmática incluso en presencia de DAG y PA. El plásmido cuádruple mutante de PKCε-GFP 4MUT, presentaba 4 mutaciones: K251A/R268A/R282A/ R283A. El objetivo era explorar

el rol de la activación dependiente de PA de PKC ϵ en la degranulación de las células RBL-2H3, para ello se generaron dos líneas estables que sobreexpresaban PKC ϵ -eGFP *wild-type* (WT) y PKC ϵ -eGFP 4MUT. De forma que todas las células expresaran estas construcciones de forma constitutiva. Estas células RBL-2H3 son similares a los mastocitos, la llegada de un antígeno a la superficie de la membrana provoca el entrecruzamiento del receptor Fc ϵ RI induciendo la activación de varias rutas de señalización que producen la hidrólisis de PIP₂, liberando DAG que permanece en la membrana e IP₃ que activa la liberación de Ca²⁺ del lumen del RE al citosol desencadenando la degranulación de los mastocitos. Dada esta compleja ruta de señalización, es difícil de discernir el mecanismo de control molecular de una proteína, principalmente cuando esta proteína no es activada por el Ca²⁺ como es el caso de la PKC ϵ .

Para estudiar el efecto individual de la activación de la PKC ϵ de forma dependiente de PA en la secreción de vesículas se realizaron estudios de β -hexosaminidasa, que se correlacionan con fusión de vesículas al detectarse el incremento de β -hexosaminidasa. El nivel basal de liberación sin ningún estímulo era cercano al 10%, a continuación, estimulamos las células con los activadores directos de la PKC ϵ , es decir, PA o una combinación de PA/DAG durante 5 min y no se midió ningún incremento en la liberación en estas condiciones en comparación con las células no estimuladas (Figura. VI.3). Únicamente, cuando se indujo una afluencia de Ca²⁺ mediante ionomicina, la liberación de β -hexosaminidasa aumentó al 31% en las células silvestres (*mock*), al 33% en las células que expresaban PKC ϵ -WT-EGFP y al 35% en las células que expresaban PKC ϵ -4MUT-EGFP (Figura. VI.3), siendo no relevante la diferencia entre las tres. Sin embargo, al añadir PA o PA/DAG junto con ionomicina que provoca la liberación de Ca²⁺, se producía una diferencia significativa exclusivamente en las células que expresaban PKC ϵ -WT-EGFP, llegando hasta un nivel de liberación superior al 40%, mientras que las células silvestres y las que tenía la versión mutante de PKC ϵ insensible a PA/DAG quedaban a niveles basales como si únicamente hubiéramos añadido Ca²⁺. Esto indica que la

localización de PKCε en la membrana plasmática debido a un incremento de PA facilita el proceso de liberación, actuando probablemente en el estado de pre-fusión de vesículas mediante la fosforilación de alguna proteína.

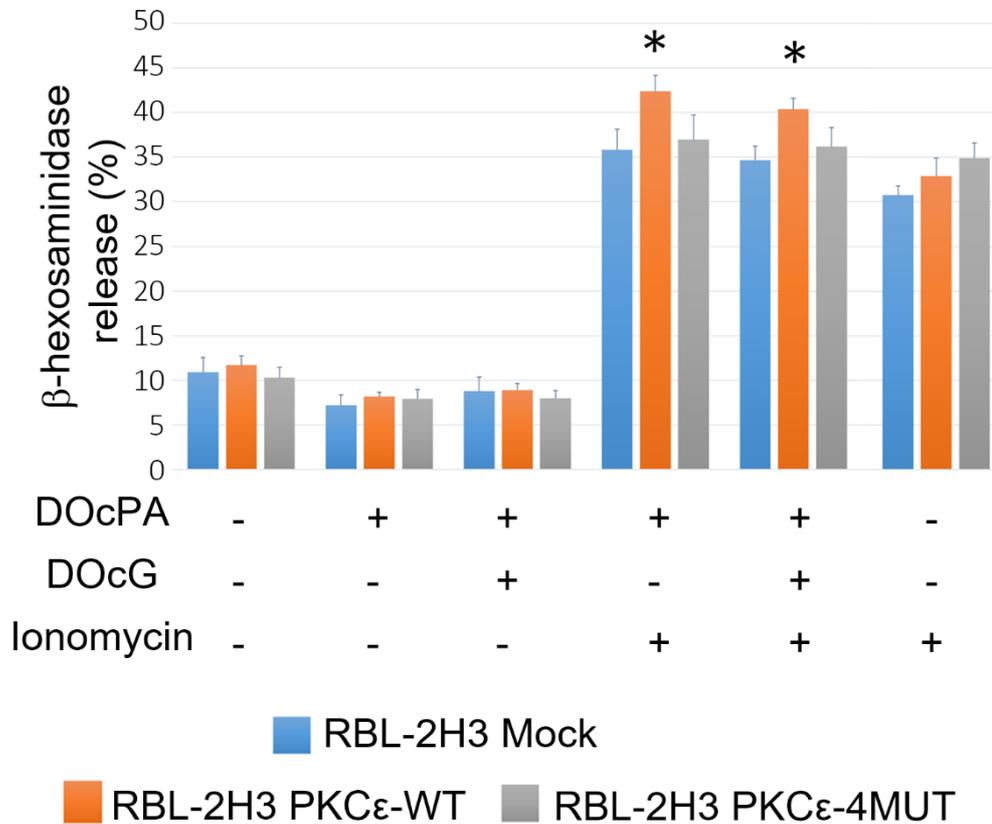


Figura. VI.3. Liberación de β-hexosaminidasa en las células inducida por diferentes tipos de estimulación. Se estudió el efecto de la liberación de β-hexosaminidasa tras la estimulación con diferentes combinaciones. La estadística para la combinación PA (5 mg/mL) + Ionomicina (3 mM), el p-value del t-test de permutación de dos caras es de 0,0418 al comparar las células mock con PKCε-WT-EGFP, arrojando esta diferencia como significativa. En cambio, cuando se comparan las células mock y las PKCε-4MUT-EGFP El p-value de la t-test de permutación de dos caras es de 0,706. En la condición tras la estimulación con PA (5 mg/mL) + DAG (4 mg /mL) + Ionomicina (3 mM), cuando se comparan las células mock con PKCε-WT-EGFP el p-value de del t-test es de 0,0168. Cuando se comparan las células mock y las PKCε-4MUT-EGFP el valor P de la prueba t de permutación de dos caras es de 0,565.

VI.3.3. PKCε fosforila la proteína SNARE llamada SNAP23

A continuación, estudiamos el efecto que la activación de la PKCε por PA podría tener sobre la fosforilación de los componentes de la maquinaria de fusión de vesículas SNARE. En las células RBL-2H3 el motor molecular que está implicado en la degranulación de vesículas está constituido por las SNARE: SNAP23, STX4 y VAMP8 (Woska & Gillespie, 2011). Dado que no existían anticuerpos comerciales que detectaran la fosforilación de estas proteínas en la

versión de rata, en una primera aproximación se recurrió a analizar la fosforilación con la técnica Phos-tag™ con resultados insatisfactorios a la hora de poner a punto la técnica. No obstante para SNAP23 se observó un cambio de movilidad electroforética tal y como describen (Suzuki & Verma, 2008) y (Hepp et al., 2005), donde la banda superior corresponde a SNAP23 fosforilado, y la banda inferior a la versión no fosforilada (Figura. VI.4).

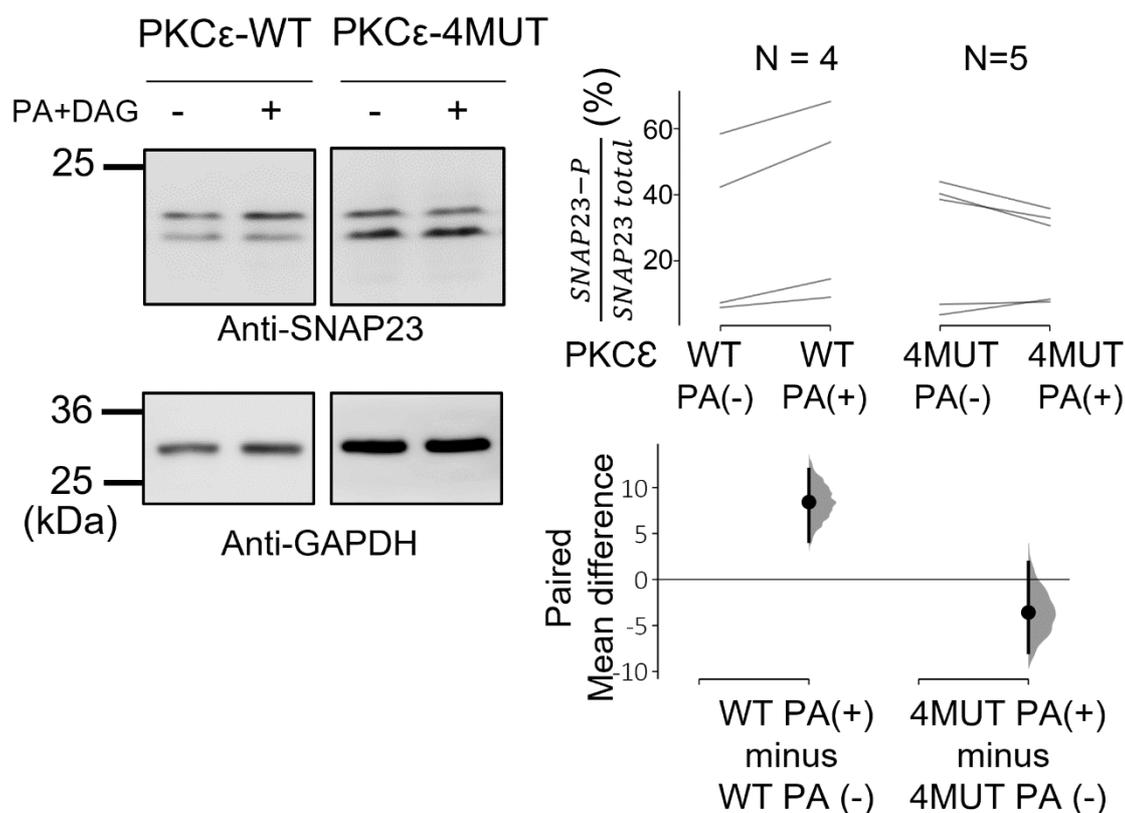


Figura. VI.4. Western-blot contra SNAP23 de células RBL-2H3 transfectadas con PKC ϵ -WT-EGFP y PKC ϵ -4MUT-EGFP estimuladas con PA+DAG. La fosforilación de SNAP23 se midió mediante el cambio de movilidad electroforética detectado por SDS-PAGE al 15% y western-blot con anticuerpo anti-SNAP23 en la imagen superior. En la imagen inferior se utilizó GAPDH como proteína de control de carga para medir la cantidad total de proteína cargada en el gel. (C) Se midió la proporción de SNAP23 fosforilada/ SNAP23 total en las dos líneas celulares indicadas anteriormente en ausencia y presencia de estímulo con PA+DAG. Los datos brutos se representan en los ejes superiores; cada conjunto de observaciones emparejadas está conectado por una línea. La diferencia media emparejada para 2 comparaciones se muestra en el gráfico de estimación de Cumming. Se realizaron al menos dos réplicas de dos experimentos biológicamente independientes. En el gráfico inferior, cada diferencia media emparejada se representa como una distribución de muestreo bootstrap. Las diferencias medias se representan como puntos; los intervalos de confianza del 95% se indican en los extremos de las barras de error verticales.

PKCε induce la liberación de vesículas y fosforilación de snap23, a través del dominio C1B que responde a ácido fosfatídico

La cuantificación por WB muestra la tendencia a aumentar la cantidad de SNAP23 fosforilada al estimular las células que expresan PKCε-WT-EGFP con PA/DAG, de igual forma como se observa de forma cualitativa la banda superior (SNAP23 fosforilado) es mucho más intensa que la inferior al estimular con PA/DAG (Figura. VI.4). Sin embargo, este efecto no ocurre en las células que expresan PKCε-4MUT-EGFP, que no responden a esta estimulación con un incremento de la banda fosforilada, en este caso aparece en la banda inferior (SNAP23 no fosforilada) (Figura. VI.4).

Sin embargo, no se observó ningún cambio visible claramente en el desplazamiento de movilidad electroforética para STX4 y VAMP8 (Figura. VI.5), aunque no podemos descartar que puedan estar fosforilados en sitios que no induzcan este efecto en la electroforesis.

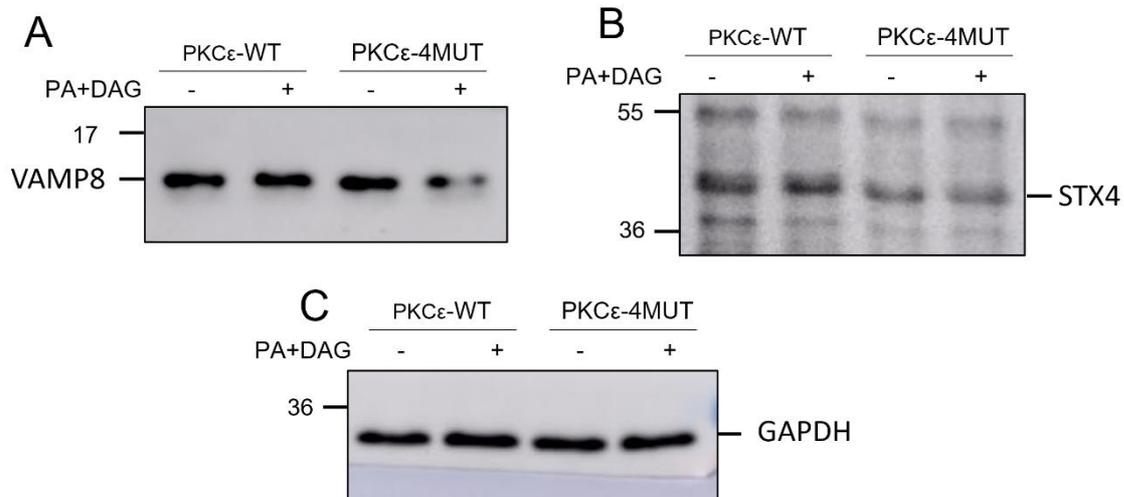


Figura. VI.5. VAMP8 y STX4 no tienen diferentes desplazamientos de movilidad electroforética debido a la fosforilación. **A)** Western-blot contra VAMP8 de células RBL-2H3 transfectadas con PKCε-WT-EGFP y PKCε-4MUT-EGFP estimuladas con PA+DAG. **B)** Western-blot contra STX4 de células RBL-2H3 transfectadas con PKCε-WT-EGFP y PKCε-4MUT-EGFP con y sin estímulo de PA+DAG. **C)** Western-blot contra GAPDH de células RBL-2H3 transfectadas con PKCε-WT-EGFP y PKCε-4MUT-EGFP con y sin estímulo de PA+DAG.

VI.3.4. Modelado del SNARE compuesto de VAMP8, SNAP23 y STX4

Se modeló mediante herramientas bioinformáticas la estructura 3D del complejo SNARE *coiled-coil* formado por SNAP23, VAMP8 y STX4 debido a que actualmente no existe ninguna estructura con resolución atómica de este triplete de proteínas, y también para comprender mejor los posibles sitios de fosforilación y como estos podrían afectar a su estructura y formación. Las proteínas individuales se modelaron utilizando el servidor SWISS-MODEL

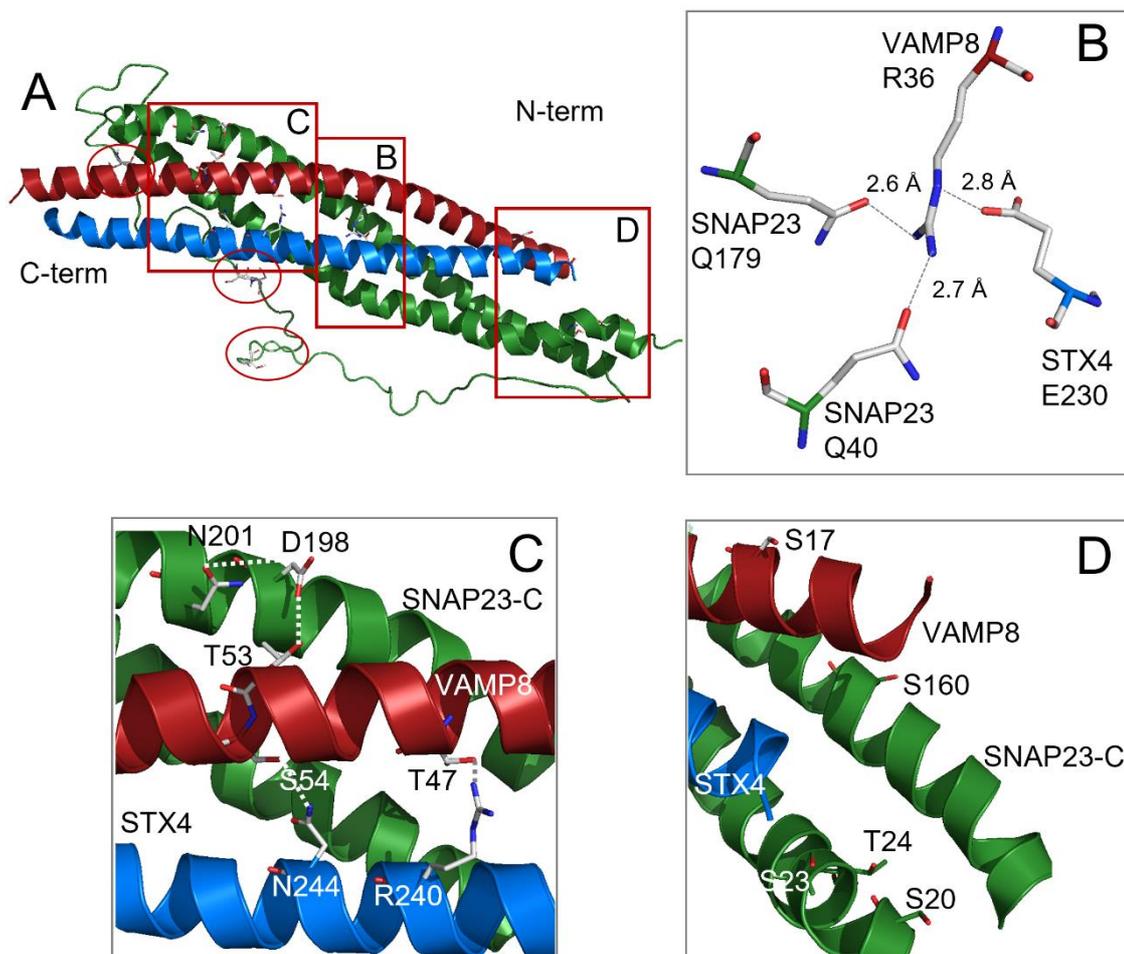


Figura. VI.6. Modelización del complejo SNARE responsable de la degranulación en las células RBL-2H3. **A).** Modelado del *coiled-coil* formado por VAMP8 (aa 10-64) (rojo), STX4 (aa 211-267) (azul) y SNAP23 (aa 7-208) (verde). Los círculos rojos indican las cadenas laterales de los residuos fosforilados más frecuentes en SNAP23. **B)** Vista de cerca de las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en la capa iónica conservada (0) formada por VAMP8R36, STX4E230, SNAP23Q40 y SNAP23Q179. Las cadenas laterales se representan como palos, los átomos de oxígeno en rojo y los de nitrógeno en azul. Los enlaces de hidrógeno se indican con una línea gris punteada con la distancia en Å. **C)** Vista de cerca de la representación cartográfica de la región del término C del complejo SNARE para mostrar cómo las cadenas laterales de los residuos frecuentemente fosforilados participan en los enlaces de hidrógeno en la cara interna de la bobina enrollada. T47 forma un enlace de hidrógeno con N240(STX4), S54 un enlace de hidrógeno con N244(STX4) y T53 un enlace de hidrógeno con D198(SNAP23) que, al mismo tiempo, es estabilizado por otra interacción con N201(SNAP23). **D)** Vista de cerca de la representación cartográfica de la región del término N del complejo SNARE para mostrar las cadenas laterales de los residuos frecuentemente implicados en la fosforilación situados en la cara exterior del *coiled-coil*.

Expasy (las coordenadas PDB utilizadas como plantillas fueron 6MDN (SNAP23), 4WY4 (VAMP8) y 1L4A (STX4), dado que para estas proteínas está resuelta su estructura, pero con otras SNAREs o proteínas. El complejo SNARE se modeló mediante una alineación estructural 3D con el complejo SNARE formado por SNAP29/STX17/VAMP8 (PDB: 4WY4), el refinamiento y la minimización de la energía del complejo se realizó mediante ejecuciones secuenciales en ClusPro (Figura. VI.6). Se añadieron los grupos fosfato de los potenciales residuos susceptibles de fosforilación según la base de datos PhosphoSitePlus (Hornbeck et al., 2019). La estructura modelada muestra cómo la capa 0 del *coiled-coil* está dispuesta por los residuos conservados VAMP8 (R36), STX4 (E230), SNAP23 (Q40) y SNAP23 (Q179) del complejo SNARE y está estabilizada por enlaces de hidrógeno (Figura. VI.6B). Cuando nos centramos en los residuos de SNAP23 y VAMP8 que podrían ser potencialmente fosforilados por PKC ϵ y PKC β , respectivamente (Figura. VI.6A), observamos que la mayoría de los sitios de SNAP23 residen en el conector de las hélices N y C-terminal que forman el complejo SNARE. No obstante, otras dos zonas se ven afectadas por la fosforilación en el complejo SNARE, una en su C-terminal (Figura. VI.6C) con residuos potencialmente fosforilables en VAMP8 que participan en la formación de puentes de hidrógeno en la cara interna del *coiled-coil*. La segunda zona se localiza en el N-terminal del complejo SNARE y está formada por sitios de fosforilación potenciales de SNAP23 y VAMP8 con la diferencia de que las cadenas laterales de estos residuos apuntan a la cara exterior del *coiled-coil* (Figura. VI.6D).

VI.4. Discusión y conclusiones

Dada la importancia de los mastocitos en el control de la alergia, la autoinmunidad, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, es crucial indagar cómo estas células modulan sus diferentes respuestas para poder desarrollar aplicaciones terapéuticas específicas contra estas enfermedades.

Tras muchos años de trabajo, todavía hay una gran falta de información sobre los mecanismos moleculares que controlan la señalización entre la

superficie celular y la maquinaria de fusión implicada en la exocitosis. Las PKC se encuentran entre las proteínas clave en las vías de transducción de señales de los mastocitos, debido a que pueden detectar muchos lípidos de señalización diferentes en la membrana plasmática. Sin embargo, todavía se está estudiando cómo cada isoenzima individual conecta y controla el sistema de secreción de vesículas. Por lo tanto, se intentó combinar los análisis estructurales realizados mediante herramientas bioinformáticas con las células vivas para dilucidar la señalización que desencadena la activación de la PKC ϵ por PA, y cómo esta señalización lipídica específica puede controlar el proceso de degranulación de los mastocitos RBL-2H3.

La falta de la estructura de alta resolución del complejo C1 con DAG de las PKC ha impedido determinar las causas estructurales que ocasionan las diferentes afinidades de estas isoenzimas por el PA. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se predijo una estructura 3D del dominio C1B de la PKC ϵ mediante modelado por homología de secuencia, además se calculó la distribución del potencial electrostático en la superficie y se comparó con la del dominio C1B de la PKC δ . Sorprendentemente, el dominio C1B ϵ presentaba un gran potencial electrostático positivo conferido por un conjunto de residuos de K y R que formaban un borde básico en la parte superior del dominio. Este borde electrostático se conserva parcialmente en el dominio C1B δ , la presencia de M239 junto a la ausencia de residuos de R en el borde de la oquedad del DAG disminuye drásticamente la superficie electropositiva disponible para interactuar con los lípidos con cabezas negativas como el PA.

Los resultados obtenidos en estudios anteriores al mutar los residuos hidrofóbicos situados en el borde superior de la hendidura de unión al ligando en el dominio C1B δ por residuos hidrofílicos mostraron que el dominio experimentó una gran reducción en su afinidad de unión al DAG, pero se hizo más dependiente de fosfolípidos cargados negativamente para interactuar con las membranas (Wang et al., 2001). Aunque el objetivo inicial de ese trabajo era demostrar el papel de estos residuos en la interacción con el DAG, se demostró

PKCε induce la liberación de vesículas y fosforilación de snap23, a través del dominio C1B que responde a ácido fosfatídico

indirectamente que un equilibrio entre los residuos hidrofóbicos internos y los hidrofílicos externos en la parte superior de los dominios C1 forman un sistema muy intrincado para modular las afinidades por el DAG y los fosfolípidos cargados negativamente de las diferentes isoenzimas de la PKC.

La alineación de la secuencia primaria de los dominios C1A y C1B de las diferentes isoenzimas de la PKC revela que para los dominios C1B, el único dominio que conserva los 4 aminoácidos que componen el borde básico completo es el C1Bε (Figura. VI.7). En cambio, en los dominios C1A se conservan los cuatro residuos básicos en todas las PKC clásicas (C1Aα, el C1Aβ y C1Aγ) y en dos PKCs nuevas (C1Aε, el C1Aη) (Figura. VI.7). No obstante, las simulaciones de dinámica molecular que comparan los residuos de lisina (K) y arginina (R) han demostrado que R posee una capacidad única para formar grandes puentes de hidrógeno con los grupos fosfato de los lípidos, lo que conduce a potenciar la unión a las membranas (Li et al., 2013), esto implica que aunque una sustitución de un residuo R por uno K puede considerarse

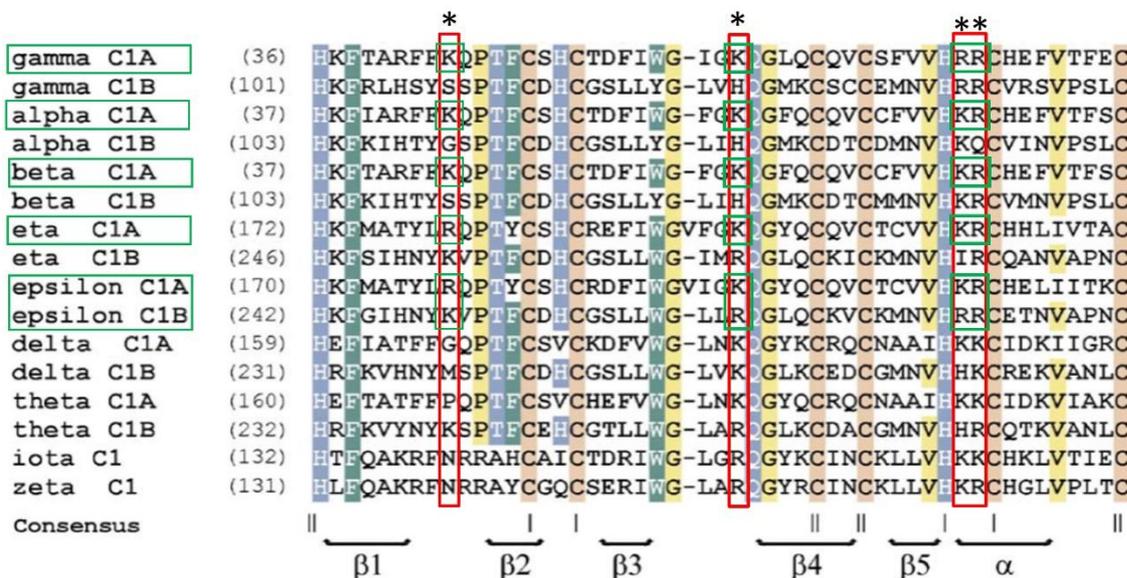


Figura. VI.7. Alineación de los dominios C1 de la familia PKC humana. Etiquetado con * los 4 residuos implicados en el borde básico, rodeado en verde los dominios C1 que conservan los cuatro residuos básicos (K/R). Los guiones indican huecos. Los residuos coloreados corresponden a los que presentan más de un 70% de homología. Los residuos aromáticos están etiquetados en verde, los residuos hidrofóbicos y la Gly están etiquetados en amarillo, los residuos polares están etiquetados en azul, excepto la Cys que está marcada en naranja. Los números romanos I y II indican los residuos implicados en los dos sitios de coordinación del Zn²⁺. Imagen modificada de Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2006.

conservadora, en este mecanismo molecular esta sustitución puede marcar fuertes diferencias.

Estos hallazgos son muy relevantes por la importante trascendencia que tienen para explicar el comportamiento diferencial de las distintas isoenzimas, y que radica en un mecanismo molecular muy sofisticado que no tiene respuesta con una mera exploración del alineamiento de la secuencia primaria, y requiere una combinación más compleja de estudio de la estructura 3D junto a estudios electrostáticos de superficie. En conjunto, estos resultados sugieren que la combinación de 3 residuos de arginina (R) en C1B ϵ permite la formación de un borde de residuos básicos que proporcionan un área electropositiva muy grande en el dominio, y son esenciales para establecer una red específica de fuertes puentes de hidrógeno que ancla mejor el dominio en la posición adecuada con respecto a la interfaz lípido-agua en microdominios enriquecidos con PA.

Los datos de esta tesis doctoral muestran que la activación de la PKC ϵ dependiente de PA aumenta la secreción de las células RBL-2H3 y esto podría estar relacionado con la fosforilación de algún componente del complejo SNARE: SNAP23, STX4 y VAMP8. Dado que se observa una mayor liberación de contenidos en las vesículas de las células que expresan PKC-WT (Figura. VI.3), es más probable que la fosforilación de SNAP23 esté estabilizando y aumentando el número de vesículas preparadas para una liberación de su contenido en presencia de Ca²⁺.

Esta observación es muy similar al efecto encontrado en un trabajo anterior que muestra que la fosforilación de IKK2 estimula la vía de exocitosis en los mastocitos. Este estudio demostró que la asociación a la membrana plasmática de SNAP23 estaba controlada por la fosforilación constitutiva de la T102 de SNAP23, además fosforilaciones adicionales en S95 y S120 eran responsables de la reubicación de SNAP23 en diferentes grupos de gránulos secretores (Naskar & Puri, 2017). De forma similar, como se observan en estos resultados, la fosforilación de SNAP23 dependiente de PKC ϵ por la señalización

endógena de PA podría ser responsable de qué las células que expresan PKCε-WT muestren una mayor secreción que las que expresan PKCε-4MUT.

Hasta la fecha no se ha descrito ninguna fosforilación de STX4 dependiente de PKCs. Además, la fosforilación de VAMP8 dependiente de PKCβ ha demostrado una reducción de la degranulación de las células RBL-2H3, debido a una estabilización del *docking* de las vesículas (Malmersjö et al., 2016). Esto indica que es muy posible que la PKCε utilice la vía de señalización PA para ejercer una fosforilación específica sobre SNAP23, y que esto se combine con la fosforilación de otros componentes del complejo SNARE por parte de otras isoenzimas de las PKCs, lo que lleva a una estabilización del *docking* en la fusión de vesículas para mejorar la degranulación en las células RBL-2H3. Es difícil predecir cómo influye la fosforilación en el complejo a nivel molecular, dado que no se dispone de información estructural 3D ni biológica. En una exploración detallada de la base de datos PhosphositePlus (Hornbeck et al., 2019) para encontrar los residuos fosforilados más frecuentes identificados por espectrometría de masas para SNAP23, STX4 y VAMP8, descubrimos que las proteínas VAMP8 y SNAP23 contienen sitios de fosforilación que se localizan en dentro del *coiled-coil* SNARE, y el resto de los residuos potenciales de fosforilación residen fuera de este dominio.

En resumen, basándonos en estos descubrimientos, se muestra un modelo estructural diferente entre el dominio C1B de la PKCε y PKCδ que es específico para la señalización de PA de PKCε en células RBL-2H3. La hipótesis más plausible es que la interacción específica lípido-proteína localiza a la quinasa en la orientación adecuada en la membrana para activar y conectar con la maquinaria de fusión SNARE, controlando directamente la fosforilación de SNAP23. La fosforilación del complejo SNARE podría estabilizar la estructura *coiled-coil* durante el acoplamiento de las vesículas y, por ende, aumentar el proceso de secreción en presencia de Ca²⁺. Hay que seguir investigando para determinar con precisión los sitios específicos de fosforilación de la PKCε en SNAP23 mediante espectrometría de masas, y si existen otros para VAMP8 y

STX4, con el objetivo de descubrir la señalización completa controlada por la activación de la PKC ϵ de forma dependiente de PA, y de este modo explotar sus potenciales aplicaciones terapéuticas.

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

VII.1. Discusión general

Tras numerosos años de investigación sobre el tráfico de membranas de la mano de diversos investigadores, y a pesar de que algunos de los más brillantes han sido galardonados por 3 convocatorias distintas de Premios Nobel por sus descubrimientos sobre el tema, aún permanece muchísimo por esclarecer, y sólo estamos en la punta del iceberg acerca de este complejo y variado sistema de transporte intracelular que albergan las células eucariotas.

En esta tesis doctoral se ha tratado de descifrar el papel molecular que desempeña Rabfilina3A en este sistema, proteína implicada en el tráfico de membranas que presenta dos dominios C2 e interacciona con SNAP25 (Ferrer-Orta et al., 2017). Esto se ha logrado haciendo uso de un amplio abanico de herramientas científicas de vanguardia como la bioinformática para comparar las implicaciones moleculares, técnicas de cultivo celular y microscopía confocal para caracterizar las interacciones *in vivo* con ensayos de proximidad, llegando hasta el uso de nuevas técnicas “ómicas” para caracterizar todas las interacciones cercanas a Rabfilina3A en dos modelos celulares distintos. Además, se planteó otro objetivo y se estudió el papel que tiene el PA en la señalización de la fusión de vesículas secretoras en un modelo de mastocitos responsables del proceso alérgico. Esta señalización por PA ocurre a través de PKC ϵ que activa a la quinasa para fosforilar a SNAP23, y promover un estado más factible para la formación del complejo SNARE y la fusión de las vesículas.

La señalización a través de iones Ca²⁺ está implicada en numerosas rutas transducción de señales que ocurren en la célula, siendo numerosas las proteínas y procesos sensibles a este segundo mensajero. La concentración de Ca²⁺ de reposo en el citoplasma es de alrededor de 100 nM, unas 50.000 veces más bajo que la concentración extracelular (Atchison & Beierwaltes, 2013). Cuando se abren distintos canales de Ca²⁺, se produce la entrada de Ca²⁺ en el citoplasma provocando la activación de numerosas proteínas que señalizan y desempeñan distintas funciones (Clapham, 2007). Entre ellas se encuentra Rabfilina3A proteína sensible a Ca²⁺ a través de sus dos dominios C2, que le

permiten detectarlo y coordinarlo para anclarse a la membrana plasmática a través de lípidos como la PS (Corbalan-Garcia & Gomez-Fernandez, 2014). Otra proteína de estudio de esta tesis doctoral es STIM1 que se encuentra anclada a la membrana del RE, es sensible a las variaciones de Ca^{2+} y al detectar una bajada de este ion en el RE se une a la membrana plasmática a través del canal de Ca^{2+} Orai1 (Wu et al., 2006; Zhou et al., 2013). A su vez $\text{PKC}\epsilon$, aunque pertenece a la familia de las PKCs es una isoforma que no es sensible a Ca^{2+} pero es sensible al PA y DAG que se producen en la ruta de señalización por la PLD (Egea-Jiménez et al., 2014; Morris, 2007).

Sinaptotagmina1 es la proteína desencadenante de la fusión de vesículas dependiente Ca^{2+} por excelencia, implicada en la fusión de vesículas sinápticas, se encuentra anclada a la vesícula y presenta dos dominios C2 en tándem sensibles a Ca^{2+} (Chang et al., 2018). Rabfilina3A presenta también dos dominios C2, con la diferencia de que no está anclada directamente a la vesícula sino indirectamente a través de las Rab3/Rab27 (Fukuda et al., 2004). Estas dos proteínas son capaces de interactuar con SNAP25 a través de su dominio C2B, sin embargo, la región de interacción es diferente como se demuestra mediante análisis de comparación estructural. La zona de interacción con Rabfilina3A localizada en la α -hélice final del dominio C2B es altamente específica presentando un potencial electronegativo, que no está conservado en Sinaptotagmina1, de este modo cada proteína a pesar de tener una homología estructural se ha especializado en interactuar con SNAP25 y el complejo SNARE a través de áreas altamente específicas.

Mediante ensayos de microscopía confocal con células PC12 *in vivo* se determinó que una de las funciones de Rabfilina3A parece ser la actuación como proteína chaperona o transportadora de SNAP25 a la membrana plasmática, para su correcta localización. SNAP25 es una proteína soluble, pero se palmitoila por la actuación de las palmitoiltransferasas DHHCs (Greaves et al., 2010). Rabfilina3A podría llevarla hacia la membrana donde allí sería palmitoilada. Por esta causa, la mutación de la región de interacción de SNAP25 parece ser clave

para la localización de SNAP25 en la membrana plasmática, y dependiente de Rabfilina3A. El efecto se ve más evidente al mutar la zona de interacción de SNAP25, y menos al mutar la de Rabfilina3A, pero podría ser debido a la expresión endógena de Doc2B en las células PC12 dado que esta proteína presenta los mismos dominios C2 que Rabfilina3A, y además conserva los residuos de interacción con SNAP25, siendo una proteína con función redundante con Rabfilina3A (Verhage et al., 1997).

Con el uso de la técnica BioID2 acoplada a espectrometría de masas, se realizó un estudio proteómico de las interacciones proteína-proteína de Rabfilina3A. Se determinó que Rabfilina3A parece interactuar o estar cerca de STIM1, y Tcp111l. Con estos resultados se decidió profundizar en el conocimiento de estas proteínas, y se realizó la misma estrategia sobre SNAP25, STIM1 y Tcp111l con el objetivo de caracterizar más profundamente el ambiente circundante a ellas a lo largo de su vida. Con los valiosos resultados obtenidos

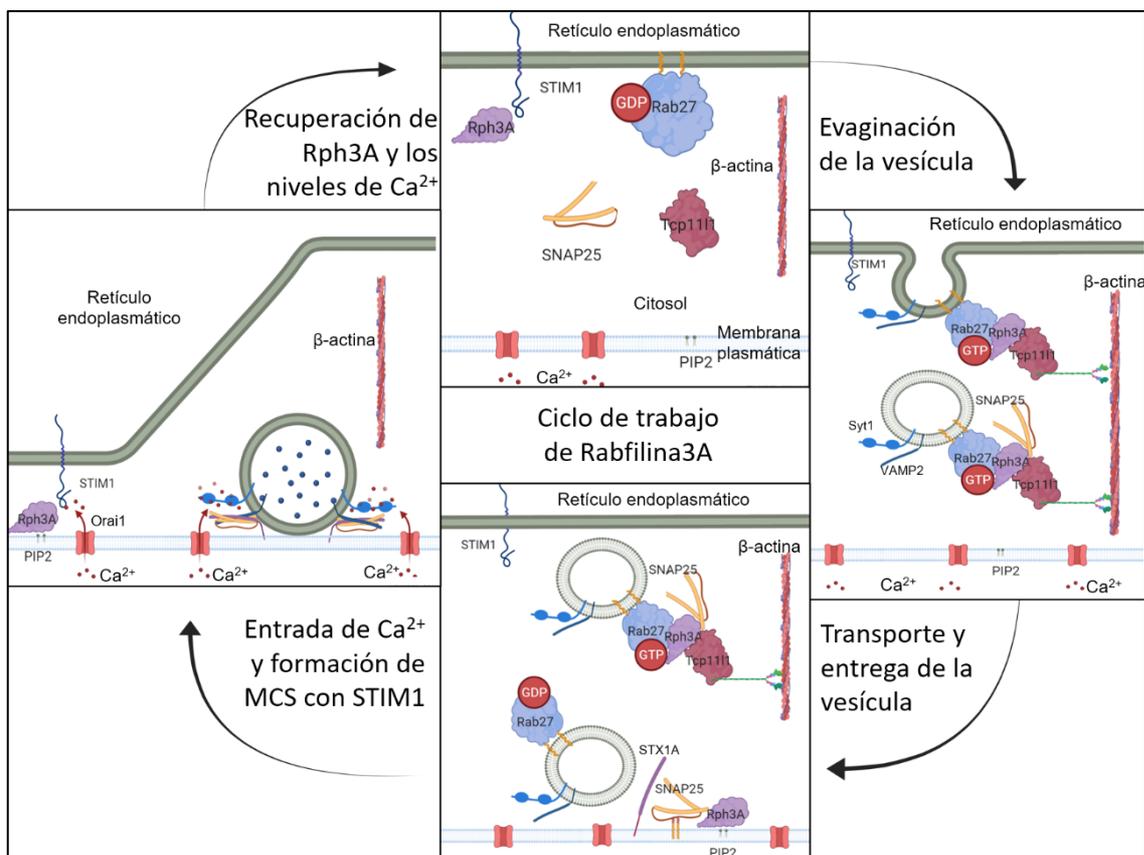


Figura. VII.1. Modelo del ciclo de trabajo de Rph3A.

en dos modelos fisiológicos distintos sobre el entorno molecular de Rabfilina3A, SNAP25, STIM1, y Tcp1111, se propone un modelo de funcionamiento de Rabfilina3A en el tráfico vesicular ayudando a transportar vesículas y a SNAP25 hacia la membrana plasmática, y posteriormente vuelve al RE gracias a STIM1 (Figura. VII.1).

El modelo propuesto en la Figura. VII.1 actuaría de la siguiente manera, en un primer lugar SNAP25, Rabfilina3A y Tcp1111 proteínas solubles residirían en el citosol, Rabfilina3A es la proteína efectora de Rab27 anclada a la vesícula. El ciclo comienza cuando Rab27 presenta GTP, iniciando el ciclo de trabajo, provoca que Rabfilina3A actúe como proteína efectora de ella (Izumi et al., 2003), además forma un complejo uniéndose a Tcp1111 como muestran los resultados del BioID2-Rph3A. A su vez Tcp1111, proteína de andamiaje, interaccionaría con proteínas del citoesqueleto como β -actina, o los microtúbulos como determinan los resultados de su BioID-Tcp1111. Esto provocaría la evaginación de la vesícula que emanaría, y comenzaría su transporte hacia la membrana plasmática, gracias a las proteínas motoras como miosinas y quinesinas que aparecen en el interactoma de BioID2-Tcp1111. SNAP25 podrían estar viajando junto a Rabfilina3A, es por ello por lo que aparecen interacciones de PLA entre estas proteínas en el citosol. Al llegar a la membrana plasmática la Rab27 hidroliza el GTP y Rabfilina3A se desacopla e interacciona con el PIP_2 de la membrana plasmática permitiendo la palmitoilación de SNAP25 por la palmitoil transferasa DHHC2 (Greaves et al., 2010), y así su correcto anclaje a la membrana plasmática. De este modo ya las proteínas SNARE se prepararían para la fusión de las vesículas cuando ocurra la señalización por la apertura de los canales de Ca^{2+} que provocan el incremento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmática. En este último paso, actuaría STIM1 que movería el RE hacia la membrana formando sitios de contacto de membrana, para recuperar los valores de Ca^{2+} del RE e interaccionaría con Rabfilina3A desplazándola de nuevo hacia el interior celular cuando se alcancen los valores de Ca^{2+} de reposo para comenzar un nuevo ciclo.

El motivo por el cual los mutantes de Rabfilina3A que son incapaces de interaccionar con PIP₂, impiden la localización de SNAP25 en la membrana plasmática, podría deberse a que Rabfilina3A no interacciona con la membrana plasmática debido a su incapacidad por interaccionar con el PIP₂, dificultando la llegada de Rabfilina3A a la membrana y por tanto, quedando desanclada de ella junto a SNAP25 e impidiendo sus palmitoilaciones por la DHHC2. No obstante, hay que continuar investigando para validar este modelo, realizando estudios de transporte de vesículas, y estudiar a fondo el papel de Tcp1111 proteína muy poco estudiada, realizando un línea celular *Knock-out* en Tcp1111 para ver que desencadenante tendría la pérdida de esta proteína.

Por otra parte, en el último capítulo se trató de caracterizar la implicación que el PA, un segundo mensajero producido por la Fosfolipasa D (PLD) a partir de PC, tiene sobre la PKC ϵ , isoforma que responde con gran afinidad a este lípido (Egea-Jiménez et al., 2014; Morris, 2007). Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se predijo la estructura 3D del dominio C1, se calculó el potencial electrostático de superficie, y se comparó con el del dominio C1B de la PKC δ . El exterior de la oquedad donde interacciona el DAG del dominio C1B ϵ presenta un gran potencial electrostático positivo conferido por un conjunto de residuos de K y R que forman un borde básico en la parte superior del dominio, permitiendo acoplar al PA. Este borde electrostático se conserva parcialmente en el dominio C1B δ , pero la presencia de M239 disminuye drásticamente la superficie electropositiva disponible para interactuar con los lípidos con cabezas negativas como el PA.

Para estudiar la implicación que estos residuos electropositivos tenían, se decidió explorar el papel de la activación dependiente de PA de PKC ϵ en la degranulación de las células RBL-2H3, para ello se generaron dos líneas estables que sobreexpresaban PKC ϵ -eGFP *wild-type* (WT) y PKC ϵ -eGFP 4MUT. Las células RBL-2H3 son similares a los mastocitos, cuando se produce llegada de un antígeno se induce la activación de rutas de señalización que producen la hidrólisis de PIP₂, liberando DAG que permanece en la membrana, e IP₃ que

activa la liberación de Ca^{2+} del lumen del RE al citosol desencadenando la degranulación de los mastocitos (Siraganian, 2003). Dada esta compleja ruta de señalización, es difícil de discernir el mecanismo de control molecular de una proteína, principalmente cuando esta proteína no es activada por el Ca^{2+} como es el caso de la $\text{PKC}\epsilon$. Para estudiar el efecto individual de la activación de la $\text{PKC}\epsilon$ de forma dependiente de PA en la secreción de vesículas se realizaron estudios de β -hexosaminidasa añadiendo PA/DAG junto con ionomicina para provocar la liberación de Ca^{2+} . La activación de la $\text{PKC}\epsilon$ dependiente de PA/DAG y Ca^{2+} aumentó la secreción de las células RBL-2H3, y esto podría estar relacionado con la fosforilación de algún componente del complejo SNARE, en concreto se observó la fosforilación de SNAP23 era más evidente en $\text{PKC}\epsilon$ -WT, por lo que podría producir un incremento de la fusión de vesículas.

Esta observación es muy similar al efecto encontrado en un trabajo anterior que muestra que la fosforilación de IKK2 estimula la vía de exocitosis en los mastocitos (Naskar & Puri, 2017). Este estudio demostró que la asociación a la membrana plasmática de SNAP23 estaba controlada por la fosforilación constitutiva de la T102 de SNAP23. Una fosforilación adicional en S95 y S120 era responsable de la reubicación de SNAP23 en diferentes grupos de gránulos secretores. De forma similar, como se observan en los resultados, la fosforilación de SNAP23 dependiente de $\text{PKC}\epsilon$ por la señalización endógena de PA podría ser responsable de por qué las células que expresan $\text{PKC}\epsilon$ -WT muestran una mayor secreción que las que expresan $\text{PKC}\epsilon$ -4MUT.

Se ha observado que la fosforilación de VAMP8 dependiente de $\text{PKC}\beta$ ha demostrado una reducción de la degranulación de las células RBL-2H3, debido a una estabilización del paso de *docking* de las vesículas (Malmersjö et al., 2016). Esto indica que es muy posible que la $\text{PKC}\epsilon$ utilice la vía de señalización del PA para ejercer una fosforilación específica sobre SNAP23, y que esto se combine con la fosforilación de otros componentes del complejo SNARE por parte de otras isoenzimas de las PKCs, lo que lleva a una estabilización del paso de *docking* en la fusión de vesículas para mejorar la

degranulación en las células RBL-2H3. Es difícil predecir cómo influye la fosforilación en el complejo a nivel molecular, dado que no se dispone de información estructural 3D ni biológica. Hay que seguir investigando para determinar con precisión los sitios específicos de fosforilación de la PKC ϵ en SNAP23 mediante espectrometría de masas, con el objetivo de descubrir la señalización completa controlada por la activación de la PKC ϵ de forma dependiente de PA, y de este modo explotar sus potenciales aplicaciones terapéuticas.

VII.2. Conclusiones

De los resultados presentados en esta memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

1. El dominio C2B de Rabfilina3A no conserva los residuos de interacción con SNAP25 que presenta Sinaptotagmina1, esta proteína se ha especializado en interactuar con SNAP25 a través de la α -hélice final del dominio C2B que presenta un elevado potencial electronegativo.
2. Rabfilina3A interactúa con las proteínas SNAP25, Sinaptotagmina1 y VAMP2 endógenas de vesículas de transporte localizadas en el citoplasma de células PC12 detectado mediante PLA, y sólo con SNAP25 y Sinaptotagmina1 en la membrana plasmática.
3. Los residuos E38A/D41A/R45A de SNAP25 son necesarios para la localización de SNAP25 en la membrana plasmática de células PC12.
4. Rabfilina3A ayuda a la localización de SNAP25 en la membrana plasmática a través de su α -hélice final y es dependiente de la interacción con PIP₂.
5. El efecto de la promoción de SNAP25 en la membrana plasmática dependiente de Rabfilina3A es mucho más acusado en un fenotipo neuronal.
6. El interactoma de Rabfilina3A en fenotipo adrenal y neuronal determina que esta proteína interactúa con STIM1, Tcpl111, Hap1 y Zwint.

7. El interactoma de Tcp1111 determina que esta proteína está implicada directamente con el citoesqueleto a través de los filamentos de actina y los microtúbulos, dado que interacciona con Actb, Tubb2a, Diaph1, Plp2 y Myh11.
8. PKC ϵ presenta una zona fuertemente electronegativa alrededor del sitio de unión a DAG de su dominio C1B que le permite unirse a PA.
9. La presencia de PKC ϵ sobreexpresada en células RBL-2H3 incrementa la fosforilación de SNAP23 y la liberación de vesículas ante un estímulo con PA y Ca²⁺.

CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aikawa, Y., Lynch, K. L., Boswell, K. L., & Martin, T. F. (2006). A Second SNARE Role for Exocytic SNAP25 in Endosome Fusion. In *Mol Biol Cell* (Vol. 17, pp. 2113-2124). <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-01-0074>
- Akhmanova, A., & Steinmetz, M. O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(12), 711-726. <https://doi.org/10.1038/nrm4084>
- Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M. C., & Zerial, M. (1994). Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *Embo j*, 13(22), 5262-5273.
- Alves, M. M., Burzynski, G., Delalande, J. M., Osinga, J., van der Goot, A., Dolga, A. M., . . . Hofstra, R. M. (2010). KBP interacts with SCG10, linking Goldberg-Shprintzen syndrome to microtubule dynamics and neuronal differentiation. *Hum Mol Genet*, 19(18), 3642-3651. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq280>
- Anderluh, A., Hofmaier, T., Klotzsch, E., Kudlacek, O., Stockner, T., Sitte, H. H., & Schütz, G. J. (2017). Direct PIP(2) binding mediates stable oligomer formation of the serotonin transporter. *Nat Commun*, 8, 14089. <https://doi.org/10.1038/ncomms14089>
- Antonin, W., Fasshauer, D., Becker, S., Jahn, R., & Schneider, T. R. (2002). Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat Struct Biol*, 9(2), 107-111. <https://doi.org/10.1038/nsb746>
- Arimura, N., Kimura, T., Nakamuta, S., Taya, S., Funahashi, Y., Hattori, A., . . . Kaibuchi, K. (2009). Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27. *Dev Cell*, 16(5), 675-686. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.03.005>
- Atchison, D. K., & Beierwaltes, W. H. (2013). The influence of extracellular and intracellular calcium on the secretion of renin. *Pflugers Arch*, 465(1), 59-69. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1107-x>
- Avagliano Trezza, R., Punt, A. M., Mientjes, E., van den Berg, M., Zampeta, F. I., de Graaf, I. J., . . . Distel, B. (2021). Mono-ubiquitination of Rabphilin 3A by UBE3A serves a non-degradative function. *Sci Rep*, 11(1), 3007. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82319-9>
- Bailly, E., McCaffrey, M., Touchot, N., Zahraoui, A., Goud, B., & Bornens, M. (1991). Phosphorylation of two small GTP-binding proteins of the Rab family by p34cdc2. *Nature*, 350(6320), 715-718. <https://doi.org/10.1038/350715a0>
- Bajorek, M., Morita, E., Skalicky, J. J., Morham, S. G., Babst, M., & Sundquist, W. I. (2009). Biochemical analyses of human IST1 and its function in cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 20(5), 1360-1373. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-05-0475>
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., & McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(18), 10037-10041. <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398>
- Barr, F., & Lambright, D. G. (2010). Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol*, 22(4), 461-470. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.04.007>

- Behrendorff, N., Dolai, S., Hong, W., Gaisano, H. Y., & Thorn, P. (2011). Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8) is a SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) selectively required for sequential granule-to-granule fusion. *J Biol Chem*, 286(34), 29627-29634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.265199>
- Bell, K. S., Al-Riyami, L., Lumb, F. E., Britton, G. J., Poole, A. W., Williams, C. M., . . . Harnett, W. (2015). The role of individual protein kinase C isoforms in mouse mast cell function and their targeting by the immunomodulatory parasitic worm product, ES-62. *Immunol Lett*, 168(1), 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.09.001>
- Bell, R. M., & Burns, D. J. (1991). Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem*, 266(8), 4661-4664.
- Biernat, J., Wu, Y. Z., Timm, T., Zheng-Fischhöfer, Q., Mandelkow, E., Meijer, L., & Mandelkow, E. M. (2002). Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell*, 13(11), 4013-4028. <https://doi.org/10.1091/mbc.02-03-0046>
- Bill, C. A., & Vines, C. M. (2020). Phospholipase C. *Adv Exp Med Biol*, 1131, 215-242. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_9
- Birmingham, K. (1999). A nobel for Blobel. *Nat Med*, 5(11), 1230. <https://doi.org/10.1038/15177>
- Blank, U., Huang, H., & Kawakami, T. (2021). The high affinity IgE receptor: a signaling update. *Curr Opin Immunol*, 72, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.03.015>
- Blobel, G., & Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol*, 67(3), 852-862. <https://doi.org/10.1083/jcb.67.3.852>
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116(2), 153-166. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01079-1)
- Boschert, U., O'Shaughnessy, C., Dickinson, R., Tessari, M., Bendotti, C., Catsicas, S., & Pich, E. M. (1996). Developmental and plasticity-related differential expression of two SNAP-25 isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*, 367(2), 177-193. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19960401\)367:2<177::aid-cne2>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19960401)367:2<177::aid-cne2>3.0.co;2-2)
- Bourke, A. M., Bowen, A. B., & Kennedy, M. J. (2018). New approaches for solving old problems in neuronal protein trafficking. *Mol Cell Neurosci*, 91, 48-66. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.04.004>
- Brozzi, F., Diraison, F., Lajus, S., Rajatileka, S., Philips, T., Regazzi, R., . . . Varadi, A. (2012). Molecular mechanism of myosin Va recruitment to dense core secretory granules. *Traffic*, 13(1), 54-69. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01301.x>
- Brozzi, F., Lajus, S., Diraison, F., Rajatileka, S., Hayward, K., Regazzi, R., . . . Váradi, A. (2012). MyRIP interaction with MyoVa on secretory granules is controlled by the cAMP-PKA pathway. *Mol Biol Cell*, 23(22), 4444-4455. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-05-0369>

- Brunger, A. T., Choi, U. B., Lai, Y., Leitz, J., White, K. I., & Zhou, Q. (2019). The pre-synaptic fusion machinery. *Curr Opin Struct Biol*, 54, 179-188. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.007>
- Brunger, A. T., Leitz, J., Zhou, Q., Choi, U. B., & Lai, Y. (2018). Ca²⁺-Triggered Synaptic Vesicle Fusion Initiated by Release of Inhibition. *Trends Cell Biol*, 28(8), 631-645. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.03.004>
- Brunger, A. T., Weninger, K., Bowen, M., & Chu, S. (2009). Single-molecule studies of the neuronal SNARE fusion machinery. *Annu Rev Biochem*, 78, 903-928. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.070306.103621>
- Bultema, J. J., & Di Pietro, S. M. (2013). Cell type-specific Rab32 and Rab38 cooperate with the ubiquitous lysosome biogenesis machinery to synthesize specialized lysosome-related organelles. *Small GTPases*, 4(1), 16-21. <https://doi.org/10.4161/sqtp.22349>
- Burke, J. E. (2018). Structural Basis for Regulation of Phosphoinositide Kinases and Their Involvement in Human Disease. *Mol Cell*, 71(5), 653-673. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.005>
- Burkhard, P., Stetefeld, J., & Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol*, 11(2), 82-88. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)01898-5](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01898-5)
- Burns, M. E., Sasaki, T., Takai, Y., & Augustine, G. J. (1998). Rabphilin-3A: a multifunctional regulator of synaptic vesicle traffic. *J Gen Physiol*, 111(2), 243-255.
- Cai, H., Reinisch, K., & Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell*, 12(5), 671-682. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.04.005>
- Cai, L., Fritz, D., Stefanovic, L., & Stefanovic, B. (2010). Nonmuscle myosin-dependent synthesis of type I collagen. *J Mol Biol*, 401(4), 564-578. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.06.057>
- Caviston, J. P., Zajac, A. L., Tokito, M., & Holzbaur, E. L. (2011). Huntingtin coordinates the dynein-mediated dynamic positioning of endosomes and lysosomes. *Mol Biol Cell*, 22(4), 478-492. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0233>
- Chang, E. Y., Szallasi, Z., Acs, P., Raizada, V., Wolfe, P. C., Fewtrell, C., . . . Rivera, J. (1997). Functional effects of overexpression of protein kinase C- α , - β , - δ , - ϵ , and - η in the mast cell line RBL-2H3. *J Immunol*, 159(6), 2624-2632.
- Chang, S., Trimbuch, T., & Rosenmund, C. (2018). Synaptotagmin-1 drives synchronous Ca²⁺-triggered fusion by C(2)B-domain-mediated synaptic-vesicle-membrane attachment. *Nat Neurosci*, 21(1), 33-40. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0037-5>
- Cheerathodi, M. R., & Meckes, D. G., Jr. (2020). BioID Combined with Mass Spectrometry to Study Herpesvirus Protein-Protein Interaction Networks. *Methods Mol Biol*, 2060, 327-341. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9814-2_19
- Chen, R. H. C., Wislet-Gendebien, S., Samuel, F., Visanji, N. P., Zhang, G., Marsilio, D., . . . Tandon, A. (2013). α -Synuclein membrane association is

- regulated by the Rab3a recycling machinery and presynaptic activity. *J Biol Chem*, 288(11), 7438-7449. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.439497>
- Chen, Y. A., & Scheller, R. H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 98-106. <https://doi.org/10.1038/35052017>
- Chen, Y. A., & Scheller, R. H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 98-106.
- Chen, Y. Q., Kuo, M. S., Li, S., Bui, H. H., Peake, D. A., Sanders, P. E., . . . Cao, G. (2008). AGPAT6 is a novel microsomal glycerol-3-phosphate acyltransferase. *J Biol Chem*, 283(15), 10048-10057. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708151200>
- Cheng, H., Dufu, K., Lee, C. S., Hsu, J. L., Dias, A., & Reed, R. (2006). Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell*, 127(7), 1389-1400. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.044>
- Chia, P. Z., Gasnereau, I., Lieu, Z. Z., & Gleeson, P. A. (2011). Rab9-dependent retrograde transport and endosomal sorting of the endopeptidase furin. *J Cell Sci*, 124(Pt 14), 2401-2413. <https://doi.org/10.1242/jcs.083782>
- Cho, W., & Stahelin, R. V. (2006). Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. In *Biochim Biophys Acta* (Vol. 1761, pp. 838-849). <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2006.06.014>
- Choudhry, H., Aggarwal, M., & Pan, P. Y. (2021). Mini-review: Synaptojanin 1 and its implications in membrane trafficking. *Neurosci Lett*, 765, 136288. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136288>
- Chruewkamlow, N., Pata, S., Mahasongkram, K., Laopajon, W., Kasinrerak, W., & Chiampanichayakul, S. (2015). $\beta 3$ subunit of Na,K ATPase regulates T cell activation with no involvement of Na,K ATPase activity. *Immunobiology*, 220(5), 634-640. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.11.017>
- Chung, S. H., Takai, Y., & Holz, R. W. (1995). Evidence that the Rab3a-binding protein, rabphilin3a, enhances regulated secretion. Studies in adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem*, 270(28), 16714-16718. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.28.16714>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Claussion, C. M., Arngården, L., Ishaq, O., Klaesson, A., Kühnemund, M., Grannas, K., . . . Söderberg, O. (2015). Compaction of rolling circle amplification products increases signal integrity and signal-to-noise ratio. *Sci Rep*, 5, 12317. <https://doi.org/10.1038/srep12317>
- Clerici, M., Luna-Vargas, M. P., Faesen, A. C., & Sixma, T. K. (2014). The DUSP-Ubl domain of USP4 enhances its catalytic efficiency by promoting ubiquitin exchange. *Nat Commun*, 5, 5399. <https://doi.org/10.1038/ncomms6399>
- Conesa-Zamora, P., Gómez-Fernández, J. C., & Corbalán-García, S. (2000). The C2 domain of protein kinase calpha is directly involved in the diacylglycerol-dependent binding of the C1 domain to the membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1487(2-3), 246-254. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00099-8](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00099-8)
- Conesa-Zamora, P., Lopez-Andreo, M. J., Gómez-Fernández, J. C., & Corbalán-García, S. (2001). Identification of the phosphatidylserine binding site in

- the C2 domain that is important for PKC alpha activation and in vivo cell localization. *Biochemistry*, 40(46), 13898-13905. <https://doi.org/10.1021/bi011303o>
- Coppola, T., Frantz, C., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Hirling, H., & Regazzi, R. (2002). Pancreatic beta-cell protein granuphilin binds Rab3 and Munc-18 and controls exocytosis. *Mol Biol Cell*, 13(6), 1906-1915. <https://doi.org/10.1091/mbc.02-02-0025>
- Coppola, T., Hirling, H., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Catsicas, S., Joberty, G., . . . Regazzi, R. (2001). Rabphilin dissociated from Rab3 promotes endocytosis through interaction with Rabaptin-5. *J Cell Sci*, 114(Pt 9), 1757-1764.
- Corbalan-Garcia, S., & Gomez-Fernandez, J. C. (2014). Signaling through C2 domains: more than one lipid target. *Biochim Biophys Acta*, 1838(6), 1536-1547. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.008>
- Corbalán-García, S., Sánchez-Carrillo, S., García-García, J., & Gómez-Fernández, J. C. (2003). Characterization of the membrane binding mode of the C2 domain of PKC epsilon. *Biochemistry*, 42(40), 11661-11668. <https://doi.org/10.1021/bi034850d>
- Corbalán-García, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2006). Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1761(7), 633-654. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2006.04.015>
- Corbalán-García, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2010). The C2 domains of classical and novel PKCs as versatile decoders of membrane signals. *Biofactors*, 36(1), 1-7. <https://doi.org/10.1002/biof.68>
- Courtney, N. A., Bao, H., Briguglio, J. S., & Chapman, E. R. (2019). Synaptotagmin 1 clamps synaptic vesicle fusion in mammalian neurons independent of complexin. *Nat Commun*, 10(1), 4076. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12015-w>
- Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, 26(12), 1367-1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. A., Olsen, J. V., & Mann, M. (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res*, 10(4), 1794-1805. <https://doi.org/10.1021/pr101065j>
- Crepaldi, L., Policarpi, C., Coatti, A., Sherlock, W. T., Jongbloets, B. C., Down, T. A., & Riccio, A. (2013). Binding of TFIIC to sine elements controls the relocation of activity-dependent neuronal genes to transcription factories. *PLoS Genet*, 9(8), e1003699. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003699>
- Czech, M. P. (2000). PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell*, 100(6), 603-606. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80696-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80696-0)
- da Silva, E. Z., Jamur, M. C., & Oliver, C. (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem*, 62(10), 698-738. <https://doi.org/10.1369/0022155414545334>

- Dacks, J. B., & Field, M. C. (2018). Evolutionary origins and specialisation of membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, 53, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.06.001>
- Dai, H., Tomchick, D. R., Garcia, J., Sudhof, T. C., Machius, M., & Rizo, J. (2005). Crystal structure of the RIM2 C2A-domain at 1.4 Å resolution. *Biochemistry*, 44(41), 13533-13542. <https://doi.org/10.1021/bi0513608>
- Dalfó, E., Barrachina, M., Rosa, J. L., Ambrosio, S., & Ferrer, I. (2004). Abnormal alpha-synuclein interactions with rab3a and rabphilin in diffuse Lewy body disease. *Neurobiol Dis*, 16(1), 92-97. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.01.001>
- de Renzis, S., Sönnichsen, B., & Zerial, M. (2002). Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. *Nat Cell Biol*, 4(2), 124-133. <https://doi.org/10.1038/ncb744>
- Deak, F., Shin, O. H., Tang, J., Hanson, P., Ubach, J., Jahn, R., . . . Sudhof, T. C. (2006). Rabphilin regulates SNARE-dependent re-priming of synaptic vesicles for fusion. *Embo j*, 25(12), 2856-2866. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601165>
- Dejgaard, S. Y., & Presley, J. F. (2019). Rab18: new insights into the function of an essential protein. *Cell Mol Life Sci*, 76(10), 1935-1945. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03050-3>
- Dekker, L. V., & Parker, P. J. (1994). Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci*, 19(2), 73-77. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90038-8)
- Deo, D. D., Bazan, N. G., & Hunt, J. D. (2004). Lipid Second Messengers and Receptors. In L. Martini (Ed.), *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (pp. 182-187). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-475570-4/00825-8>
- Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., & Baker, N. A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res*, 32(Web Server issue), W665-667. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh381>
- Doyotte, A., Mironov, A., McKenzie, E., & Woodman, P. (2008). The Bro1-related protein HD-PTP/PTPN23 is required for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(17), 6308-6313. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707601105>
- Dugani, C. B., & Klip, A. (2005). Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep*, 6(12), 1137-1142. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400584>
- Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>
- Eathiraj, S., Pan, X., Ritacco, C., & Lambright, D. G. (2005). Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature*, 436(7049), 415-419. <https://doi.org/10.1038/nature03798>
- Efron, B., & Narasimhan, B. (2020). The automatic construction of bootstrap confidence intervals. *J Comput Graph Stat*, 29(3), 608-619. <https://doi.org/10.1080/10618600.2020.1714633>

- Egea-Jiménez, A. L., Corbalán-García, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2014). The C1B domains of novel PKC ϵ and PKC η have a higher membrane binding affinity than those of the also novel PKC δ and PKC θ . *Biochim Biophys Acta*, 1838(7), 1898-1909. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.04.003>
- Ehrenreich, J. H., Bergeron, J. J., Siekevitz, P., & Palade, G. E. (1973). Golgi fractions prepared from rat liver homogenates. I. Isolation procedure and morphological characterization. *J Cell Biol*, 59(1), 45-72. <https://doi.org/10.1083/jcb.59.1.45>
- Eisenberg-Bord, M., Shai, N., Schuldiner, M., & Bohnert, M. (2016). A Tether Is a Tether Is a Tether: Tethering at Membrane Contact Sites. *Dev Cell*, 39(4), 395-409. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.10.022>
- Engelender, S., Sharp, A. H., Colomer, V., Tokito, M. K., Lanahan, A., Worley, P., . . . Ross, C. A. (1997). Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum Mol Genet*, 6(13), 2205-2212. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.13.2205>
- Erickson, J. D., & Eiden, L. E. (1993). Functional identification and molecular cloning of a human brain vesicle monoamine transporter. *J Neurochem*, 61(6), 2314-2317. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb07476.x>
- Erickson, J. D., Schafer, M. K., Bonner, T. I., Eiden, L. E., & Weihe, E. (1996). Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(10), 5166-5171. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.5166>
- Falcone, F. H., Wan, D., Barway, N., & Sagi-Eisenberg, R. (2018). RBL cells as models for in vitro studies of mast cells and basophils. *Immunol Rev*, 282(1), 47-57. <https://doi.org/10.1111/imr.12628>
- Fantini, J., & Yahi, N. (2015). Chapter 3 - Lipid Metabolism and Oxidation in Neurons and Glial Cells. In J. Fantini & N. Yahi (Eds.), *Brain Lipids in Synaptic Function and Neurological Disease* (pp. 53-85). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800111-0.00003-5>
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., & Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(26), 15781-15786. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15781>
- Fernandez, I., Arac, D., Ubach, J., Gerber, S. H., Shin, O., Gao, Y., . . . Rizo, J. (2001). Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. In *Neuron* (Vol. 32, pp. 1057-1069).
- Fernández-Chacón, R., Königstorfer, A., Gerber, S. H., García, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., . . . Südhof, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, 410(6824), 41-49. <https://doi.org/10.1038/35065004>
- Ferrer-Orta, C., Pérez-Sánchez, M. D., Coronado-Parra, T., Silva, C., López-Martínez, D., Baltanás-Copado, J., . . . Verdaguer, N. (2017). Structural characterization of the Rabphilin-3A-SNAP25 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(27), E5343-e5351. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702542114>

- Foletti, D. L., Blitzer, J. T., & Scheller, R. H. (2001). Physiological modulation of rabphilin phosphorylation. *J Neurosci*, 21(15), 5473-5483. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-15-05473.2001>
- Fréchette, L., Binda, C., Génier, S., Degrandmaison, J., Boisvert, M., & Parent, J. L. (2020). GGA3 interacts with L-type prostaglandin D synthase and regulates the recycling and signaling of the DP1 receptor for prostaglandin D(2) in a Rab4-dependent mechanism. *Cell Signal*, 72, 109641. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109641>
- Fukuda, M. (2003). Distinct Rab binding specificity of Rim1, Rim2, rabphilin, and Noc2. Identification of a critical determinant of Rab3A/Rab27A recognition by Rim2. *J Biol Chem*, 278(17), 15373-15380. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212341200>
- Fukuda, M. (2008). Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci*, 65(18), 2801-2813. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8351-4>
- Fukuda, M., Kanno, E., & Yamamoto, A. (2004). Rabphilin and Noc2 are recruited to dense-core vesicles through specific interaction with Rab27A in PC12 cells. *J Biol Chem*, 279(13), 13065-13075. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306812200>
- Fukuda, R., McNew, J. A., Weber, T., Parlati, F., Engel, T., Nickel, W., . . . Söllner, T. H. (2000). Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE. *Nature*, 407(6801), 198-202. <https://doi.org/10.1038/35025084>
- Fykse, E. M., Li, C., & Sudhof, T. C. (1995). Phosphorylation of rabphilin-3A by Ca²⁺/calmodulin- and cAMP-dependent protein kinases in vitro. *J Neurosci*, 15(3 Pt 2), 2385-2395.
- Gaffaney, J. D., Xue, R., & Chapman, E. R. (2014). Mutations that disrupt Ca²⁺-binding activity endow Doc2 β with novel functional properties during synaptic transmission. *Mol Biol Cell*, 25(4), 481-494. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-10-0571>
- Galli, S. J., Nakae, S., & Tsai, M. (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 6(2), 135-142. <https://doi.org/10.1038/ni1158>
- Galli, S. J., & Tsai, M. (2010). Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol*, 40(7), 1843-1851. <https://doi.org/10.1002/eji.201040559>
- Gallo, A., Danglot, L., Giordano, F., Hewlett, B., Binz, T., Vannier, C., & Galli, T. (2020). Role of the Sec22b-E-Syt complex in neurite growth and ramification. *J Cell Sci*, 133(18). <https://doi.org/10.1242/jcs.247148>
- Gallo, A., Vannier, C., & Galli, T. (2016). Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Associations: Structures and Functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 32, 279-301. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125024>
- Gammons, J., Halpage, J., & Mancarella, S. (2021). Mapping the Proximity Interaction Network of STIM1 Reveals New Mechanisms of Cytoskeletal Regulation. *Cells*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/cells10102701>
- Gao, J., Hirata, M., Mizokami, A., Zhao, J., Takahashi, I., & Takeuchi, H. (2016). Differential role of SNAP-25 phosphorylation by protein kinases A and C in the regulation of SNARE complex formation and exocytosis in PC12

- cells. *Cell Signal*, 28(5), 425-437.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.12.014>
- García-Faroldi, G., Melo, F. R., Rönnberg, E., Grujic, M., & Pejler, G. (2013). Active caspase-3 is stored within secretory compartments of viable mast cells. *J Immunol*, 191(3), 1445-1452.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300216>
- García-García, J., Gómez-Fernández, J. C., & Corbalán-García, S. (2001). Structural characterization of the C2 domain of novel protein kinase Cepsilon. *Eur J Biochem*, 268(4), 1107-1117.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.2680041107.x>
- Gardner, M. J., & Altman, D. G. (1986). Confidence intervals rather than P values: estimation rather than hypothesis testing. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 292(6522), 746-750. <https://doi.org/10.1136/bmj.292.6522.746>
- Gatta, A. T., & Levine, T. P. (2017). Piecing Together the Patchwork of Contact Sites. *Trends Cell Biol*, 27(3), 214-229.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.010>
- Gentz, R., Rauscher, F. J., 3rd, Abate, C., & Curran, T. (1989). Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science*, 243(4899), 1695-1699.
<https://doi.org/10.1126/science.2494702>
- 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.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90556-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90556-8)
- Gerth, F., Jäpel, M., Pechstein, A., Kochlamazashvili, G., Lehmann, M., Puchkov, D., . . . Haucke, V. (2017). Intersectin associates with synapsin and regulates its nanoscale localization and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(45), 12057-12062. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715341114>
- Gibieža, P., & Petrikaitė, V. (2021). The dual functions of Rab11 and Rab35 GTPases-regulation of cell division and promotion of tumorigenicity. *Am J Cancer Res*, 11(5), 1861-1872.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., 3rd, & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 6(5), 343-345.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Gillingham, A. K., Sinka, R., Torres, I. L., Lilley, K. S., & Munro, S. (2014). Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases. *Dev Cell*, 31(3), 358-373. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.10.007>
- Gingras, A. C., Abe, K. T., & Raught, B. (2019). Getting to know the neighborhood: using proximity-dependent biotinylation to characterize protein complexes and map organelles. *Curr Opin Chem Biol*, 48, 44-54.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.017>
- Giovannone, A. J., Winterstein, C., Bhattaram, P., Reales, E., Low, S. H., Baggs, J. E., . . . Weimbs, T. (2018). Soluble syntaxin 3 functions as a transcriptional regulator. *J Biol Chem*, 293(15), 5478-5491.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000874>
- Goedert, M. (2015). NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -

- synuclein. *Science*, 349(6248), 1255555. <https://doi.org/10.1126/science.1255555>
- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2015). A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell*, 161(1), 161-172. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.036>
- Gong, L. W., Di Paolo, G., Diaz, E., Cestra, G., Diaz, M. E., Lindau, M., . . . Toomre, D. (2005). Phosphatidylinositol phosphate kinase type I gamma regulates dynamics of large dense-core vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(14), 5204-5209. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501412102>
- Goody, R. S., Rak, A., & Alexandrov, K. (2005). The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments. *Cell Mol Life Sci*, 62(15), 1657-1670. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-4486-8>
- Greaves, J., Gorleku, O. A., Salaun, C., & Chamberlain, L. H. (2010). Palmitoylation of the SNAP25 protein family: specificity and regulation by DHHC palmitoyl transferases. *J Biol Chem*, 285(32), 24629-24638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.119289>
- Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(7), 2424-2428. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2424>
- Grosdidier, A., Zoete, V., & Michielin, O. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res*, 39(Web Server issue), W270-277. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr366>
- Gudimchuk, N. B., & McIntosh, J. R. (2021). Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22(12), 777-795. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00399-x>
- Guerra, F., & Bucci, C. (2016). Multiple Roles of the Small GTPase Rab7. *Cells*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/cells5030034>
- Guerrero-Valero, M., Ferrer-Orta, C., Querol-Audi, J., Marin-Vicente, C., Fita, I., Gomez-Fernandez, J. C., . . . Corbalan-Garcia, S. (2009). Structural and mechanistic insights into the association of PKC α -C2 domain to PtdIns(4,5)P₂. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (Vol. 106, pp. 6603-6607). <https://doi.org/10.1073/pnas.0813099106>
- Guillen, J., Ferrer-Orta, C., Buxaderas, M., Perez-Sanchez, D., Guerrero-Valero, M., Luengo-Gil, G., . . . Corbalan-Garcia, S. (2013). Structural insights into the Ca²⁺ and PI(4,5)P₂ binding modes of the C2 domains of rabphilin 3A and synaptotagmin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(51), 20503-20508. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316179110>
- Gunning, P. W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., & Robinson, R. C. (2015). The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J Cell Sci*, 128(11), 2009-2019. <https://doi.org/10.1242/jcs.165563>
- Gómez-Fernández, J. C., & Corbalán-García, S. (2007). Diacylglycerols, multivalent membrane modulators. *Chem Phys Lipids*, 148(1), 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.04.003>
- Hall, C., Lim, L., & Leung, T. (2005). C1, see them all. *Trends Biochem Sci*, 30(4), 169-171. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.02.003>

- Hamilton, P. J., Belovich, A. N., Khelashvili, G., Saunders, C., Erreger, K., Javitch, J. A., . . . Galli, A. (2014). PIP2 regulates psychostimulant behaviors through its interaction with a membrane protein. *Nat Chem Biol*, *10*(7), 582-589. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1545>
- Hammond, G. R. V., & Burke, J. E. (2020). Novel roles of phosphoinositides in signaling, lipid transport, and disease. *Curr Opin Cell Biol*, *63*, 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.12.007>
- Hanley, P. J., Vollmer, V., & Bähler, M. (2020). Class IX Myosins: Motorized RhoGAP Signaling Molecules. *Adv Exp Med Biol*, *1239*, 381-389. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38062-5_16
- Hardies, K., Cai, Y., Jardel, C., Jansen, A. C., Cao, M., May, P., . . . Weckhuysen, S. (2016). Loss of SYNJ1 dual phosphatase activity leads to early onset refractory seizures and progressive neurological decline. *Brain*, *139*(Pt 9), 2420-2430. <https://doi.org/10.1093/brain/aww180>
- Hay, J. C., Chao, D. S., Kuo, C. S., & Scheller, R. H. (1997). Protein interactions regulating vesicle transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in mammalian cells. *Cell*, *89*(1), 149-158. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80191-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80191-9)
- Hegde, R. S., & Keenan, R. J. (2021). The mechanisms of integral membrane protein biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00413-2>
- Hendrickson, S. L., Lautenberger, J. A., Chinn, L. W., Malasky, M., Sezgin, E., Kingsley, L. A., . . . O'Brien, S. J. (2010). Genetic variants in nuclear-encoded mitochondrial genes influence AIDS progression. *PLoS One*, *5*(9), e12862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012862>
- Hepp, R., Puri, N., Hohenstein, A. C., Crawford, G. L., Whiteheart, S. W., & Roche, P. A. (2005). Phosphorylation of SNAP-23 regulates exocytosis from mast cells. *J Biol Chem*, *280*(8), 6610-6620. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412126200>
- Hewlett, B., Singh, N. P., Vannier, C., & Galli, T. (2021). ER-PM Contact Sites - SNARING Actors in Emerging Functions. *Front Cell Dev Biol*, *9*, 635518. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.635518>
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., & Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(10), 682-696. <https://doi.org/10.1038/nrm2774>
- Hirose, H., Arasaki, K., Dohmae, N., Takio, K., Hatsuzawa, K., Nagahama, M., . . . Tagaya, M. (2004). Implication of ZW10 in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *Embo j*, *23*(6), 1267-1278. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600135>
- Hitomi, T., Zhang, J., Nicoletti, L. M., Grodzki, A. C., Jamur, M. C., Oliver, C., & Siraganian, R. P. (2004). Phospholipase D1 regulates high-affinity IgE receptor-induced mast cell degranulation. *Blood*, *104*(13), 4122-4128. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2091>
- Ho, J., Tumkaya, T., Aryal, S., Choi, H., & Claridge-Chang, A. (2019). Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics. *Nature Methods*, *16*, 565-566. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0470-3>
- Hodgkin, M. N., Pettitt, T. R., Martin, A., Michell, R. H., Pemberton, A. J., & Wakelam, M. J. (1998). Diacylglycerols and phosphatidates: which

- molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem Sci*, 23(6), 200-204. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01200-6](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01200-6)
- Hofherr, A., Seger, C., Fitzpatrick, F., Busch, T., Michel, E., Luan, J., . . . Köttgen, M. (2018). The mitochondrial transporter SLC25A25 links ciliary TRPP2 signaling and cellular metabolism. *PLoS Biol*, 16(8), e2005651. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005651>
- Homma, Y., Hiragi, S., & Fukuda, M. (2021). Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *Febs j*, 288(1), 36-55. <https://doi.org/10.1111/febs.15453>
- Horgan, C. P., Hanscom, S. R., Jolly, R. S., Futter, C. E., & McCaffrey, M. W. (2010). Rab11-FIP3 links the Rab11 GTPase and cytoplasmic dynein to mediate transport to the endosomal-recycling compartment. *J Cell Sci*, 123(Pt 2), 181-191. <https://doi.org/10.1242/jcs.052670>
- Horgan, C. P., & McCaffrey, M. W. (2011). Rab GTPases and microtubule motors. *Biochem Soc Trans*, 39(5), 1202-1206. <https://doi.org/10.1042/bst0391202>
- Hornbeck, P. V., Kornhauser, J. M., Latham, V., Murray, B., Nandhikonda, V., Nord, A., . . . Gnad, F. (2019). 15 years of PhosphoSitePlus®: integrating post-translationally modified sites, disease variants and isoforms. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D433-d441. <https://doi.org/10.1093/nar/qky1159>
- Horváth, D., Tamás, I., Sipos, A., Darula, Z., Bécsi, B., Nagy, D., . . . Lontay, B. (2017). Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate neurotransmitter release by regulating SNAP-25 of SNARE complex. *PLoS One*, 12(5), e0177046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177046>
- Hoshino, A., Helwig, M., Rezaei, S., Berridge, C., Eriksen, J. L., & Lindberg, I. (2014). A novel function for proSAAS as an amyloid anti-aggregant in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 128(3), 419-430. <https://doi.org/10.1111/jnc.12454>
- Houdusse, A., & Titus, M. A. (2021). The many roles of myosins in filopodia, microvilli and stereocilia. *Curr Biol*, 31(10), R586-r602. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.005>
- Hsu, K. S., Otsu, W., Li, Y., Wang, H. C., Chen, S., Tsang, S. H., . . . Sung, C. H. (2019). CLIC4 regulates late endosomal trafficking and matrix degradation activity of MMP14 at focal adhesions in RPE cells. *Sci Rep*, 9(1), 12247. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48438-0>
- Hsu, S. C., TerBush, D., Abraham, M., & Guo, W. (2004). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Int Rev Cytol*, 233, 243-265. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(04\)33006-8](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(04)33006-8)
- Hu, C. D., & Kerppola, T. K. (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol*, 21(5), 539-545. <https://doi.org/10.1038/nbt816>
- Huang, K. P. (1989). The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci*, 12(11), 425-432. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90091-x](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90091-x)
- Hughson, F. M., & Reinisch, K. M. (2010). Structure and mechanism in membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol*, 22(4), 454-460. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.03.011>

- Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev*, 91(1), 119-149. <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009>
- Huttlin, E. L., Bruckner, R. J., Navarrete-Perea, J., Cannon, J. R., Baltier, K., Gebreab, F., . . . Gygi, S. P. (2021). Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell*, 184(11), 3022-3040.e3028. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.011>
- Huttlin, E. L., Bruckner, R. J., Paulo, J. A., Cannon, J. R., Ting, L., Baltier, K., . . . Harper, J. W. (2017). Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature*, 545(7655), 505-509. <https://doi.org/10.1038/nature22366>
- Imig, C., Min, S. W., Krinner, S., Arancillo, M., Rosenmund, C., Südhof, T. C., . . . Cooper, B. H. (2014). The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones. *Neuron*, 84(2), 416-431. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.10.009>
- Inoue, M., Chiang, S. H., Chang, L., Chen, X. W., & Saltiel, A. R. (2006). Compartmentalization of the exocyst complex in lipid rafts controls Glut4 vesicle tethering. *Mol Biol Cell*, 17(5), 2303-2311. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-01-0030>
- Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold, R., & Drummen, G. P. (2012). Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*, 17(4), 4047-4132. <https://doi.org/10.3390/molecules17044047>
- Iwama, S., Sugimura, Y., Kiyota, A., Kato, T., Enomoto, A., Suzuki, H., . . . Oiso, Y. (2015). Rabphilin-3A as a Targeted Autoantigen in Lymphocytic Infundibulo-neurohypophysitis. *J Clin Endocrinol Metab*, 100(7), E946-954. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-4209>
- Izumi, T., Gomi, H., Kasai, K., Mizutani, S., & Torii, S. (2003). The roles of Rab27 and its effectors in the regulated secretory pathways. *Cell Struct Funct*, 28(5), 465-474. <https://doi.org/10.1247/csf.28.465>
- Jahn, R., & Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. In *Nature* (Vol. 490, pp. 201-207). <https://doi.org/10.1038/nature11320>
- Jahn, R., & Scheller, R. H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. In *Nat Rev Mol Cell Biol* (Vol. 7, pp. 631-643). <https://doi.org/10.1038/nrm2002>
- Jang, J. H., Lee, C. S., Hwang, D., & Ryu, S. H. (2012). Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog Lipid Res*, 51(2), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.003>
- Jimenez, A. J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., & Perez, F. (2014). ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*, 343(6174), 1247136. <https://doi.org/10.1126/science.1247136>
- Jing, J., He, L., Sun, A., Quintana, A., Ding, Y., Ma, G., . . . Zhou, Y. (2015). Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca²⁺ influx. *Nat Cell Biol*, 17(10), 1339-1347. <https://doi.org/10.1038/ncb3234>

- Jose Lopez-Andreo, M., Gomez-Fernandez, J. C., & Corbalan-Garcia, S. (2003). The simultaneous production of phosphatidic acid and diacylglycerol is essential for the translocation of protein kinase Cepsilon to the plasma membrane in RBL-2H3 cells. *Mol Biol Cell*, 14(12), 4885-4895. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-05-0295>
- Kapitein, L. C., & Hoogenraad, C. C. (2015). Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron*, 87(3), 492-506. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.046>
- Karim, Z. A., Zhang, J., Banerjee, M., Chicka, M. C., Al Hawas, R., Hamilton, T. R., . . . Whiteheart, S. W. (2013). IκB kinase phosphorylation of SNAP-23 controls platelet secretion. *Blood*, 121(22), 4567-4574. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-470468>
- Karlsson, M., Zhang, C., Méar, L., Zhong, W., Digre, A., Katona, B., . . . Lindskog, C. (2021). A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv*, 7(31). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh2169>
- Karniguian, A., Zahraoui, A., & Tavitian, A. (1993). Identification of small GTP-binding rab proteins in human platelets: thrombin-induced phosphorylation of rab3B, rab6, and rab8 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(16), 7647-7651. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.16.7647>
- Kato, M., Sasaki, T., Ohya, T., Nakanishi, H., Nishioka, H., Imamura, M., & Takai, Y. (1996). Physical and functional interaction of rabphilin-3A with alpha-actinin. *J Biol Chem*, 271(50), 31775-31778.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, 10(6), 845-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Khidr, L., Wu, G., Davila, A., Procaccio, V., Wallace, D., & Lee, W. H. (2008). Role of SUV3 helicase in maintaining mitochondrial homeostasis in human cells. *J Biol Chem*, 283(40), 27064-27073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802991200>
- Kienle, N., Kloepper, T. H., & Fasshauer, D. (2009). Differences in the SNARE evolution of fungi and metazoa. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 4), 787-791. <https://doi.org/10.1042/bst0370787>
- Kim, D. I., Birendra, K. C., Zhu, W., Motamedchaboki, K., Doye, V., & Roux, K. J. (2014). Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(24), E2453-2461. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406459111>
- Kim, D. I., Jensen, S. C., Noble, K. A., Kc, B., Roux, K. H., Motamedchaboki, K., & Roux, K. J. (2016). An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol Biol Cell*, 27(8), 1188-1196. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-12-0844>
- Kim, S. C., & Wang, X. (2020). Phosphatidic acid: an emerging versatile class of cellular mediators. *Essays Biochem*, 64(3), 533-546. <https://doi.org/10.1042/ebc20190089>
- Klim, J. R., Williams, L. A., Limone, F., Guerra San Juan, I., Davis-Dusenbery, B. N., Mordes, D. A., . . . Eggan, K. (2019). ALS-implicated protein TDP-43 sustains levels of STMN2, a mediator of motor neuron growth and repair. *Nat Neurosci*, 22(2), 167-179. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0300-4>

- Klumperman, J., & Pucadyil, T. (2021). Understanding membrane traffic from molecular ensemble, energetics, and the cell biology of participant components. *Curr Opin Cell Biol*, 71, iii-vi. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.06.001>
- Kobayashi, S., Kohda, T., Miyoshi, N., Kuroiwa, Y., Aisaka, K., Tsutsumi, O., . . . Ishino, F. (1997). Human PEG1/MEST, an imprinted gene on chromosome 7. *Hum Mol Genet*, 6(5), 781-786. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.5.781>
- Kobayashi, S., Koujin, T., Kojidani, T., Osakada, H., Mori, C., Hiraoka, Y., & Haraguchi, T. (2015). BAF is a cytosolic DNA sensor that leads to exogenous DNA avoiding autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(22), 7027-7032. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501235112>
- Kodama, Y., & Hu, C. D. (2010). An improved bimolecular fluorescence complementation assay with a high signal-to-noise ratio. *Biotechniques*, 49(5), 793-805. <https://doi.org/10.2144/000113519>
- Kodama, Y., & Hu, C. D. (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *Biotechniques*, 53(5), 285-298. <https://doi.org/10.2144/000113943>
- Koike, S., & Jahn, R. (2022). SNARE proteins: zip codes in vesicle targeting? *Biochem J*, 479(3), 273-288. <https://doi.org/10.1042/bcj20210719>
- Komuro, R., Sasaki, T., Orita, S., Maeda, M., & Takai, Y. (1996). Involvement of rabphilin-3A in Ca²⁺-dependent exocytosis from PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 219(2), 435-440. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0251>
- Konjikusic, M. J., Gray, R. S., & Wallingford, J. B. (2021). The developmental biology of kinesins. *Dev Biol*, 469, 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.09.009>
- Koos, B., Andersson, L., Clausson, C. M., Grannas, K., Klaesson, A., Cane, G., & Söderberg, O. (2014). Analysis of protein interactions in situ by proximity ligation assays. *Curr Top Microbiol Immunol*, 377, 111-126. https://doi.org/10.1007/82_2013_334
- Kraft, S., & Kinet, J. P. (2007). New developments in FcεpsilonRI regulation, function and inhibition. In *Nat Rev Immunol* (Vol. 7, pp. 365-378). <https://doi.org/10.1038/nri2072>
- Kremers, G. J., Goedhart, J., van Munster, E. B., & Gadella, T. W., Jr. (2006). Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius. *Biochemistry*, 45(21), 6570-6580. <https://doi.org/10.1021/bi0516273>
- Kuroda, T. S., & Fukuda, M. (2004). Rab27A-binding protein Slp2-a is required for peripheral melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes. *Nat Cell Biol*, 6(12), 1195-1203. <https://doi.org/10.1038/ncb1197>
- Kursula, P., Kursula, I., Massimi, M., Song, Y. H., Downer, J., Stanley, W. A., . . . Wilmanns, M. (2008). High-resolution structural analysis of mammalian profilin 2a complex formation with two physiological ligands: the formin homology 1 domain of mDia1 and the proline-rich domain of VASP. *J Mol Biol*, 375(1), 270-290. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.050>

- Kádková, A., Radecke, J., & Sørensen, J. B. (2019). The SNAP-25 Protein Family. *Neuroscience*, 420, 50-71. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.09.020>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lai, H. T., & Chiang, C. M. (2013). Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Assay for Direct Visualization of Protein-Protein Interaction in vivo. *Bio Protoc*, 3(20). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.935>
- Lambeth, J. D., & Ryu, S. H. (1996). Chapter 9 - Glycerolipids in signal transduction. In D. E. Vance & J. E. Vance (Eds.), *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 31, pp. 237-255). Elsevier. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60516-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60516-5)
- Landrette, S. F., Kuo, Y. H., Hensen, K., Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., Perrat, P. N., Van de Ven, W. J., . . . Castilla, L. H. (2005). Plag1 and Plagl2 are oncogenes that induce acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfb-MYH11. *Blood*, 105(7), 2900-2907. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3630>
- Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C., & Jahn, R. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo j*, 20(9), 2202-2213. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2202>
- Lee, A. S., Kranzusch, P. J., Doudna, J. A., & Cate, J. H. (2016). eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation. *Nature*, 536(7614), 96-99. <https://doi.org/10.1038/nature18954>
- Lee, C., & Goldberg, J. (2010). Structure of coatomer cage proteins and the relationship among COPI, COPII, and clathrin vesicle coats. *Cell*, 142(1), 123-132. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.030>
- Lee, H. K., Safieddine, S., Petralia, R. S., & Wenthold, R. J. (2002). Identification of a novel SNAP25 interacting protein (SIP30). *J Neurochem*, 81(6), 1338-1347. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00937.x>
- Lee, J. D., Huang, P. C., Lin, Y. C., Kao, L. S., Huang, C. C., Kao, F. J., . . . Yang, D. M. (2008). In-depth fluorescence lifetime imaging analysis revealing SNAP25A-Rabphilin 3A interactions. *Microsc Microanal*, 14(6), 507-518. <https://doi.org/10.1017/s1431927608080628>
- Lemmon, M. A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic*, 4(4), 201-213. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2004.00071.x>
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2), 99-111. <https://doi.org/10.1038/nrm2328>
- Lerman, J. C., Robblee, J., Fairman, R., & Hughson, F. M. (2000). Structural analysis of the neuronal SNARE protein syntaxin-1A. In *Biochemistry* (Vol. 39, pp. 8470-8479).
- Li, C., Takei, K., Geppert, M., Daniell, L., Stenius, K., Chapman, E. R., . . . Südhof, T. C. (1994). Synaptic targeting of rabphilin-3a, a synaptic vesicle Ca²⁺/phospholipid-binding protein, depends on Rab3A/Rab3C. *Neuron*, 13, 885-898.
- Li, D., Héroult, K., Zylbersztejn, K., Lauterbach, M. A., Guillon, M., Oheim, M., & Ropert, N. (2015). Astrocyte VAMP3 vesicles undergo Ca²⁺ -independent

- cycling and modulate glutamate transporter trafficking. *J Physiol*, 593(13), 2807-2832. <https://doi.org/10.1113/jp270362>
- Li, G., Lucas, J. J., & Gelfand, E. W. (2005). Protein kinase C alpha, beta1, and beta2 isozymes regulate cytokine production in mast cells through MEKK2/ERK5-dependent and -independent pathways. *Cell Immunol*, 238(1), 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.12.001>
- Li, L., Vorobyov, I., & Allen, T. W. (2013). The different interactions of lysine and arginine side chains with lipid membranes. *J Phys Chem B*, 117(40), 11906-11920. <https://doi.org/10.1021/jp405418y>
- Li, X. J., Li, S. H., Sharp, A. H., Nucifora, F. C., Jr., Schilling, G., Lanahan, A., . . . Ross, C. A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature*, 378(6555), 398-402. <https://doi.org/10.1038/378398a0>
- Lim, Y. S., Chua, C. E., & Tang, B. L. (2011). Rabs and other small GTPases in ciliary transport. *Biol Cell*, 103(5), 209-221. <https://doi.org/10.1042/bc20100150>
- Lin, Y. T., Chen, Y., Wu, G., & Lee, W. H. (2006). Hec1 sequentially recruits Zwint-1 and ZW10 to kinetochores for faithful chromosome segregation and spindle checkpoint control. *Oncogene*, 25(52), 6901-6914. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209687>
- Ling, K., Bairstow, S. F., Carbonara, C., Turbin, D. A., Huntsman, D. G., & Anderson, R. A. (2007). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase modulates adherens junction and E-cadherin trafficking via a direct interaction with mu 1B adaptin. *J Cell Biol*, 176(3), 343-353. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606023>
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., & Meyer, T. (2005). STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*, 15(13), 1235-1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>
- Liu, S., & Storrie, B. (2015). How Rab proteins determine Golgi structure. *Int Rev Cell Mol Biol*, 315, 1-22. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2014.12.002>
- Liu, Y., Su, Y., & Wang, X. (2013). Phosphatidic acid-mediated signaling. *Adv Exp Med Biol*, 991, 159-176. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6331-9_9
- Lou, X., & Shin, Y. K. (2016). SNARE zippering. *Biosci Rep*, 36(3). <https://doi.org/10.1042/bsr20160004>
- Lyon, A. M., & Tesmer, J. J. (2013). Structural insights into phospholipase C-β function. *Mol Pharmacol*, 84(4), 488-500. <https://doi.org/10.1124/mol.113.087403>
- Ma, C., Li, W., Xu, Y., & Rizo, J. (2011). Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nat Struct Mol Biol*, 18(5), 542-549. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2047>
- Malmersjö, S., Di Palma, S., Diao, J., Lai, Y., Pfuetzner, R. A., Wang, A. L., . . . Meyer, T. (2016). Phosphorylation of residues inside the SNARE complex suppresses secretory vesicle fusion. *EMBO J*, 35(16), 1810-1821. <https://doi.org/10.15252/embj.201694071>

- Martin, T. F. (2015). PI(4,5)P₂-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochim Biophys Acta*, 1851(6), 785-793. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2014.09.017>
- Martin, T. F., & Grishanin, R. N. (2003). PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. *Methods Cell Biol*, 71, 267-286. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(03\)01012-4](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(03)01012-4)
- Martinez-Arroyo, O., Ortega, A., Perez-Hernandez, J., Chaves, F. J., Redon, J., & Cortes, R. (2020). The Rab-Rabphilin system in injured human podocytes stressed by glucose overload and angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol*, 319(2), F178-f191. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00077.2020>
- Martiny-Baron, G., & Fabbro, D. (2007). Classical PKC isoforms in cancer. *Pharmacol Res*, 55(6), 477-486. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.04.001>
- Marín-Vicente, C., Nicolás, F. E., Gómez-Fernández, J. C., & Corbalán-García, S. (2008). The PtdIns(4,5)P₂ ligand itself influences the localization of PKC α in the plasma membrane of intact living cells. *J Mol Biol*, 377(4), 1038-1052. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.011>
- Matsui, Y., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Kondo, J., Teranishi, Y., & Takai, Y. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *Mol Cell Biol*, 10(8), 4116-4122. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.8.4116-4122.1990>
- Maximov, A., Tang, J., Yang, X., Pang, Z. P., & Sudhof, T. C. (2009). Complexin controls the force transfer from SNARE complexes to membranes in fusion. *Science*, 323(5913), 516-521. <https://doi.org/10.1126/science.1166505>
- May, D. G., & Roux, K. J. (2019). BiOID: A Method to Generate a History of Protein Associations. *Methods Mol Biol*, 2008, 83-95. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9537-0_7
- McKiernan, C. J., Stabila, P. F., & Macara, I. G. (1996). Role of the Rab3A-binding domain in targeting of rabphilin-3A to vesicle membranes of PC12 cells. *Mol Cell Biol*, 16(9), 4985-4995. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.9.4985>
- McLaughlin, S., & Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature*, 438(7068), 605-611. <https://doi.org/10.1038/nature04398>
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., & Murray, D. (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31, 151-175. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.31.082901.134259>
- McMahan, R. S., Birkland, T. P., Smigiel, K. S., Vandivort, T. C., Rohani, M. G., Manicone, A. M., . . . Parks, W. C. (2016). Stromelysin-2 (MMP10) Moderates Inflammation by Controlling Macrophage Activation. *J Immunol*, 197(3), 899-909. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600502>
- Mendez, M., & Gaisano, H. Y. (2013). Role of the SNARE protein SNAP23 on cAMP-stimulated renin release in mouse juxtaglomerular cells. *Am J*

- Physiol Renal Physiol*, 304(5), F498-504.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00556.2012>
- Metcalf, D. D., & Boyce, J. A. (2006). Mast cell biology in evolution. In *J Allergy Clin Immunol* (Vol. 117, pp. 1227-1229).
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.03.031>
- Meyer, T., & Oancea, E. (2000). Studies of signal transduction events using chimeras to green fluorescent protein. *Methods Enzymol*, 327, 500-513.
[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)27298-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)27298-4)
- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J. P., Lange, O., Wiegand, A., Makarov, A., . . . Horning, S. (2011). Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics*, 10(9), M111.011015.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011015>
- Milosevic, I., Sørensen, J. B., Lang, T., Krauss, M., Nagy, G., Haucke, V., . . . Neher, E. (2005). Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci*, 25(10), 2557-2565. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3761-04.2005>
- Min, S. W., Chang, W. P., & Südhof, T. C. (2007). E-Syts, a family of membranous Ca²⁺-sensor proteins with multiple C2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10), 3823-3828. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611725104>
- Mittelstaedt, T., Alvarez-Baron, E., & Schoch, S. (2010). RIM proteins and their role in synapse function. *Biological Chemistry*, 391(6), 599-606.
- Montaville, P., Coudeville, N., Radhakrishnan, A., Leonov, A., Zweckstetter, M., & Becker, S. (2008). The PIP₂ binding mode of the C2 domains of rabphilin-3A. *Protein Sci*, 17(6), 1025-1034.
<https://doi.org/10.1110/ps.073326608>
- Morell, M., Espargaro, A., Aviles, F. X., & Ventura, S. (2008). Study and selection of in vivo protein interactions by coupling bimolecular fluorescence complementation and flow cytometry. *Nat Protoc*, 3(1), 22-33.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.496>
- Morita, H., Saito, H., Matsumoto, K., & Nakae, S. (2016). Regulatory roles of mast cells in immune responses. *Semin Immunopathol*, 38(5), 623-629.
<https://doi.org/10.1007/s00281-016-0566-0>
- Morris, A. J. (2007). Regulation of phospholipase D activity, membrane targeting and intracellular trafficking by phosphoinositides. *Biochem Soc Symp*(74), 247-257. <https://doi.org/10.1042/bss0740247>
- Mukherjee, K., Yang, X., Gerber, S. H., Kwon, H. B., Ho, A., Castillo, P. E., . . . Südhof, T. C. (2010). Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(14), 6504-6509.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1002307107>
- Muller, P. A., & Klomp, L. W. (2009). ATOX1: a novel copper-responsive transcription factor in mammals? *Int J Biochem Cell Biol*, 41(6), 1233-1236. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.001>
- Nabb, A. T., Frank, M., & Bentley, M. (2020). Smart motors and cargo steering drive kinesin-mediated selective transport. *Mol Cell Neurosci*, 103, 103464. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2019.103464>

- Nagata, Y., & Suzuki, R. (2022). FcεRI: A Master Regulator of Mast Cell Functions. *Cells*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/cells11040622>
- Nakagawa, C., Inahata, K., Nishimura, S., & Sugimoto, K. (2011). Improvement of a Venus-based bimolecular fluorescence complementation assay to visualize bFos-bJun interaction in living cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75(7), 1399-1401. <https://doi.org/10.1271/bbb.110189>
- Nakamura, N., Yamamoto, A., Wada, Y., & Futai, M. (2000). Syntaxin 7 mediates endocytic trafficking to late endosomes. *J Biol Chem*, 275(9), 6523-6529. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6523>
- Nakashima, K., Takeuchi, S., Iwama, S., Kiyota, A., Yasuda, Y., Iwata, N., . . . Sugimura, Y. (2018). Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1, a novel interactor of rabphilin-3A, deubiquitylates rabphilin-3A and regulates arginine vasopressin secretion in PC12 cells. *Endocr J*, 65(3), 325-334. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0399>
- Naskar, P., & Puri, N. (2017). Phosphorylation of SNAP-23 regulates its dynamic membrane association during mast cell exocytosis. *Biol Open*, 6(9), 1257-1269. <https://doi.org/10.1242/bio.025791>
- Nechushtan, H., Leitges, M., Cohen, C., Kay, G., & Razin, E. (2000). Inhibition of degranulation and interleukin-6 production in mast cells derived from mice deficient in protein kinase Cβ. *Blood*, 95(5), 1752-1757.
- Neher, E., & Penner, R. (1994). Mice sans synaptotagmin. *Nature*, 372(6504), 316-317. <https://doi.org/10.1038/372316a0>
- Newton, A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev*, 101(8), 2353-2364. <https://doi.org/10.1021/cr0002801>
- Newton, A. C. (2018). Protein kinase C: perfectly balanced. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 53(2), 208-230. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1442408>
- Ng, E. L., & Tang, B. L. (2008). Rab GTPases and their roles in brain neurons and glia. *Brain Res Rev*, 58(1), 236-246. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.04.006>
- Niehaus, J. L., Liu, Y., Wallis, K. T., Egertová, M., Bhartur, S. G., Mukhopadhyay, S., . . . Lewis, D. L. (2007). CB1 cannabinoid receptor activity is modulated by the cannabinoid receptor interacting protein CRIP 1a. *Mol Pharmacol*, 72(6), 1557-1566. <https://doi.org/10.1124/mol.107.039263>
- Niwa, S., Tanaka, Y., & Hirokawa, N. (2008). KIF1Bβ- and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD. *Nat Cell Biol*, 10(11), 1269-1279. <https://doi.org/10.1038/ncb1785>
- Obuse, C., Iwasaki, O., Kiyomitsu, T., Goshima, G., Toyoda, Y., & Yanagida, M. (2004). A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat Cell Biol*, 6(11), 1135-1141. <https://doi.org/10.1038/ncb1187>
- Ochoa, W. F., Corbalán-García, S., Eritja, R., Rodríguez-Alfaro, J. A., Gómez-Fernández, J. C., Fita, I., & Verdaguer, N. (2002). Additional binding sites for anionic phospholipids and calcium ions in the crystal structures of complexes of the C2 domain of protein kinase calpha. *J Mol Biol*, 320(2), 277-291. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)00464-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00464-3)

- On, J. S. W., Arokiaraj, A. W. R., & Chow, B. K. C. (2019). Molecular evolution of CRH and CRHR subfamily before the evolutionary origin of vertebrate. *Peptides*, 120, 170087. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.04.014>
- Ostermeier, C., & Brunger, A. T. (1999). Structural Basis of Rab Effector Specificity: Crystal Structure of the Small G Protein Rab3A Crystal Complexed with the Effector Domain of Raphilin-3A. *Cell*, 96, 363-374.
- Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., & Reuveny, E. (2012). SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell*, 149(2), 425-438. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.055>
- Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., . . . Lewis, R. S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136(5), 876-890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.014>
- Pellinen, T., Tuomi, S., Arjonen, A., Wolf, M., Edgren, H., Meyer, H., . . . Ivaska, J. (2008). Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis. *Dev Cell*, 15(3), 371-385. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.001>
- Peng, Z., & Beaven, M. A. (2005). An essential role for phospholipase D in the activation of protein kinase C and degranulation in mast cells. *J Immunol*, 174(9), 5201-5208. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5201>
- Pereira, S., Massacrier, A., Roll, P., Vérine, A., Etienne-Grimaldi, M. C., Poitelon, Y., . . . Szepietowski, P. (2008). Nuclear localization of a novel human syntaxin 1B isoform. *Gene*, 423(2), 160-171. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.07.010>
- Perin, M. S., Brose, N., Jahn, R., & Sudhof, T. C. (1991). Domain structure of synaptotagmin (p65). *J Biol Chem*, 266(1), 623-629.
- Petkovic, M., Jemaiel, A., Daste, F., Specht, C. G., Izeddin, I., Vorkel, D., . . . Galli, T. (2014). The SNARE Sec22b has a non-fusogenic function in plasma membrane expansion. *Nat Cell Biol*, 16(5), 434-444. <https://doi.org/10.1038/ncb2937>
- Pettitt, T. R., Martin, A., Horton, T., Liossis, C., Lord, J. M., & Wakelam, M. J. (1997). Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions. Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 272(28), 17354-17359. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17354>
- Pfeffer, S. R. (2017). Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Mol Biol Cell*, 28(6), 712-715. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-10-0737>
- Plutner, H., Cox, A. D., Pind, S., Khosravi-Far, R., Bourne, J. R., Schwaninger, R., . . . Balch, W. E. (1991). Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *J Cell Biol*, 115(1), 31-43. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.1.31>
- Pollard, T. D., & Goldman, R. D. (2018). Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030288>

- Pons, V., Luyet, P. P., Morel, E., Abrami, L., van der Goot, F. G., Parton, R. G., & Gruenberg, J. (2008). Hrs and SNX3 functions in sorting and membrane invagination within multivesicular bodies. *PLoS Biol*, 6(9), e214. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060214>
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229-233. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90691-h](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90691-h)
- Pu, Y., Peach, M. L., Garfield, S. H., Wincovitch, S., Marquez, V. E., & Blumberg, P. M. (2006). Effects on ligand interaction and membrane translocation of the positively charged arginine residues situated along the C1 domain binding cleft in the atypical protein kinase C isoforms. *J Biol Chem*, 281(44), 33773-33788. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606560200>
- Puri, N., & Roche, P. A. (2006). Ternary SNARE complexes are enriched in lipid rafts during mast cell exocytosis. *Traffic*, 7(11), 1482-1494. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00490.x>
- Putney, J. W., Jr., & Ribeiro, C. M. (2000). Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell Mol Life Sci*, 57(8-9), 1272-1286. <https://doi.org/10.1007/pl00000765>
- Quevedo, M. F., Bustos, M. A., Masone, D., Roggero, C. M., Bustos, D. M., & Tomes, C. N. (2019). Grab recruitment by Rab27A-Rabphilin3a triggers Rab3A activation in human sperm exocytosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866(4), 612-622. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.12.005>
- Ramalingam, L., Oh, E., Yoder, S. M., Brozinick, J. T., Kalwat, M. A., Groffen, A. J., . . . Thurmond, D. C. (2012). Doc2b is a key effector of insulin secretion and skeletal muscle insulin sensitivity. *Diabetes*, 61(10), 2424-2432. <https://doi.org/10.2337/db11-1525>
- Ramos-Miguel, A., Barakauskas, V., Alamri, J., Miyauchi, M., Barr, A. M., Beasley, C. L., . . . Honer, W. G. (2019). The SNAP25 Interactome in Ventromedial Caudate in Schizophrenia Includes the Mitochondrial Protein ARF1. *Neuroscience*, 420, 97-111. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.045>
- Rapali, P., Szenes, Á., Radnai, L., Bakos, A., Pál, G., & Nyitray, L. (2011). DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *Febs j*, 278(17), 2980-2996. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08254.x>
- Rasmussen, S. A., & Friedman, J. M. (2000). NF1 gene and neurofibromatosis 1. *Am J Epidemiol*, 151(1), 33-40. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010118>
- Rastaldi, M. P., Armelloni, S., Berra, S., Li, M., Pesaresi, M., Poczewski, H., . . . D'Amico, G. (2003). Glomerular podocytes possess the synaptic vesicle molecule Rab3A and its specific effector rabphilin-3a. *Am J Pathol*, 163(3), 889-899. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63449-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63449-9)
- Rathore, S. S., Bend, E. G., Yu, H., Hammarlund, M., Jorgensen, E. M., & Shen, J. (2010). Syntaxin N-terminal peptide motif is an initiation factor for the assembly of the SNARE-Sec1/Munc18 membrane fusion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(52), 22399-22406. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012997108>

- Ravichandran, V., Chawla, A., & Roche, P. A. (1996). Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues. *J Biol Chem*, 271(23), 13300-13303. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13300>
- Raykova, D., Koos, B., Asplund, A., Gelléri, M., Ivarsson, Y., Danielson, U. H., & Söderberg, O. (2016). Let There Be Light! *Proteomes*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/proteomes4040036>
- Razin, E., Szallasi, Z., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., & Rivera, J. (1994). Protein kinases C-beta and C-epsilon link the mast cell high-affinity receptor for IgE to the expression of c-fos and c-jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(16), 7722-7726. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7722>
- Reck-Peterson, S. L., Redwine, W. B., Vale, R. D., & Carter, A. P. (2018). The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(6), 382-398. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0004-3>
- Reina-Campos, M., Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J. (2019). The Dual Roles of the Atypical Protein Kinase Cs in Cancer. *Cancer Cell*, 36(3), 218-235. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.07.010>
- Ren, C., Yuan, Q., Jian, X., Randazzo, P. A., Tang, W., & Wu, D. (2020). Small GTPase ARF6 Is a Coincidence-Detection Code for RPH3A Polarization in Neutrophil Polarization. *J Immunol*, 204(4), 1012-1021. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901080>
- Reyland, M. E. (2009). Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14(6), 2386-2399. <https://doi.org/10.2741/3385>
- Rizo, J. (2018). Mechanism of neurotransmitter release coming into focus. *Protein Sci*, 27(8), 1364-1391. <https://doi.org/10.1002/pro.3445>
- Rizo, J., & Rosenmund, C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 15(7), 665-674. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1450>
- Rizo, J., & Xu, J. (2015). The Synaptic Vesicle Release Machinery. *Annu Rev Biophys*, 44, 339-367. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-034057>
- Rossi, V., Picco, R., Vacca, M., D'Esposito, M., D'Urso, M., Galli, T., & Filippini, F. (2004). VAMP subfamilies identified by specific R-SNARE motifs. *Biol Cell*, 96(4), 251-256. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.12.009>
- Rothman, J. E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 372(6501), 55-63. <https://doi.org/10.1038/372055a0>
- Sabbir, M. G. (2020). CAMKK2-CAMK4 signaling regulates transferrin trafficking, turnover, and iron homeostasis. *Cell Commun Signal*, 18(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00575-0>
- Saheki, Y., & De Camilli, P. (2017). The Extended-Synaptotagmins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864(9), 1490-1493. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.03.013>
- Sahu, G., Wazen, R. M., Colarusso, P., Chen, S. R. W., Zamponi, G. W., & Turner, R. W. (2019). Junctophilin Proteins Tether a Cav1-RyR2-KCa3.1 Tripartite Complex to Regulate Neuronal Excitability. *Cell Rep*, 28(9), 2427-2442.e2426. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.075>
- Saitoh, S., Maruyama, T., Yako, Y., Kajita, M., Fujioka, Y., Ohba, Y., . . . Fujita, Y. (2017). Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical

- extrusion of transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(12), E2327-e2336. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602349114>
- Sakai, T., Sugiyama, T., Banno, Y., Kato, Y., & Nozawa, Y. (2004). Involvement of phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase C in prostaglandin F₂α-induced 1,2-diacylglycerol formation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Metab*, 22(3), 198-206. <https://doi.org/10.1007/s00774-003-0470-2>
- Sakisaka, T., Itoh, T., Miura, K., & Takenawa, T. (1997). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol Cell Biol*, 17(7), 3841-3849. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.7.3841>
- Sakurai, K., Yamashita, R., Niituma, S., Iwama, S., Sugimura, Y., Arihara, Z., & Takahashi, K. (2017). Usefulness of anti-rabphilin-3A antibodies for diagnosing central diabetes insipidus in the third trimester of pregnancy. *Endocr J*, 64(6), 645-650. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0028>
- Salaün, C., James, D. J., Greaves, J., & Chamberlain, L. H. (2004). Plasma membrane targeting of exocytic SNARE proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1693(2), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.05.008>
- Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S., & Takai, Y. (1990). Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem*, 265(4), 2333-2337.
- Sato, D. X., & Kawata, M. (2018). Positive and balancing selection on SLC18A1 gene associated with psychiatric disorders and human-unique personality traits. *Evol Lett*, 2(5), 499-510. <https://doi.org/10.1002/evl3.81>
- Sauvola, C. W., & Littleton, J. T. (2021). SNARE Regulatory Proteins in Synaptic Vesicle Fusion and Recycling. *Front Mol Neurosci*, 14, 733138. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.733138>
- Savaryn, J. P., Toby, T. K., & Kelleher, N. L. (2016). A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics*, 16(18), 2435-2443. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600113>
- Scales, S. J., Yoo, B. Y., & Scheller, R. H. (2001). The ionic layer is required for efficient dissociation of the SNARE complex by alpha-SNAP and NSF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(25), 14262-14267. <https://doi.org/10.1073/pnas.251547598>
- Scheltema, R. A., Hauschild, J. P., Lange, O., Hornburg, D., Denisov, E., Damoc, E., . . . Mann, M. (2014). The Q Exactive HF, a Benchtop mass spectrometer with a pre-filter, high-performance quadrupole and an ultra-high-field Orbitrap analyzer. *Mol Cell Proteomics*, 13(12), 3698-3708. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.043489>
- Scherbaum, W. A. (2021). Autoimmune diabetes insipidus. *Handb Clin Neurol*, 181, 193-204. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820683-6.00015-4>
- Schiavo, G., Santucci, A., Dasgupta, B. R., Mehta, P. P., Jontes, J., Benfenati, F., . . . Montecucco, C. (1993). Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett*, 335(1), 99-103. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80448-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80448-4)

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schlattner, U., Gehring, F., Vernoux, N., Tokarska-Schlattner, M., Neumann, D., Marcillat, O., . . . Wallimann, T. (2004). C-terminal lysines determine phospholipid interaction of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J Biol Chem*, 279(23), 24334-24342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314158200>
- Schluter, O. M., Schnell, E., Verhage, M., Tzonopoulos, T., Nicoll, R. A., Janz, R., . . . Sudhof, T. C. (1999). Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release. *J Neurosci*, 19(14), 5834-5846.
- Schwartz, S. L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A., & Wandinger-Ness, A. (2007). Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci*, 120(Pt 22), 3905-3910. <https://doi.org/10.1242/jcs.015909>
- Scigelova, M., & Makarov, A. (2009). Advances in bioanalytical LC-MS using the Orbitrap™ mass analyzer. *Bioanalysis*, 1(4), 741-754. <https://doi.org/10.4155/bio.09.65>
- Sclip, A., Bacaj, T., Giam, L. R., & Südhof, T. C. (2016). Extended Synaptotagmin (ESyt) Triple Knock-Out Mice Are Viable and Fertile without Obvious Endoplasmic Reticulum Dysfunction. *PLoS One*, 11(6), e0158295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158295>
- Scorrano, L., De Matteis, M. A., Emr, S., Giordano, F., Hajnóczky, G., Kornmann, B., . . . Schuldiner, M. (2019). Coming together to define membrane contact sites. *Nat Commun*, 10(1), 1287. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09253-3>
- Sears, R. M., May, D. G., & Roux, K. J. (2019). BioID as a Tool for Protein-Proximity Labeling in Living Cells. *Methods Mol Biol*, 2012, 299-313. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9546-2_15
- Selma-Soriano, E., Llamusi, B., Fernández-Costa, J. M., Ozimski, L. L., Artero, R., & Redón, J. (2020). Rabphilin involvement in filtration and molecular uptake in Drosophila nephrocytes suggests a similar role in human podocytes. *Dis Model Mech*, 13(9). <https://doi.org/10.1242/dmm.041509>
- Serrano-López, E. M., López-Martínez, D., Gómez-Fernández, J. C., Egea-Jimenez, A. L., & Corbalán-García, S. (2021). PKCε controls the fusion of secretory vesicles in mast cells in a phosphatidic acid-dependent mode. *Int J Biol Macromol*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.019>
- Setsube, R., Sakurai, M., Sakaguchi, Y., & Wada, K. (2009). Ubiquitin dimers control the hydrolase activity of UCH-L3. *Neurochem Int*, 54(5-6), 314-321. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.12.013>
- Shahheydari, H., Frost, S., Smith, B. J., Groblewski, G. E., Chen, Y., & Byrne, J. A. (2014). Identification of PLP2 and RAB5C as novel TPD52 binding partners through yeast two-hybrid screening. *Mol Biol Rep*, 41(7), 4565-4572. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3327-y>
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein.

- In *Nat Biotechnol* (Vol. 22, pp. 1567-1572). <https://doi.org/10.1038/nbt1037>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., . . . Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 13(11), 2498-2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Shen, F., & Seabra, M. C. (1996). Mechanism of digeranylgeranylation of Rab proteins. Formation of a complex between monogeranylgeranyl-Rab and Rab escort protein. *J Biol Chem*, 271(7), 3692-3698. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.7.3692>
- Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 59, 223-239. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., . . . Takai, Y. (1993). Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Mol Cell Biol*, 13(4), 2061-2068.
- Shirataki, H., Yamamoto, T., Hagi, S., Miura, H., Oishi, H., Jin-no, Y., . . . Takai, Y. (1994). Rabphilin-3A is associated with synaptic vesicles through a vesicle protein in a manner independent of Rab3A. *J Biol Chem*, 269(52), 32717-32720.
- Shyu, Y. J., Liu, H., Deng, X., & Hu, C. D. (2006). Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *Biotechniques*, 40(1), 61-66. <https://doi.org/10.2144/000112036>
- Siraganian, R. P. (2003). Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr Opin Immunol*, 15(6), 639-646. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.09.010>
- Sitkoff, D., Sharp, K. A., & Honig, B. (1994). Accurate Calculation of Hydration Free Energies Using Macroscopic Solvent Models. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(7), 1978-1988. <https://doi.org/10.1021/j100058a043>
- Sivars, U., Aivazian, D., & Pfeffer, S. R. (2003). Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature*, 425(6960), 856-859. <https://doi.org/10.1038/nature02057>
- Sjöstedt, E., Zhong, W., Fagerberg, L., Karlsson, M., Mitsios, N., Adori, C., . . . Mulder, J. (2020). An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science*, 367(6482). <https://doi.org/10.1126/science.aay5947>
- Skach, W. R. (2007). The expanding role of the ER translocon in membrane protein folding. *J Cell Biol*, 179(7), 1333-1335. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711107>
- Smith, N. L., Abi Abdallah, D. S., Butcher, B. A., Denkers, E. Y., Baird, B., & Holowka, D. (2013). *Toxoplasma gondii* inhibits mast cell degranulation by suppressing phospholipase C γ -mediated Ca²⁺ mobilization. *Front Microbiol*, 4, 179. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00179>

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., . . . Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1), 76-85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Smith, R., Klein, P., Koc-Schmitz, Y., Waldvogel, H. J., Faull, R. L., Brundin, P., . . . Li, J. Y. (2007). Loss of SNAP-25 and rabphilin 3a in sensory-motor cortex in Huntington's disease. *J Neurochem*, 103(1), 115-123. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04703.x>
- Soboloff, J., Rothberg, B. S., Madesh, M., & Gill, D. L. (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(9), 549-565. <https://doi.org/10.1038/nrm3414>
- Soboloff, J., Spassova, M., Hewavitharana, T., He, L. P., Luncsford, P., Xu, W., . . . Gill, D. L. (2007). TRPC channels: integrators of multiple cellular signals. *Handb Exp Pharmacol*(179), 575-591. https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7_34
- Soni, S., Jain, B. P., Gupta, R., Dharavath, S., Kar, K., Komath, S. S., & Goswami, S. K. (2018). Biophysical Characterization of SG2NA Variants and their Interaction with DJ-1 and Calmodulin in vitro. *Cell Biochem Biophys*, 76(4), 451-461. <https://doi.org/10.1007/s12013-018-0854-5>
- Sponder, G., Mastrototaro, L., Kurth, K., Merolle, L., Zhang, Z., Abdulhanan, N., . . . Kolisek, M. (2016). Human CNNM2 is not a Mg(2+) transporter per se. *Pflugers Arch*, 468(7), 1223-1240. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1816-7>
- Stahelin, R. V., Digman, M. A., Medkova, M., Ananthanarayanan, B., Melowic, H. R., Rafter, J. D., & Cho, W. (2005). Diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cepsilon: mechanistic differences between protein kinases Cdelta and Cepsilon. *J Biol Chem*, 280(20), 19784-19793. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411285200>
- Stanic, J., Carta, M., Eberini, I., Pelucchi, S., Marcello, E., Genazzani, A. A., . . . Gardoni, F. (2015). Rabphilin 3A retains NMDA receptors at synaptic sites through interaction with GluN2A/PSD-95 complex. *Nat Commun*, 6, 10181. <https://doi.org/10.1038/ncomms10181>
- Stanic, J., Mellone, M., Napolitano, F., Racca, C., Zianni, E., Minocci, D., . . . Gardoni, F. (2017). Rabphilin 3A: A novel target for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Neurobiol Dis*, 108, 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.08.001>
- Steinberg, S. F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev*, 88(4), 1341-1378. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2007>
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(8), 513-525. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>
- Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O., & Zerial, M. (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell*, 83(3), 423-432. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90120-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90120-5)
- Stephens, L. R., Jackson, T. R., & Hawkins, P. T. (1993). Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim Biophys Acta*, 1179(1), 27-75. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(93\)90072-w](https://doi.org/10.1016/0167-4889(93)90072-w)

- Strick, D. J., & Elferink, L. A. (2005). Rab15 effector protein: a novel protein for receptor recycling from the endocytic recycling compartment. *Mol Biol Cell*, 16(12), 5699-5709. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-03-0204>
- Suh, Y. H., Yoshimoto-Furusawa, A., Weih, K. A., Tessarollo, L., Roche, K. W., Mackem, S., & Roche, P. A. (2011). Deletion of SNAP-23 results in pre-implantation embryonic lethality in mice. *PLoS One*, 6(3), e18444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018444>
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., & Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395(6700), 347-353. <https://doi.org/10.1038/26412>
- Suzuki, K., & Verma, I. M. (2008). Phosphorylation of SNAP-23 by IκB kinase 2 regulates mast cell degranulation. *Cell*, 134(3), 485-495. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.050>
- Sweeney, H. L., & Holzbaur, E. L. F. (2018). Motor Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021931>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., . . . von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res*, 49(D1), D605-d612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>
- Sánchez-Bautista, S., Corbalán-García, S., Pérez-Lara, A., & Gómez-Fernández, J. C. (2009). A comparison of the membrane binding properties of C1B domains of PKCγ, PKCδ, and PKCε. *Biophys J*, 96(9), 3638-3647. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.02.021>
- Sánchez-Bautista, S., Marín-Vicente, C., Gómez-Fernández, J. C., & Corbalán-García, S. (2006). The C2 domain of PKCα is a Ca²⁺-dependent PtdIns(4,5)P₂ sensing domain: a new insight into an old pathway. *J Mol Biol*, 362(5), 901-914. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.093>
- Sánchez-Fernández, G., Cabezudo, S., García-Hoz, C., Benincá, C., Aragay, A. M., Mayor, F., Jr., & Ribas, C. (2014). Gαq signalling: the new and the old. *Cell Signal*, 26(5), 833-848. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.01.010>
- Südhof, T. C. (2013a). A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat Med*, 19(10), 1227-1231. <https://doi.org/10.1038/nm.3338>
- Südhof, T. C. (2013b). Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80(3), 675-690. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>
- Südhof, T. C., & Rothman, J. E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, 323(5913), 474-477. <https://doi.org/10.1126/science.1161748>
- Tai, G., Lu, L., Wang, T. L., Tang, B. L., Goud, B., Johannes, L., & Hong, W. (2004). Participation of the syntaxin 5/Ykt6/GS28/GS15 SNARE complex in transport from the early/recycling endosome to the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell*, 15(9), 4011-4022. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-12-0876>
- Takeda, S., Minakata, S., Koike, R., Kawahata, I., Narita, A., Kitazawa, M., . . . Nitani, Y. (2010). Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation--steric and allosteric inhibition. *PLoS Biol*, 8(7), e1000416. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000416>

- Tan, J. Z. A., & Gleeson, P. A. (2019). The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1861(4), 697-712. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.013>
- Tan, M. G., Lee, C., Lee, J. H., Francis, P. T., Williams, R. J., Ramirez, M. J., . . . Lai, M. K. (2014). Decreased rabphilin 3A immunoreactivity in Alzheimer's disease is associated with Abeta burden. *Neurochem Int*, 64, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.10.013>
- Tan, S. L., & Parker, P. J. (2003). Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem J*, 376(Pt 3), 545-552. <https://doi.org/10.1042/bj20031406>
- Taupenot, L. (2007). Analysis of regulated secretion using PC12 cells. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 15, Unit 15.12. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1512s36>
- Teng, F. Y., Wang, Y., & Tang, B. L. (2001). The syntaxins. *Genome Biol*, 2(11), Reviews3012. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-11-reviews3012>
- Tkaczyk, C., Iwaki, S., Metcalfe, D. D., & Gilfillan, A. M. (2005). Roles of adaptor molecules in mast cell activation. *Chem Immunol Allergy*, 87, 43-58. <https://doi.org/10.1159/000087570>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Tsuboi, T. (2009). Molecular mechanism of attachment process of dense-core vesicles to the plasma membrane in neuroendocrine cells. *Neurosci Res*, 63(2), 83-88. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.11.003>
- Tsuboi, T., & Fukuda, M. (2005). The C2B domain of rabphilin directly interacts with SNAP-25 and regulates the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem*, 280(47), 39253-39259. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507173200>
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., . . . Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*, 13(9), 731-740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>
- Vale, R. D., & Milligan, R. A. (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, 288(5463), 88-95. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.88>
- Varoqueaux, F., & Fasshauer, D. (2017). Getting Nervous: An Evolutionary Overhaul for Communication. *Annu Rev Genet*, 51, 455-476. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-024648>
- Veleri, S., Punnakkal, P., Dunbar, G. L., & Maiti, P. (2018). Molecular Insights into the Roles of Rab Proteins in Intracellular Dynamics and Neurodegenerative Diseases. *Neuromolecular Med*, 20(1), 18-36. <https://doi.org/10.1007/s12017-018-8479-9>
- Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., Ochoa, W. F., Fita, I., & Gómez-Fernández, J. C. (1999). Ca(2+) bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase Calpha directly to phosphatidylserine. *Embo j*, 18(22), 6329-6338. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.22.6329>

- Verhage, M., de Vries, K. J., Røshol, H., Burbach, J. P., Gispen, W. H., & Südhof, T. C. (1997). DOC2 proteins in rat brain: complementary distribution and proposed function as vesicular adapter proteins in early stages of secretion. *Neuron*, 18(3), 453-461. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81245-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81245-3)
- Verstreken, P., Koh, T. W., Schulze, K. L., Zhai, R. G., Hiesinger, P. R., Zhou, Y., . . . Bellen, H. J. (2003). Synaptojanin is recruited by endophilin to promote synaptic vesicle uncoating. *Neuron*, 40(4), 733-748. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00644-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00644-5)
- Vitale, G., Rybin, V., Christoforidis, S., Thornqvist, P., McCaffrey, M., Stenmark, H., & Zerial, M. (1998). Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5. *Embo j*, 17(7), 1941-1951. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.7.1941>
- Vivona, S., Cipriano, D. J., O'Leary, S., Li, Y. H., Fenn, T. D., & Brunger, A. T. (2013). Disassembly of all SNARE complexes by N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) is initiated by a conserved 1:1 interaction between α -soluble NSF attachment protein (SNAP) and SNARE complex. *J Biol Chem*, 288(34), 24984-24991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.489807>
- Vogel, G. F., Klee, K. M., Janecke, A. R., Müller, T., Hess, M. W., & Huber, L. A. (2015). Cargo-selective apical exocytosis in epithelial cells is conducted by Myo5B, Slp4a, Vamp7, and Syntaxin 3. *J Cell Biol*, 211(3), 587-604. <https://doi.org/10.1083/jcb.201506112>
- Vogel, K., & Roche, P. A. (1999). SNAP-23 and SNAP-25 are palmitoylated in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 258(2), 407-410. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0652>
- Wakelam, M. J. (1998). Diacylglycerol--when is it an intracellular messenger? *Biochim Biophys Acta*, 1436(1-2), 117-126. [https://doi.org/10.1016/s0005-2760\(98\)00123-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2760(98)00123-4)
- Wang, J., & Richards, D. A. (2012). Segregation of PIP2 and PIP3 into distinct nanoscale regions within the plasma membrane. *Biol Open*, 1(9), 857-862. <https://doi.org/10.1242/bio.20122071>
- Wang, J. Q., Chen, J. H., Chen, Y. C., Chen, M. Y., Hsieh, C. Y., Teng, S. C., & Wu, K. J. (2013). Interaction between NBS1 and the mTOR/Rictor/SIN1 complex through specific domains. *PLoS One*, 8(6), e65586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065586>
- Wang, L., Liang, Z., & Li, G. (2011). Rab22 controls NGF signaling and neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol Biol Cell*, 22(20), 3853-3860. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-03-0277>
- Wang, Q. J., Fang, T. W., Nacro, K., Marquez, V. E., Wang, S., & Blumberg, P. M. (2001). Role of hydrophobic residues in the C1b domain of protein kinase C delta on ligand and phospholipid interactions. *J Biol Chem*, 276(22), 19580-19587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010089200>
- Wang, T., Li, L., & Hong, W. (2017). SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic*, 18(12), 767-775. <https://doi.org/10.1111/tra.12524>
- Wang, X., Wang, H., Xu, B., Huang, D., Nie, C., Pu, L., . . . Chen, X. W. (2021). Receptor-Mediated ER Export of Lipoproteins Controls Lipid Homeostasis in Mice and Humans. *Cell Metab*, 33(2), 350-366.e357. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.10.020>

- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K., & Südhof, T. C. (1997). Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*, 388, 593-598.
- Weber, P., Batoulis, H., Rink, K. M., Dahlhoff, S., Pinkwart, K., Söllner, T. H., & Lang, T. (2017). Electrostatic anchoring precedes stable membrane attachment of SNAP25/SNAP23 to the plasma membrane. *Elife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.19394>
- Wegrzyn, J. L., Bark, S. J., Funkelstein, L., Mosier, C., Yap, A., Kazemi-Esfarjani, P., . . . Hook, V. (2010). Proteomics of Dense Core Secretory Vesicles Reveal Distinct Protein Categories for Secretion of Neuroeffectors for Cell-Cell Communication. *J Proteome Res*, 9(10), 5002-5024. <https://doi.org/10.1021/pr1003104>
- Wei, Y., Wang, D., Jin, F., Bian, Z., Li, L., Liang, H., . . . Zen, K. (2017). Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23. *Nat Commun*, 8, 14041. <https://doi.org/10.1038/ncomms14041>
- Weibrecht, I., Leuchowius, K. J., Clausson, C. M., Conze, T., Jarvius, M., Howell, W. M., . . . Söderberg, O. (2010). Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev Proteomics*, 7(3), 401-409. <https://doi.org/10.1586/epr.10.10>
- Westerink, R. H., & Ewing, A. G. (2008). The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol (Oxf)*, 192(2), 273-285. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01805.x>
- Wilhelm, B. G., Mandad, S., Truckenbrodt, S., Kröhnert, K., Schäfer, C., Rammner, B., . . . Rizzoli, S. O. (2014). Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science*, 344(6187), 1023-1028. <https://doi.org/10.1126/science.1252884>
- Willemsen, M. H., Ba, W., Wissink-Lindhout, W. M., de Brouwer, A. P., Haas, S. A., Bienek, M., . . . Kleefstra, T. (2014). Involvement of the kinesin family members KIF4A and KIF5C in intellectual disability and synaptic function. *J Med Genet*, 51(7), 487-494. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102182>
- Willshaw, A., Grant, K., Yan, J., Rockliffe, N., Ambavarapu, S., Burdyga, G., . . . Gawler, D. (2004). Identification of a novel protein complex containing annexin A4, rabphilin and synaptotagmin. *FEBS Lett*, 559(1-3), 13-21. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01513-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01513-8)
- Woo, J. S., Srikanth, S., Nishi, M., Ping, P., Takeshima, H., & Gwack, Y. (2016). Junctophilin-4, a component of the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions, regulates Ca²⁺ dynamics in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(10), 2762-2767. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524229113>
- Worst, T. S., Meyer, Y., Gottschalt, M., Weis, C. A., von Hardenberg, J., Frank, C., . . . Erben, P. (2017). RAB27A, RAB27B and VPS36 are downregulated in advanced prostate cancer and show functional relevance in prostate cancer cells. *Int J Oncol*, 50(3), 920-932. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3872>
- Woska, J. R., Jr., & Gillespie, M. E. (2011). Small-interfering RNA-mediated identification and regulation of the ternary SNARE complex mediating

- RBL-2H3 mast cell degranulation. *Scand J Immunol*, 73(1), 8-17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02471.x>
- Wu, L. L., & Zhou, X. F. (2009). Huntingtin associated protein 1 and its functions. *Cell Adh Migr*, 3(1), 71-76. <https://doi.org/10.4161/cam.3.1.7511>
- Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M., & Lewis, R. S. (2006). Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol*, 174(6), 803-813. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604014>
- Wu, X. S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J. R., Matesic, L. E., . . . Hammer, J. A., 3rd. (2002). Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol*, 4(4), 271-278. <https://doi.org/10.1038/ncb760>
- Xu, D., Li, Y., Wu, L., Zhao, D., Yu, J., Huang, T., . . . Li, P. (2018). Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions. *J Cell Biol*, 217(3), 975-995. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704184>
- Xu, Z. B., Chaudhary, D., Olland, S., Wolfrom, S., Czerwinski, R., Malakian, K., . . . Mosyak, L. (2004). Catalytic domain crystal structure of protein kinase C- θ (PKC θ). *J Biol Chem*, 279(48), 50401-50409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409216200>
- Yamaguchi, T., Shirataki, H., Kishida, S., Miyazaki, M., Nishikawa, J., Wada, K., . . . Takai, Y. (1993). Two functionally different domains of rabphilin-3A, Rab3A p25/smg p25A-binding and phospholipid- and Ca(2+)-binding domains. *J Biol Chem*, 268(36), 27164-27170.
- Yamashiro, S., Yamakita, Y., Totsukawa, G., Goto, H., Kaibuchi, K., Ito, M., . . . Matsumura, F. (2008). Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. *Dev Cell*, 14(5), 787-797. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.02.013>
- Yang, C., & Kazanietz, M. G. (2003). Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends Pharmacol Sci*, 24(11), 602-608. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2003.09.003>
- Yano, M., Koumoto, Y., Kanesaki, Y., Wu, X., & Kido, H. (2004). 20S proteasome prevents aggregation of heat-denatured proteins without PA700 regulatory subcomplex like a molecular chaperone. *Biomacromolecules*, 5(4), 1465-1469. <https://doi.org/10.1021/bm049957a>
- Yasuda, Y., Iwama, S., Kiyota, A., Izumida, H., Nakashima, K., Iwata, N., . . . Sugimura, Y. (2018). Critical role of rabphilin-3A in the pathophysiology of experimental lymphocytic neurohypophysitis. *J Pathol*, 244(4), 469-478. <https://doi.org/10.1002/path.5046>
- Yin, C., Argintaru, D., & Heit, B. (2019). Rab17 mediates intermixing of phagocytosed apoptotic cells with recycling endosomes. *Small GTPases*, 10(3), 218-226. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1308852>
- Yoon, T. Y., & Munson, M. (2018). SNARE complex assembly and disassembly. *Curr Biol*, 28(8), R397-r401. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.005>
- Yu, H., Liu, Y., Gulbranson, D. R., Paine, A., Rathore, S. S., & Shen, J. (2016). Extended synaptotagmins are Ca²⁺-dependent lipid transfer proteins at membrane contact sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(16), 4362-4367. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517259113>

- Yu, N., Signorile, L., Basu, S., Ottema, S., Lebbink, J. H. G., Leslie, K., . . . Galjart, N. (2016). Isolation of Functional Tubulin Dimers and of Tubulin-Associated Proteins from Mammalian Cells. *Curr Biol*, 26(13), 1728-1736. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.069>
- Yuan, Q., Ren, C., Xu, W., Petri, B., Zhang, J., Zhang, Y., . . . Tang, W. (2017). PKN1 Directs Polarized RAB21 Vesicle Trafficking via RPH3A and Is Important for Neutrophil Adhesion and Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Rep*, 19(12), 2586-2597. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.080>
- Zaoui, K., Benseddik, K., Daou, P., Salaün, D., & Badache, A. (2010). ErbB2 receptor controls microtubule capture by recruiting ACF7 to the plasma membrane of migrating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(43), 18517-18522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000975107>
- Zhang, G., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., & Hurley, J. H. (1995). Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell*, 81(6), 917-924. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90011-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90011-x)
- Zhang, N., Yao, L. L., & Li, X. D. (2018). Regulation of class V myosin. *Cell Mol Life Sci*, 75(2), 261-273. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2599-5>
- Zhang, X., Yan, C., Zhan, X., Li, L., Lei, J., & Shi, Y. (2018). Structure of the human activated spliceosome in three conformational states. *Cell Res*, 28(3), 307-322. <https://doi.org/10.1038/cr.2018.14>
- Zhang, Y., Luan, Z., Liu, A., & Hu, G. (2001). The scaffolding protein CASK mediates the interaction between rabphilin3a and beta-neurexins. *FEBS Lett*, 497(2-3), 99-102.
- Zhang, Y., O'Connor, J. P., Siomi, M. C., Srinivasan, S., Dutra, A., Nussbaum, R. L., & Dreyfuss, G. (1995). The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *Embo j*, 14(21), 5358-5366.
- Zhou, Q., Lai, Y., Bacaj, T., Zhao, M., Lyubimov, A. Y., Uervirojnangkoorn, M., . . . Brunger, A. T. (2015). Architecture of the synaptotagmin-SNARE machinery for neuronal exocytosis. *Nature*, 525(7567), 62-67. <https://doi.org/10.1038/nature14975>
- Zhou, Q., Zhou, P., Wang, A. L., Wu, D., Zhao, M., Südhof, T. C., & Brunger, A. T. (2017). The primed SNARE-complexin-synaptotagmin complex for neuronal exocytosis. *Nature*, 548(7668), 420-425. <https://doi.org/10.1038/nature23484>
- Zhou, Y., Srinivasan, P., Razavi, S., Seymour, S., Meraner, P., Gudlur, A., . . . Hogan, P. G. (2013). Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry. *Nat Struct Mol Biol*, 20(8), 973-981. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2625>
- Zhukovsky, M. A., Filograna, A., Luini, A., Corda, D., & Valente, C. (2019). Phosphatidic acid in membrane rearrangements. *FEBS Lett*, 593(17), 2428-2451. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13563>
- Ziegler, D. V., Vindrieux, D., Goehrig, D., Jaber, S., Collin, G., Griveau, A., . . . Bernard, D. (2021). Calcium channel ITPR2 and mitochondria-ER contacts promote cellular senescence and aging. *Nat Commun*, 12(1), 720. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20993-z>

Zorec, R. (2018). SNARE-mediated vesicle navigation, vesicle anatomy and exocytotic fusion pore. *Cell Calcium*, 73, 53-54.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.03.004>