



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

**PATRON DE EXPRESION Y DIVERSIDAD ESTRUCTURAL  
DEL GEN D2092.1 DE *C. elegans***

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**JOSÉ LUIS TÉLLEZ ARREOLA**

**TUTOR**  
**DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES INB, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**  
**DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA INB, UNAM**  
**DR. CARLOS SALDAÑA GUTIÉRREZ FCN, UAQ**

México, Junio del 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de Examen certificamos que la tesis elaborada por José Luis Téllez Arreola, cuyo título es: **“Patrón de Expresión y Diversidad Estructural del Gen D2092.1 de *C. elegans*”** se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firmas

Presidente

Dr. Michael C. Jeziorski

\_\_\_\_\_

Secretario (Tutor)

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

\_\_\_\_\_

Vocal

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

\_\_\_\_\_

Suplente

Dra. Stéphanie Colette Thebault

\_\_\_\_\_

Suplente

Dr. Francisco Vázquez Cuevas

\_\_\_\_\_

Aprobado por el Comité Académico

\_\_\_\_\_  
Dr. Alfredo Varela Echavarría  
Coordinador del Programa

## Agradecimientos

A la **UNIVERSIDA AUTÓNOMA DE MÉXICO** por darme un espacio como alumno en el programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología).

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por sus valiosos comentarios, su paciencia, su tiempo y por compartir conmigo sus conocimientos para llevar a cabo este proyecto.

A la Técnico Académico M. en C. Ángeles Edith Espino Saldaña, por su valiosa ayuda y enseñanzas para entender a la biología molecular durante la elaboración de este proyecto.

Al Auxiliar de Laboratorio Sra. Marina Ramírez Romero por tener siempre tan buena disposición para ayudar.

A mis compañeros del laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular II: Alejandra González González, Adriana Petriz Reyes, Alfredo Alanís Palacios, Gabriela Berenice Gómez González y Areli Huanosta Gutiérrez

A mi Comité Tutoral, al Dr. Alfredo Varela Echavarría y al Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez por las observaciones y sugerencias hechas durante la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.  
Becario No.474236

A la Unidad de Proteogenómica.  
Dra. Anaid Antaramian Salas

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

A la Unidad de Enseñanza.  
M. en C. Leonor Casanova Rico

A la unidad de videoconferencias.  
Psic. Ma. de Lourdes Lara Ayala.

A la Biblioteca.  
Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela  
Bib. Teresita de Jesús Pérez Cruz  
MVZ Román Pacheco Barrita

## Dedicatoria

**A:**

Mi hijo José Alí Téllez Flores, porque eres un factor determinante que me ayuda a seguir adelante y que gracias a ti inicie este camino y el cual continuaremos juntos hasta lograr los objetivos planteados. “Te amo Chiquito”

Mi Pareja Adriana Flores por el amor que me ofreces, por tus sabios consejos, por tu paciencia, por compartir conmigo tu forma de ver la vida, por el tiempo que hemos tenido que tolerar las diferencias, y apoyarnos mutuamente para lograr nuestro proyecto de vida en familia y en la ciencia.

Mis papas Bertha Alicia Arreola y José Luis Téllez, gracias por todo el apoyo incondicional que me brindan, por creer en mí y en la familia que forme para lograr el primer paso de este sueño que estoy cumpliendo y que continuara.

A mis hermanos Cesar Raúl Téllez, Yasir Téllez e Ivette Téllez, por el apoyo y sustento que me dan en todos los sentidos, espero poder regresarles algún día un poco de lo que me han dado.

Quiero que sepan que ustedes son el pilar que me mantiene de pie.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMEN</b>                                  | 1  |
| <b>ABSTRACT</b>                                 | 2  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                          | 3  |
| <b>2. ANTECEDENTES</b>                          | 4  |
| 2.1.- PROTEINAS CON DOMINIOS C2                 | 4  |
| 2.1.2 DOMINIO C2.                               | 4  |
| 2.3. PROTEÍNAS TRANSMEMBRANALES CON DOMINIOS C2 | 6  |
| 2.3.1. SINAPTOTAGMINAS                          | 6  |
| 2.3.2. FERLINAS                                 | 7  |
| 2.3.3 MCTPS                                     | 8  |
| 2.3.3.1 MCTPS EN C. ELEGANS                     | 10 |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b>                         | 12 |
| <b>4. OBJETIVOS</b>                             | 12 |
| 4.1. OBJETIVO GENERAL                           | 12 |
| 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES                     | 13 |
| 4.3. HIPÓTESIS                                  | 13 |
| <b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>                 | 14 |
| 5.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO                 | 14 |
| 5.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)  | 15 |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.3. EXTRACCIÓN DE DNA DE GELES DE AGAROSA                                   | 16        |
| 5.4. CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.  | 17        |
| 5.5. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES MEDIANTE CHOQUE TÉRMICO.        | 18        |
| 5.6. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO POR LISIS ALCALINA.                        | 18        |
| 5.7. SUBCLONACIÓN DE LOS PROMOTORES EN EL PLÁSMIDO PPD121.86.                | 20        |
| 5.8. MICROINYECCIÓN  | 21        |
| 5.9. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN POR MICROSCOPIA CONFOCAL.              | 22        |
| <b>6. RESULTADOS</b>   | <b>23</b> |
| 6.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.   | 23        |
| 6.2. AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LOS PROMOTORES DEL GEN D2092.1.            | 23        |
| 6.3. SUBCLONACIÓN DE LOS PROMOTORES DEL GEN D2092.1 EN EL PLÁSMIDO PPD121.86 | 26        |
| 6.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES DE LOS PLÁSMIDOS D2092.1A Y B.    | 27        |
| 6.5. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE D2092.1A Y D2092.1B.                             | 28        |
| <b>7. DISCUSIÓN</b>  | <b>30</b> |
| <b>8. CONCLUSIONES</b>   | <b>33</b> |
| <b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>34</b> |
| <b>10. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>  | <b>37</b> |

## Resumen

Las proteínas transmembranales con múltiples dominios C2 (MCTPs), presentan tres dominios C2 conservados, uno o dos pases transmembranales y una secuencia C terminal corta. Los vertebrados tienen dos genes independientes (*MCTP1* y *MCTP2*) que codifican para estas proteínas, su expresión ha sido descrita en órganos como el cerebro, el corazón, el riñón, el musculo y los testículos.. En contraste, en organismos invertebrados como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, solo se ha identificado un gen que codifica para las MCTPs (Shin et al. 2005). El objetivo de este trabajo fue caracterizar el patrón de expresión del gen D2092.1 de *C. elegans*, el cual es homólogo de MCTP2. Análisis *in silico* predicen que D2092.1 presenta dos variantes (D2092.1a y D2092.1b), que son dirigidos por dos promotores independientes.

Para determinar el patrón de expresión dirigido por estos promotores se realizaron: 1) análisis bioinformáticos de los promotores de cada variante; 2) construcción y microinyección en *C. elegans* de plásmidos que contienen los promotores de D2092.1a o D2092.1b dirigiendo la expresión de GFP y 3) análisis de la distribución de la expresión de GFP por microscopía confocal.

Los resultados de los análisis *in silico*, sugieren que las MCTP2 están localizadas en el tejido muscular y/o neuronas. Sin embargo, los experimentos de expresión *in vivo*, indicaron que los promotores dirigen la expresión en neuronas y no en músculos. D2092.1a dirigió la expresión en tres neuronas situadas en la parte ventral de la faringe, mientras que D2092.1b en neuronas del ganglio anterior (AG), y desde el cordón nervioso ventral (VNC) hasta el ganglio preanal (PAG).

Con base en estos resultados concluimos que los promotores del gen D2092.1 se expresan en neuronas del nematodo *C. elegans* sin encontrar evidencia de la expresión en músculos.



## Abstract

Multiple C2 domain and transmembrane regions proteins (MCTPs), present three conserved C2 domains, one or two transmembrane regions and one short C terminal sequence. Vertebrates have two MCTP genes (MCTP1 and MCTP2). In contrast, invertebrates such as *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* express only one MCTP gene (Shin et al. 2005)

The aim of this work was to characterize the expression of the *C. elegans* D2092.1 gene that encodes for the MCTP2 homologous gene, and has been proposed to be directed by two transcriptional promoters. These putative promoters would direct the expression of two different transcripts (D2092.1a y D2092.1b).

The following studies were performed: 1) bioinformatic analysis of the promoters for each variant, 2) construction and microinjection of expression plasmids that include D2092.1a and D2092.1b promoters driving the GFP expression, and 3) analysis of the expression by laser confocal microscopy.

*In silico* studies suggested that the promoters would direct the expression of D2092.1 in neurons and/or muscle. However, analysis of the expression pattern indicated that the reporter gene for D2092.1 is present in neurons and not in muscle. D2092.1a was located in three neurons ventral to the pharynx, whereas the D2092.1b is distributed in anterior ganglion neurons (AG) and from the ventral nerve cord (VNC) to the preanal ganglion (PAG).

Based on these observations, we conclude that the promoters of D2092.1 drive its expression in neurons. No evidence was found for the expression in muscle.

## 1. Introducción

Uno de los procesos fisiológicos ampliamente estudiados en neurociencias es la descripción del papel funcional de proteínas que contienen dominios C2. Como ejemplo están las que se encuentran embebidas en las vesículas sinápticas (vs) (Südhof & Malenka 2008; Südhof 2004). Algunas de las proteínas que conforman estructuralmente a la membrana de las vs presentan regiones conservadas llamadas dominios C2 (Nalefski & Falke 1996). Los dominios C2 comprenden aproximadamente 130 aminoácidos, que forman láminas  $\beta$ , las cuales tienen la propiedad de unir diversos ligandos y sustratos como fosfolípidos, inositol polifosfatos y  $\text{Ca}^{2+}$ . Los dominios C2 fueron identificados en las sinaptotagminas revisado por (Ubach et al. 1998) y posteriormente en varias proteínas como las ferlinas y las E-Syts (Extended Synaptotagmin-Like Proteins) (Min et al. 2007). Se sabe que el dominio C2 dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  también está presente en otras proteínas como la proteína cinasa C (PKC) y la fosfolipasa A2 (Corbalan-García & Gómez-Fernández 2014). Las proteínas que participan en la neurotransmisión que contienen los dominios C2 han sido ampliamente estudiadas. (Bansal & Campbell 2004) puntualizan que estas proteínas tienen una relevancia biológica determinante, ya que responden al flujo entrante de  $\text{Ca}^{2+}$  con la participación de los dominios C2 en dos procesos biológicos importantes tales y como son la generación de segundos mensajeros y la fusión de las vs a la membrana para la exocitosis de neurotransmisores. Las proteínas que han sido caracterizadas funcionalmente como sensoras de  $\text{Ca}^{2+}$ , contienen más de un dominio C2. Se ha descrito que los dominios C2 de estas proteínas se encuentran altamente conservados en otras familias de proteínas que aún no han sido caracterizadas como las proteínas transmembranales con múltiples dominios C2 (MCTPs).

En el presente trabajo nos enfocamos a describir el patrón de expresión y la diversidad estructural del gen D2092.1 de *C. elegans*, el cual, es el gen homólogo que codifica para la proteína MCTP2 de mamíferos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1.- PROTEINAS CON DOMINIOS C2

#### 2.1.2 DOMINIO C2.

El dominio C2 fue identificado por primera vez en la PKC (Nishizuka 1988). La estructura a alta resolución de este dominio se determinó originalmente en las proteínas sinaptotagminas (Figura 1) (Ubach et al. 1998; Sutton et al. 1995), todas estas participan en procesos celulares como el tráfico de proteínas de membrana, la generación de segundos mensajeros, la activación de proteínas GTPasas, la señalización dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y la neurotransmisión.

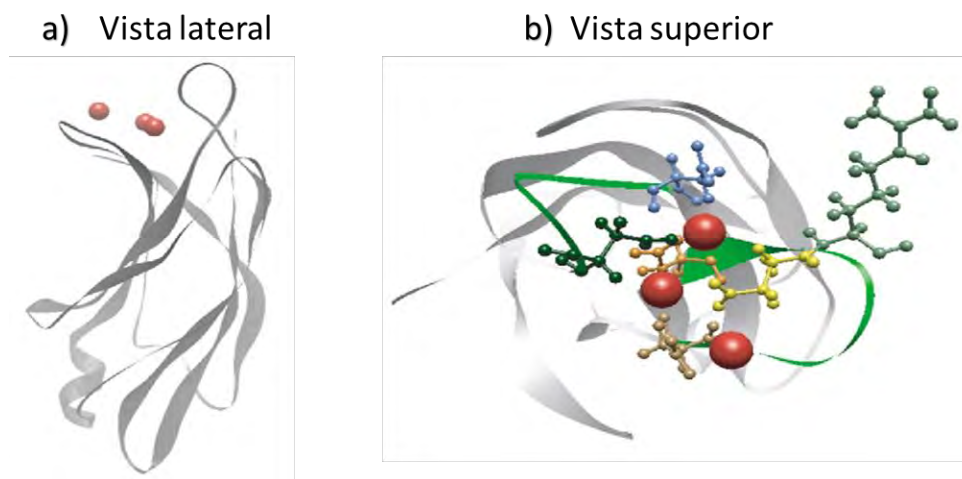


Figura 1.- Estructura del dominio C2 de la sinaptotagmina I. a) Vista lateral del dominio C2 de la sinaptotagmina 1. b) vista superior del dominio C2 donde se muestra los sitios de unión del  $\text{Ca}^{2+}$ . El ion  $\text{Ca}^{2+}$  está representado por las esferas rojas, en gris se muestran las láminas  $\beta$ , en verde los asas de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  y en azul los residuos de aspartato modificado de (Bai & Chapman 2004).



## 2.3. PROTEÍNAS TRANSMEMBRANALES CON DOMINIOS C2

Como se mencionó, las proteínas con múltiples dominios C2, están implicadas en cascadas de vías de señalización y en tráfico de membranas. Utilizando herramientas bioinformáticas se ha estimado que existen alrededor de 99 proteínas que contienen dominios C2 en el ser humano (Schultz et al. 1998).

Las proteínas que presentan dominios funcionales C2 se han dividido en dos grupos: 1) las que estas unidas a membranas, las cuales, presentan múltiples dominios C2 y con segmentos de residuos hidrofóbicos que permiten su anclaje a membranas y 2) las que son solubles y que como característica principal solo presentan un dominio C2 y no poseen pases transmembranales. Sin embargo, aún se desconoce sobre el papel funcional de muchas de estas proteínas (Corbalan-García & Gómez-Fernández 2014).

### 2.3.1. Sinaptotagminas

Las sinaptotagminas forman parte de una familia de proteínas con dominios C2 y con 1 segmento transmembranal. La sinaptotagmina-1 es un elemento clave para la neurotransmisión por estar embebida en las vesículas exocíticas que contienen neurotransmisores y detonan el proceso de exocitosis en respuesta a los cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular. Investigaciones realizadas en esta familia de proteínas, han demostrado que el dominio C2A de estas fija tres iones de  $Ca^{2+}$  (Ubach et al. 1998) y el dominio C2B fija dos iones de  $Ca^{2+}$  (Fernández-Chacón et al. 2001). La afinidad para fijar  $Ca^{2+}$  por los dominios C2 es relativamente baja; sin embargo se ha demostrado que la afinidad por el  $Ca^{2+}$  se incrementa considerablemente al unirse a los fosfolípidos de las membranas, debido a que las cabezas de los fosfolípidos presentan cargas negativas que estabilizan la fijación del  $Ca^{2+}$ . También se ha demostrado que los dominios C2 de la sinaptotagmina-1 son sensores de las concentraciones de este catión y que son fundamentales para la exocitosis rápida de neurotransmisores, pero no para la

fusión de la membrana de las vs con la membrana plasmática de la neurona. Se mostró que realizando mutaciones específicas en los dominios C2A de la sinaptotagmina 1 se altera la afinidad para fijar  $Ca^{2+}$ , lo cual, resulta en el decremento en la tasa de exocitosis durante la neurotransmisión (Fernández-Chacón et al. 2001). Por otra parte, mutaciones generadas en el dominio C2 de la sinaptotagmina 1 afectan la función de esta proteína como sensor de  $Ca^{2+}$  en la liberación de neurotransmisores en el hipocampo (Geppert et al. 1994). Además, se ha demostrado que mutaciones en el dominio dominio C2B de la sinaptotagmina I, incrementan la tasa de liberación del neurotransmisor (Mace et al. 2009). Los resultados de los trabajos anteriores demuestran la importancia que tienen los dominios C2 al censar el  $Ca^{2+}$  en la regulación de la neurotransmisión.

### **2.3.2. Ferlinas**

Las ferlinas están involucradas en la fusión y en la fisión de endomembranas, así como también en la modulación de señales de  $Ca^{2+}$  (Gustavsson et al. 2012; Marty et al. 2013; Therrien et al. 2009). Dentro de esta familia se encuentran las disferlinas, otoferlinas y las mioferlinas, las cuales presentan 6 a 7 dominios C2 en su estructura (Figura 2). Varios estudios han reportado la importancia de esta familia de proteínas en diversos procesos biológicos, por ejemplo, en la espermatogénesis y en el proceso de reparación muscular en el nematodo *C.elegans* (Washington & Ward 2006), así como en exocitosis de los neurotransmisores en humanos (Lek et al. 2012; Min et al. 2007; Lalani et al. 2013).

### 2.3.3 MCTPs

En un trabajo en el cual se utilizaron herramientas bioinformáticas, se identificaron nuevos genes que codifican para proteínas que incluyen dominios C2, se reportaron los genes *MCTPs* en mamíferos, definiéndose así una nueva familia de proteínas transmembranales con múltiples dominios C2. Esta familia de proteínas presenta variantes generadas por edición alternativa (*MCTP1* y *MCTP2*) y están conformadas de tres dominios C2 con los extremos N y C terminales citoplasmáticos y separados por una o dos regiones transmembranales (Figura 2) (Shin et al. 2005). Los resultados de esta investigación demostraron que en mamíferos estas proteínas se encuentran localizadas en vesículas intracelulares y tienen propiedades diferentes a las sinaptotagminas, E-syts y ferlinas, ya que fijan  $Ca^{2+}$  sin requerir unirse a los fosfolípidos de la membrana. Adicionalmente, por mediante la técnica de *Western-blot* se encontró que las MCTPs se expresan principalmente en tejido muscular y cardiaco, y una menor proporción en el cerebro en general (Shin et al. 2005). En otro trabajo se identificaron las proteínas ortólogas a las MCTPs en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se observó que tienen un papel fundamental en el anclaje del retículo endoplasmático a la membrana plasmática de la levadura (Manford et al. 2012).

Por otro lado, aunque la función de estas proteínas MCTPs es desconocida, existen reportes, los cuales mencionan de las posibles implicaciones que pudieran tener en invertebrados y mamíferos. Por ejemplo, la *MCTP1* está asociada a vesículas sinápticas en neuronas del hipocampo (WU CHUN 2009), por lo que podría jugar un papel en la regulación de la transmisión sináptica (Gustavsson et al. 2012) En otro trabajo cuyo objetivo fue la caracterización de genes que se expresan en la vía olfativa de *Drosophila melanogaster* se ubicaron a las MCTPs en las células accesorias del tercer segmento que conforma la antena. Además, la delección del gen estructural que codifica para estas proteínas en esta especie causa alta mortalidad (Tunstall et al. 2012).

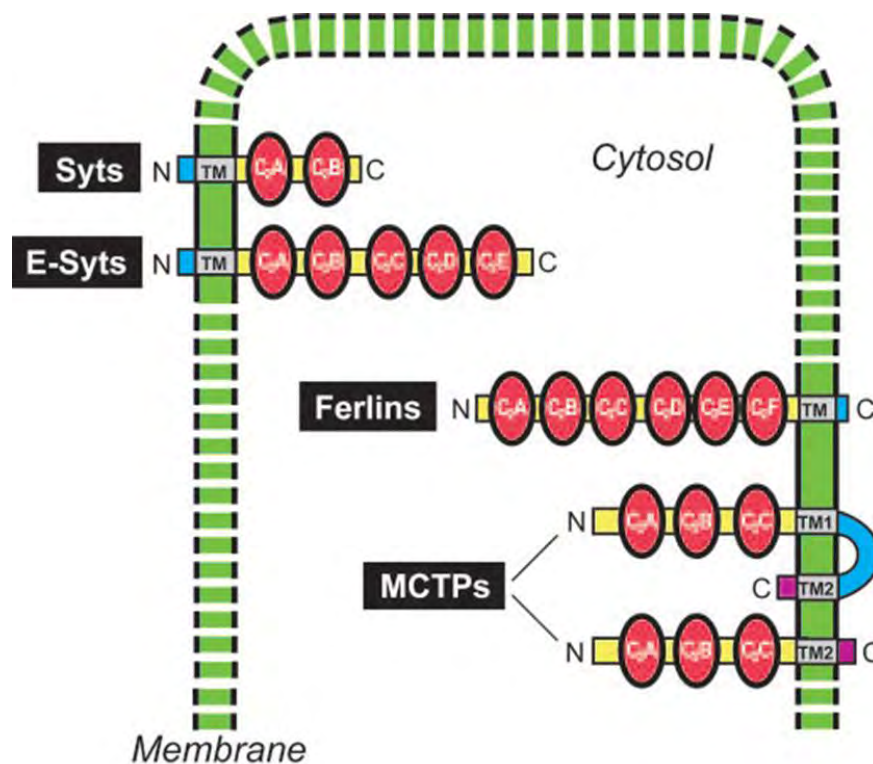


Figura 2.- Estructura de proteínas que presentan múltiples dominios C2 (círculos en rojo) y regiones transmembranales (TM) tomado de (Shin et al. 2005).

En humanos el gen *MCTP2* está ubicado en la región cromosómica 15q26, la cual está asociada a la heredabilidad de la esquizofrenia. La genotipificación de 37 polimorfismos del gen *MCTP2* indicó que algunos de estos son factores putativos para el desarrollo de esta enfermedad (Djurovic et al. 2009). Además, se ha mostrado que *MCTP2* juega un papel determinante en la cardiogénesis y en la coacción aortica, ya que se demostró que mutaciones en este gen generan cambios en los dominios C2 los que conducen al estrechamiento de la aorta (Lalani et al. 2013). De manera interesante, estas enfermedades cardíacas pueden ser reproducidas experimentalmente al suprimir la expresión mediante el uso de morfolinós en embriones de la rana *Xenopus laevis* (Lalani et al. 2013).



### 2.3.3.1 MCTPs en *C. elegans*

Estudios preliminares en nuestro laboratorio identificaron por métodos bioinformáticos al gen D2092.1 de *C. elegans* como el único gen homólogo a las MCTP2. Se predice que este gen codifica para dos isoformas de la proteína derivadas de edición (isoforma A y la isoforma B) y que cada una de ellas es regulada por dos diferentes promotores (Figura 3).

Al analizar los promotores de cada una de las isoformas del gene D2092.1, se observó que estas tienen sitios de unión para los siguientes factores de transcripción, LIN14, SKN1, CEH22, TRA1, HLH2, HLH19, los cuales se expresan en tejido neuronal y muscular (Figura 4) (Hong et al. 2000; An & Blackwell 2003; Kuchenthal et al. 2001). Estas observaciones sugieren que el gen D2092.1 de *C. elegans* podría expresarse en neuronas o en músculo; sin embargo, la presencia de estos sitios de unión para estos factores no es prueba suficiente de que D2092.1 se exprese exclusivamente en estos tipos celulares, por lo que se debe realizar un análisis más detallado para definir el patrón de expresión del gen. Por otro lado, la supresión de la expresión de D2092.1 mediante RNAi es letal para el nematodo en el desarrollo embrionario, pero no se ha descrito con detalle el fenotipo derivado de la delección del gen (Maeda et al. 2001).

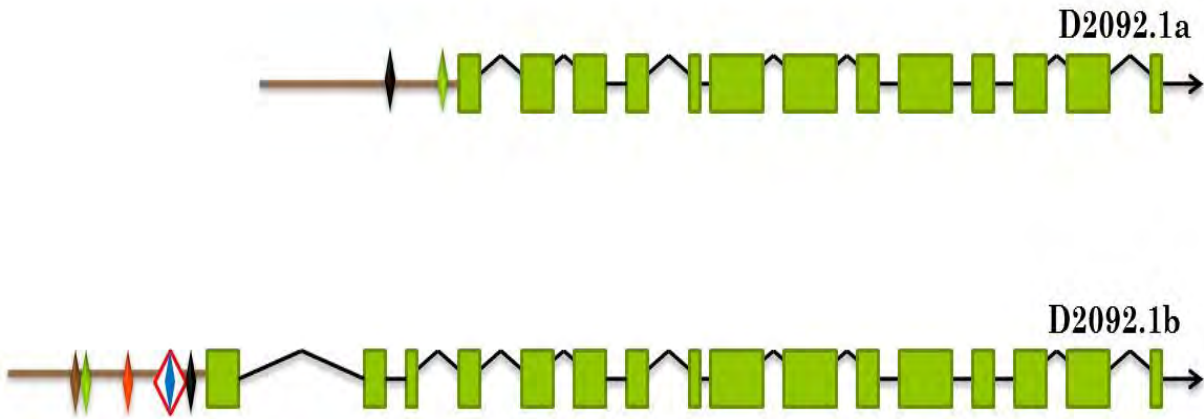


Figura 3. Análisis in silico de la estructura del gen D2092.1, en donde se observa la predicción de dos promotores (D2092.1a y D2092.1b), la



organización exón-intrón de las isoformas derivadas.

Figura 4. Análisis in silico e identificación de los sitios de reconocimiento para factores de transcripción de los promotores para D2092.1a (a) y D2092.1b (b). Los sitios LIN14, SKN-1, HLH2, HLH-8, TRA-1, CEH-22, HLH-19 y la metionina (Met) están señalados con

recuadros. Las secuencias fueron analizadas en el programa TRANSFAC® 7.0 de Gene-Regulation.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Con estos antecedentes se plantea que las proteínas MCTP2 podrían participar en la modulación de señales en las que participa el  $Ca^{2+}$ . Hasta el momento no existe información respecto a las propiedades funcionales de las MCTP2 ni sobre su localización celular; pero debido a las similitudes en su secuencia primaria con las sinaptotagminas, ferlinas, E-syts y Tcbs, se sugiere que son proteínas que participan en la fusión de vesículas a la membrana o pudieran mediar la unión de la membrana plasmática con el retículo endoplasmático.

En conjunto, los antecedentes sugieren que las MCTP2 podrían tener un rol relevante en la función de músculo y/o neuronas, y que el uso del nematodo *C. elegans* como modelo experimental podría permitir descifrar las propiedades de estas proteínas. Para este estudio se plantea determinar cuál es el patrón de expresión generado por los dos promotores alternativos que presenta el gen D2092.1 y así inferir la distribución de la proteína MCTP2.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo general

Determinar el patrón de expresión del gen D2092.1 en el nematodo *C. Elegans*.

## 4.2. Objetivos particulares

Clonar los promotores alternativos D2092.1a y D2092,1b.

Generar los vectores de expresión D2092.1a::pPD121.86 y D2092.1b::pPD121.8.

Determinar el patrón de expresión de las isoformas (a y b) del gen D2092.1.

## 4.3. Hipótesis

1. Los promotores del gen D2092.1 dirigen la expresión a neuronas y/o músculos del nematodo *C. elegans*.

## 5. Materiales y métodos.

### 5.1. Extracción de ADN Genómico

Para la extracción del ADN genómico, se usó el método de extracción por proteinasa K y fenol modificado de (Daryl Stafford et al., 1976).

Se colectaron gusanos de la cepa silvestre N2 de *C. elegans*, se congelaron con nitrógeno líquido y se homogenizó el material en un mortero. Después se le agregó 10 volúmenes de solución amortiguadora de lisis (10mM Tris-Cl pH 8.0, 0.1 M, EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 20 mg/ml de RNAsa) con respecto del volumen de la muestra (Sambrook J. et al., 2001) y se incubó por 1 h a 37°C. Se agregó al lisado la proteinasa K a una concentración final de 100µg/ml, se procedió a mezclar suavemente y se incubó en baño maría a 50°C por 30 min, agitando la solución periódicamente. Posteriormente, se dejó temperar la solución y se le agregó un volumen de fenol equivalente a la solución, mezclando por 10 min y de manera suave hasta formar una emulsión, se colocó el tubo en un mezclador a 30 rpm toda la noche a 4°C. Se centrifugó la mezcla a 5000 g por 15 min, a temperatura ambiente y se obtuvieron dos fases. La fase acuosa (0.3 cm) se centrifugó a 5000 g por 20 min. a temperatura ambiente. Esta extracción con fenol se repitió dos veces más. La fase acuosa se pasó a un tubo nuevo y se le adicionaron 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10M y 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente, se agitó suavemente hasta obtener un precipitado. En seguida, se centrifugó a 5000 g por 5 min. Se retiró el sobrenadante de etanol y se dejó secar por 10 min a 37°C. Una vez evaporado el etanol de la muestra se disolvió en 1 ml de solución TE (100mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0). El producto obtenido se analizó en un gel de agarosa al 0.8 % (Sambrook J. et al, 2001).

## 5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó esta técnica para la amplificación de los promotores del gen D2092.1 del nematodo *C. elegans*. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Techne usando la enzima *Taq* DNA polimerasa Platinum de alta fidelidad (Life Technologies) de acuerdo al protocolo del productor.

Para la reacción de PCR se utilizó el ADN genómico extraído y se utilizaron oligonucleótidos específicos (tabla 1) diseñados con sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Sal* I y *Bam* HI, los cuales permitieron la subclonación del fragmento amplificado a un vector de expresión. Los componentes utilizados en la reacción de PCR se ilustran en la (tabla 2) y el protocolo de PCR se muestra en la (tabla 3).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para PCR.

| Región            | Secuencia de los oligonucleótidos   | Producto amplificado (pb) |
|-------------------|---|---------------------------|
| Promotor D2092.1a | FD 5'gtcgacaaattagtagtctactccataa3'<br>RD 5'ggatcctcatattgctgcaaccgtttgaa3' | 2000                      |
| Promotor D2092.1b | FD 5'gtcgactgtcgagtgcgctgtagaatttag3'<br>RD 5'ggatcctcatgtttgtgtgttctctc3'  | 2000                      |

Tabla 2. Los componentes de la reacción de PCR

| Componente                    | Volumen $\mu$ l |
|-------------------------------|-----------------|
| 10 x Buffer                   | 5               |
| MgCl <sub>2</sub> 50mM        | 3.5             |
| dNTPs 10mM                    | 1               |
| Primers 2.5 $\mu$ M           | 8               |
| ADN (100 ng/ $\mu$ l)         | 1               |
| Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l) | 1               |
| H <sub>2</sub> O              | 30.5            |
| VOLUMEN FINAL                 | 50              |

Tabla 3. Protocolo de PCR

|                     | Temperatura | Tiempo   | Numero de ciclos |
|---------------------|-------------|----------|------------------|
| Temperatura inicial | 94°C        | 5 min    | 1                |
| Desnaturalización   | 94°C        | 45 s     |                  |
| Alineamiento        | 54°C        | 45 s     | 35               |
| Extensión           | 72°C        | 2.10 min |                  |
| Extensión final     | 72°C        | 5 min    | 1                |

### 5.3. Extracción de DNA de geles de agarosa

El producto obtenido en la amplificación se analizó en un gel de agarosa al 0.8%, utilizando un marcador de peso molecular para corroborar el tamaño el fragmento. Se aisló el producto mediante el protocolo de purificación QIAquick GEL (QIAGEN) que se describe a continuación. Se pesó la banda cortada se colocó en un tubo de 1.5ml. Se agregaron 3 volúmenes de solución QG con respecto del peso de la muestra (solución de solubilización) y se incubó a 50°C por 10 min hasta disolver la agarosa agitando con el vortex. Se agregó un volumen de isopropanol a la muestra y la solución se transfirió a una columna del kit la cual

se centrifugó 1 min a 13,000 rpm. El líquido que pasó a través de la columna se desechó y se agregó 0.75 ml de buffer PE (solución de lavado 5X) antes de centrifugar 1 min a 13,000 rpm. Después se colocó la columna en un tubo limpio, agregando 30  $\mu$ l de buffer de elución, se dejó incubando a 50°C para mejorar la eficiencia de la elución del ADN y posterior a ello, se centrifugó 1 min a 13,000 rpm.

#### 5.4. Clonación de productos de PCR.

Para la clonación del promotor del gen D2092.1 en el vector pGEMT-EASY se utilizó el protocolo indicado por la casa comercial (tabla 4).

Tabla 4. Reacción de ligación del promotor del gen D2092.1 en el vector pGEMT-EASY.

| Componente                   | Volumen $\mu$ l |
|------------------------------|-----------------|
| 2X buffer de ligación rápido | 10              |
| Vector pGEMT-EASY 50 ng.     | 0.5             |
| Producto de PCR              | 8.5             |
| Ligasa (1U/ $\mu$ l)         | 1.0             |
| H <sub>2</sub> O             | ----            |
| Volumen final                | 20              |

Se incubo a 4°C por 16 h y una vez pasado este tiempo se procedió a la transformación de bacterias competentes.



### **5.5. Transformación de bacterias competentes mediante choque térmico.**

Se mezclaron 5 µl de la reacción de ligación (ADN-vector) en un vial de *E. coli* (XL1 blue) competentes para transformación para su incubación por 30 min en hielo tras la cual se dio un choque térmico a 42°C por 90 seg seguido por 2 min en hielo. Se incubó en 400 µl de medio LB por 2 h a 37°C a 550 rpm. Posteriormente se sembraron 200 µl de las bacterias transformadas en cajas Petri con LB-agar con ampicilina (50 µg/ml). Se incubaron por 16 h y se seleccionaron varias colonias para su propagación en tubos con 4 ml de medio líquido LB con ampicilina. Se incubaron las bacterias por 16 h a 37°C con agitación de 160 rpm y se procedió a hacer la extracción de ADN plasmídico.

### **5.6. Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina.**

Las clonas obtenidas fueron procesadas para la obtención del ADN plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina. Una vez que se cultivaron las clonas, se tomaron 1.5 ml y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min; el sobrenadante se descartó y el botón obtenido se resuspendió en 200 µl de solución 1 (Tris-Cl 25mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, pH 8.0). Se agitó en el vortex hasta disolución completa, después se agregaron 200 µl de la solución 2 (NaOH 10 N y SDS 10%), se mezcló suavemente por inversión, posteriormente se adicionaron 350 µl de solución 3 (60 ml de acetato de potasio 5M, 11.5 ml de ácido acético concentrado, 28.5ml de agua), se agitó nuevamente por inversión. Una vez obtenida la mezcla se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó lo equivalente a 1 vol de fenol, se agitó utilizando el vortex y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. El sobrenadante obtenido se pasó a otro tubo nuevo para adicionarle 0.8 volúmenes de isopropanol y después centrifugar a 13,000rpm por 5 min para obtener un precipitado. El sobrenadante resultante se descartó y la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70% frío y se centrifugó por 2 min a 13,000 rpm. Se removió el sobrenadante y el botón obtenido se secó en una incubadora a 37°C por 10 min. Por último el DNA fue resuspendido en 20 µl de

H<sub>2</sub>O. Para corroborar la extracción del ADN plasmídico se analizaron 4 µl de cada una de las muestras en geles de agarosa al 0.8 %. Posteriormente, se caracterizaron las muestras con enzimas de restricción BamHI y Sall, para seleccionar las clonas que fueran positivas con el fragmento clonado (Tabla 5).

Tabla 5. Reacción de digestión de Ce. Proms. y pGEMT-EASY.

| Componente             | Volumen µl |
|------------------------|------------|
| H2O                    | 7          |
| ADN                    | 1          |
| Buffer 10X             | 1          |
| Enzimas Sall (10 U/µl) | 0.5        |
| BamHI (10 U/µl)        | 0.5        |
| Volumen final          | 10         |

Las reacciones de digestión se incubaron por 1 h a 37 °C y se analizò el producto en un gel de agarosa al 0.8%.

Posterior a la caracterización con las enzimas de restricción se secuenciaron varias clonas para corroborar la identidad del producto obtenido. La secuenciación se llevó a cabo con el secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (unidad de Proteogenómica INB-UNAM). La secuenciación se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del kit Big Dye sequencing V.2 basado en el uso de terminadores dNTP's marcados con fluorocromos: IRDye-800. Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el algoritmo BLAST y el programa TRANSFAC® 7.0 de Gene-Regulation.

### 5.7. Subclonación de los promotores en el plásmido pPD121.86.

Con la finalidad de utilizar un vector que permitiera probar la función de los promotores del gen D2092.1, se introdujeron los fragmentos en el vector de expresión pPD121.86 diseñado en el laboratorio del Dr. Andrew Fire. Como características específicas de este vector se encuentran las siguientes: presenta un casete que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) como reportero, contiene tres intrones heterólogos sintéticos ( $\Lambda\beta\delta$ ) flanqueando la región codificante de GFP, los cuales dan mayor estabilidad a la expresión del reportero. La estrategia de clonación se ilustra en la (Figura 5).

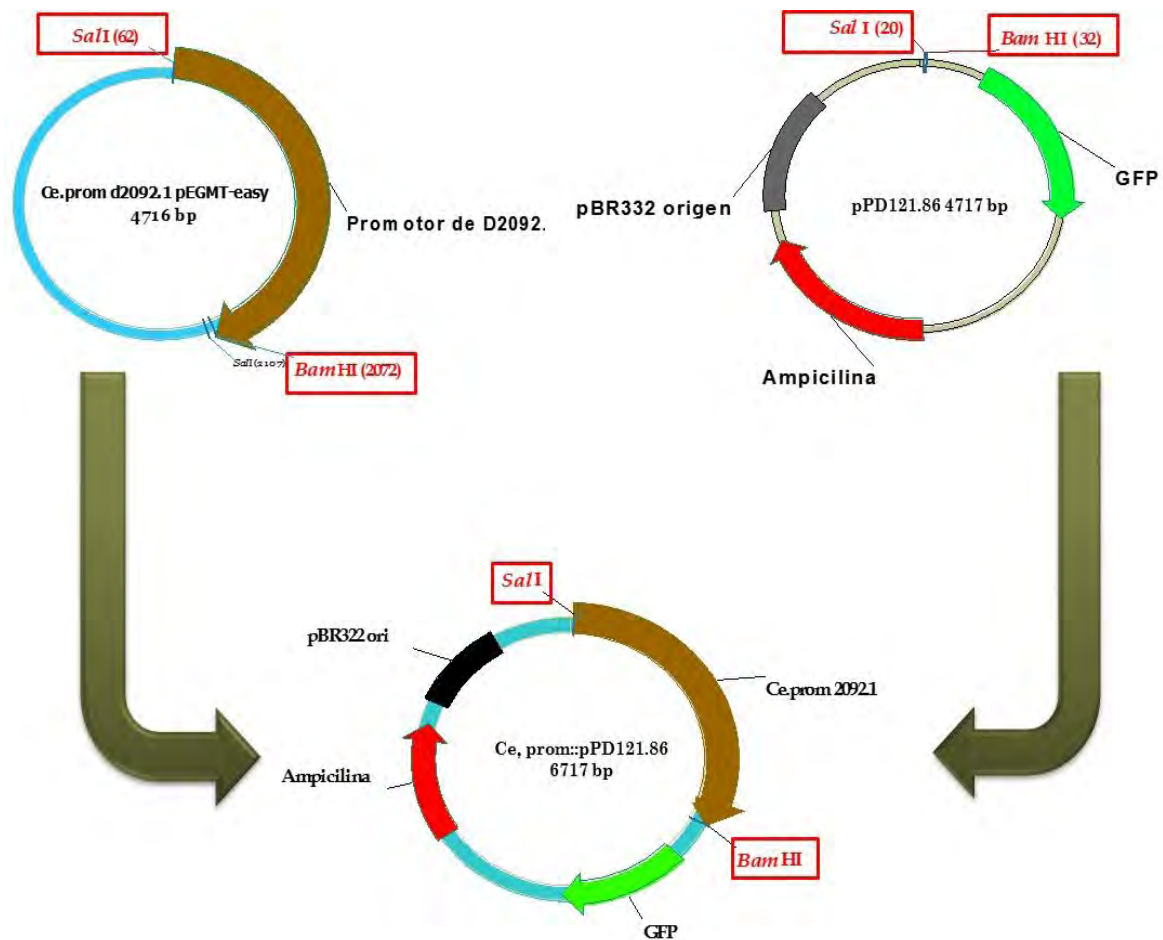


Figura 5. Estrategia de subclonación de los promotores del gen D2092.1 de *C. elegans* en el vector de expresión pPD121.86.

Los fragmentos correspondientes a cada uno de los promotores, flanqueados por los sitios de restricción Sall y BamHI fueron ligados al vector de expresión pPD121.86.

Tabla 6. Reacción de ligación del promotor del gen D2092.1 y el vector de expresión.

| Componente           | Volumen $\mu$ l |
|----------------------|-----------------|
| H2O                  | 5.5             |
| Buffer 10X           | 1.5             |
| ADN vector           | 1               |
| ADN Inserto          | 6               |
| Ligasa (1U/ $\mu$ l) | 1               |
| Volumen final        | 15              |

La ligación se incubó por 16 h a temperatura ambiente (Tabla 6). El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes XL1-blue mediante el protocolo anteriormente descrito, se extrajo ADN plasmídico, y las clonas fueron caracterizadas mediante la digestión con la enzimas Sall y BamHI, para liberar los fragmentos correspondientes a los promotores y al vector de expresión (Tabla 5).

### 5.8. Microinyección

Se inyectaron 10 gusanos con los plásmidos que portan cada uno de los promotores (pPD2092.1A:GFP y pPD2092.1B:GFP) a una concentración de 50ng/ $\mu$ l. La inyección se realizó a nivel de los brazos anterior y posterior del aparato reproductor de hermafroditas jóvenes con un microinyector PV-820 marca WPI. Además se utilizó como control de inyección el plásmido pPmyo-2:mCherry (50ng/ $\mu$ l), el cual permite la expresión de la proteína rojo fluorescente en la faringe.

## **5.9. Análisis del patrón de expresión por microscopia confocal.**

Para observar a los nematodos **F1**, se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM780 DUO; 488nm para excitar GFP y 556nm para mCherry. Se analizaron 15 gusanos y se tomaron 50 planos ópticos de 1.3  $\mu\text{m}$  por animal, el análisis de imágenes se realizó con el software Imagej1.47.

## 6. Resultados

### 6.1. Extracción de ADN genómico.

La integridad del DNA genómico aislado fue analizada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 6).

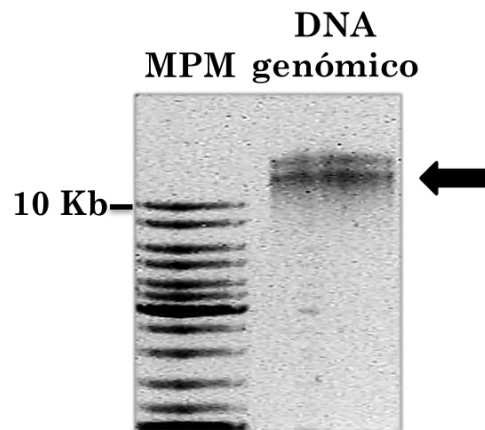


Figura 6. Fotografía del gel de agarosa en el que se muestra la ADN genómico (flecha) aislado de *C. elegans*. MPM: marcador de peso molecular.

Se determinó la concentración por espectrofotometría y el análisis arrojó una concentración de 49.8 ng/ $\mu$ l y 2.37 en el cociente  $\lambda_{260}/280$ .

### 6.2. Amplificación y clonación de los promotores del gen D2092.1.

Una vez obtenido el ADN genómico se realizó PCR donde se amplificaron los fragmentos que corresponden a los promotores de gen D2092.1 de *C. elegans*. Con un peso de 2 Kb (Figura 7), cada uno coincide con lo reportado en el la base de datos <http://www.worfdb.dfci.harvard.edu> con número de identificación D2092.1a y D2092.1b.

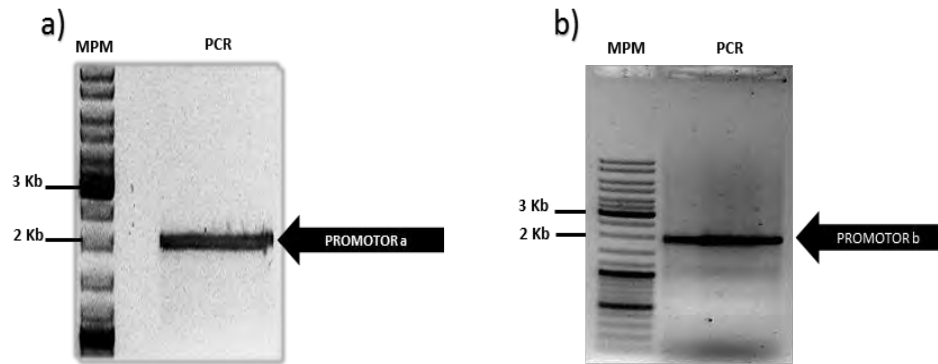


Figura 7. Productos de PCR de los promotores del gen D2092.1a (a) y D2092.1b (b).

Se obtuvieron diez clonas independientes, productos de la ligación del fragmento del promotor D2092.1a y tres clonas de la ligación del promotor D2092.1b en pGEM-Easy. Se analizaron los plásmidos obtenidos por medio de electroforesis en gel de agarosa (Figura 8a) y se caracterizaron mediante cortes con enzimas de restricción BamHI y Sal I (Figura 8b), el mapa funcional y de restricción de estos plásmidos se representa en la Figura 8c.

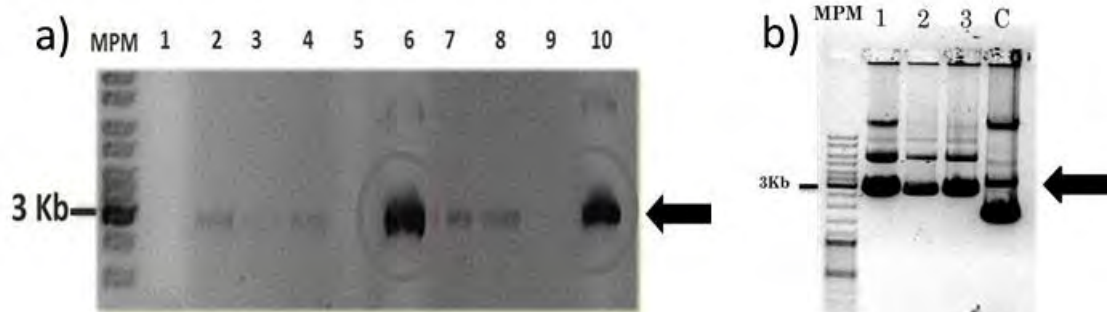


Figura 8A. Clonas del promotor para isoforma D2092.1a (a) e isoforma D2092.1b (b) en el vector pGEMT-EASY. MPM: marcador de peso molecular; C: plásmido control.

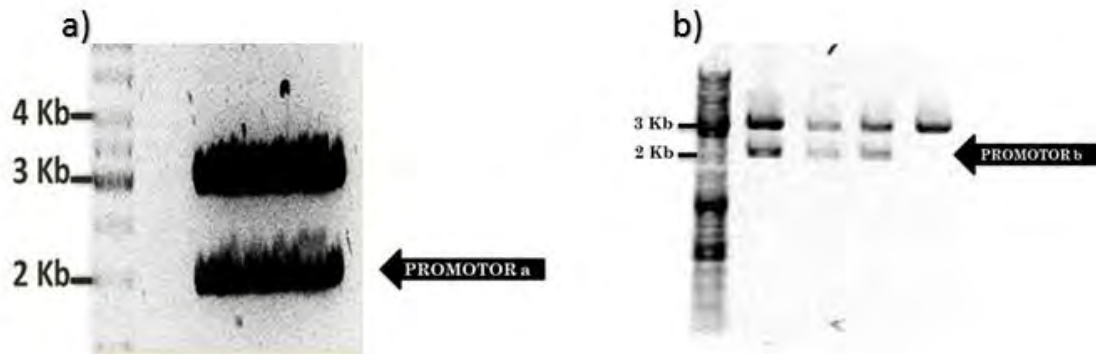


Figura 8B. Caracterización con las enzimas de restricción *SalI* y *BamHI* de las clonas de los promotor para las isoformas D2092.1a (a) e isoforma D2092.1b (b) en el vector pGEMT-EASY.

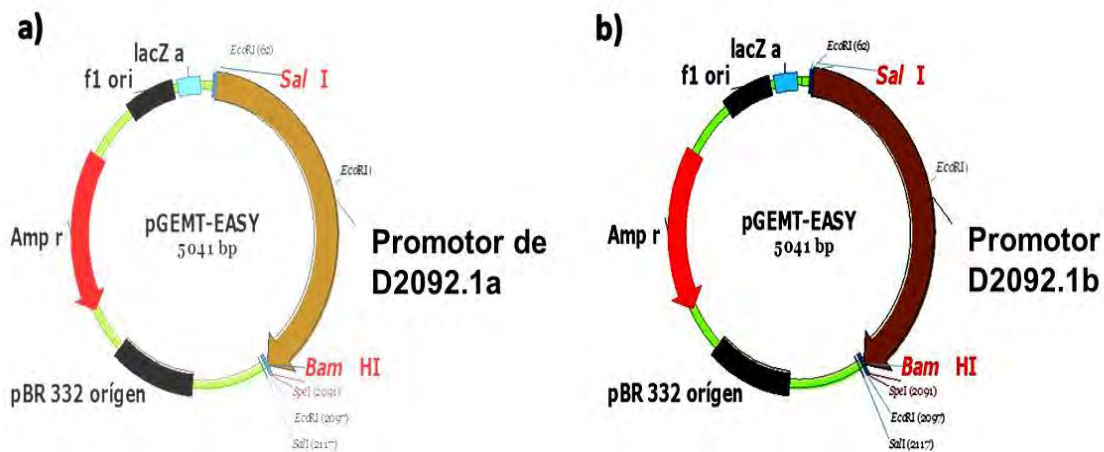


Figura 8C. Mapas de restricción de los plásmidos que portan D2092.1 a y b en pGEMT-EASY.



### 6.3. Subclonación de los promotores del gen D2092.1 en el plásmido pPD121.86

Una vez clonados los promotores, se procedió a subclonarlos en el vector pPD121.86 mediante la estrategia ilustrada en la (Figura 5). Para ello se utilizó los fragmentos del promotor y del vector de expresión digeridos con las enzimas BamHI y Sal (Figura 9). Los plásmidos obtenidos de la ligación de los fragmentos se muestran en la Figura 10.

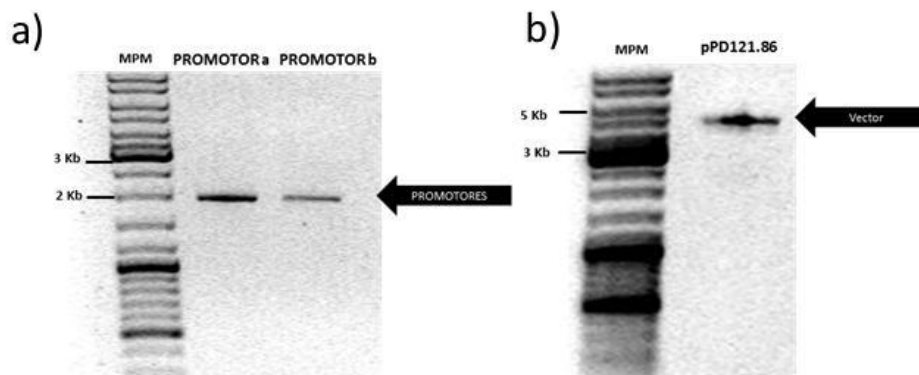


Figura 9. Geles de agarosa en donde se muestran los fragmentos que corresponden a los promotores del gen D2092.1a y D2092.1b cortados con las enzimas Sall y BamHI (a), vector de expresión pPD121.86 (b).

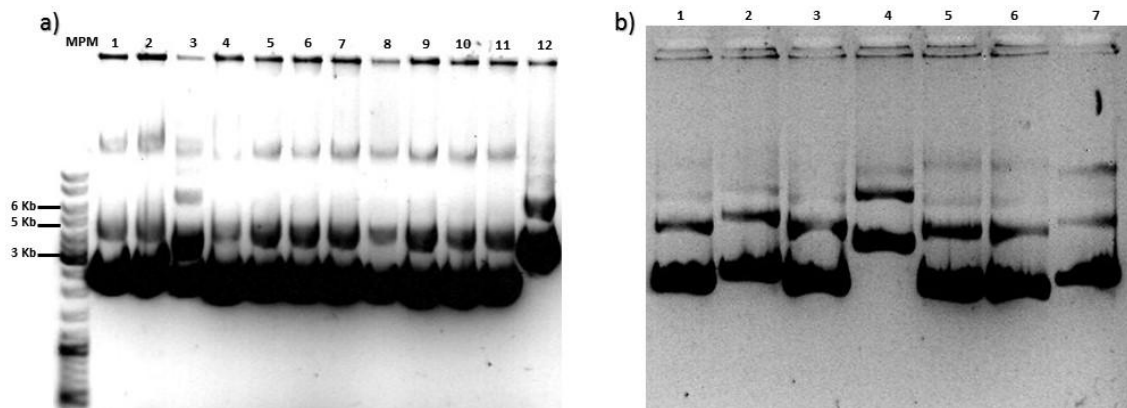


Figura 10. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa en donde se muestran los plásmidos obtenidos de D2092.1a (a) y D2092.1b (b).

#### 6.4. Caracterización de las construcciones de los plásmidos D2092.1a y b.

Se analizaron varios plásmidos mediante cortes con las enzimas *Sall* y *BamHI* y los resultados se muestran en la Figura 11 y los mapas de restricción de estos plásmidos en la figura 12.

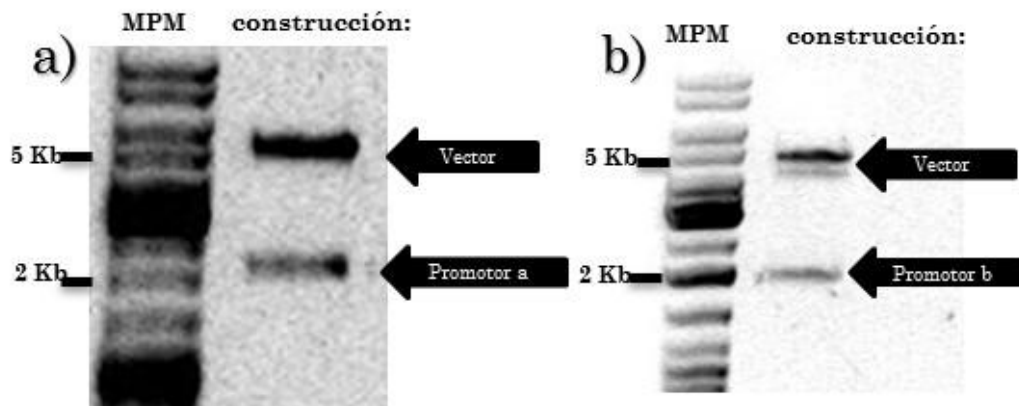


Figura 11. Fotografía del gel de agarosa en donde se muestra la digestión de las clonas para D2092.1a (a) y D2092.1b (b) con las enzimas *Sall* y *BamHI*.

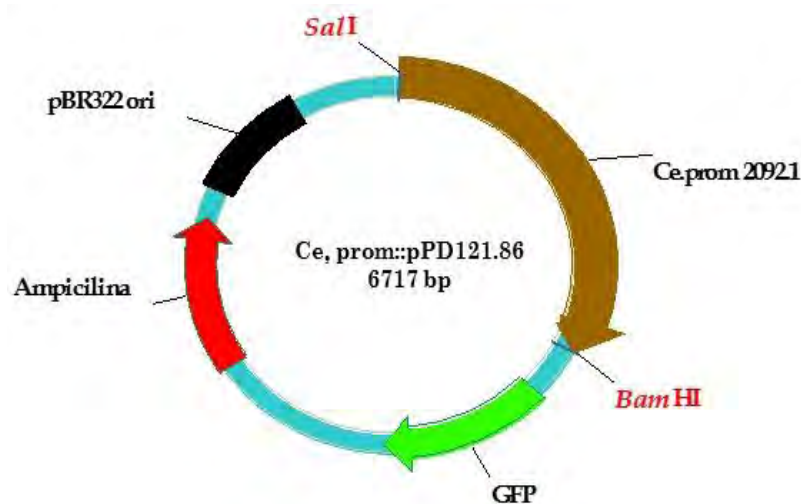


Figura 12. Mapa de los plásmidos pPD121.86::pD2092.1a y b.

### 6.5. Patrón de expresión de D2092.1a y D2092.1b.

Una vez microinyectadas las construcciones para las isoformas D2092.1a y D2092.1b, se inició la observación de la F1. Se estima que el porcentaje de nematodos que incorporaron el plásmido fue alrededor del 20%. El patrón de expresión de cada una de las isoformas se analizó en adultos.

En lo que se refiere al patrón de expresión de GFP acoplada al promotor de la isoforma D2092.1a, se encontró localizada en tres neuronas adyacentes a la faringe del nematodo. La localización observada del reportero corresponde a neuronas presentes en el anillo nervioso (Figura 13).

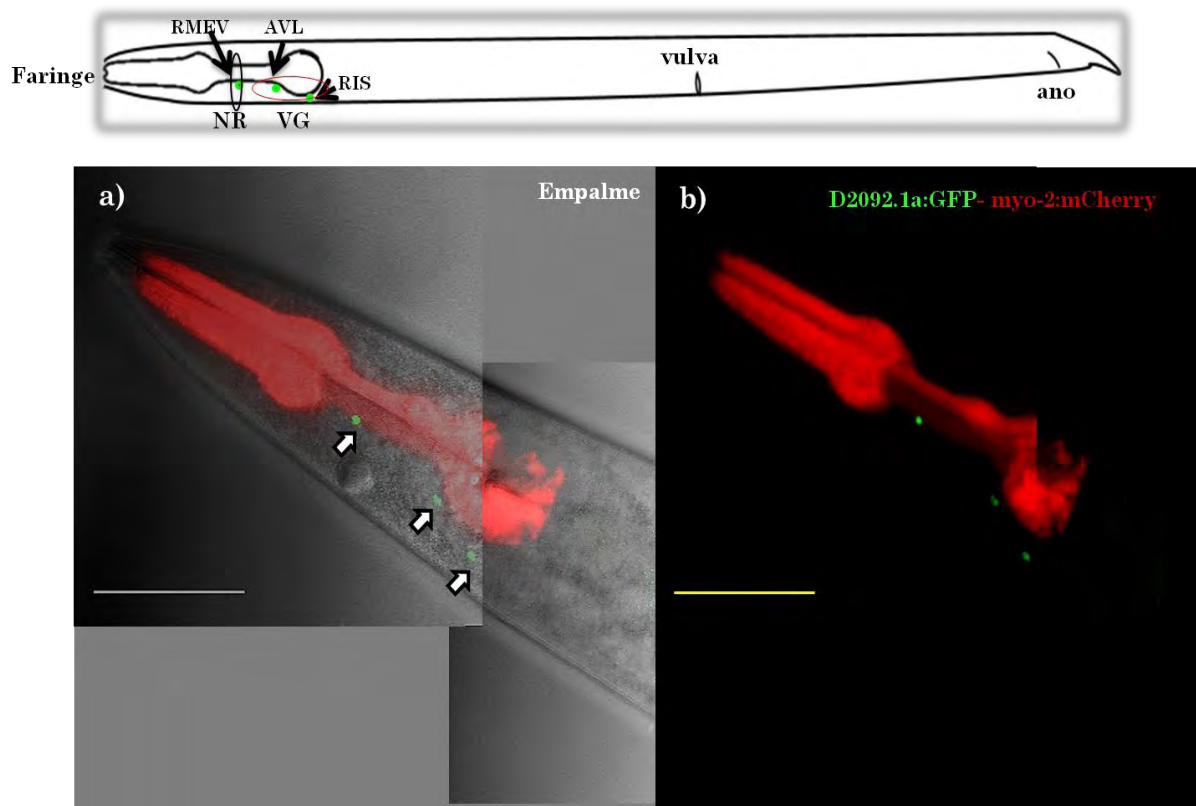


Figura 13. Patrón de expresión de D2092.1a::GFP y myo-2::mCherry. **a)** Superposición de las señales donde se muestra la expresión de la isoforma D2092.1a de la proteína en las neuronas adyacentes a la faringe(flechas). **b)** Expresión de D2092.1a::GFP y myo-2::mCherry. Las barras equivalen a 50 $\mu$ m.

A diferencia de la isoforma D2092.1a, la señal de GFP de la isoforma D2092.1b se situó alrededor de la faringe, estructura correspondiente a la posición anatómica que tiene el anillo nervioso y su distribución se extendió en sentido caudal hasta la porción adyacente al ano. Este patrón de expresión corresponde al cordón de neuronas motoras ventrales (VNC) del gusano (Figura 14).

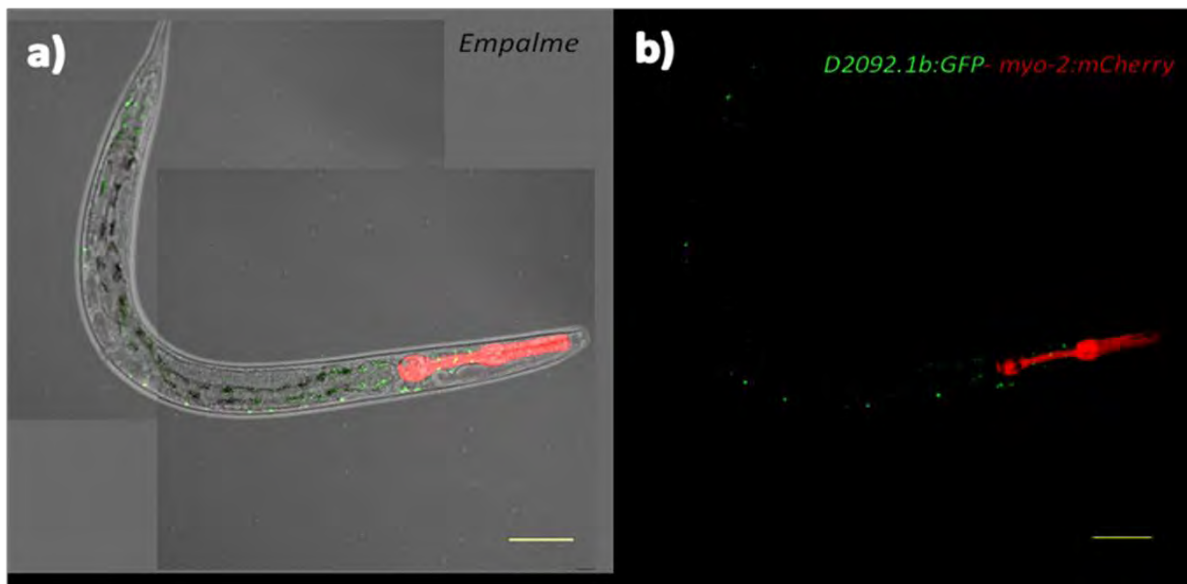
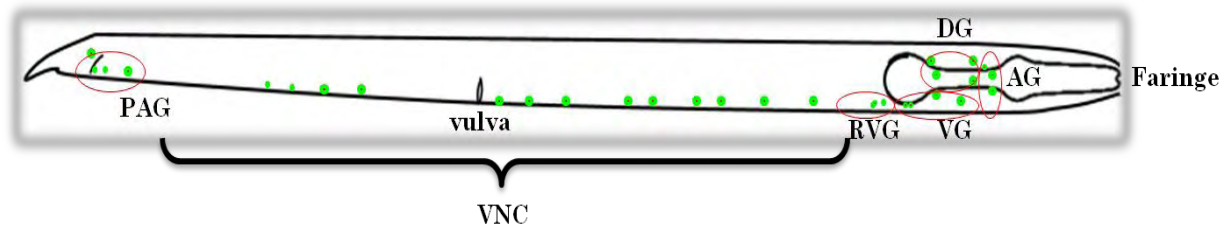


Figura 14. Patrón de expresión D2092.1b:GFP y myo-2::mCherry **a)**. Empalme de las señales donde se observa la localización de la isoforma D2092.1b en verde en las neuronas ubicadas a nivel a la faringe y a las correspondientes al VNC. **b)**. Expresión de D2092.1b::GFP y myo-2::mCherry. Las barras equivalen a 50µm.

## 7. Discusión

En el presente estudio se analizó el patrón de expresión del gen reportero GFP dirigido por dos promotores del gen D2092.1 de *C. elegans*. Este gen codifica para dos proteínas MCTPs, cuya función aún no ha sido esclarecida. Las observaciones indican que el promotor D2092.1a dirige la expresión del gen reportero en tres neuronas adyacentes a la faringe, mientras que el D2092.1b lo dirige en neuronas del ganglio ventral y el VNC.

Los análisis *in silico* de los promotores de D2092.1 indicaron que estos tienen sitios de unión para factores de transcripción propios de los sistemas nervioso y muscular del nematodo. Por lo que la hipótesis central de este proyecto era que el gen reportero se expresa en cualquiera de estos dos sistemas. Como se mostró en la sección de resultados los dos promotores dirigieron la expresión del gen reportero en neuronas, y no se encontró evidencia de su expresión en músculo. Estos resultados sugieren que la proteína MCTP2 deberá expresarse en los grupos de neuronas que se discutirán más adelante, pero contrasta con los hallazgos de la localización de esta proteína en mamíferos, la cual fue ubicada en músculo, particularmente en el músculo cardiaco (Shin et al. 2005) y en *D. melanogaster*, en donde se ubicó en células de origen glial (Tunstall et al. 2012).

Como se indicó, nuestros resultados revelan que existe una diferencia en cuanto a la localización de la expresión dirigida por los promotores D2092.1a y D2092.1b. Con respecto a la localización de D2092.1a, nuestros hallazgos muestran que las tres neuronas situadas adyacentes a la faringe podrían corresponder a las siguientes identidades, la neurona más posterior es muy similar a la de la interneurona GABAérgica RIS, la cual, subyace ventralmente a nivel del ganglio ventral y del lado derecho del animal adyacente al extremo posterior al bulbo terminal de la faringe y cuyas funciones aún son desconocidas (Eastman, Horvitz, & Jin, 1999; Hobert, Johnston, & Chang, 2002; Altun, 2005; Jorgensen, 2005; Schuske, Beg, & Jorgensen, 2004). En lo que corresponde a la segunda neurona la localización de su soma en la porción de transición entre la parte

posterior del bulbo terminal y el istmo de la faringe, es sugerente que pudiera tratarse de la neurona polimodal (motoneurona/interneurona) de naturaleza GABAérgica AVL, cuyo soma se encuentra situado en la región comprendida por el ganglio ventral en el plano medio lateral con relación al istmo de la faringe (McIntire et al. 1993; Eastman et al. 1999; Hobert et al. 2002; Jorgensen 2005). La tercera neurona, pudiera corresponder a la neurona RMEV, esto debido a que anatómicamente la señal que se observa de GFP a nivel de la porción anterior y en sentido ventral al istmo de la faringe, corresponde con la disposición anatómica del soma de esta motoneurona. La misma tiene como función principal inervar los músculos de la cabeza y conformar parte del anillo nervioso que rodea la faringe (Hobert et al., 2002; Altun, 2005). En conjunto los resultados de la expresión dirigida por el promotor D2092.1a indican que su expresión se encuentra focalizada en motoneuronas e interneuronas situadas en el ganglio ventral, las cuales presentan solo un soma y se sitúan de manera unilateral alrededor de la faringe del nematodo (White et al. 1986). Por otra parte, referente a la expresión dirigida por D2092.1b, los hallazgos revelan que esta isoforma está ampliamente distribuida en neuronas del ganglio anterior (AG), pasando por el anillo nervioso (NR), el ganglio retrovesicular (RVG) y extendiéndose por todo el VNC hasta llegar a la región donde se sitúa el ganglio preanal (PAG). El número de células donde se encontró la señal del gen reportero fue consistentemente de 30 por animal y se analizaron 15 animales generados de 3 inyecciones independientes. De acuerdo con estos resultados existen varias posibilidades en cuanto a la identidad de las células nerviosas en las que se encontró la expresión. Por la ubicación anatómica de los somas que rodean a la faringe a nivel de la cabeza y tomando como parámetro el número de células y la distribución de estas en donde se encontró señal del reportero, se sugiere que correspondan a las interneuronas AIA, AIB, AIZ, AIY, las cuales tienen los somas ubicados en la porción dorsal de la faringe (White et al. 1986). Así mismo, la detección de expresión a nivel del ganglio ventral sugiere que las interneuronas podrían ser las AVA y AVB (White, Southgate, Thomson, & Brenner, 1986; Altun, 2005). En cuanto al patrón de expresión en el VNC, los resultados sugieren que pueden corresponder a



neuronas motoras del tipo AS, AVA AVG DA, DB, VA, VC y VD, las cuales se encuentran localizadas a lo largo de todo el VNC hasta llegar al PAG. La ubicación anatómica de estas neuronas fue descrita por primera vez por (White et al. 1986) utilizando microscopía electrónica de transmisión. En cuanto a su identidad neuroquímica se han dividido en dos grandes grupos: 1) las neuronas colinérgicas, las cuales están comprendidas por las del tipo DA, DB, VB, AS, DD, HSN, VC4/5, AIY, VA, DA, VB, DB, IL1, RMD y PVQ que son neuronas motoras (Rand, 2007; Altun, 2012) y cabe la posibilidad que sea en algunas de estas neuronas donde se expresa D2092.1b.; 2) neuronas GABAérgicas del tipo DD, VD, RME RIS, AVL y DVB, este grupo de neuronas se divide por su función en motoneuronas e interneuronas. El número de neuronas que forman a este circuito GABAérgico incluye 26 células que van en sentido antero posterior del anillo nervioso hasta el ano ( Altun, 2012; Eastman et al., 1999; Jorgensen, 2005; Schuske et al., 2004). De acuerdo a la disposición y el número de las células que expresan GFP, pudiese ser que D2092.1b se sitúe en el sistema GABAérgico del VNC del nematodo.

Tomando en cuenta a las neuronas en la que se encontró la expresión de GFP, parece ser que estas pudieran estar implicadas en el control del movimiento de *C. elegans*. Sin embargo, para poder identificar y describir con precisión el tipo de neuronas en la que se expresa el gen D2092.1, este estudio deberá complementarse con la co-expresión de marcadores de la identidad neuronal (GABAérgica, colinérgica, etc) además del uso del reportero GFP soluble, de tal manera que se logre observar la fluorescencia en toda la célula y no únicamente en el núcleo. Esto es importante debido a que la anatomía de las neuronas y la conexión de estas ya se ha caracterizado y se utiliza como patrón de identificación celular en *C. elegans* (White et al. 1986; Jorgensen 2005).

## 8. Conclusiones

1. Los promotores del gen D2092.1 dirigen la expresión del reportero a neuronas del nematodo *C. elegans*. No se encontró evidencia de la expresión en músculos.
2. El promotor D2092.1a dirigió la expresión en neuronas adyacentes a la faringe del gusano.
3. El promotor D2092.1b dirigió la expresión en neuronas adyacentes a la faringe y en células que comprenden el cordón nervioso ventral.



## 9. Bibliografía

An, J.H. & Blackwell, T.K., 2003. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes & development*, 17, pp.1882–1893.

Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2012. Handbook of *C. elegans* Anatomy. In WormAtlas

Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2005. Cell identification in *C. elegans*. In WormAtlas.

Bai, J. & Chapman, E.R., 2004. The C2 domains of synaptotagmin--partners in exocytosis. *Trends in biochemical sciences*, 29(3), pp.143–51.

Bansal, D. & Campbell, K.P., 2004. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends in cell biology*, 14(4), pp.206–13.

Corbalan-Garcia, S. & Gómez-Fernández, J.C., 2014. Signaling through C2 domains: More than one lipid target. *Biochimica et biophysica acta*, 1838(6), pp.1536–1547.

Djurovic, S. et al., 2009. Association of MCTP2 gene variants with schizophrenia in three independent samples of Scandinavian origin (SCOPE). *Psychiatry research*, 168(3), pp.256–8.

Eastman, C., Horvitz, H.R. & Jin, Y., 1999. Coordinated transcriptional regulation of the *unc-25* glutamic acid decarboxylase and the *unc-47* GABA vesicular transporter by the *Caenorhabditis elegans* UNC-30 homeodomain protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(15), pp.6225–34.

Fernández-Chacón, R. et al., 2001. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, 410(6824), pp.41–9.

Geppert, M. et al., 1994. Synaptotagmin I: a major Ca<sup>2+</sup> sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79(4), pp.717–27.

Gustavsson, N., Wu, B. & Han, W., 2012. Calcium Signaling M. S. Islam, ed. , 740, pp.731–757.

Hobert, O., Johnston, R.J. & Chang, S., 2002. Left-right asymmetry in the nervous system: the *Caenorhabditis elegans* model. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(8), pp.629–40.

Hong, Y., Lee, R.C. & Ambros, V., 2000. Structure and function analysis of LIN-14, a temporal regulator of postembryonic developmental events in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and cellular biology*, 20, pp.2285–2295.

Jorgensen, E.M., 2005. Gaba. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1, pp.1–13.

Kuchenthal, C.A., Chen, W. & Okkema, P.G., 2001. Multiple enhancers contribute to expression of the NK-2 homeobox gene *ceh-22* in *C. elegans* pharyngeal muscle. *Genesis*, 31, pp.156–166.

Lalani, S.R. et al., 2013. MCTP2 is a dosage-sensitive gene required for cardiac outflow tract development. *Human molecular genetics*, 22(21), pp.4339–48.

Lek, A. et al., 2012. Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 13(2), pp.185–94.

Mace, K.E. et al., 2009. Synaptotagmin I stabilizes synaptic vesicles via its C(2)A polylysine motif. *Genesis*, 47(5), pp.337–45.

Maeda, I. et al., 2001. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current biology : CB*, 11(3), pp.171–6.

Manford, A.G. et al., 2012. ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Developmental cell*, 23(6), pp.1129–40.

Marty, N.J. et al., 2013. The C2 domains of otoferlin, dysferlin, and myoferlin alter the packing of lipid bilayers. *Biochemistry*, 52(33), pp.5585–92.

McIntire, S.L. et al., 1993. The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 364, pp.337–341.

Min, S. et al., 2007. E-Syts, a family of membranous Ca<sup>2+</sup>-sensor proteins with multiple C2 domains. *J Biol Chem*, 282(10), pp.3823–3828.

Nalefski, E. a & Falke, J.J., 1996. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 5(12), pp.2375–90.

Nishizuka, Y., 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334, pp.661–665.

Rand, J.B., 2007. Acetylcholine. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, pp.1–21.

Schultz, J. et al., 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), pp.5857–5864.

Schuske, K., Beg, A. a & Jorgensen, E.M., 2004. The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends in neurosciences*, 27(7), pp.407–14.

Shin, O.-H. et al., 2005. Evolutionarily conserved multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions (MCTPs) and unusual Ca<sup>2+</sup> binding properties. *The Journal of biological chemistry*, 280(2), pp.1641–51.

Sudhof, T.C., 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annual review of neuroscience*, 27, pp.509–47.

Südhof, T.C. & Malenka, R.C., 2008. Understanding synapses: past, present, and future. *Neuron*, 60(3), pp.469–76.

Sutton, R.B. et al., 1995. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding fold. *Cell*, 80(6), pp.929–38.

Therrien, C. et al., 2009. Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides. *Biochemistry*, 48(11), pp.2377–84.

Tunstall, N.E. et al., 2012. A screen for genes expressed in the olfactory organs of *Drosophila melanogaster* identifies genes involved in olfactory behaviour. *PloS one*, 7(4).

Ubach, J. et al., 1998. Ca<sup>2+</sup> binding to synaptotagmin: how many Ca<sup>2+</sup> ions bind to the tip of a C2-domain? *The EMBO journal*, 17(14), pp.3921–30.

Washington, N.L. & Ward, S., 2006. FER-1 regulates Ca<sup>2+</sup> -mediated membrane fusion during *C. elegans* spermatogenesis. *Journal of cell science*, 119, pp.2552–2562.

White, J.G. et al., 1986. The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 314(1165), pp.1–340.

WU CHUN, 2009. *MCTP1 , A NOVEL MEMBER OF TRANSMEMBRANE C2 DOMAIN PROTEIN*. National University of Singapore.

## 10. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1.- ESTRUCTURA DEL DOMINIO C2 DE LA SINAPTOTAGMINA I.....  | 4  |
| FIGURA 2.- ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS QUE PRESENTAN MÚLTIPLES DOMINIOS C2.....   | 9  |
| 11  |    |
| FIGURA 3. ANÁLISIS IN SILICO DE LA ESTRUCTURA DEL GEN D2092.1, EN DONDE SE<br>OBSERVA LA PREDICCIÓN DE DOS PROMOTORES (D2092.1A Y D2092.1B), LA<br>ORGANIZACIÓN EXÓN-INTRÓN DE LAS ISOFORMAS DERIVADAS. ....          | 11 |
| FIGURA 4. ANÁLISIS IN SILICO E IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE RECONOCIMIENTO PARA<br>FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LOS PROMOTORES PARA D2092.1A (A) Y<br>D2092.1B (B). ....   | 11 |
| TABLA 1. SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR.....   | 15 |
| TABLA 2. LOS COMPONENTES DE LA REACCIÓN DE PCR.....   | 16 |
| TABLA 3. PROTOCOLO DE PCR.....  | 16 |
| TABLA 4. REACCIÓN DE LIGACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN D2092.1 EN EL VECTOR<br>pGEMT-EASY.....  | 17 |
| TABLA 5. REACCIÓN DE DIGESTIÓN DE CE. PROMS. Y pGEMT-EASY.....  | 19 |
| FIGURA 5. ESTRATEGIA DE SUBCLONACIÓN DE LOS PROMOTORES DEL GEN D2092.1 DE <i>C.</i><br><i>ELEGANS</i> EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN PPD121.86. ....   | 20 |
| LOS FRAGMENTOS CORRESPONDIENTES A CADA UNO DE LOS PROMOTORES, FLANQUEADOS<br>POR LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN SALI Y BAMHI FUERON LIGADOS AL VECTOR DE<br>EXPRESIÓN PPD121.86.....                                       | 21 |
| TABLA 6. REACCIÓN DE LIGACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN D2092.1 Y EL VECTOR DE<br>EXPRESIÓN. ....  | 21 |
| FIGURA 6. FOTOGRAFÍA DEL GEL DE AGAROSA EN EL QUE SE MUESTRA LA ADN GENÓMICO<br>(FLECHA) AISLADO DE <i>C. ELEGANS</i> . MPM: MARCADOR DE PESO MOLECULAR.....  | 23 |
| FIGURA 7. PRODUCTOS DE PCR DE LOS PROMOTORES DEL GEN D2092.1A (A) Y<br>D2092.1B (B). ....   | 24 |
| FIGURA 8A. CLONAS DEL PROMOTOR PARA ISOFORMA D2092.1A (A) E ISOFORMA<br>D2092.1B (B) .....  | 24 |
| FIGURA 8B. CARACTERIZACIÓN CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN SALI Y BAMHI DE LAS<br>CLONAS DE LOS PROMOTOR PARA LAS ISOFORMAS D2092.1A (A) E ISOFORMA<br>D2092.1B (B) .....  | 25 |
| FIGURA 8C. MAPAS FUNCIONALES Y DE RESTRICCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS QUE PORTAN<br>D2092.1 A Y B EN pGEMT-EASY.....   | 25 |
| FIGURA 9. GELES DE AGAROSA EN DONDE SE MUESTRAN LOS FRAGMENTOS QUE<br>CORRESPONDEN A LOS PROMOTORES DEL GEN D2092.1A Y D2092.1B CORTADOS<br>CON LAS ENZIMAS SALI Y BAMHI (A), VECTOR DE EXPRESIÓN PPD121.86 (B). .... | 26 |
| FIGURA 10. FOTOGRAFÍA DE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA EN DONDE SE<br>MUESTRAN LOS PLÁSMIDOS OBTENIDOS DE D2092.1A (A) Y D2092.1B (B).....  | 26 |

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 11. FOTOGRAFÍA DEL GEL DE AGAROSA EN DONDE SE MUESTRA LA DIGESTIÓN DE LAS CLONAS PARA D2092.1A (A) Y D2092.1B (B) CON LAS ENZIMAS SALI Y BAMHI. | 27 |
| FIGURA 12. MAPA DE LOS PLÁSMIDOS PPD121.86::PD2092.1A Y B.   | 27 |
| FIGURA 13. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE D2092.1A::GFP Y MYO-2::MCHERRY   | 28 |
| FIGURA 14. PATRÓN DE EXPRESIÓN D2092.1B:GFP Y MYO-2:MCHERRY  | 29 |