



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Análisis funcional del gen *mctp-1* de *Caenorhabditis elegans*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
JOSÉ LUIS TÉLLEZ ARREOLA

DIRECTOR DE TESIS
DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES
INB, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ IFC, UNAM
DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA INB, UNAM

QUERÉTARO, Noviembre del 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO** por darme un espacio como alumno y al programa de doctorado en Ciencias Biomédicas.

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo para llevar a cabo este proyecto.

A la Auxiliar de Laboratorio Sra. Marina Ramírez Romero.

A mis compañeros del laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular II en especial a Gaby y al Dr. J. A. Contreras Vite.

A el Dr. Erik Jorgensen por estar siempre dispuesto a compartir el conocimiento de manera altruista y por haberme integrado como miembro de su laboratorio.

Al Dr. Argel Estrada por la ayuda para realizar el modelado y por las buenas conversaciones sobre ciencia.

A mi Comité Tutor Dra. Rosa Navarro y al Dr. Alfredo Varela.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Beca 395834

A la comisión México-Estados Unidos para el intercambio educativo "COMEXUS" por la beca Fulbright-García Robles. Su apoyo fue fundamental para la culminación de este trabajo.

Al financiamiento de: Proyecto CONACYT. A1-S-7659, Proyecto PAPIIT. IN 204520

A la Unidad de Microscopía.

ISC. Elsa Nydia Hernández Ríos

A la Unidad de Proteogenómica.

MC Adriana González

A la Unidad de Enseñanza.

M. en C. Leonor Casanova Rico

Dra. Nuri Aranda

Dedicatoria

A mis pequeños Ali, Nabil y Pema.

Por qué a través de su existencia mi vida se llena de alegría y motivación.

A Adriana por atreverte a ser mi ser mi compañera de aventuras, por estar en todo momento apoyándome y ser un pilar muy fuerte de nuestra familia.

A mis papas José Luis y Bertha por haberme dado una niñez increíble, y por siempre confiar en mis proyectos.

A todos mis profesores, colegas y personas que me han apoyado y de manera indirecta han sido parte de este proyecto.

Abreviaturas

Ca²⁺: Ion Calcio

E-Syts: Sinaptogaminas extendidas

GABA: ácido gamma aminobutírico

IP4, IP5 y IP6: inositol polifosfatos

MCTPs: Proteínas transmembranales con múltiples dominios C2

OAB: solución 1x de alineamiento

PKC: proteínas cinasas c

PtdIns(4,5)P2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

sgRNA: RNA guía

TMR1: segmento transmembranal 1

TMR2: segmento transmembranal 2

VNC: cordón neuronal ventral

VS: vesículas sinápticas

Índice

Introducción.....	13
Antecedentes	15
Proteínas con dominios C2.....	16
Proteínas transmembranales con múltiples dominios C2 (MCTPs).....	18
<i>C.elegans</i> como modelo biológico.....	20
<i>C. elegans</i> como modelo de estudio del sistema nervioso.....	22
Neurobiología del comportamiento motor de <i>C. elegans</i>	24
MCTPs en <i>C. elegans</i>	27
Planteamiento del problema.....	29
Hipótesis	29
Objetivos generales	30
Objetivos particulares.....	30
Materiales y Métodos	31
Metodología parte I.....	31
Identificación de las MCTPs en diferentes especies.	31
Alineamientos de secuencias	31
.....	32
Construcción de árboles filogenéticos	32
Metodología parte II.....	34
Generación del mutante de <i>mctp-1</i> mediante CRISPR-Cas9.....	34
Construcción del plásmido de reparación para generar el knock-out.....	38
Caracterización del fenotipo de las cepas mutantes de <i>mctp-1</i>	43
Resultados	49
Resultados Parte I.....	49

Resultados Parte II	59
Análisis funcional de <i>mctp-1</i> en <i>C. elegans</i>	59
Dos promotores regulan la expresión de las cuatro isoformas <i>mctp-1</i> : Pmcpt-1b dirige la expresión en las neuronas, y Pmctp-1a a la espermateca.	62
Caracterización de los plásmidos intermediarios que conforman el plásmido de reparación BHI::GFP::Unc-119::BHD.	67
Selección de animales modificados por CRISPR/Cas9.....	68
Caracterización del fenotipo del mutante de <i>mctp-1</i>	70
La ausencia de MCTP-1 afecta la tasa de liberación de los neurotransmisores.....	76
Discusión	82
Conclusiones.....	89
Perspectivas.....	90
Bibliografía	92
Anexos	105
Artículo: MCTP-1 modulates neurotransmitter release in <i>C. elegans</i>	105

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 ESTRUCTURA DEL DOMINIO C2.	16
FIGURA 2 FAMILIAS DE PROTEÍNAS QUE CONTIENEN DOMINIOS C2	17
FIGURA 3 CICLO DE VIDA DE <i>C. ELEGANS</i> A 22 °C. MODIFICADO DE WORMATLAS 2016.	21
FIGURA 4 SISTEMA NERVIOSO DE <i>C. ELEGANS</i>	23
FIGURA 5 COMPOSICIÓN NEURONAL DEL CORDÓN NERVIOSO VENTRAL DE <i>C. ELEGANS</i>	26
FIGURA 6 MODELO DE LA ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA MCTP-1B DE <i>C. ELEGANS</i>	27
FIGURA 7 EL PROMOTOR PMCTP-1B DIRIGE LA EXPRESIÓN DE GFP A NEURONAS DE <i>C. ELEGANS</i> .	28
FIGURA 8 PARÁMETROS ESTABLECIDOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MCTP	32
FIGURA 9 ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL VECTOR QUE CONTIENE LA SECUENCIA QUE CODIFICA PARA EL RNA GUÍA.	35
FIGURA 10 SITIO DE CLONACIÓN SAPI EN EL VECTOR PMLS134.	35
FIGURA 11 CLONACIÓN DE LOS BRAZOS HOMÓLOGOS DERECHO E IZQUIERDO EN LOS VECTORES INTERMEDIARIOS 4-1 Y 2-3 RESPECTIVAMENTE MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA GATEWAY.	37
FIGURA 12 CLONACIÓN DEL FRAGMENTO GFP::UNC-119 EN EL VECTOR INTERMEDIARIO 1-2 MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA DE CLONACIÓN DE GIBSON	38
FIGURA 13 CLONACIÓN DEL VECTOR FINAL PARA GENERAR EL ALELO MUTADO DE MCTP-1 (ALLELO AMT1) MEDIANTE CRISPR/CAS9 MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA GATEWAY	39

FIGURA 14 MAPA DEL PLÁSMIDO DE REPARACIÓN (PJLT63) UTILIZADO PARA GENERAR LOS ANIMALES KNOCK-OUT AMT1	39
FIGURA 15 SITIO DE INSERCIÓN DE LOS GENES DE GFP Y UNC-119 EN EL LOCUS DEL GEN MCTP-1.	42
FIGURA 16 ESQUEMA PARA GENERAR MACHOS MEDIANTE CHOQUE TÉRMICO EN LA CEPA SILVESTRE (N2).	46
FIGURA 17 ESQUEMA DE RETROCRUZAS PARA LIMPIAR EL FONDO GENÉTICO DE LAS MUTANTES	47
FIGURA 18 PROTOCOLO PARA LA TINCIÓN DE GOTAS DE LÍPIDOS EN C. ELEGANS	48
FIGURA 19 ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LAS PROTEÍNAS MCTP EN ESPECIES MODELO.	50
FIGURA 20 MODELO A ESCALA DE LA PROTEÍNA MCTP TOMANDO EN CUENTA LA SECUENCIA CONSENSO DE VARIAS ESPECIES MODELO.	51
FIGURA 21 ANÁLISIS DE LOS EN LOS DOMINIOS C2 DE LAS PROTEÍNAS MCTP PRESENTAN SITIOS DE UNIÓN A Ca^{2+} Y UN MOTIVO POLIBÁSICO DE UNIÓN A LÍPIDOS.	54
FIGURA 22 ALINEAMIENTO DE LAS REGIONES TRANSMEMBRANALES DE LAS PROTEÍNAS MCTP.	55
FIGURA 23 ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LOS DOMINIOS C2 DE LAS PROTEÍNAS MCTP.	57
FIGURA 24 ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LOS DOMINIOS C2 DE LA MCTP DE C. ELEGANS CON Ca^{2+} Y PIP2	58
FIGURA 25 EL GEN MCTP-1 CODIFICA UNA PROTEÍNA CON MÚLTIPLES DOMINIOS C2.	61
FIGURA 26 LOS PROMOTORES DE MCTP-1 DIRIGEN LA EXPRESIÓN A NEURONAS Y A LA ESPERMATECA EN C. ELEGANS.	63
FIGURA 27 FOTO DEL MUTANTE (TM6603) Y DE LA CEPA SILVESTRE.	65

FIGURA 28 CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS QUE PORTAN PARA LOS ARN GUÍAS.	66
FIGURA 29 CARACTERIZACIÓN DE LOS VECTORES INTERMEDIARIOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	67
FIGURA 30 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS ALELOS MCTP-1 (AMT1 Y TM6603).	69
FIGURA 31 MCTP-1 SE EXPRESA EN LAS NEURONAS CILIADAS DE LA CABEZA, NECESARIAS PARA DETECTAR LA COMIDA Y REGULAR EL COMPORTAMIENTO DE PUESTA DE HUEVOS.	72
FIGURA 32 MCTP-1 SE EXPRESA EN LAS NEURONAS MOTORAS Y REGULA LA VELOCIDAD DE MOVIMIENTO DEL GUSANO EN MEDIO SÓLIDO Y LÍQUIDO.	75
FIGURA 33 DIAGRAMA QUE ILUSTRA LOS MECANISMOS MOLECULARES QUE SUBYACEN A LA PARÁLISIS INDUCIDA POR EL ALDICARB EN EL NEMATODO C. ELEGANS.	77
FIGURA 34 LA MUTACIÓN EN MCTP-1 AFECTA LA FUNCIÓN PRESINÁPTICA PERO NO LA POSTSINÁPTICA.	79
FIGURA 35 COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE GOTAS DE LÍPIDOS EN EL INTESTINO DE ANIMALES ADULTOS JÓVENES	81

Resumen

Las proteínas con múltiples dominios C2 y regiones transmembranales o MCTPs, son sensores de Ca^{2+} estructuralmente relacionados con otras proteínas que desempeñan un rol fundamental en tráfico de membranas y exocitosis de neurotransmisores. Se ha reportado que mutaciones y polimorfismos de un solo nucleótido en los genes que codifican para las MCTPs están asociados a patologías congénitas como coartación aórtica, y enfermedades neurodegenerativas como esquizofrenia y desorden bipolar. El presente trabajo aborda el estudio de las proteínas MCTP en dos partes; en la primera se hizo un análisis bioinformático sobre la distribución filogenética y organización estructural de las MCTPs. Se encontró que estas proteínas emergieron en metazoarios y están bien conservadas en vertebrados. Debido a que aún no se cuenta con estudios estructurales de las MCTPs, se realizó un análisis de la secuencia de estas proteínas que permitió generar un modelo estructural *in silico*. Nuestros resultados sugieren los dominios funcionales están altamente conservados: los dominios C2s y las dos regiones transmembrana. Los dominios C2 presentan la clásica conformación tipo II de láminas β y los sitios de aspartato que unen al ion Ca^{2+} . Aunado a ello se encontró un motivo rico en lisinas en los dominios C2A y C2B en todas las especies analizadas, lo que les confiere la característica de unir 1,2-diacyl-sn-glycero-3-[fosfoinositol-4,5-bifosfato] [PtdIns(4,5)P2] o PIP2. En la segunda parte se generaron animales mutantes nulos para el gen *mctp-1* utilizando la técnica de edición genética CRISPR/Cas9 y se estudiaron los efectos de esta mutación mediante ensayos de comportamiento finamente regulados por circuitos neuronales específicos en *C. elegans*.

Los resultados muestran que estas mutaciones generan fenotipos relacionados con el sistema nervioso: alteraciones en la puesta de huevos, en la velocidad del movimiento, el número de coletazos al nado y en la longitud de la onda del movimiento. Además, el mutante del gen presenta resistencia al aldicarb, un inhibidor de la colinesterasa, por lo que se deduce que su acción

es a nivel presináptico. En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que la proteína MCTP-1 es un sensor de Ca^{2+} que juega un papel importante en la función sináptica y en la regulación de los circuitos neuronales donde se expresa.

Abstract

Proteins with multiple C2 domains and transmembrane regions or MCTPs are putative Ca^{2+} sensors structurally related to proteins that play fundamental roles in membrane trafficking and exocytosis of neurotransmitters. Mutations and single nucleotide polymorphisms reported in genes that encode MCTPs are associated with congenital pathologies such as aortic coarctation and neurodegenerative diseases such as schizophrenia and bipolar disorder. This work deals with the study of MCTP proteins in two parts; in the first one, we performed a bioinformatic analysis of their phylogenetic distribution and structural organization. We found that these proteins emerged in metazoans and are well preserved in vertebrates. Since there are not yet structural studies of MCTPs, we analyzed the primary sequences of these proteins that allowed generating a structural model *in silico*. Our results suggest that the functional domains are highly conserved: three C2s domains and two transmembrane regions. The C2 domains have the classic type II conformation of β laminae and conserved aspartate residues that bind Ca^{2+} . In addition, we found a lysine-rich motif in C2A and C2B domains in all species analyzed, which confers a potential binding site for 1,2-diacyl-sn-glycero-3-[fosfoinositol-4,5-bifosfato] [PtdIns(4,5)P₂] o PIP₂. In the second part, we generated a null mutant of the *mctp-1* gene using the CRISPR/Cas9 genetic editing technique. These mutation's effects were studied employing behavioral tests regulated by specific neuronal circuits in *C. elegans*.

The results show that the *mctp-1* null mutant exhibits phenotypes related to the nervous system: alterations in egg laying, in speed, and thrashing. The *mctp-1* mutant presents resistance to aldicarb, a cholinesterase inhibitor, so we deduce that its action is at a presynaptic level. Overall, our findings suggest that the MCTP-1 protein is a Ca^{2+} sensor that plays a role in synaptic function and regulates neuronal circuits.

Introducción

Diversas proteínas que participan en la transducción de señales y en la transmisión sináptica presentan dominios C2 como parte de su estructura. Se sabe que estos dominios están compuestos por aproximadamente 130 aminoácidos, los cuales forman ocho láminas beta (β) y presentan residuos de aspartato (D) que tienen la propiedad de unir diversos ligandos y sustratos como fosfolípidos, inositol polifosfatos y Ca^{2+} (Corbalan-Garcia and Gómez-Fernández, 2014). Los dominios C2 fueron originalmente encontrados en las proteínas cinasas c (PKC) y posteriormente en familias de proteínas que participan en la transmisión sináptica como las sinaptotagminas (Ubach et al., 1998), las ferlinas y las E-Syts (sinaptogaminas extendidas) (Min et al., 2007). Se sabe que estas proteínas tienen una relevancia biológica determinante, ya que responden al flujo entrante de Ca^{2+} para la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática de la neurona para la exocitosis de neurotransmisores. En la naturaleza existen varias otras proteínas que incluyen dominios C2 en su estructura cuya función aún se desconoce. Entre estas se encuentra una nueva familia de proteínas que presentan tres de estos dominios en tándem y dos segmentos transmembrana (MCTPs) que permiten su anclaje en vesículas intracelulares (Shin et al., 2005). Actualmente se sabe muy poco sobre la función de estas proteínas.

En el presente estudio se realizó un análisis filogenético de la distribución de los genes *mctp* y se generó un modelo estructural *in silico* de la proteína MCTP-1. Para determinar el papel de este gen se utilizó como modelo experimental el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el cual presenta un solo gen *mctp*; para determinar el patrón de expresión del gen *mctp-1* previamente se generó un transgénico con el promotor del gen *mctp-1* (Pmctp1b) controlando la expresión de un gen reportero (GFP), (Tellez-Arreola JL. tesis de maestría., 2014) que mostró su expresión en sistema nervioso, en este trabajo se generó un mutante al que se le removió una parte del gen por medio

de CRISPR/Cas9 y finalmente se determinaron qué características se ven afectadas por la remoción.

Los resultados mostraron que los genes *mctp* están ampliamente distribuidos en vertebrados e invertebrados, pero no se encontraron en bacterias, y algunos phyla de invertebrados (celentéreos, esponjas); el modelo estructural localizó un sitio nuevo para la unión de PIP2. Por otro lado, se identificó un segundo promotor del gen *mctp-1* (*Pmctp1a*) que dirige la expresión en células de la espermateca, esto complementa el patrón de expresión registrado previamente que indica amplia distribución en el sistema nervioso. Se encontraron cuatro isoformas del gen que son producto del uso alternativo de los dos promotores y de eventos de splicing alternativo. Se analizaron las características de dos alelos mutantes de *mctp-1* los que mostraron una menor tasa de oviposición, cambios en la velocidad de desplazamiento y coleteos y resistencia al inhibidor de acetilcolinesterasa aldicarb, lo que sugiere fuertemente su participación en la función sináptica.

Antecedentes

La señalización de Ca^{2+} intracelular regula diferentes procesos fundamentales como la expresión de genes, muerte celular, desarrollo y en neuronas modula la liberación de neurotransmisores (Burgoyne et al., 2019). La exocitosis de neurotransmisores es un proceso mediante el cual una neurona se comunica con una célula blanco mediante la sinapsis. En las sinapsis químicas se lleva a cabo la liberación de neurotransmisores desde la neurona presináptica en donde estos son liberados a la hendidura sináptica y eventualmente se unen a receptores específicos en la post-sinapsis (Burgoyne et al., 2019). En 1973 se demostró que el Ca^{2+} es un elemento esencial que modula la liberación del neurotransmisor en las terminales nerviosas (Miledi, 1973). Este descubrimiento abrió la puerta a nuevas preguntas para tratar de entender cómo el Ca^{2+} regula la exocitosis de neurotransmisores y cuáles son los componentes moleculares encargados de detectar el Ca^{2+} . Las señales de Ca^{2+} en neuronas son esencialmente reguladas por proteínas que al unirlo tienen cambios conformacionales que les permite interactuar o regular la función de otras proteínas blanco (Ikuro and Ames 2006; Burgoyne and Haynes 2015; McCue et al. 2010b). Dentro de los sensores que se han identificado como esenciales en la función neuronal se encuentran: la calmodulina, las proteínas neuronales con motivos de mano EF, como las calcineurinas y las sinaptotagminas. Las sinaptotagminas son proteínas que presentan dominios C2 en su estructura, los cuales son fundamentales para detectar el Ca^{2+} que permea por canales selectivos a este ion en las terminales sinápticas y que facilita la fusión de vesículas sinápticas para liberar los neurotransmisores (Fernández-Chacón et al. 2001; Südhof 2013). En años recientes se han identificado otros grupos de proteínas que se expresan en el sistema nervioso y que contienen en su estructura primaria dominios C2; sin embargo, aún se desconoce su función (Corbalan-García and Gómez-Fernández, 2014).

Proteínas con dominios C2

El dominio C2 fue identificado por primera vez en la proteína cinasa C (PKC) (Nishizuka, 1988). La estructura a alta resolución de este dominio se determinó originalmente en las sinaptotagminas (Figura 1) (Sutton et al., 1995). Los dominios C2 se han identificado en proteínas que participan en procesos celulares diversos como el tráfico de proteínas de membrana, la generación de segundos mensajeros, la activación de proteínas GTPasas, la señalización dependiente de Ca^{2+} y la neurotransmisión

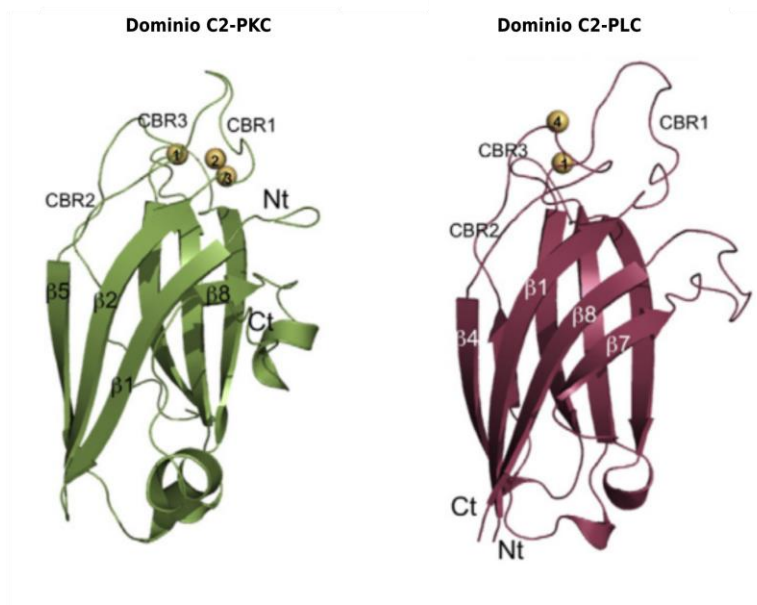


Figura 1 Estructura del dominio C2.

En verde se muestra la estructura del dominio C2 tipo I de la proteína Cinasa C (PKC) y en morado el dominio C2 tipo II de la proteína fosfolipasa C (PLC). En la parte superior de ambos dominios se muestra los sitios de unión del Ca^{2+} (CBR 1-3). El ion Ca^{2+} está representado por las esferas amarillas. Cada dominio está conformado de 8 láminas β . Modificado de (Corbalan-Garcia and Gómez-Fernández, 2014).

Existe una amplia variedad de proteínas que incluyen el dominio funcional C2 (Figura 2). Este dominio provee un sensor de Ca^{2+} intrínseco el cual, para su funcionamiento, puede ser dependiente o no de fosfolípidos (Shin et al., 2005). Las proteínas que contienen este dominio están involucradas en traducción de señales (por ejemplo, PKCs) o neurotransmisión (como las sinaptotagminas). Las proteínas que contienen un solo dominio C2 se localizan en el citoplasma, mientras que las que contienen dos o más dominios se encuentran asociadas a membranas (Cho and Stahelin, 2006; Geppert et al., 1994; Min et al., 2007; Nalefski and Falke, 1996; Südhof and Malenka, 2008; Ubach et al., 1998).

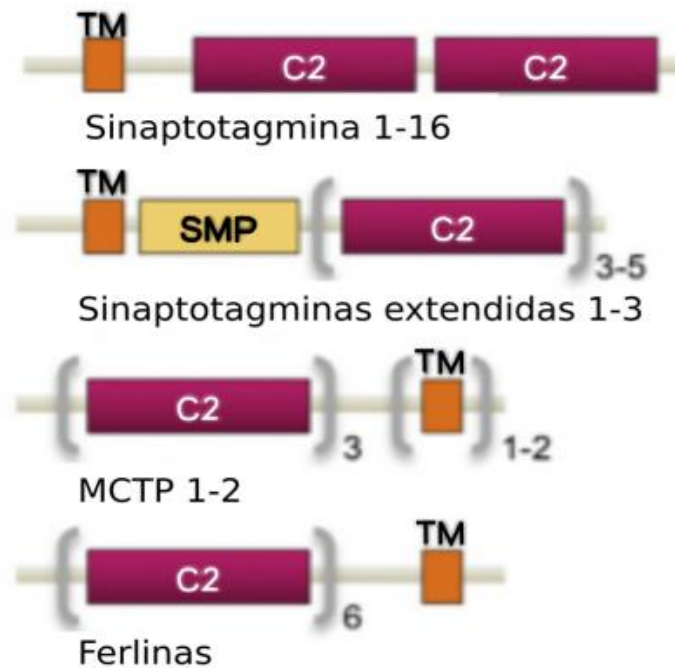


Figura 2 Familias de proteínas que contienen dominios C2

Este grupo de proteínas participan en transporte de vesículas. Los dominios C2 están representados por los rectángulos en morado, las regiones transmembranales en color naranja (TM) y el dominio de unión a lípidos en color café claro (SMP). Modificado de (Corbalan-García and Gómez-Fernández, 2014).

Proteínas transmembranales con múltiples dominios C2 (MCTPs)

En mamíferos, se han identificado dos genes que codifican para MCTPs: *MCTP1* y *MCTP2*. Las MCTPs presentan variantes generadas por remoción diferencial de exones y dentro de sus características estructurales presentan tres dominios C2 orientados hacia el extremo amino (N) y dos regiones transmembranales en el extremo carboxilo (C) (Shin et al., 2005).

En los vertebrados, las MCTP se expresan ampliamente en múltiples tejidos: riñón, corazón, hígado, pulmones, músculo esquelético, testículos, bazo y sistema nervioso central (Qiu et al., 2015; Shin et al., 2005; Espino-Saldaña et al., 2020). Dentro de las células, estas proteínas se localizan en vesículas intracelulares de los cuerpos de las neuronas, en los procesos neuronales, en endosomas y retículo endoplásmico (Genç et al., 2017; Qiu et al., 2015; Shin et al., 2005).

Las MCTP son moléculas importantes por su relación con varias enfermedades. Por ejemplo, algunos polimorfismos en los genes de las MCTP están vinculados al trastorno bipolar y la esquizofrenia. Asimismo, se han identificado mutaciones en MCTP-2 asociadas a trastornos del desarrollo como la malformación cardíaca congénita (Djurovic et al., 2009; Lalani et al., 2013). En ratones, se ha identificado que el gene *Mctp1* es un elemento regulatorio esencial para la expresión del gen *Nr2f1* que codifica para el receptor nuclear tipo 2, dado que la remoción de *Mctp1* genera defectos en la regulación de la transcripción *Nr2f1* en la cóclea embrionaria que contribuyen a la separación incorrecta del utrículo y el sáculo en el vestíbulo de los ratones (Tarchini, 2018), pese a ello, la función propia de la proteína MCTP1 no ha sido esclarecida. Por otro lado, la sobreexpresión de la isoforma corta (*Mctp1s*) genera efectos en las vías de endocitosis de células PC12 y neuronas de hipocampo en cultivo (Qiu et al., 2015). Esto sugiere que esta isoforma puede jugar un papel importante en la vía de endocitosis. Algunas mutaciones de la MCTP en *Drosophila melanogaster* son letales durante el desarrollo de las larvas, mientras que otras tienen defectos en

la regulación de la neurotransmisión, lo que sugiere funciones tanto en el sistema nervioso en desarrollo como en el maduro (Genç et al., 2017; Tunstall et al., 2012).

En el pez cebra *Danio rerio*, se identificaron cuatro genes *mctp*: *mctp1a*, *1b*, *2a* y *2b*. Por hibridación *in situ* se determinó que se expresan ampliamente desde el desarrollo larvario hasta en el adulto, en donde se encuentran en múltiples tejidos incluyendo el sistema nervioso, músculo e hígado (Espino-Saldaña et al., 2020). Por medio de marcaje con proteínas fluorescentes, la proteína Mctp2b fue encontrada en retículo endoplásmico, lisosomas y endosomas (Espino-Saldaña et al., 2020). Utilizando CRISPR/Cas9 para mutar el gen Mctp2b se encontró que las larvas del pez detienen su desarrollo días después de su nacimiento y mueren, lo que sugiere que este gen es esencial para el desarrollo normal en esta especie (Espino-Saldaña et al 2020).

Aunque por homología se han identificado genes de *mctp* en invertebrados (*D. melanogaster*, *C. elegans*) y vertebrados (ratones, ratas, pez cebra), aún se desconoce su filogenia y función. Si bien se cuenta con datos de fenotipos a nivel intracelular y efectos letales durante el desarrollo embrionario en peces y en *D. melanogaster*, aún se desconoce la función en los diversos tejidos en las que se expresan incluyendo las neuronas; así como también cuál es su papel en la regulación de los diferentes circuitos neuronales que controlan comportamientos específicos *in vivo*.

Para contestar estas preguntas, en este estudio se realizó un análisis para identificar en cuáles genomas se encuentran las MCTP's y cuál es su papel funcional *in vivo* mediante la remoción del gen por *mctp-1* utilizando como modelo experimental el nematodo *C. elegans*.

***C.elegans* como modelo biológico**

C. elegans es un nematodo de vida libre cuya distribución es cosmopolita. Tiene un ciclo de vida corto que toma 48 h a 25 °C desde la etapa embrionaria hasta el adulto (Figura 3) (Corsi et al., 2015; de Bono and Maricq, 2005); presenta dimorfismo sexual ya que hay hermafroditas y machos en donde la mayor parte de la población es hermafrodita y con una muy baja incidencia de machos (0.2 %) (Hodgkin et al., 1979). Los hermafroditas adultos generan hasta ~300 individuos por autofecundación en su periodo fértil, que se mantienen fácilmente en placas con agar y micronutrientes (colesterol, sales de Ca²⁺, magnesio y potasio), adicionadas con bacteria *Escherichia coli* de la cepa OP50 como alimento. Los individuos hermafroditas, se auto fertilizan y generan una población a partir de un solo individuo, estas características lo convierten en un modelo genético muy robusto. Aunado a ello, la gama de estrategias experimentales, su fácil mantenimiento en el laboratorio, y las similitudes en los procesos moleculares y celulares entre *C. elegans* y otras especies a través de la evolución (función de proteínas, regulación de la expresión génica, estructura y función de orgánulos, metabolismo etc.) han hecho de este organismo un modelo ideal para investigar la biología de organismos eucariontes. Por otro lado, alrededor del 60% de los genes presentes en humanos tienen un ortólogo en el genoma de *C. elegans* (Kaletta and Hengartner, 2006), y 40 % de los genes que están asociados a enfermedades en humanos, presentan un ortólogo en el genoma de *C. elegans* (Culetto and Sattelle, 2000). Dentro de sus múltiples ventajas como modelo de estudio, una de las más importantes es que su desarrollo es muy estereotipado y del cual ya se conoce con exactitud el mapa de destino de cada una de las células que lo comprenden. En la etapa adulta está formado por 959 células somáticas para el caso de los hermafroditas y 1031 en machos (Altun, 2012). Por lo anterior, *C. elegans* ofrece muchas

***C. elegans* como modelo de estudio del sistema nervioso.**

C. elegans se ha convertido en un modelo importante en las neurociencias. Su sistema nervioso está conformado por 302 neuronas y 56 células gliales (Altun, 2012). El 50% de sus neuronas están localizadas en la cabeza, alrededor de la faringe formando el anillo nervioso, mientras que las restantes están localizadas en los ganglios cerca de la faringe, en el cordón neuronal ventral y los ganglios de la cola (Figura 4) (de Bono and Maricq, 2005; White et al., 1986). El sistema nervioso completo del hermafrodita de *C. elegans* fue descrito por primera vez utilizando cortes seriados y tomando imágenes con el microscopio electrónico de transmisión (White et al., 1986). Los resultados de estos experimentos, permitieron conocer con exactitud la morfología de cada neurona, así como las sinapsis químicas que se forman (~7000), uniones comunicantes (~600) y las uniones neuromusculares (~2000) (White et al., 1986). Las neuronas del hermafrodita se clasifican en diferentes morfotipos (~ 118), de las cuales 39 son neuronas sensitivas, 27 neuronas motoras, y el resto son interneuronas (de Bono and Maricq, 2005). *C. elegans* presenta la mayoría de la maquinaria de neurotransmisión que se encuentran en vertebrados, incluyendo acetilcolina, ácido gamma aminobutírico (GABA), serotonina, dopamina y glutamato (Brockie y Maricq, 2006; Chase and Koelle, 2007; Jorgensen, 2005; Li, 2008; R y, 2007), incluso se ha propuesto al etanol como una molécula capaz de funcionar como neurotransmisor en *C. elegans* (McIntire, 2010).

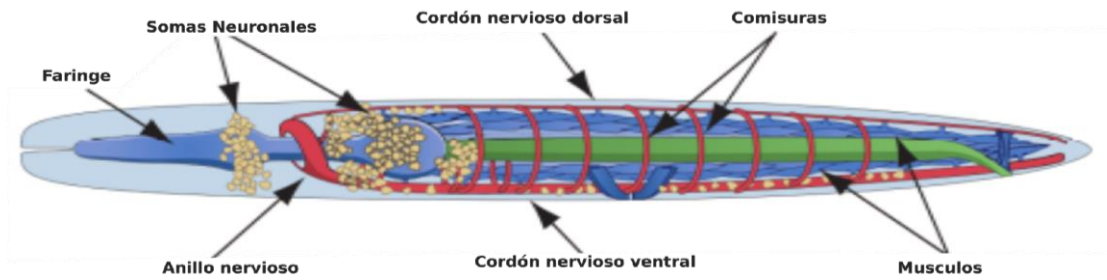


Figura 4 Sistema nervioso de *C. elegans*

En color café se muestran los somas de las neuronas agrupadas en ganglios. En color rojo se representa el anillo neuronal alrededor de la faringe (índigo) y los procesos de los axones a lo largo del cordón neuronal ventral y dorsal. Modificado de (Schafer, 2016).

Neurobiología del comportamiento motor de *C. elegans*

C. elegans tiene una anatomía relativamente sencilla y presenta una serie de comportamientos altamente estereotipados y bien caracterizados. Muchos de los trabajos realizados sobre el comportamiento describen cómo este nematodo detecta los estímulos externos y cambia su conducta motora (de Bono y Maricq, 2005). Presenta un movimiento sinusoidal, el cual es generado a partir de la cabeza y se transmite como una onda que se propagan a través del cuerpo (de Bono y Maricq, 2005). La propagación de las ondas en forma de “S” en el agar, permiten al nematodo generar movimiento y desplazarse, estos movimientos son resultado de la contracción y relajación de los músculos dorsales y ventrales que se encuentra a lo largo del cuerpo inervados por moto-neuronas GABAérgicas y colinérgicas (de Bono y Maricq, 2005; Gjorgjieva et al., 2014; Wen et al., 2012; Zhen y Samuel, 2015). Se han descrito tres características principales responsables de generar el movimiento en medio sólido: 1.- la presión hidrostática que presenta el animal, 2.- la tensión superficial y 3.- la fricción entre el gusano y su sustrato (de Bono y Maricq, 2005), las cuales permiten la formación de la onda del cuerpo y genera la fuerza de propulsión para desplazarse hacia adelante y hacia atrás. El movimiento de *C. elegans* se divide en cuatro categorías principales o macro estados: 1.- el desplazamiento hacia adelante, el cual consiste en la propagación de ondas dorso-ventrales del cuerpo, en sentido anterior a posterior los cuales se inician en la cabeza. 2.- desplazamiento hacia atrás, este consiste en la propagación de las ondas del cuerpo dorso-ventralmente en sentido posterior a anterior iniciado en la cola. 3.- “Dwelling”, se refiere a la propagación de una variedad de ondas del cuerpo en sentido dorso-ventral que presentan una dinámica no direccional y 4.- quiescencia, la cual representa una falta de movimiento (Gjorgjieva et al., 2014). El circuito neuromotor del movimiento está conformado por 95 músculos y 75 neuronas motoras que dirigen el movimiento ondulatorio del cuerpo del nematodo y

que están distribuidas en el cordón neuronal ventral (VNC). Las neuronas que conforman el VNC se dividen en 5 grupos, A (21), B (18), D (19), VC (6), y AS (11). Las A, B y D son subdivididas en dorsales y ventrales según los músculos del cuerpo al que inervan (Figura 5). Los neurotransmisores implicados en el control de los movimientos son: el sistema colinérgico (excitatorio) y el sistema GABAérgico (inhibitorio). Las motoneuronas que controlan el movimiento hacia adelante y que inervan por segmentos la musculatura, son los tipos de neuronas excitatorias e inhibitorias en los músculos dorsales (DB y DD) y músculos ventrales (VB y VD) y las neuronas que controlan el movimiento de reversa son (DA, DD y VA, VD) (Figura 5). La conectividad de estas motoneuronas es muy importante, ya que, si en determinado segmento de la musculatura se contrae por acción de neuronas colinérgicas, la musculatura contralateral debe relajarse debido a la acción de las neuronas inhibitorias GABAérgicas para generar un patrón de movimiento estable en un tiempo y espacio determinado (de Bono y Maricq, 2005; Gjorgjieva et al., 2014; Wen et al., 2012; Zhen y Samuel, 2015). Sin embargo, aunque se tienen mapeadas las redes neuronales que se generan y cómo éstas modulan los movimientos, aún no se han caracterizado a detalle cómo es que los patrones centrales de movimiento son generados.

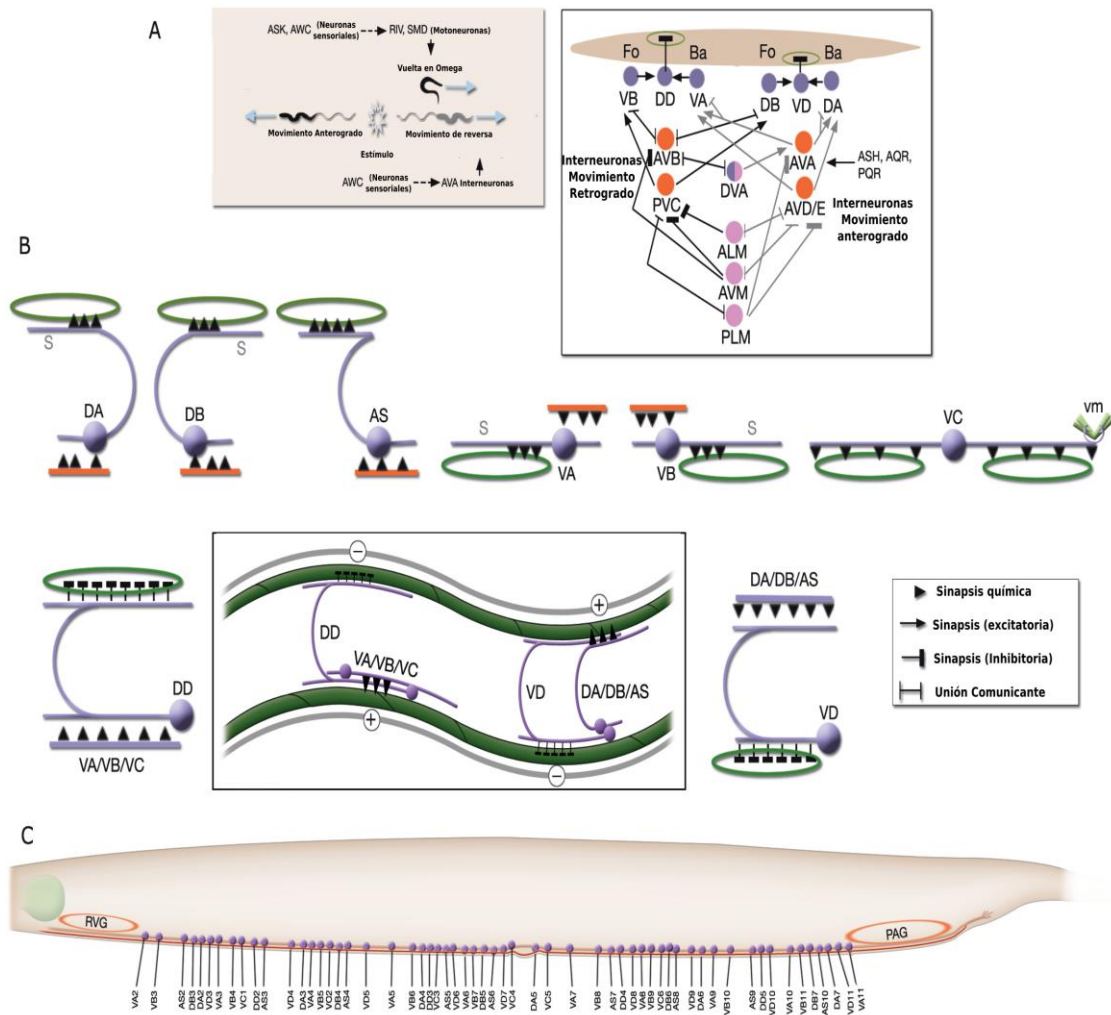


Figura 5 Composición neuronal del cordón nervioso ventral de *C. elegans*

A) Comportamientos controlados por el circuito motor (panel derecho), conectividad entre las interneuronas de comando (círculos en color naranja) y las motoneuronas (círculos en color rosa). B) Motoneuronas que controlan los movimientos anterógrados (Tipo A), movimientos retrógrados (Tipo B) y ambos movimientos (Tipo D). C) Esquema de la posición de las motoneuronas que conforman el cordón neuronal ventral entre el ganglio retro vesicular y el ganglio pre anal. Modificado de Wormatlas 2016.

MCTPs en *C. elegans*

El modelado de la proteína basado en el análisis de posibles dominios funcionales revela que las MCTPs en *C. elegans* contienen tres dominios C2 y dos segmentos transmembranales (Shin et al 2005) (Figura 6). En investigaciones realizadas en nuestro grupo de trabajo se identificó al gen *mctp-1* en *C. elegans* como el único gen homólogo a las MCTPs de mamíferos. Este contiene dos promotores independientes (*Pmctp-1a* y *Pmctp-1b*). En cuanto a la función de los promotores, se demostró que *Pmctp-1b::GFP* se expresa en la mayoría de las neuronas del nematodo pero no se encontró expresión en otros tipos celulares (Figura 7, Téllez Arreola, JL. Tesis de Maestría 2014).

Por otro lado, Un reporte reciente sugiere que MCTP-2 presenta en su extremo C- terminal un dominio de homología reticulón (RHD), que es característico de proteínas del retículo endoplasmático involucradas en inducir la curvatura del organelo. Este reporte asocia a las MCTPs con la generación de gotas de lípidos presentes en el intestino del nematodo (Joshi et al., 2018). Sin embargo, aún no es claro cómo las MCTP funcionan en la generación de las gotas de lípidos. Debido a que el patrón de expresión obtenido en estudios previos sugiere principalmente la localización de *mctp-1* en sistema nervioso, no se encontró plausible la asociación de producción de gotas de lípidos con MCTP, porque en este trabajo se decidió abordar la evaluación de la producción de lípidos en los alelos mutantes del gen *mctp-1*.

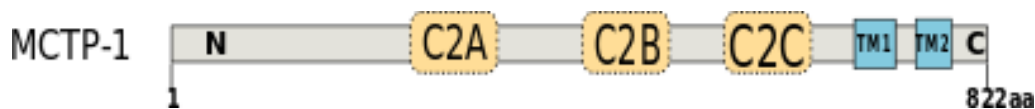


Figura 6 Modelo de la organización funcional de la proteína MCTP-1b de *C. elegans*

En color amarillo se representan los dominios C2, en azul las regiones transmembranales.

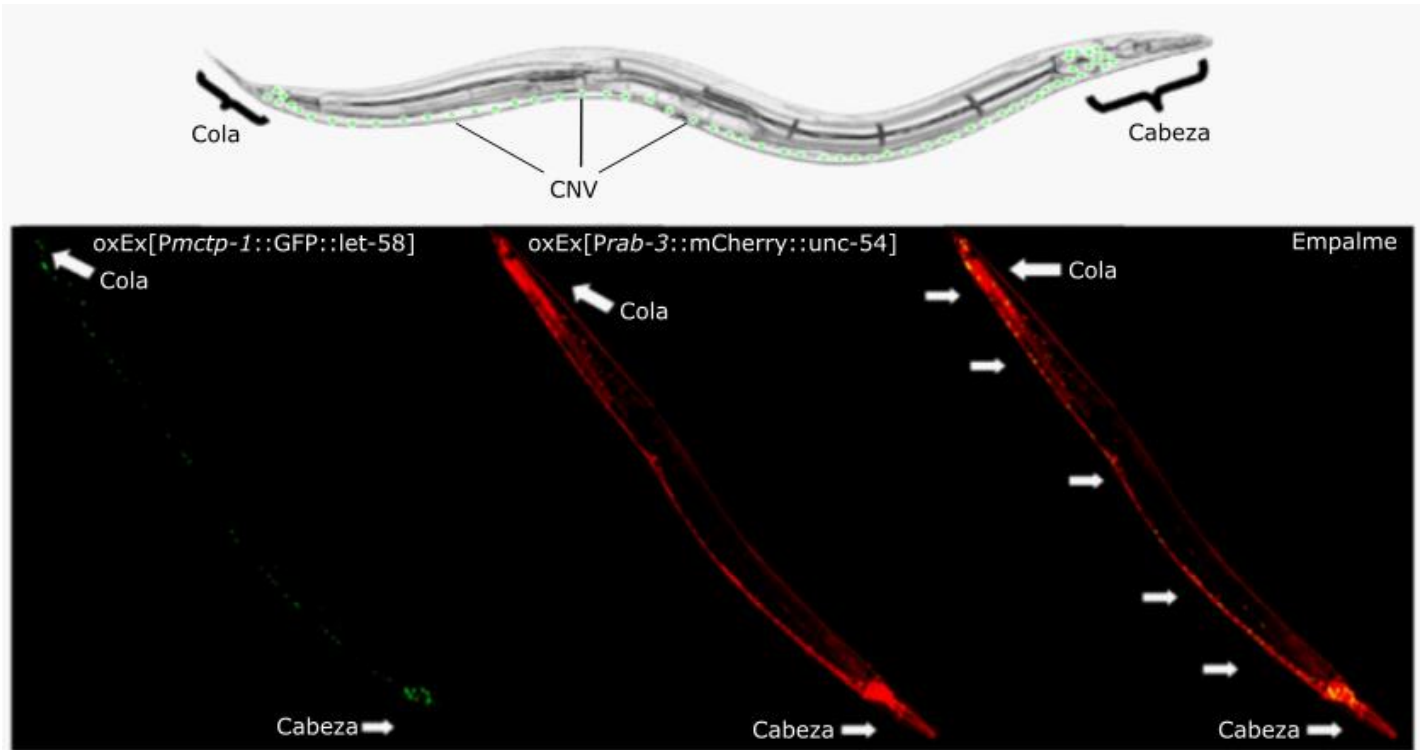


Figura 7 El promotor Pmctp-1b dirige la expresión de GFP a neuronas de *C. elegans*.

Expresión de *Pmctp-1::NLS GFP*, la señal del gen reportero se localiza en células localizadas en la cabeza, cordón neuronal ventral y región de la cola. La expresión del marcador pan neuronal *rab-3P::mCherry* a lo largo del sistema nervioso se muestra en el panel central. El empalme de ambas señales se muestra en el panel de la derecha y resalta la co-localización de la expresión de *mctp-1* en neuronas. Micrografía tomada por José Luis Téllez -Laboratorio de neurobiología celular y molecular D-15.CNV, cordón nervioso ventral.

Planteamiento del problema

Las proteínas MCTPs presentan un porcentaje alto de homología estructural con las sinaptotagminas y las ferlinas, específicamente con los dominios funcionales C2. Estas ya han sido descritas ampliamente en cuanto a su afinidad al Ca^{2+} y a su participación en la maquinaria de exocitosis de diversas células incluyendo las neuronas. Sin embargo, poco se conoce sobre las MCTPs en cuanto a las características estructurales y al papel funcional en organismos completos *in vivo*. Por lo tanto, en este trabajo se pretende determinar la distribución de los genes *mctp* en diversos phyla, construir un modelo *in silico* que permita elucidar sus características estructurales y funcionales *in vivo*.

Es importante mencionar que muchos principios fundamentales que tenemos hoy en día en neurobiología se han identificado mediante manipulaciones genéticas activando o inhibiendo genes de manera selectiva en modelos de invertebrados como es el caso del nematodo *C.elegans*. Por lo tanto, nos propusimos determinar si la remoción de manera experimental del gen *mctp-1* de *C. elegans* afecta comportamientos estereotipados finamente regulados por circuitos neuronales específicos que nos den información sobre su función.

Hipótesis

Hipótesis

- A) Las MCTPs se expresan solo en organismos eucariotes, dado que en organismos procariontes no se tiene conocimiento de secuencias de proteínas que solo presenten tres dominios C2 y 2 regiones transmembranales.
- B) Los dominios funcionales de las proteínas MCTP se encuentran conservadas entre especies.
- C) La proteína MCTP-1 regula la función de neuronas sensoriales de *C. elegans*.

D) La remoción del gen *mctp-1* afecta la locomoción del nematodo. Dado que *mctp-1* se expresa en neuronas motoras de *C. elegans*.

E) La remoción del gen *mctp-1* afecta la neurotransmisión en el nematodo dado que posee características propias de una proteína sensor de calcio y se expresa en neuronas.

Objetivos generales

1. Realizar un análisis de la distribución filogenética de los genes *mctp*.
2. Construir un modelo *in silico* de la estructura de MCTP-1
3. Determinar el fenotipo del mutante del gen *mctp-1* de *C. elegans*.

Objetivos particulares

1a. Generar una base de datos con las secuencias de aminoácidos de las proteínas MCTP presentes en el ProteinBank.

1b. Comparar las secuencias de aminoácidos de las MCTPs de las diferentes especies en las que se presentan.

1c. Construir dendogramas de las MCTPs.

2a. Recabar secuencias primarias de proteínas MCTPs de diversos phyla.

2b Determinar cuáles dominios y secuencias primarias que están conservadas.

2c. Generar un modelo que prediga la estructura tridimensional de MCTP.

3a. Generar un mutante de delección del gen *mctp-1* de *C. elegans*

3b. Determinar el fenotipo del mutante de *mctp-1*.

3c. Determinar sí la mutación en el gen *mctp-1* está asociada a la función sináptica.

Materiales y Métodos

La metodología de este trabajo está dividida en dos partes: La primera describe los métodos utilizados para el análisis de bioinformática y modelado molecular y la segunda referente a la parte experimental del proyecto.

Metodología parte I

Identificación de las MCTPs en diferentes especies.

Se obtuvieron del banco de datos de proteínas (Protein Data Bank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) las secuencias de aminoácidos utilizando los programas SMART y COBALT (Schultz et al., 1998). Se usó como referencia la secuencia primaria de la proteína MCTP de *C. elegans* (NP_491908.2). Los criterios de inclusión para identificar las secuencias de la MCTP en otras especies fueron: 1) la presencia de tres dominios C2 y 2) dos regiones transmembranales. Las MCTP de *Arabidopsis* (Liu et al., 2017), fueron descartadas en este estudio ya que son más diversas en su organización estructural y no se ajustan a los criterios establecidos para nuestra comparación de secuencias.

Alineamientos de secuencias

Se realizaron en el programa COBALT usando parámetros por default del programa (Figura 8). COBALT utiliza la alineación de múltiples secuencias de una base de datos de motifs y dominios conservados en distintas proteínas y la similitud utilizando RPS-BLAST, BLASTP y PHI-BLAST (Papadopoulos y R., 2007). Se alinearon nuevamente las secuencias con el programa Jalview y se utilizaron los algoritmos del programa t-coffee.

Alignment Parameters	
Gap Penalties	Opening: -11 Extension: -1
End-Gap Penalties	Opening: -5 Extension: -1
Constraint Parameters	
RPS blast	<input checked="" type="checkbox"/> Use RPS BLAST to guide alignment
Constraint E-value	0.003
Conserved columns	<input checked="" type="checkbox"/> Find Conserved Columns and Recompute Alignment
Query Clustering Parameters	
Query Clustering Parameters	<input checked="" type="checkbox"/> Use query clusters
Word Size	4
Max Cluster distance	0.8
Alphabet	Regular

Figura 8 Parámetros establecidos para la identificación de las proteínas MCTP

Construcción de árboles filogenéticos

Utilizamos múltiples secuencias obtenidas por COBALT como entrada para generar árboles filogenéticos para analizar los patrones de divergencia de las MCTP en las especies en las que se identificaron genes *mctp*. El árbol filogenético de los organismos modelo experimentales y el árbol de dominios C2 se generaron utilizando el programa de alineación “Muscle”, el método de máxima probabilidad con inferencia bayesiana (M.Bayes3.2) o el bootstrapping (100 réplicas) dentro de la plataforma de “phylogeny.f”r según fuera necesario.

Predicción de la estructura secundaria y modelado de las MCTP'S

Utilizamos el software PSIPRED para la predicción de la estructura secundaria, y el software RaptorX Structure Prediction para modelar la estructura terciaria de la MCTP a partir de la secuencia de *C. elegans* (**NP_491908.2**) utilizando los parámetros predeterminados del servidor (Jones, 1999; Källberg et al., 2012). El modelo de PDB generado automáticamente fue modificado manualmente en Molsoft ICM-Pro v3.8-3 manteniendo la integridad de todos los dominios predichos en una configuración común. Posteriormente, las moléculas de Ca²⁺ fueron cargadas desde ChemSpider en el proyecto ICM (CSID: 4573905), y se sometió para su acoplamiento con los dominios C2A, C2B y C2C de la MCTP usando como templado la estructura del dominio C2 de las PKC α (PDB: 3GPE, Valero-Guerrero et al., 2009) por medio de la función Pocket Finder del ICM (Dey y Chen, 2011). El modelo final fue enviado al servidor de minimización de energía de Yasara (Krieger et al., 2009), y las imágenes generadas en PyMOL v2.2.2 Schrodinger LLC (Schrödinger, San Diego, CA).

Metodología parte II

Generación del mutante de *mctp-1* mediante CRISPR-Cas9.

La metodología para la construcción de los plásmidos que permitieron la remoción del gen *mctp1* por CRISPR/Cas 9 se realizó en cuatro pasos: 1) selección de secuencias y generación de plásmidos que portan el RNA guía, 2) construcción de dos plásmidos que portan fragmentos: a) río arriba y, b) río abajo del gen *mctp-1* para permitir la recombinación homóloga, 3) construcción de un plásmido que porta los genes de selección para la identificación de eventos de recombinación en el genoma: GFP y *unc-119*, 4) construcción de un plásmido que ensambla los elementos para la recombinación: fragmentos río arriba y río debajo de *mctp-1* y genes de selección (GFP y *unc-119*).

Construcción de los guías de ARN.

Para la generación de los RNAs guía se diseñaron primers que contienen un sitio PAM (NGG) (ver lista de oligonucleótidos en Anexo). El sitio PAM se seleccionó utilizando el programa en la página (<http://crispr.mit.edu/>) utilizando 250 pb del sitio blanco para introducir la mutación en el genoma. El programa seleccionó los sitios óptimos para realizar el corte en el DNA y en esta estrategia se utilizaron tres de ellos, por lo que se construyeron tres plásmidos de manera independiente los cuales portan la secuencia para cada guía. Una vez que se seleccionó el sitio PAM, se tomaron como base 19 nucleótidos a los cuales se les agregó la secuencia TTG para el primer en sentido y AAC para el reverso complementario. Estas secuencias permiten la ligación en el sitio SapI del plásmido pMLS134.

Para generar el plásmido (Figura 9) que contiene la secuencia del RNA guía (sgRNA) se clonaron los oligos en el plásmido pMLS 134 (Figura 10) (Donado por el Dr. E. Jorgensen, U. Utah) mediante la técnica Golden Gate (Padgett y Sorge, 1996) con el siguiente protocolo:

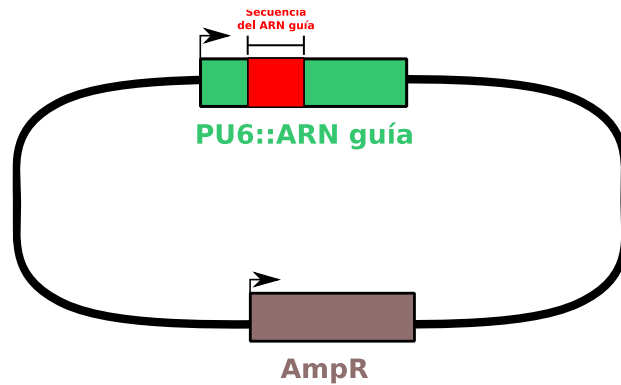


Figura 9 Esquema representativo del vector que contiene la secuencia que codifica para el RNA guía.

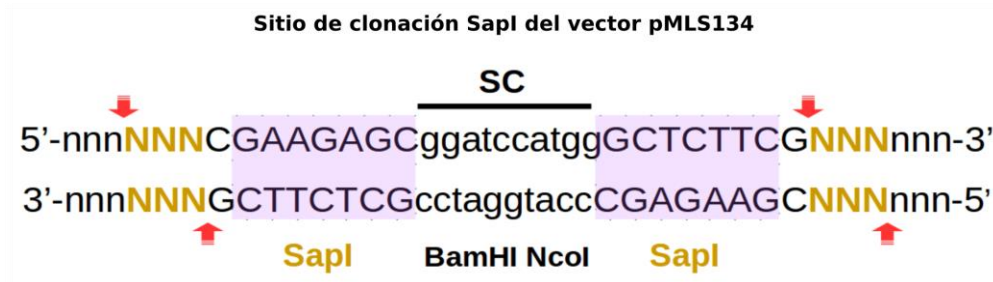


Figura 10 Sitio de clonación SapI en el vector pMLS134.

Sitio de clonación de los primers para generar el ARN guía utilizando el plásmido pMLS 134. El sitio de reconocimiento para la enzima SapI se indica en morado y el sitio del corte en color marrón. Los sitios BamHI y NcoI se resaltan en negro. En Rojo se muestra el fragmento de 20 pares correspondientes al RNA guía. En verde representa la secuencia del promotor U6 y el andamiaje para la expresión de ARN guía.

Protocolo Sap-Trap: Primero se alinearon los oligos para formar DNA de doble cadena. Para ello, se disolvieron a una concentración de 100 μ M en TE y se mezclaron con una solución de alineamiento 1x (OAB) para hacer alícuotas a una concentración final de 10 μ M. La solución 1X OAB contiene: 20 mM Tris-Cl 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂. El par de oligos se incubaron a 95° C por 5 min, posteriormente se dejaron a temperatura ambiente para que ocurra el alineamiento de los primers. Para la clonación de las guías se procedió a preparar el plásmido pMLS134 (Schwartz y Jorgensen, 2016) el cual fue cortado con SapI. Se ligó el DNA de doble cadena formado por el alineamiento de los oligos con el plásmido pMLS134 y se inactivó la reacción a 65°C por 30 min. Se procedió a transformar bacterias (*E. coli* cepa XL1-blue) con 1 μ L de la reacción de ligación (50 ng) y se tamizaron las clonas resultantes con la enzima BamHI. Los patrones de restricción para identificar clonas positivas son los siguientes: plásmido correcto debe liberar un fragmento de 3.5 Kb y negativo 2.1 Kb con BamHI. Se aseguró la identidad del plásmido mediante secuenciación utilizando el oligo M13F (Schwartz y Jorgensen, 2016). Los plásmidos permiten la expresión del RNA guía bajo el promotor constitutivo del sgRNA U6.

Construcción de los vectores intermediarios que portan los fragmentos del gen *mctp-1*, el gen de GFP y el gen *unc-119*.

Para clonar los fragmentos que permitieron la recombinación homóloga se amplificaron 1.5 kb río arriba del inicio de la transcripción de la isoforma *mctp-1a* y 1.5 Kb río abajo del sexto exón presente en las isoformas a-c. Se clonaron en los plásmidos donadores del sistema Gateway (4-1 y 2-3), de tal manera que se generaron una secuencia homóloga derecha y una izquierda (Brazo homólogo izquierdo pDonor(4-1) y brazo homólogo derecho pDonor(2-3) (Figura 11).

Posteriormente se construyó un plásmido final mediante una reacción LR (LHA pDonor (4-1) (Figura 13), pJLT6 (GFP::*Let858utr*::*Unc-119+*) (Figura 12). pDonor (1-2) y RHA pDonor (2-3).

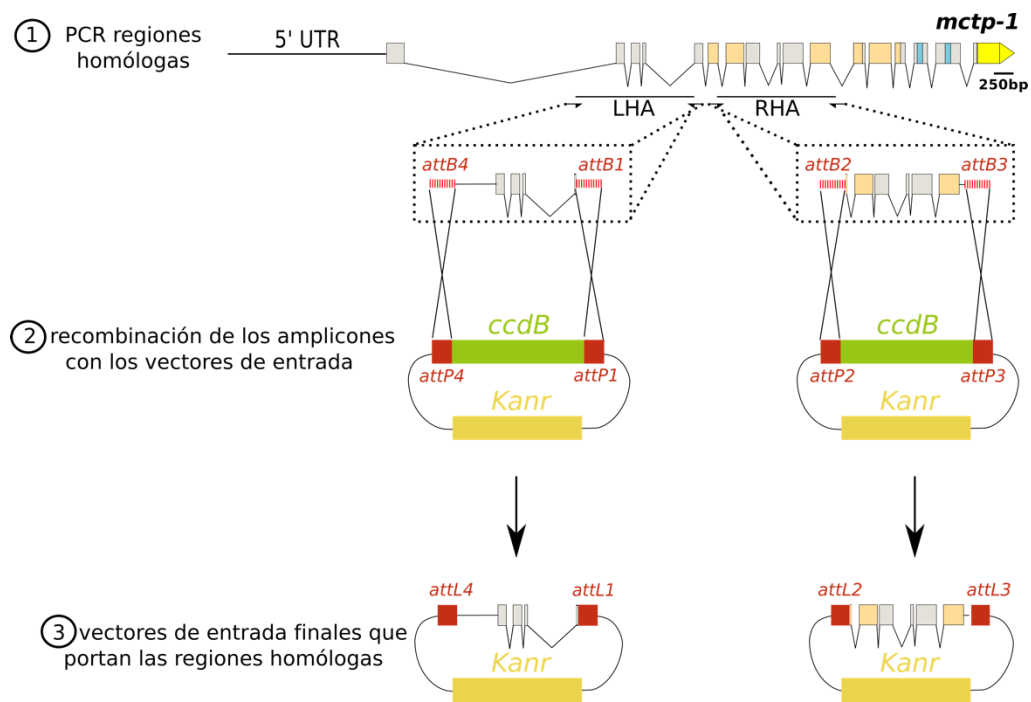


Figura 11 Clonación de los brazos homólogos derecho e izquierdo en los vectores intermediarios 4-1 y 2-3 respectivamente mediante el uso del sistema Gateway.

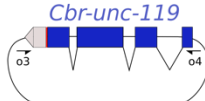
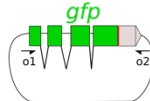
Clonación de Gibson mediante
sobrelape de 20 pares de bases

Pares de oligos con sobrelape

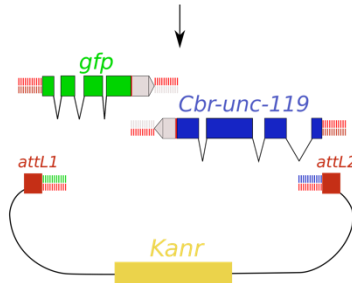
1.-o1-o5

2.-o2-o3

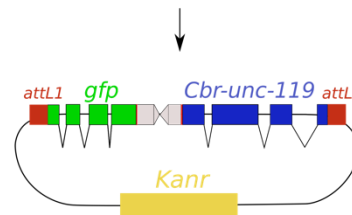
3.-o4-o6



① PCR de amplicones
a ensamblar



② Recombinación de los amplicones
GFP y unc-119 con el
vector de entrada 1-2



③ vector intermediario 1-2 GFP::unc-119

Figura 12 Clonación del fragmento GFP::unc-119 en el vector intermediario 1-2 mediante el uso de la técnica de clonación de Gibson

Construcción del plásmido de reparación para generar el knock-out.

Para la generación del plásmido de reparación se realizó una reacción LR en la cual se pusieron los siguiente plásmidos para su recombinación: pDest r3-r4 50 ng/ul 1 µl, pJLT47 (RHA 4-1) 50 ng/ul 1 µl, pJLT46 (LHA 2-3) 50 ng/µl 1ul, pJLT6 (GFP::UTR::Unc-119) 50 ng/µl 1 ul, LR clonasa 1µl (5X) (Figuras 13 , 14) y se dejó por 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente se transformó en *E. coli* Top 10, se seleccionaron colonias y se tamizó para identificar el plásmido positivo.

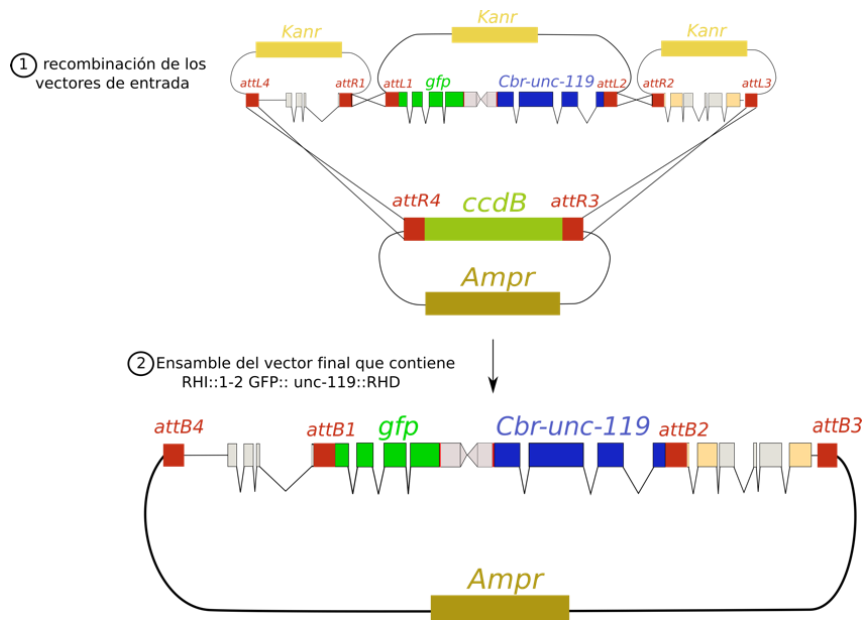


Figura 13 Clonación del vector final para generar el alelo mutado de *mctp-1* (alelo *amt1*) mediante CRISPR/Cas9 mediante el uso del sistema Gateway

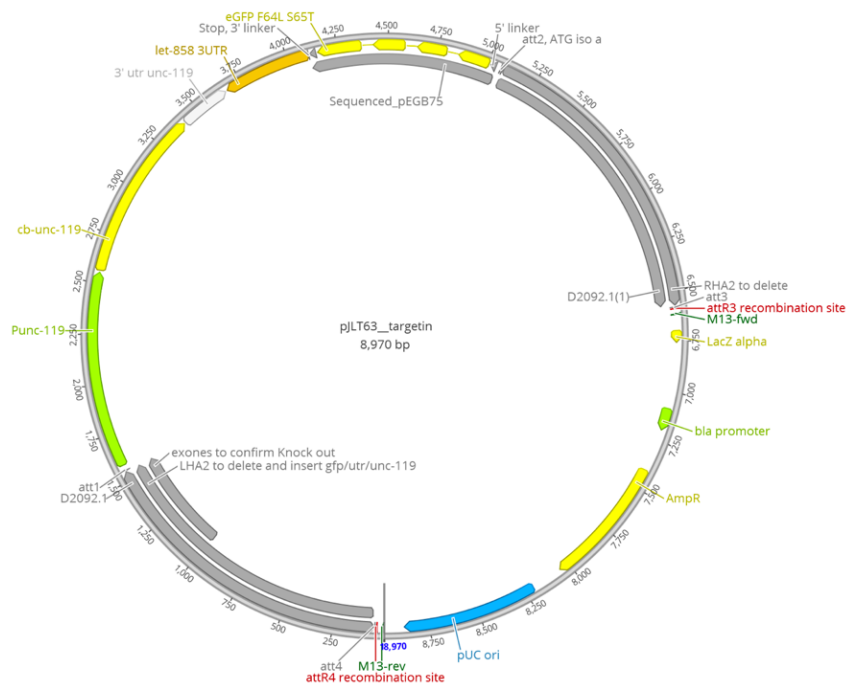


Figura 14 Mapa del plásmido de reparación (pJLT63) utilizado para generar los animales knock-out *amt1*

Generación de los mutantes del gen *mctp-1* mediante CRISPR/Cas9

Se microinyectaron 410 animales para integrar las secuencias de los genes de selección *unc-119* y GFP flanqueados por 2 brazos homólogos de 1.5 Kb de *mctp-1*. Para la micro inyección se utilizó la cepa EG6207 (*unc-119Ed3*)III con los siguientes plásmidos: CRISPR Mix: Cas9 50 ng/μl, pCFJ90 2.5 ng/μl (Pmyo-2::mCherry), pCFJ104 10 ng/ul (Pmyo-3::mCherry), pGH8 4 ng/μl (Prab-3::mCherry), plásmido de reparación (35 ng/μl) y los tres sgRNA (30 ng/μl cada uno) (Schwartz y Jorgensen, 2016). Se colocaron dos animales en una placa con medio de cultivo y se mantuvieron a 25°C por 7-10 días hasta que agotaran el alimento, se seleccionaron los animales que revirtieron el fenotipo *unc-119*. Se seleccionaron individuos que presentaron un fenotipo similar al silvestre y que a su vez no expresaran los marcadores de co-inyección, se pasó un animal por caja nueva para observar la progenie de esta generación (Schwartz y Jorgensen, 2016).

Se verificó la integración de los genes de selección. Para ello se aisló DNA genómico mediante lisis de gusanos (ver solución en tabla 1), el lisado se utilizó como molde de DNA para PCR para amplificar el gen de selección (*unc-119*) y corroborar que se ha interrumpido el marco de lectura abierto de *mctp-1*.

Para corroborar la integración de los genes de selección mediante PCR se siguió el siguiente protocolo.

Tabla 1 Solución de lisis

Solución de lisis	
H2O	80 ul
Proteinasa K	2.5 ul
Buffer GC NEB	20 ul

Se aislaron 5 gusanos y se colocan en un tubo con 5 μ l de solución para lisis (tabla 1). Posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido por 5 min. Después se descongelan a temperatura ambiente y se incubaron en el termociclador por 1 h a 60°C y después 30 min a 95°C para inactivar la proteinasa K. Para realizar el PCR se tomó 1 μ l del lisado como templado de DNA. La manipulación con CRISPR/Cas9 interrumpió el marco de lectura del gen *mctp-1* en las diferentes isoformas a-c (Figura 15) (Cho et al., 2013; Horii et al., 2014; Waaijers et al., 2013; Waaijers y Boxem, 2014).

Una vez obtenidos los mutantes se procedió a realizar retrocruzadas (Figura 17) para limpiar el fondo genético de posibles mutaciones ligadas a la remoción de *mctp-1* con machos de la cepa silvestre en al menos una vez (Figuras 16, 17).

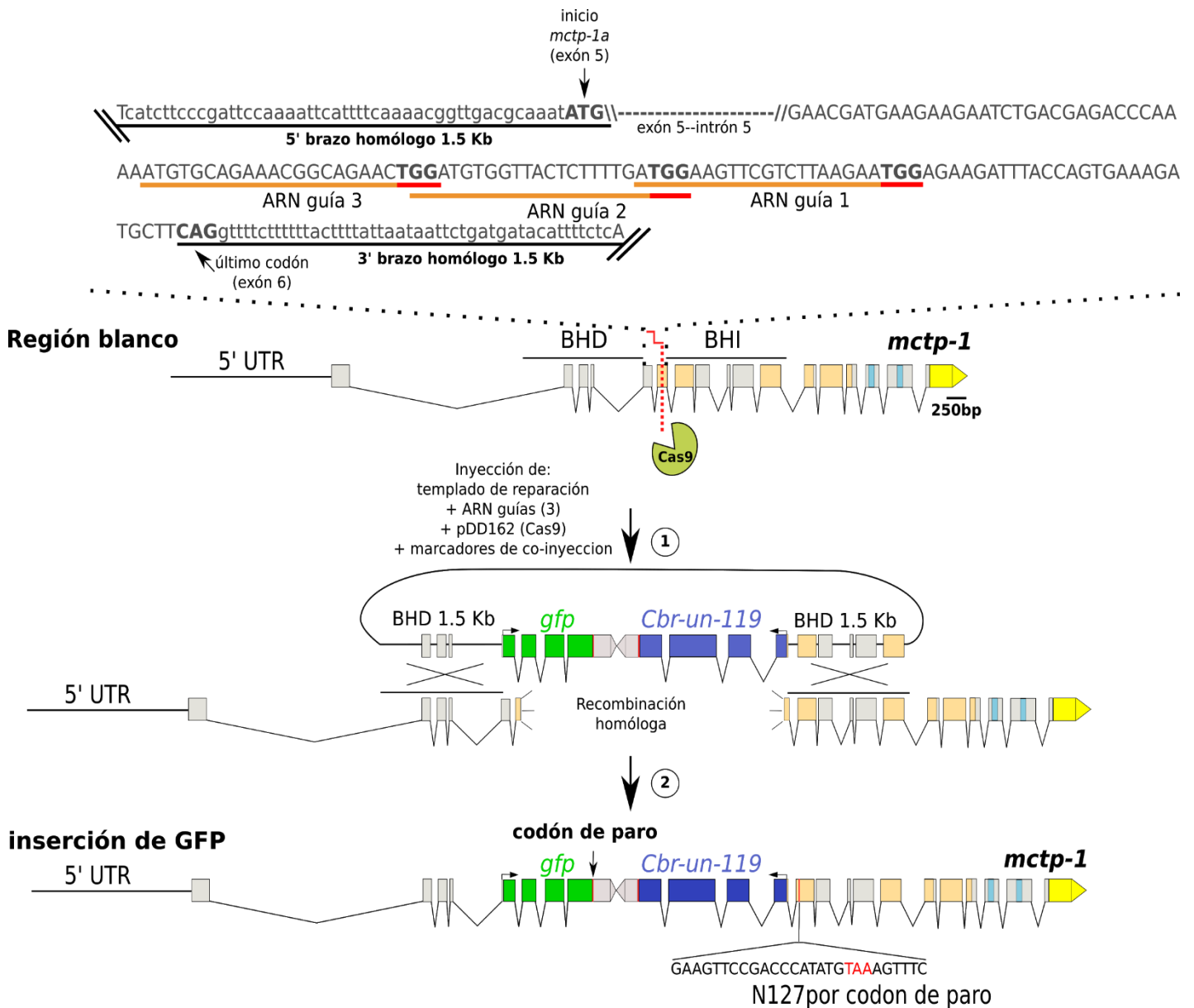


Figura 15 Sitio de inserción de los genes de GFP y *unc-119* en el locus del gen *mctp-1*.

Representación esquemática del sitio de la inserción de GFP::*let-858*; *unc-119*+ por el sistema CRISPR/Cas9. La línea discontinua y la Z en color rojo representa sitios blancos donde se unen los guías en el exón. La secuencia removida se muestra en gris. Las secuencias de sgrNA de 20 pb se representan en las líneas negras dentro de las bases eliminadas y la secuencia PAM (NGG) se representa en líneas rojas (parte superior). Ambos brazos homólogos izquierdo (BHI) y derecho (BHD) tienen un tamaño de 1.5 Kb representados con líneas negras en el esquema de la región blanco. En el paso 1 se representa la recombinación del templado de reparación con la región blanco del gen. En el paso 2 se representa las modificaciones que genera la inserción de GFP y *unc-119* en el locus del gen *mctp-1*.

Caracterización del fenotipo de las cepas mutantes de *mctp-1*.

Debido a que los resultados previos sugerían la expresión de *mctp-1* en el sistema nervioso del sistema se utilizaron pruebas que evaluaran la función de este mediante los procedimientos descritos por Hart (2006) con algunas modificaciones. Para ello se midió la respuesta motora mediante ensayos que determinaron: velocidad del desplazamiento, frecuencia de los coletazos (“thrashing”) al nadar y número de huevos ovipositados por hora. Todos los ensayos se llevaron a cabo en el alelo *amt1* y algunos fueron realizados en el alelo *av112*. Este alelo se generó mediante el uso de dos guías de RNA que dirigen el corte de la Cas9, 1) río arriba de la isoforma a y 2) río abajo del codón de paro del gen *mctp-1*, por lo que también se considera un alelo nulo (Joshi et al 2018).

Se evaluó el efecto de la remoción del gen *mctp-1* en la transmisión sináptica utilizando inhibidores de la acetilcolinesterasa (aldicarb 1 mM, que evalúa la actividad presináptica) y el agonista de los receptores colinérgicos tipo nicotínicos (levamisol 0.4 mM, que evalúa la actividad post-sináptica) (Mahoney et al., 2006).

Estos análisis permitieron evaluar de manera integral la participación funcional de *mctp-1* dentro del cordón ventral neuronal, el cual está implicado en las conductas antes mencionadas.

Puesta de huevos

Primero, los animales fueron sincronizados a la misma edad. Se seleccionaron animales en estadio L4 tardío 24 h antes del ensayo y transferidos a placas inoculadas con bacterias que se mantuvieron a temperatura ambiente. Para evitar el escape de los animales, se aplicó 100 µl de 4M D-fructosa alrededor de la placa sobre el agar y se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta haberse secado la fructosa. Luego, los animales fueron transferidos a placas con o sin comida y se dejaron a los animales ovipositar durante 2 h. Posteriormente los animales fueron retirados y los

huevos se contaron para cada condición. En cada condición se utilizaron diez animales por placa y el número de repeticiones por grupo fue de seis.

Número de coletazos al nado

Se seleccionaron animales en estadio L4 24 h antes del análisis y mantenidos en placas a temperatura ambiente. Posteriormente, un solo animal fue colocado en una gota de 20 μ l M9 por un minuto, después se contaron el número de coletazos en un minuto. Para cada cepa se analizaron 20 animales. Un coleteo se define como un ciclo de movimiento donde la cabeza y cola van hacia la misma dirección y regresan al punto inicial.

Grabación de videos

Se utilizaron animales adultos jóvenes previamente sincronizados y se mantuvieron en placas a temperatura ambiente. Para grabar los videos, los animales fueron puestos en placas con NGM nuevas. Se les permitió 10 min de habituación antes de la grabación. Los videos fueron grabados en un estereomicroscopio Olympus SZX7 con una cámara con sensor CMOS de alta velocidad, marca y modelo PCO.Edge 4,2 a 10 fps utilizando el software Camware 6,4. La resolución de los videos fue de 1024 x1024 megapíxeles y se guardaron como videos de ocho bits en formato WMA. Los videos fueron analizados en el software Worm Lab MBF de la Prueba gratuita 3.1.

Análisis de la locomoción

Velocidad: es el promedio de velocidad en μ /seg para cada gusano incluyendo movimiento hacia delante y movimiento de reversa.

Ensayos de farmacología

Se agregó aldicarb 1 mM o levamisol 0.4 mM a placas con agar NGM. Para los experimentos se añadió 100 µl de 4M D-fructosa en el borde de la placa para mantener los gusanos dentro del agar. Para los ensayos se utilizaron 30 animales adultos jóvenes para cada genotipo. Los ensayos fueron hechos en las mismas condiciones para cada genotipo y concentración por triplicado.

Rescate de fenotipo

Se amplificaron 13 KB correspondientes al gen *mctp-1*, incluyendo su promotor. Este fragmento fue amplificado mediante PCR usando los primers ojlt197 y ojlt198 y posteriormente fue microinyectado a una concentración de 50 ng/µl conjuntamente con marcadores de co-inyección (CFJ90 2.5 ng/ul y pPD135.64 10 ng/ul)

Microinyección

Se inyectaron gusanos con los diferentes plásmidos para cada estrategia. 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. Se usaron capilares WPI 0.5 mm de radio interno y 1mm radio externo.

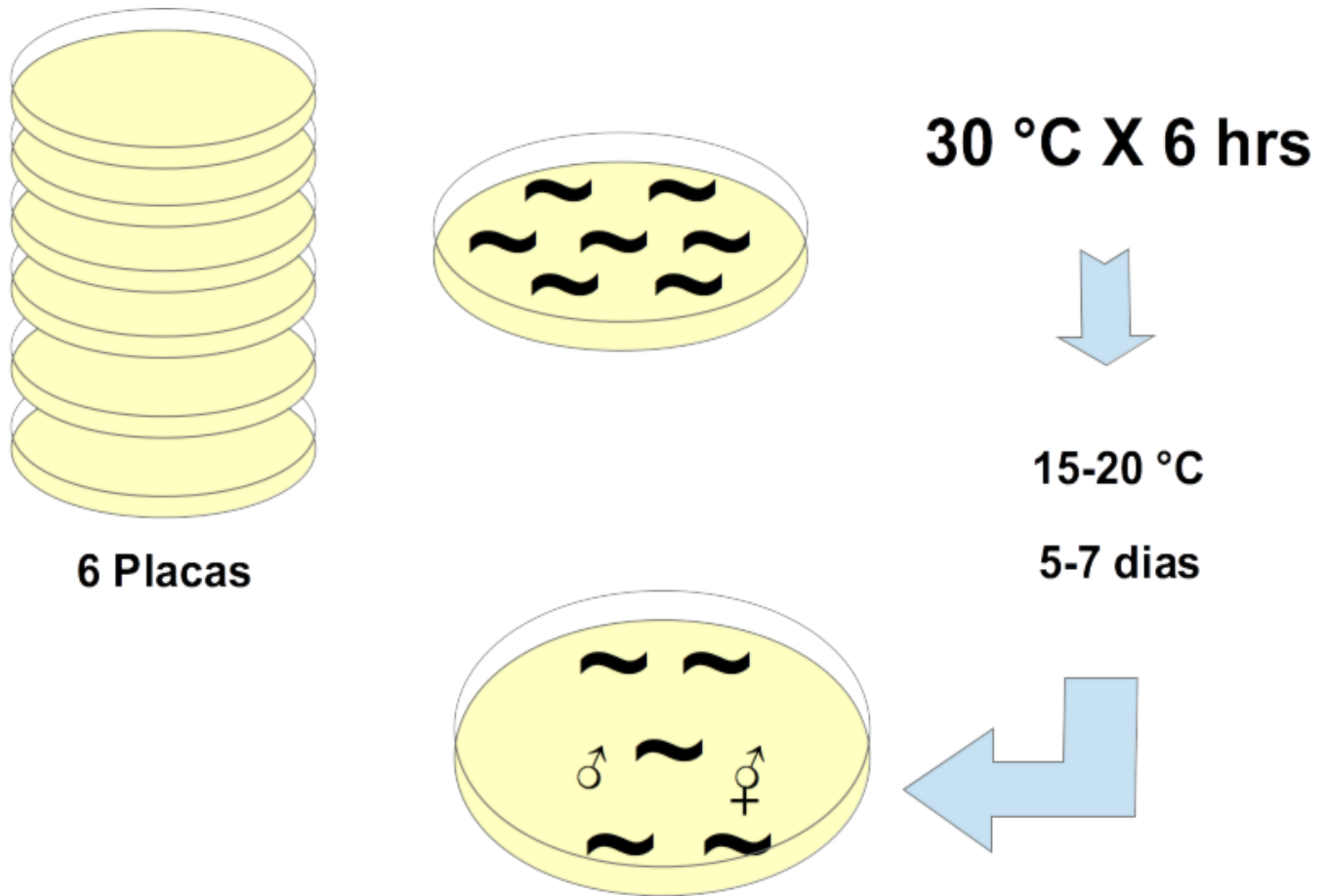


Figura 16 Esquema para generar machos mediante choque térmico en la cepa silvestre (N2).

Se seleccionaron nematodos de la cepa silvestre N2 en estadio L4 y se colocaron 5 a 10 animales por placa, posteriormente se les aplicó un choque térmico a 30°C por 6 horas, después se pasaron a 20 °C y se dejaron de 5 a 7 días hasta obtener machos. Posteriormente se cruzaron machos de la cepa silvestre (N2) y hermafroditas N2 en proporción 5:1 respectivamente. Con esto se obtiene una proporción 50:50 de hermafroditas: machos y se procedió a cruzar con los alelos *tm6603* y *amt1* (Figura 17). El alelo *tm6603* incluye una deleción del gen que elimina únicamente el dominio C2B de la proteína.

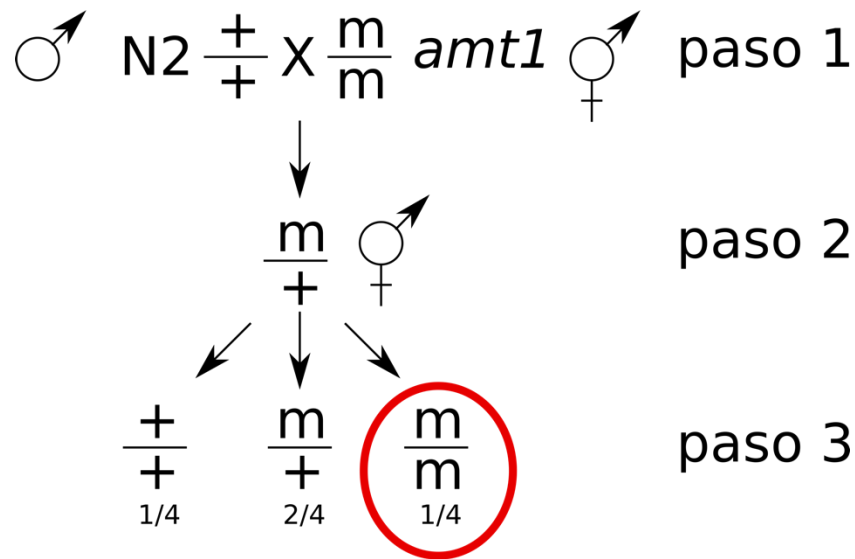


Figura 17 Esquema de retrocruzadas para limpiar el fondo genético de las mutantes

En el paso 1 se muestran la cruzada de los parentales (P0), se cruzó el mutante *mctp-1(amt1)* con machos de la cepa silvestre. En el paso 2 se seleccionan animales hermafroditas (F1) y se colocan de manera individual en cajas con alimento. En el paso 3 se seleccionan varios animales F2 (genotipo dentro del círculo rojo) y se separan de manera individual en cajas con alimento, y se dejan ovipositar. Posteriormente se corroboró por PCR de un solo gusano que hayan mantenido la mutación en *mctp-1*. El signo “+” significa alelo silvestre y la letra “m” se refiere a la mutación en el gen *mctp-1*.

Tinción de gotas de lípidos

Se sincronizaron gusanos y se tomaron muestras en el estadio L4, estos se colocaron por 30 min en un tubo con 5mM de BODIPY™ 493/503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a, 4a-Diaza-s-Indacene de Thermo-Fisher) disuelto en medio M9, posteriormente, se retiró la solución y se cambió por M9 y se dejaron reposar 5 min. Este paso se repitió tres veces para eliminar al máximo posible restos del Bodipy. Se retiran los gusanos del M9 y se inmovilizan con azida de sodio a 50 mM por 5 min para después transferir los gusanos a un portaobjetos con camas de agar al 2% en donde se añadió una suspensión de poliestireno. Se colocó un cubreobjetos y se analizó la muestra al microscopio confocal (Fig. 18).

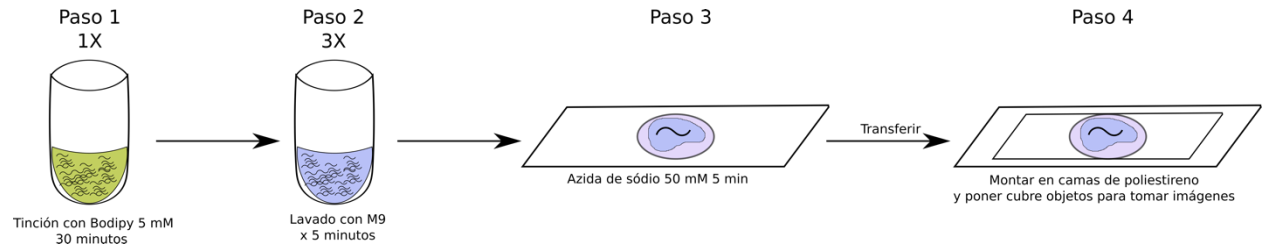


Figura 18 Protocolo para la tinción de gotas de lípidos en *C. elegans*

Resultados

Los resultados de este trabajo se presentan en dos partes: Parte I, describe los resultados obtenidos del análisis de bioinformática y modelado molecular. Parte II, describe los resultados de la fase experimental del proyecto.

Resultados Parte I

Se han propuesto a las MCTPs como una familia de proteínas ubicuas presentes en diversos organismos que incluyen desde plantas hasta el ser humano. Sin embargo, aún no es clara la nomenclatura de los diferentes tipos de MCTPs, su distribución en los diversos organismos en los que se expresa ni los dominios funcionales conservados. Por definición para considerar a una proteína parte de las MCTPs se deben de cumplir los siguientes criterios: 1.- tener dentro de su estructura específicamente tres dominios C2, 2.- presentar una o dos regiones transmembranales en el extremo carboxilo terminal. Tomando en cuenta estas consideraciones se realizó una búsqueda de las secuencias aminoacídicas de proteínas en todos los organismos presentes en la base de datos del GeneBank y así poder establecer los organismos que expresan las MCTP, así como las diferencias entre las distintas clases de MCTPs y tratar de entender su función.

Análisis filogenético de las proteínas MCTP

Para tratar de entender el origen de las MCTPs se buscaron secuencias de proteínas que presenten tres dominios C2 y una o dos regiones transmembranales. Nuestros resultados muestran que las secuencias de proteínas MCTP se encuentran solo en metazoarios, desde los nematodos hasta los humanos. No encontramos evidencia de MCTP en organismos unicelulares como bacterias, levaduras, coanoflagelados. Tampoco se encontraron en animales multicelulares como esponjas, placozoarios y cnidarios. Se generaron dendogramas utilizando diferentes organismos

que se utilizan como modelos biológicos experimentales, incluyendo a *Ciona intestinalis*, un tunicado que representa la línea base de los cordados (Figura 19). El análisis del dendograma muestra la divergencia de la familia de proteínas MCTP en tres clases principales: MCTPi presentes en invertebrados y MCTP-1 y MCTP-2 están presentes en vertebrados.

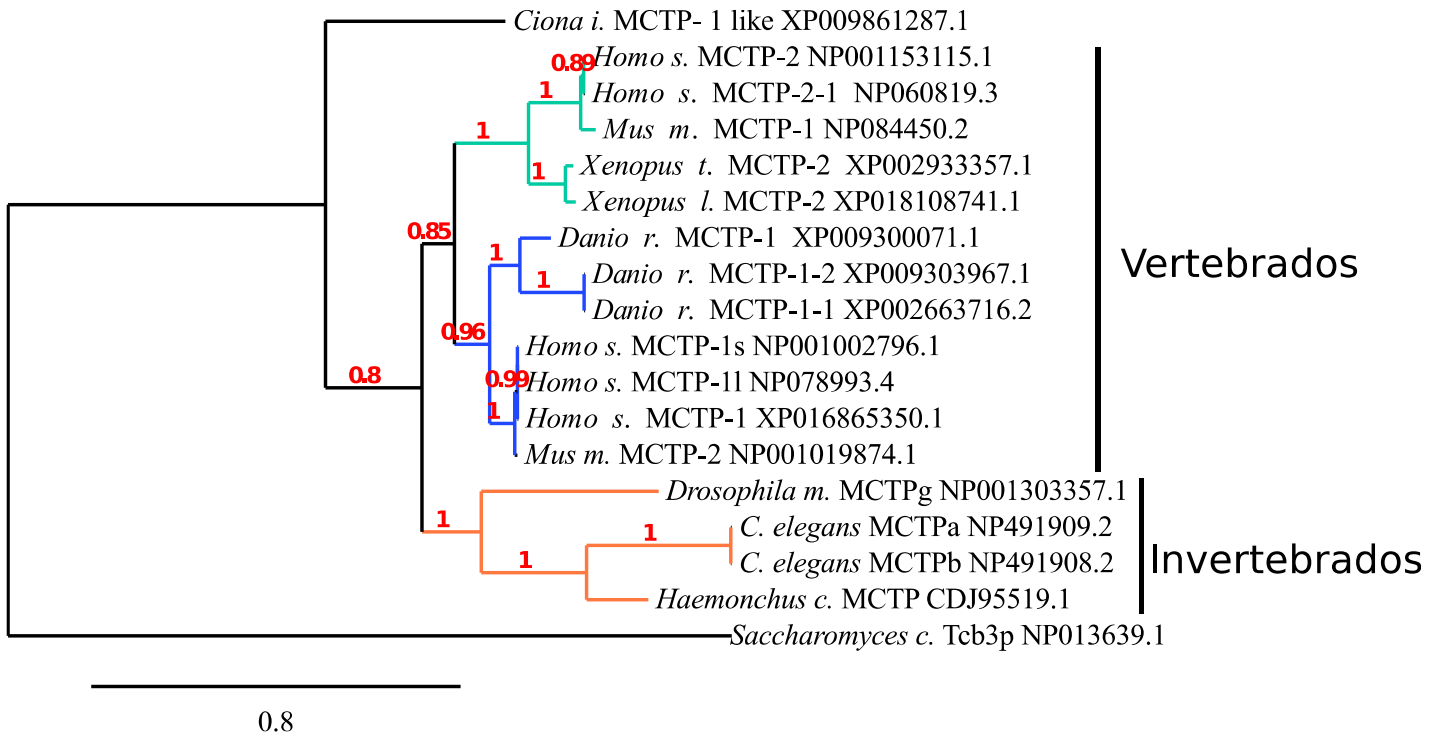


Figura 19 Árbol filogenético de las proteínas MCTP en especies modelo.

Todas las secuencias seleccionadas del NCBI aparecen con su número de identificación. El árbol se generó utilizando el método de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana utilizando 100 réplicas. Se utilizó la secuencia de la tricalbina 3 (Tcb3) NP_013639.1 de *S. cerevisiae* como grupo externo dado que tiene dominios funcionales parecidos, pero no está emparentada con las MCTPs. El clado coloreado en rojo representa al MCTPi, el clado en color azul marino representa MCTP-1 y el clado en color verde representa MCTP-2. La barra representa las unidades de distancia de la longitud de las ramas del árbol.

Los dominios funcionales de unión a Ca^{2+} C2 se encuentran conservados en las proteínas MCTP en diferentes especies.

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas MCTP poseen tres dominios citosólicos C2 en tándem y dos regiones transmembranales (Figura 20). Para analizar el grado de conservación de los motivos funcionales de unión a Ca^{2+} y lípidos, se alinearon las secuencias de aminoácidos correspondientes a los tres dominios C2 (C2A, C2B y C2C) presentes en diferentes modelos biológicos (Figura 21), así como su región C terminal, para determinar el grado de conservación de la secuencia de aminoácidos de las regiones transmembranales (Figura 22). La comparación de los dominios C2 mostró una alta conservación en la secuencia primaria, aunque el grado de conservación es diferente entre ellos. En general, el dominio C2C es el más conservado, seguido por el C2A y finalmente el C2B. Estos dominios poseen residuos de aspartato que se pliegan para formar motivos de unión al Ca^{2+} . Para corroborar el grado de conservación de estos residuos, se analizó su número y posición y se compararon con dominio C2 de la PKC α (**3GPE**).

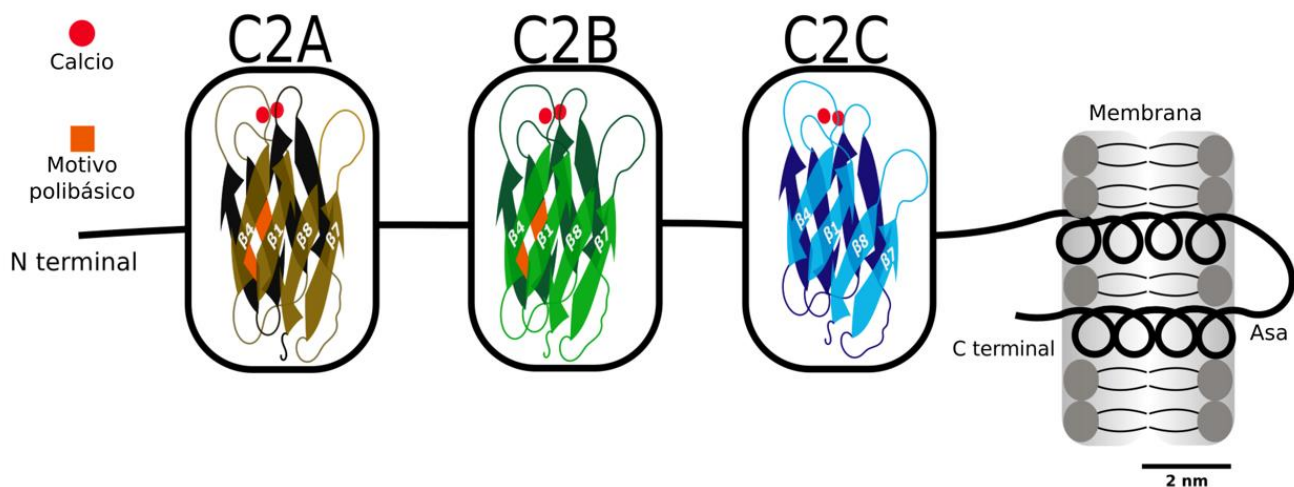


Figura 20 Modelo a escala de la proteína MCTP tomando en cuenta la secuencia consenso de varias especies modelo.

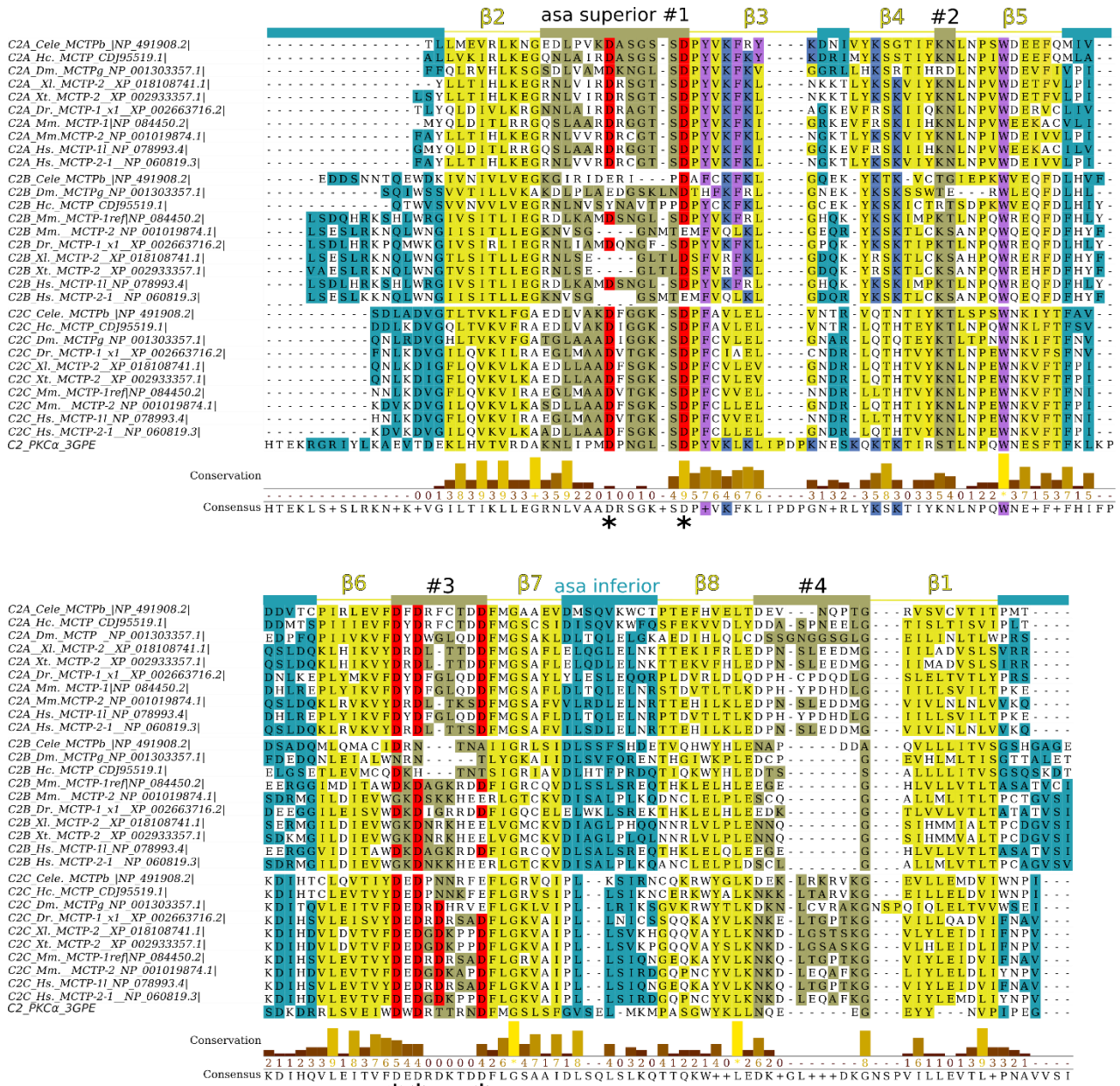
Diagrama general de las MCTPs utilizando la secuencia consenso generada a partir de la alineación de las secuencias de las especies modelo. Dos hélices transmembranales en el extremo C- anclan a la proteína a la membrana, seguidas de tres dominios C2. Los sitios putativos de unión del Ca^{2+} y lípidos (motivo polibásico) se muestran en el esquema en C2A a C2C y C2A-C2B respectivamente.

Nuestros resultados muestran que la posición de cinco residuos de aspartato se conserva parcialmente en los tres dominios C2 de las MCTP. Por ejemplo, los residuos de aspartato 1 a 4 se conservan en el dominio C2C, mientras que el quinto presenta la sustitución D → E en *C. elegans*, *H. contortus*, *D. melanogaster* y *C. intestinalis* (Figura 21); además C2B presenta sólo cuatro residuos de aspartato en lugar de cinco y todos ellos presentan diversas sustituciones de aminoácidos, entre ellos: D → A, E, H, N o T (Figura 21). En algunas isoformas de humanos y ratones solo presentan uno o dos residuos de aspartato, lo que sugiere que pueden no unir Ca²⁺ (Figura 21). La posición de los residuos de aminoácidos predice que los sitios de unión al Ca²⁺ están bien conservados en C2A y C2C en la mayoría de las MCTP analizadas, pero ese no es el caso de C2B.

Por otra parte, en los dominios C2A y C2B, se detectó la presencia de un dominio rico en lisinas o motivo polibásico (Figura 21) (Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2014; Di Paolo y De Camilli, 2006). Este motivo, llamado así por la presencia de residuos cargados positivamente (K, K, K) y aromáticos (Y, W), una fosfatidilserina y PtdIns(4,5)P2 (PIP2) en la sinaptotagmina 1 y PKCα (Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2014, Valero-Guerrero et al., 2009). La presencia de este dominio ha abierto la puerta a una hipótesis de trabajo para determinar si los fosfolípidos podrían ser necesarios para la unión al Ca²⁺, lo que contrasta con las observaciones que sugieren que la función de las MCTP es independiente de las interacciones con los lípidos (Shin et al., 2005). En conjunto, encontramos al menos dos sitios potenciales de unión del PIP2 que se asemejan a otros dominios C2 conocidos por penetrar en la membrana plasmática, Nuestros resultados de acoplamiento molecular indican que estas cavidades ricas en lisinas en C2A y C2B pueden unir mediante puentes de hidrogeno a PIP2; posiblemente esta interacción se de en coordinación con los aspartatos presentes en C2A, C2B y C2C que potencialmente estabilizan moléculas de Ca²⁺ (Figura 24).

En síntesis, los análisis obtenidos con el software SMART produjo un modelo que sugiere que los dominios C2 de la MCTP abarcan alrededor de 125 residuos, mientras que PSIPRED sugiere que la estructura secundaria de los dominios C2 están conformados por ocho cadenas β , que es una característica de la conformación del dominio C2 Clase 2 (topología-II) en la que los terminales N y C están cerca del fondo y la lámina β_2 corresponde al sentido de la β_1 del Dominio C2 tipo I (Figura 21).

Un segundo criterio para establecer que una proteína pertenece a las MCTP fue la presencia de dos segmentos de residuos hidrofóbicos que forman la región transmembrana (TMR) que permite a la proteína anclarse a las membranas de vesículas u otros orgánulos. Se ha demostrado que sólo un segmento es suficiente para anclar la proteína a las vesículas intracelulares (Shin et al 2005, Qiu et al 2015), aunque se desconoce si la falta de uno de los TMR desvía el tráfico de la proteína hacia otros organelos. Las secuencias de aminoácidos del TMR de las MCTP fueron analizadas por SMART. La MCTP-2 incluye dos TMR situados hacia el terminal C, con excepción de la isoforma 2 de humanos, que carece de un TMR (Figura 22). La segunda TMR está más conservada (70%) en diferentes especies, mientras que la secuencia de la primera TMR está menos conservada (10%). El análisis funcional que utiliza versiones de los TMR fusionados a YFP reveló que ambas TMR dirigen la proteína a vesículas intracelulares, lo que sugiere que una TMR basta para anclar la proteína en las vesículas (Shin et al., 2005).



*sitios de unión a Ca²⁺ motivo polibásico YxKx_{n-1}KxKx_{n-2}W(Y/L/C)X_{n-3}Asn
Figura 21 Análisis de los en los dominios C2 de las proteínas MCTP presentan sitios de unión a Ca²⁺ y un motivo polibásico de unión a lípidos.

Para determinar la conservación de los sitios de unión a Ca²⁺, se utilizaron como secuencias base las correspondientes al dominio C2 de la PKCα de humano. La estructura secundaria fue calculada usando el software PSIPRED. Las columnas marcadas con asteriscos negros son los residuos de unión a Ca²⁺. Los sitios putativos de unión a los lípidos se muestran en color azul y violeta. Para determinar la conservación de estos sitios se utilizó como referencia la secuencia del dominio C2B de la sinaptotagmina-1 humana. Las columnas marcadas con asteriscos negros son los residuos de unión a Ca²⁺ y los residuos que conforman el motivo polibásico están en color azul y violeta. Se indica el grado de conservación de la secuencia y el consenso de cada segmento. Clave de las abreviaturas: Cele. *C. elegans*, Dm, *D. melanogaster*, Hc, *Haemonchus contortus*, Mm, *Mus musculus*, Dr, *Danio rerio*, Xl, *Xenopus laevis*, Xt, *Xenopus tropicalis*, Hs, *Homo sapiens*. PKCα, proteína cinasa C.

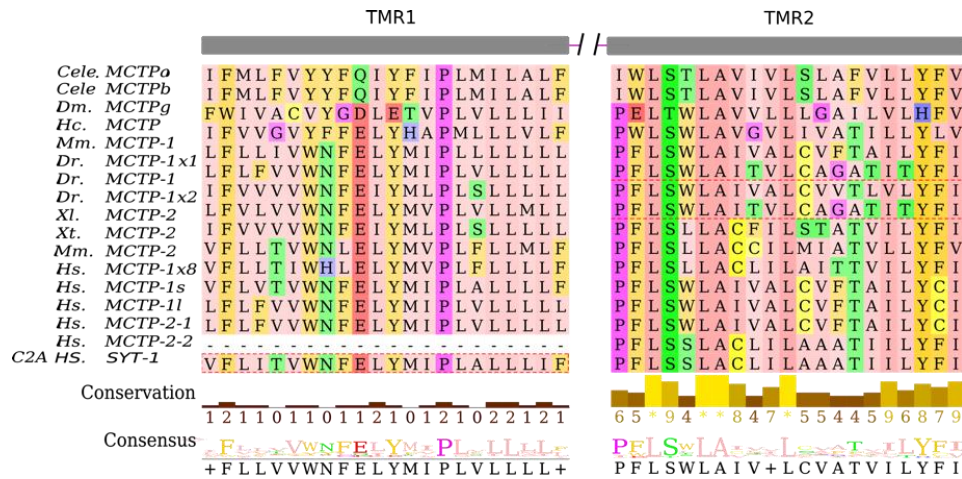


Figura 22 Alineamiento de las regiones transmembranales de las proteínas MCTP.

Las regiones conservadas se calcularon utilizando SMART. Las columnas en gris representan las regiones transmembranales 1 y 2, respectivamente. El histograma en la parte inferior del alineamiento indica el grado de conservación de la secuencia y el consenso de cada segmento. Clave de las abreviaturas: Cele. *C. elegans*, Dm, *D. melanogaster*, Hc, *Haemonchus contortus*, Mm, *Mus musculus*, Dr, *Danio rerio*, Xl, *Xenopus leavis*, Xt, *Xenopus tropicalis*, Hs, *Homo sapiens*. SYT-1, synaptotagmina 1.

Divergencia de los dominios C2 de las MCTPs

Se ha propuesto de manera canónica a los dominios C2 como un dominio de unión a calcio, sin embargo, hay diferencias funcionales entre las diferentes proteínas que presentan este tipo de dominios y que no necesariamente unen calcio, dado las diferencias observadas en cuanto a la sustitución de algunos residuos entre especies, nos propusimos analizar si esas sustituciones funcionan como una marca molecular para determinar el subtipo de dominio C2 (A, B o C) al que corresponde.

Exploramos si la secuencia de aminoácidos de los dominios C2 de las MCTP varían entre ellos. Se utilizaron alineamientos de los tres dominios C2 de especies representativas de cada clado para generar árboles de máxima verosimilitud. Observamos tres cladogramas generales: el primero incluye el dominio C2C de todas las especies (*C. elegans*, *H. contortus*, *C. intestinalis*, *X. leavis*, *X. tropicalis*, *D. rerio*, *M. musculus* y *H. sapiens*) (Figura 23). El segundo y principal clado incluye C2A y C2B, lo que sugiere que pueden tener funciones similares, al menos como lo sugiere la conservación de su secuencia de aminoácidos (Figura 23). Cabe destacar que tanto el C2A como el C2B poseen los supuestos residuos de unión de lípidos incluidos en el dominio rico en lisina, y que el dominio C2C no tiene este dominio, lo que indica una característica estructural que sugiere funciones similares entre los dominios C2A y C2B y diferentes a C2C (Figura 23).

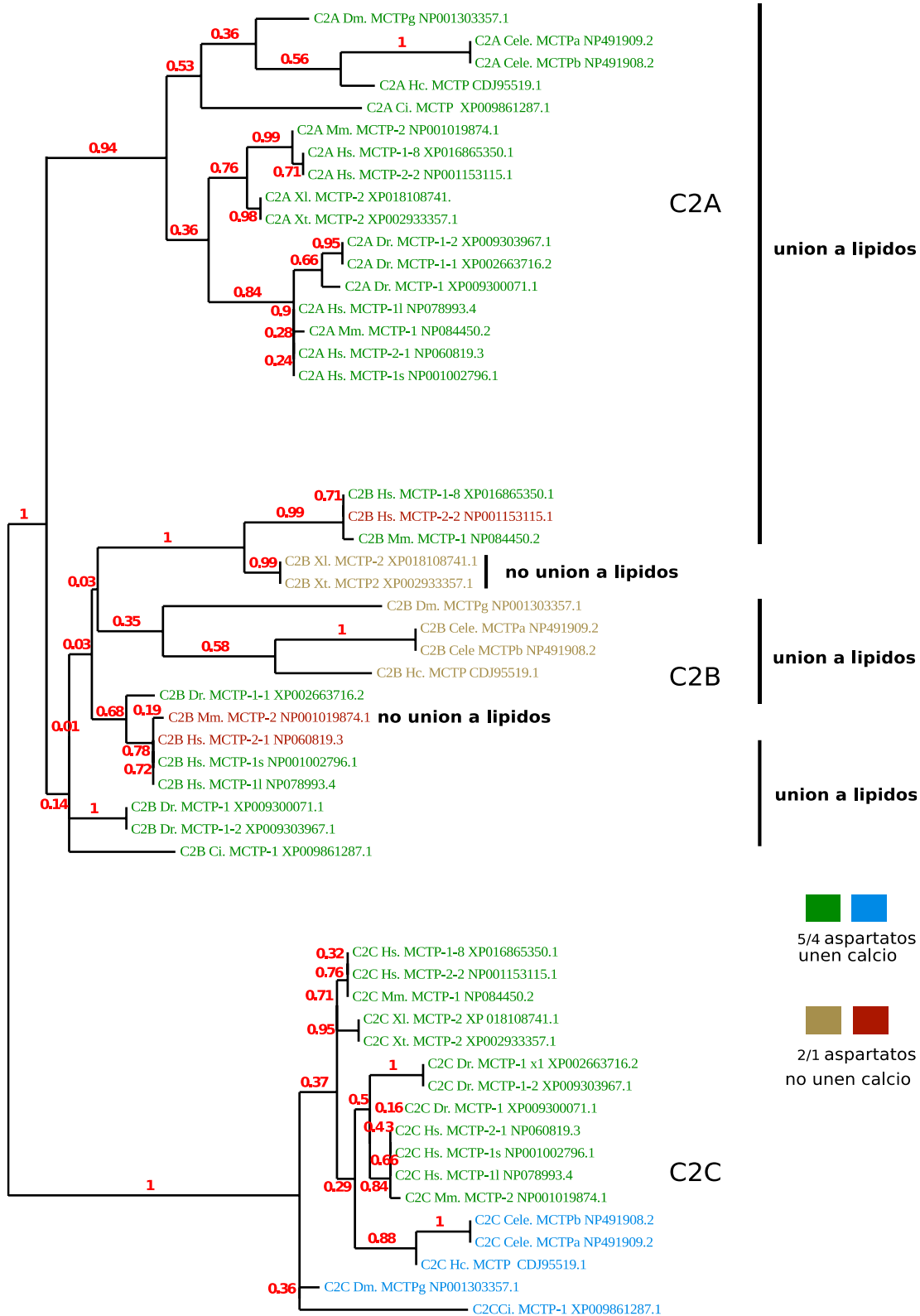


Figura 23 Árbol filogenético de los dominios C2 de las proteínas MCTP.

Se muestra un árbol de máxima verosimilitud para los dominios C2 de las MCTPs. Se utilizaron 100 réplicas para determinar el valor de cada nodo, los valores a lo largo de las ramas se indican en rojo. La barra representa la distancia evolutiva en unidades de cada rama o grupo.

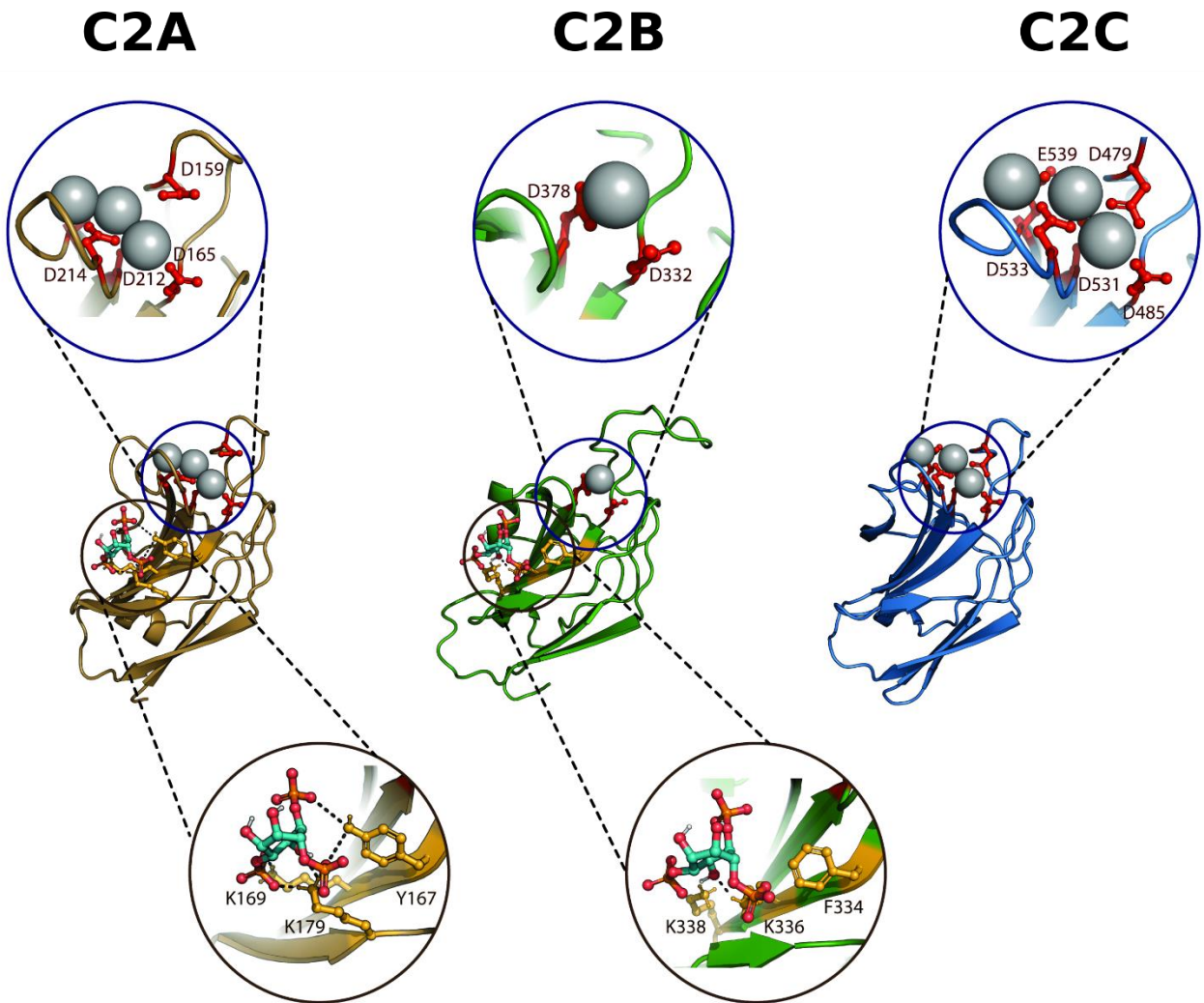


Figura 24 Acoplamiento molecular de los dominios C2 de la MCTP de *C. elegans* con Ca^{2+} y PIP2

Representación tridimensional de C2A (marrón), C2B (verde) y C2C (azul). En los círculos localizados en la parte superior se muestran la ampliación de las regiones que interactúan con los residuos relacionados con los dominios de unión a Ca^{2+} (esferas color gris). En los círculos localizados en la parte inferior se muestran la ampliación de los residuos relacionados con los motivos polibásicos predichos (amarillo) y su interacción con PIP2 (rojo-verde), en líneas punteadas se muestran los puentes de hidrógenos formado por la interacción con los grupos fosfato de PIP2.

En conjunto estos resultados nos permiten confirmar que las MCTPs se conforman de tres dominios C2 y dos segmentos transmembranales y proponemos que estas proteínas emergieron en organismos eucariotas. Derivado del análisis de dominios funcionales nuestros resultados sugiere que estas proteínas tienen la capacidad de unir el ion Ca^{2+} y lípidos específicos de la membrana plasmática (PIP2); aunado a ellos estas características se encuentran conservadas entre especies lo cual nos permite analizar su función en organismos modelo *in vivo* como es el caso del nematodo *C. elegans*.

Resultados Parte II

En estudios anteriores en *D. melanogaster* y *D. rerio*, se ha mostrado un cierto porcentaje de letalidad en los animales mutantes para *mctp*'s, lo cual podría suponer que tienen un papel esencial; sin embargo, estos hallazgos no permiten analizar el fenotipo de los mutantes a detalle ni sus posibles implicaciones en estadio adulto. Las MCTPs presentan alto grado de conservación entre especies, por lo que nos propusimos determinar la función de estas proteínas *in vivo* utilizando como modelo el nematodo *C. elegans*.

Análisis funcional de *mctp-1* en *C. elegans*

Estructura del gen *mctp-1* y su patrón de expresión en *C. elegans*

El gen *mctp-1* contiene 18 exones (Figura. 25A). El análisis de la secuencia predice dos promotores alternativos en *C. elegans* (WORFDB PROMOTEROME, Dupuy et al., 2004). La base de datos WormBase muestra que el gen presenta dos isoformas, sin embargo, se encontraron otras dos isoformas adicionales mediante análisis de las asimetrías derivadas de resultados de transcriptómica y secuencias de tran-splicing (SL1). A continuación, se describen los cuatro ARNm de *mctp-1* (a-d) y la actividad de cada uno de los promotores: 1) El promotor P*mctp-1a* regula la

expresión de la isoforma mctp-1a; la cual incluye 13 exones que codifican para 736 aminoácidos y el exón 5 contiene el primer codón de inicio de la traducción. 2) El promotor Pmctp1-b da lugar a las isoformas mctp-1b, c, d. A) La isoforma b incluye 15 exones que codifican para 822 aminoácidos; los exones 2, 5 y 9 se omiten y el exón 1 contiene el primer codón ATG dentro del marco (Figura. 25A). B) La isoforma c (mctp-1c) tiene 15 exones, los exones 5 y 9 se incluyen y el exón 2 contiene el primer ATG dentro del marco de lectura. C) La isoforma d (mctp-1d) se origina a partir de un codón de inicio de traducción alternativo en el exón 9, que está ausente en las otras tres isoformas; esta isoforma no incluye el dominio C2A, pero conserva C2B y C2C. Mediante RT-PCR se mostró la expresión de los cuatro RNAm en el animal silvestre: mctp-1a, -1b, -1c y -1d (Figura. 25B) y hay al menos tres secuencias de trans-splicing SL1 en el extremo N del gen (Figura. 25A).

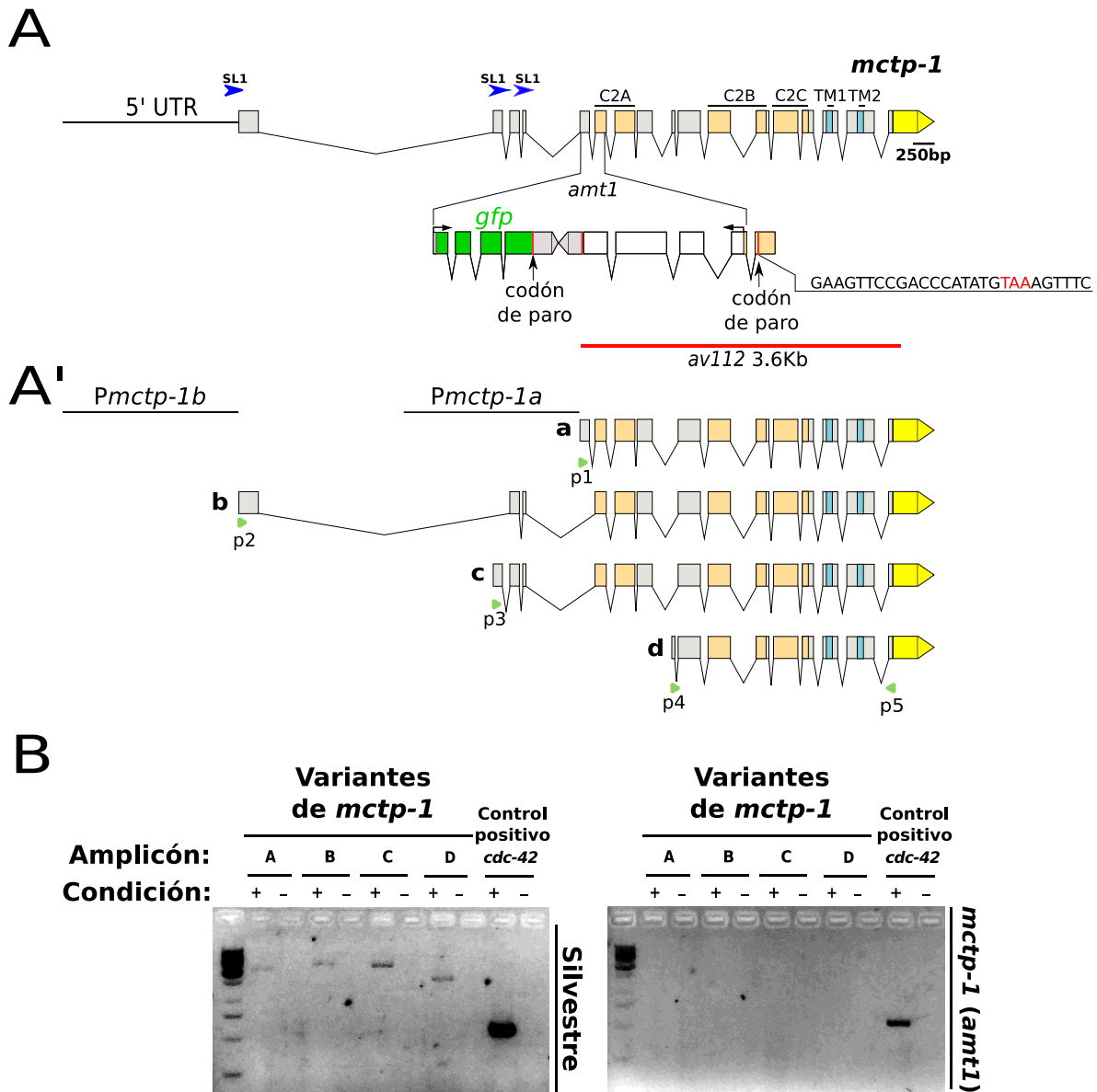


Figura 25 El gen *mctp-1* codifica una proteína con múltiples dominios C2.

(A) Esquema que representa la estructura del gen *mctp-1*. Los exones que codifican para los tres dominios C2 naranja claro, las regiones transmembranales – azul claro, y el 3' UTR está en amarillo. Abajo se muestra el sitio de inserción del casete CRISPR en el alelo *amt1*: La inserción del casete CRISPR elimina 304 pb entre el comienzo del exón 5 y el final del exón 6. Se muestran dos codones de paro, uno en GFP y otro en el exón 7 (flecha negra apuntando a la línea roja vertical). Las cabezas de flechas color azul representan los sitios de esas de las señales de corte y empalme. La línea roja horizontal, alelo de pérdida de función *av112*. (A') (Joshi et al 2018). El gen *mctp-1* presenta cuatro isoformas por eventos de corte y empalme alternativo que son reguladas por dos promotores: *Pmctp-1b* y *Pmctp-1a*. La mayor variabilidad entre las isoformas se encuentra entre los primeros nueve exones. Todas las isoformas, excepto la *mctp-1d*, contienen los tres dominios C2. Los cebadores que se emplean para identificar las variantes de cada variante de *mctp-1* y realizar el análisis de genotipo se muestran en el panel B, en flechas verdes. Dominios C2: naranja claro, regiones transmembranales: azul claro, 3' UTR: amarillo. B) Resultados obtenidos por RT-PCR de las isoformas de *mctp-1* en animales silvestres y de los mutantes *mctp-1(amt1)*. Se muestran los amplicones A-D para cada isoforma. El control experimental se muestra con el signo “+” y el control negativo con “-“. El *cdc-42* es un gen de mantenimiento que se utiliza como control positivo general. En los grupos experimentales de tipo silvestre, las isoformas *mctp-1* A-D están presentes como bandas únicas que tienen un tamaño de 2,17kb, 2,43kb, 2,31kb y 1,59kb, respectivamente. Las cuatro isoformas *mctp-1* están ausentes en los animales mutantes *mctp-1(amt1)*.

Dos promotores regulan la expresión de las cuatro isoformas *mctp-1*: Pmctp-1b dirige la expresión en las neuronas, y Pmctp-1a a la espermateca.

Para determinar el patrón de expresión de *mctp-1*, generamos gusanos transgénicos que expresan GFP bajo los promotores Pmctp-1a o Pmctp-1b (Figura. 26A). La señal de Pmctp-1a::GFP se encontró casi exclusivamente en la espermateca (Figura. 26B), mientras que la Pmctp-1b::GFP se expresó en todo el sistema nervioso (Figura. 26C). Para determinar si este promotor está activo exclusivamente en las neuronas, co-expresamos mCherry bajo el promotor pan-neuronal *rab-3* (Figura. 26C). Los coeficientes de Mander y Pearson indicaron una alta co-localización usando el promotor Pmctp1b (Figura. 26C), caso contrario de la isoforma Pmctp-1a.

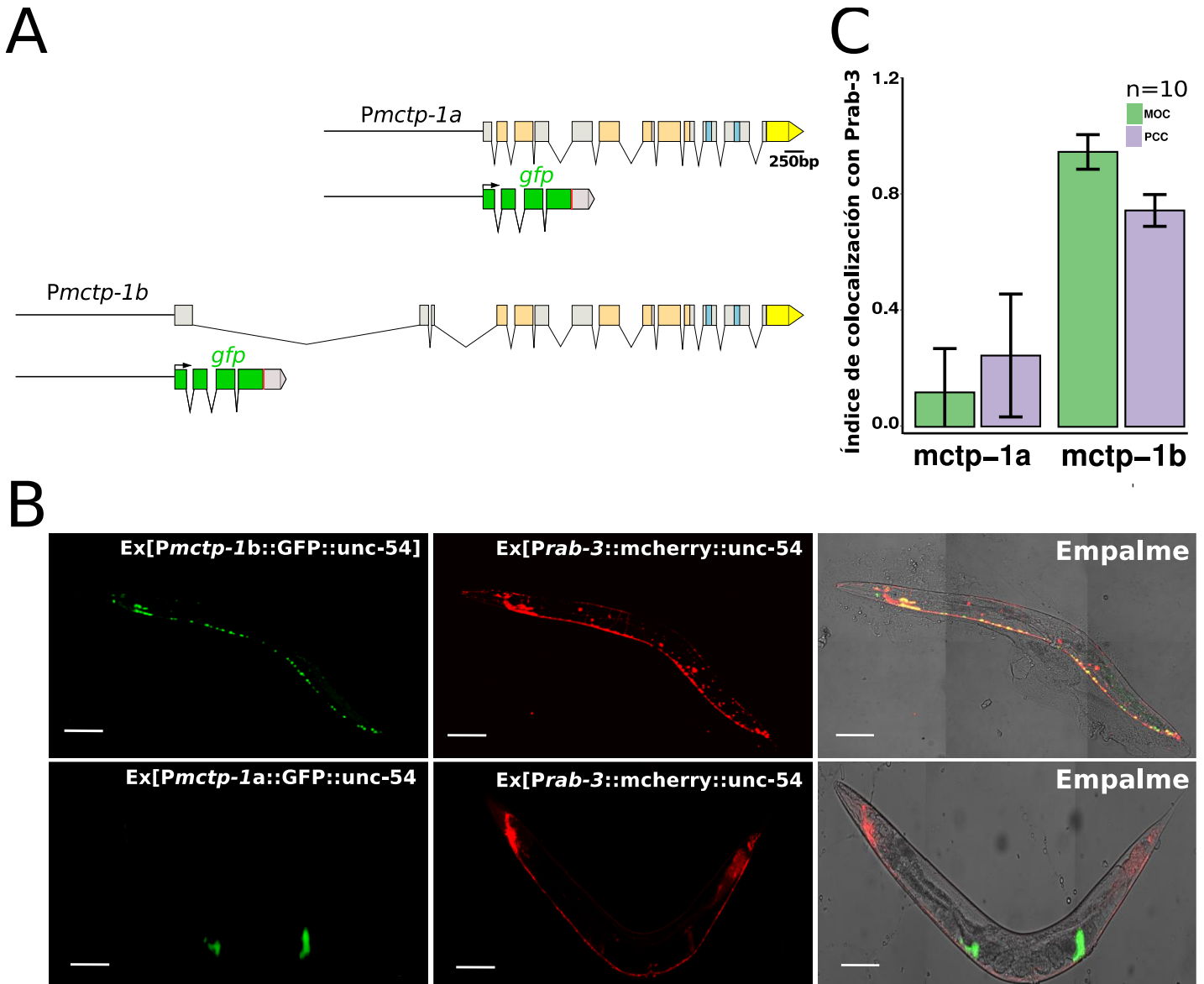


Figura 26 Los promotores de *mctp-1* dirigen la expresión a neuronas y a la espermateca en *C. elegans*.

(A) Esquema representativo de las fusiones de transcripción utilizadas para determinar los patrones de expresión de cada isoforma. El GFP (cuadro verde) se fusionó con una región de 2Kb río arriba de sitio predicho de inicio de la transcripción. B) Expresión del reportero bajo el promotor *Pmctp-1b* en el hermafrodita adulto *C. elegans*. *Pmctp-1b* se expresa en todo el sistema nervioso de *C. elegans* y se co-localiza con el marcador pan-neuronal *Prab-3::mCherry*, panel superior. *Pmctp-1a::GFP* se expresa en la espermateca, panel inferior. Barra de escala, 50 μ m. C) Medidas de co-localización de las fusiones transcripcionales del *mctp-1* con el reportero pan neuronal *Prab-3::mCherry*. Índice de co-localización de Mander (MOC, verde) y del coeficiente de correlación de Pearson (PCC, púrpura) que indican los índices de co-localización de ambos reporteros transcripcionales con el marcador pan-neuronal *Prab-3::mCherry*. Basándose en ambos resultados, los índices de co-localización de *Pmctp-1b::GFP* y *Prab-3::mCherry* es significativamente mayor ($p > 0,005$, MOC= $0,94 \pm 0,06$, PCC= $0,74 \pm 0,05$) que la de *Pmctp-1a::GFP* y *Prab-3::mCherry* (MOC= $0,11 \pm 0,15$, PCC= $0,24 \pm 0,21$).

En conjunto el patrón de expresión sugiere que la función de MCTP-1 podría estar relacionada a la regulación de Ca^{2+} en la espermateca y en neuronas motoras del cordón nervioso ventral y de la cabeza, posiblemente regulando circuitos específicos que modulan comportamientos estereotipados, así como la fertilidad.

Caracterización molecular de los mutantes de *mctp-1*.

Caracterizamos dos alelos mutantes de *mctp-1*: *tm6603* generado por mutagénesis química utilizando TMP/UV por el consorcio de Japón (NBRP) y *amt1* generado en este trabajo. *tm6603* presenta una deleción de 741 pb que elimina los exones 7 a 10. El alelo *amt1* fue generado por CRISPR/Cas9 tiene GFP y *unc-119* integrados dentro de gen *mctp-1* lo que introdujo un codón de paro prematuro (Figuras 25A, 30). Con base en las modificaciones en la secuencia *mctp-1*, el alelo *tm6603* se consideró un mutante en el que se elimina únicamente C2B mientras que C2A y C2C se conservan en fase. En el alelo *amt1*, la inserción de GFP y *unc-119* generó un codón de parada en el exón 7 que afectó la expresión de las cuatro isoformas *mctp-1a-c*.

Se realizaron seis retro cruza de la cepa que porta el alelo *tm6603* con la cepa silvestre, las cruza se corroboraron mediante PCR para confirmar que la remoción del fragmento de 741 pb se mantenía en el locus esperado (Figura 27).

Las mutaciones se confirmaron mediante PCR (Figura 30B -D) y la supresión de la expresión del ARNm de *mctp-1* mediante RT-PCR (Figura 25B). Dado que *mctp-1* (*tm6603*) no mostró un fenotipo evidente, se dejó de lado y se realizó la caracterización del fenotipo utilizando los alelos *mctp-1* (*amt1* y *av112*).

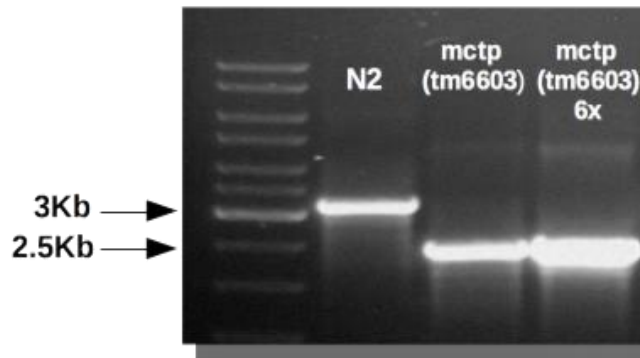


Figura 27 Foto del mutante (tm6603) y de la cepa silvestre.

Se muestra la genotipificación del alelo tm6603, la imagen muestra la diferencia entre los amplicones de la cepa silvestre (N2), el mutante sin retrocruzas (*tm6603*) y la cepa con 6 retro cruza (*tm6603* 6X).

Con respecto a la construcción del alelo *amt1*, primero se obtuvieron los plásmidos necesarios para llevar a cabo la recombinación. Los RNA guías se clonaron en el plásmido pLMS134. Se seleccionaron 4 colonias de producto de la transformación de bacterias, se aisló el plásmido y se trató con las enzimas de restricción BamHI y Scal (Figura 28). Los resultados muestran que los plásmidos seleccionados portan los tres ARN guías ya que presentaron un peso de 3.5 kb y no se deriva ningún fragmento, lo cual sugiere que la secuencia de los ARN guía se clonó de manera adecuada, por lo cual se secuenciaron y se corroboró que efectivamente estaban integrados en el plásmido (ver figura 8 y 9).

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para generar los RNA guías dirigidos a diferentes sitios de gen *mctp-1*

Gen	Chr	Secuencia de los ARN guía	Sitio PAM	Orientación	Distancia en bases de la región homóloga 3'
<i>mctp-1</i>	I	FD 5' TTG atggaagttcgtcttaagaa3' RV 5' AAC tcttaagacgaacttccat3'	TGG	antisentido	26
<i>mctp-1</i>	I	FD 5' TTG atgtgcagaaacggcagaac3' RV 5' AAC gttctgccgtttctgcacat3'	TGG	antisentido	45
<i>mctp-1</i>	I	FD 5' TTG gatgtggttactctttga3' RV 5' AAC tcaaaagagtaaccacatc3'	TGG	antisentido	66

Nota: Para ver el sitio de corte exacto de cada guía ver figura 15.

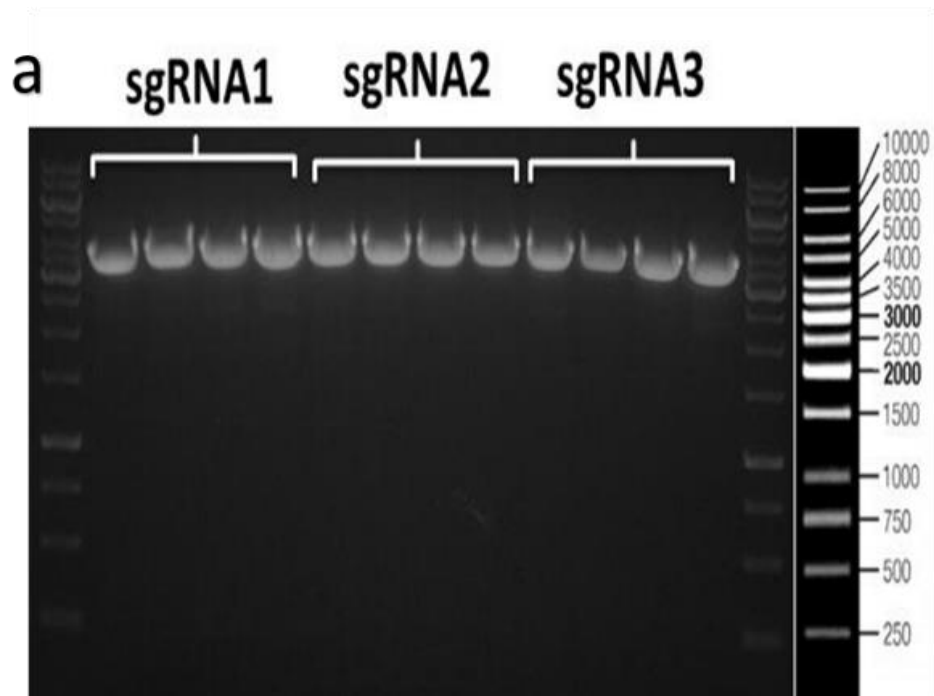


Figura 28 Caracterización de los plásmidos que portan para los ARN guías.

Fotografía del gel de agarosa donde se muestra el ADN de los plásmidos construidos para generar los RNAs guía.

Caracterización de los plásmidos intermediarios que conforman el plásmido de reparación BHI::GFP::Unc-119::BHD.

Una vez hecha las reacciones de recombinación por GIBSON o Gateway, se procedió a extraer el DNA de los plásmidos y caracterizarlos mediante el uso de 3 enzimas de restricción para cada plásmido (Figura 29). Las enzimas que se seleccionaron fueron aquellas que permitieron identificar los fragmentos clonados con precisión para cada plásmido (Figura 29).

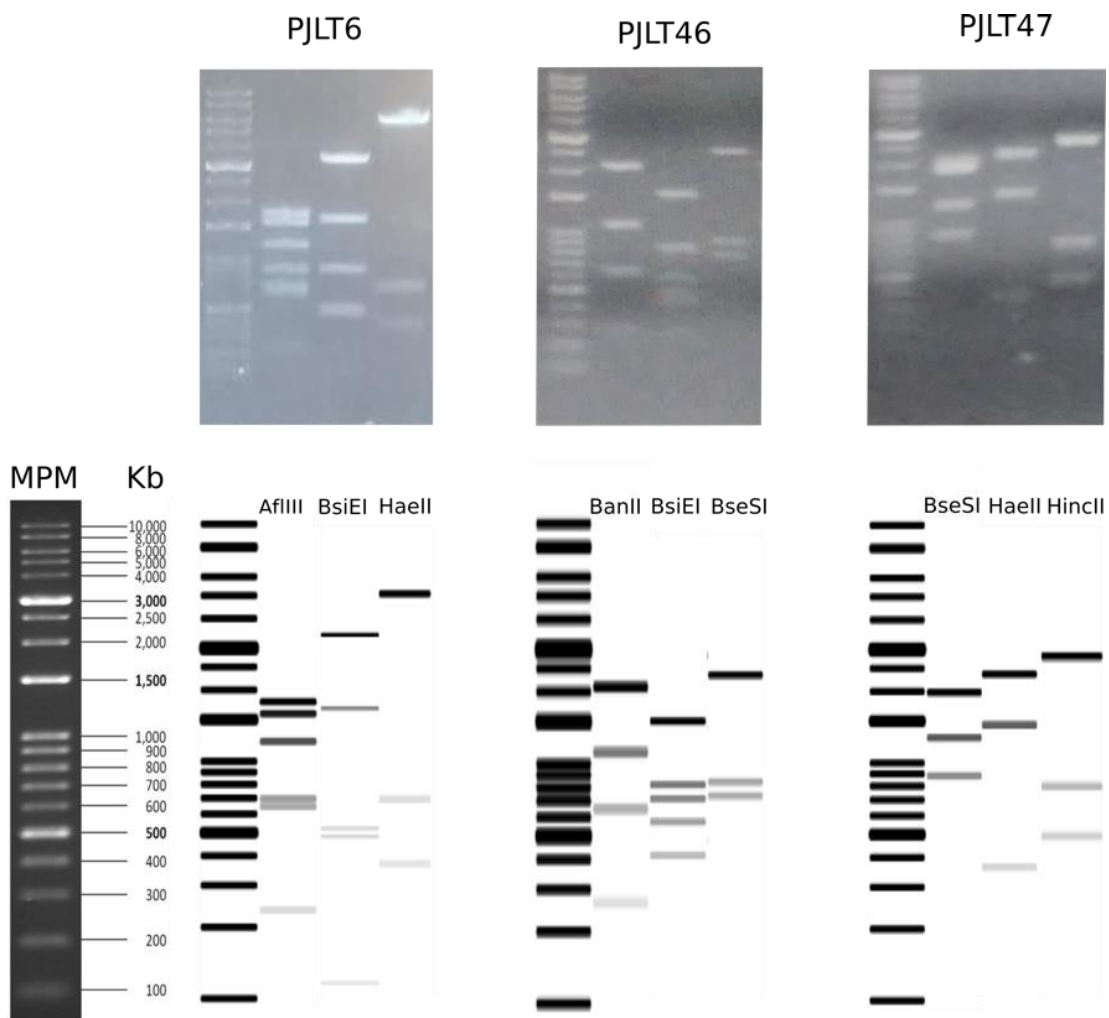


Figura 29 Caracterización de los Vectores intermediarios con enzimas de restricción

En la imagen se muestra la caracterización de los plásmidos intermediarios que se utilizaron para la construcción del plásmido de reparación para generar el alelo *mctp-1* (*amt1*) mediante CRISPR/Cas9. En el panel superior se muestra fotos representativas del patrón de restricción para cada plásmido. En el panel inferior se muestra los patrones predichos in silico de cada plásmido con su correspondiente enzima.

Selección de animales modificados por CRISPR/Cas9

El alelo *mctp-1(amt1)* fue generado mediante CRISPR/Cas9 (Figura 15). Se inyectaron animales del mutante para *unc-119* (ed3)III (EG6207) con el cassette de selección positiva GFP::*let-858utr+unc-119* (+) flanqueado por los brazos homólogos de 1.5 kb de largo a cada lado y los tres ARN guía de manera simultánea (Schwartz y Jorgensen, 2016). La mezcla incluía: Cas9-pDD162 (30 ng/μl), plásmido de Addgene #46168 (*Peft-3::cas9-SV40-NLS::tbb-2 39UTR*) (Dickinson et al., 2013), marcadores de coinyección CFJ90 (2,5 ng/ μl), pPD136.15 (10 ng/μl), pGH8 (4 ng/μl), PJLT63 (35 ng/μl) y 3 sgRNAs (30 ng/μl cada uno). Se colocaron 2 gusanos por caja durante 7 días hasta que presentaron inanición. Posteriormente, se seleccionaron aquellos animales que rescataron la locomoción a través de la copia de tipo silvestre de la *unc-119* y a su vez que la expresión de los arreglos extra cromosómicos de los marcadores de co-inyección ya no estuvieran presentes. Los animales seleccionados se identificaron por PCR y RT-PCR (Figuras 25B y 30).

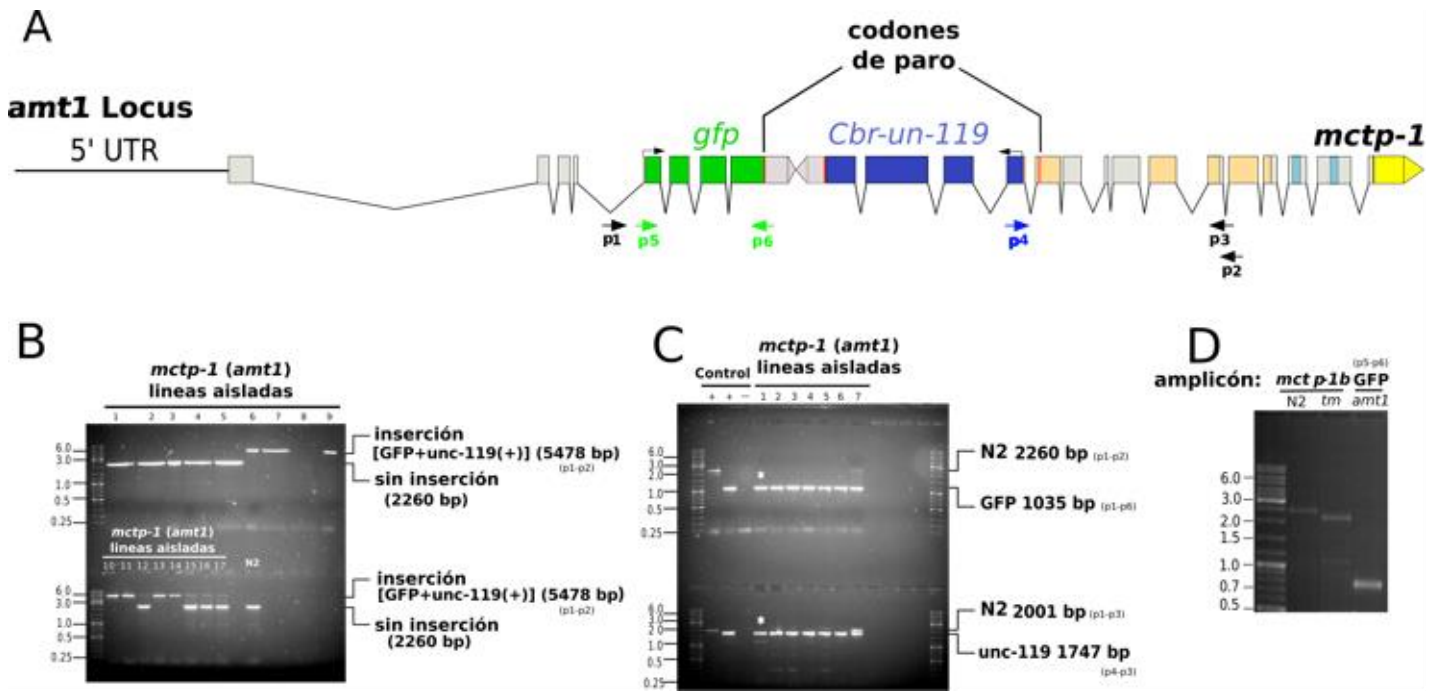


Figura 30 Caracterización molecular de los alelos *mctp-1 (amt1 y tm6603)*.

A) Representación esquemática del locus de *mctp-1*. Las flechas representan la ubicación de los primers utilizados para genotipificar el mutante de *mctp-1*. (B) Confirmación de la inserción del fragmento que porta los genes para GFP::*unc-119* por PCR. La imagen muestra diferentes líneas aisladas donde se detecta la inserción. Se usó el alelo silvestre como control para contrastar animales sin la inserción. (C) Después de volver a cruzar para limpiar el fondo *unc-119*, se genotificaron diferentes líneas con primers internos que coinciden con la inserción de GFP y *unc-119* y cebadores externos que coinciden con el gen *mctp-1*. El mutante *mctp-1 amt1* está marcado con un asterisco. (D) Se confirmó la presencia del RNA mensajero de GFP por RT-PCR en el alelo *amt1*, lo que confirma su transcripción. Por otro lado, se detectó que el RNA mensajero del alelo *tm6603 (tm)* presenta un peso menor al silvestre N2, por lo cual se concluye que el alelo *tm6603* no es un alelo nulo.

Nuestros resultados indican que generamos dos líneas de mutantes: 1.- *mctp-1(amt1)* considerado como alelo nulo y 2.- *mctp-1(tm6603)* que expresa una proteína carente del dominio C2B. Dado que el alelo *amt1* no presenta letalidad, eso nos permite plantear una serie de experimentos para poder elucidar la función de MCTP en el animal *in vivo*.

Caracterización del fenotipo del mutante de *mctp-1*.

MCTP-1 es necesaria para la detección de alimentos y comportamientos de puesta de huevos

Ya que contamos con el mutante nulo y tomando en cuenta que MCTP se expresa en neuronas de la cabeza las cuales con certeza por la anatomía de las dendritas se puede deducir son neuronas ciliadas polimodales quimio-sensitivas y/o mecano-sensoriales (Figura 31A), procedimos a realizar ensayos que nos permiten evaluar la función neuronal de manera indirecta mediante el análisis de fenotipos regulados por estas neuronas.

Para comprobar si la MCTP-1 es necesaria para las funciones sensoriales, realizamos un ensayo de puesta de huevos (Schafer, 2005). En los hermafroditas adultos, la presencia de alimento se detecta a través de los cilios sensoriales (Bae y Barr, 2008; Bargmann, 2006); aunado a ello, la detección de la comida está acoplada al comportamiento de puesta de huevos, de tal manera que en ausencia de comida los animales silvestres reducen significativamente la tasa de puesta de huevos (Trent, 1982). Encontramos que, para la cepa silvestre, la ausencia de alimento redujo el número de huevos puestos por hora, de $9,05 \pm 1,02$ huevos/h en medio con alimento a $5,12 \pm 1,18$ huevos/h en medio sin alimento ($p < 0,05$, $N=6$ $n=10$) (Figura 31B). A continuación, investigamos si los mutantes del *mctp-1* se vieron afectados en este comportamiento. En primer lugar, en presencia de comida, los animales mutantes *mctp-1(amt1)* produjeron un número significativamente menor de huevos por hora que los animales de tipo salvaje (N2 vs. *mctp-*

1(*amt1*): $9,05 \pm 1,02$ huevos/h vs. $1,55 \pm 0,25$ huevos/h). Se encontraron defectos similares en los animales mutantes *mctp-1 (av112)* (N2 vs. *mctp-1(av112)*): $9,05 \pm 1,02$ huevos/h vs $4,82 \pm 0,58$ huevos/h, $p < 0,05$) (Figura. 31B). En segundo lugar, en ausencia de alimento, los animales mutantes *mctp-1 (amt1)* pusieron un número reducido de huevos por hora que los hermafroditas de tipo silvestre (N2 vs. *mctp-1(amt1)*): $5,12 \pm 1,18$ huevos/h vs. $1,25 \pm 0,447$ huevos/h, $p < 0,001$, N=6 ensayos n=10 animales por cada grupo). También se detectó una reducción en la tasa de puesta de huevos en los animales mutantes *mctp-1 (av112)* (N2 vs *mctp-1 (av112)*): $5,12 \pm 1,18$ huevos /h vs $2,45 \pm 0,27$ huevos/h, $p < 0,001$). Por lo tanto, ambos mutantes muestran defectos en la puesta de huevos. Posiblemente dado que *Pmctp-1a::GFP* (y presumiblemente *MCTP-1*) se expresa en la espermateca de los hermafroditas adultos, nos preguntamos si la reducción de las tasas de puesta de huevos se debe a defectos en la fertilización. Para contestar a esta pregunta observamos si había presencia de ovocitos no fecundados; los cuales, son puestos como células esféricas que podrían ser fácilmente detectados. Sin embargo, no notamos ningún embrión no fecundado puesto por los mutantes *amt1* o *av112* hermafroditas mutantes durante nuestro estudio.

Es importante destacar que este efecto causado en ambos mutantes se rescata mediante la expresión del fragmento completo del gen *mctp-1* incluyendo las regiones Inter-génicas río arriba y río abajo del mismo (Figura 31B). Estos resultados sugieren que el defecto en la puesta de huevos en ambos mutantes, *mctp-1(amt1)* y *mctp-1(av112)* es el resultado de la pérdida de *MCTP-1* en las neuronas.

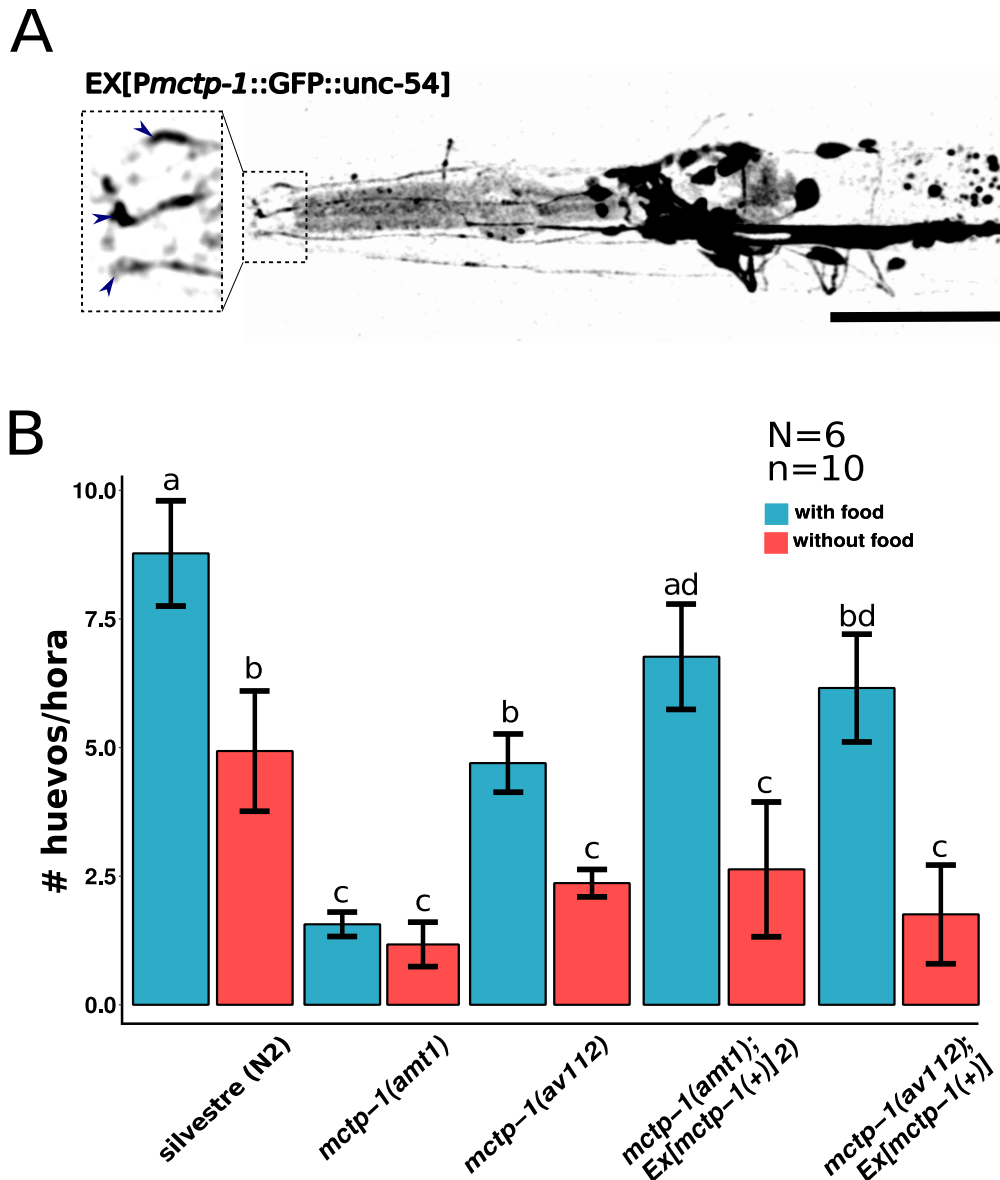


Figura 31 MCTP-1 se expresa en las neuronas ciliadas de la cabeza, necesarias para detectar la comida y regular el comportamiento de puesta de huevos.

(A) Expresión de *Pmctp-1*::GFP en la cabeza de un hermafrodita adulto. En la ampliación se muestra el extremo ciliar de las neuronas de la cabeza; las flechas azules apuntan a las terminaciones de los cilios. Barra de escala, 50 μ m. micrografía tomada en un microscopio confocal con un objetivo 63X. (B) Comparación del comportamiento de puesta de huevos cuando los animales fueron puestos con comida (verde) y sin comida (púrpura). Las letras minúsculas a-c indican grupos estadísticamente distintos por la prueba de Kruskal-Wallis con las correcciones post-hoc de Conover y Bonferroni para las comparaciones por pares. Para cada grupo el número de repeticiones por grupo, N= 6. Cada replica contenía n=10 gusanos. Las barras y bigotes representan como media \pm SD. Los animales silvestres con comida ponen huevos a una tasa de $9,05 \pm 1,02$ huevos por hora en comparación con los animales mutantes *mctp-1(amt1)* como *mctp-1(av112)* que ponen huevos a una tasa significativamente menor (*amt1* $1,55 \pm 0,250$ huevos/hora, *av112* $4,82 \pm 0,580$ huevos/hora). La tasa de puesta de huevos de los animales silvestres sin comida se redujo a $5,12 \pm 1,18$ huevos/hora, esta tasa es similar a la tasa de puesta de huevos en los alimentos de los animales mutantes *mctp-1(av112)* ($4,82 \pm 0,580$ huevos/hora). Las tasas de puesta de huevos dentro y fuera de los alimentos son comparables en los animales mutantes *mctp-1(amt1)* (en los alimentos, $1,55 \pm 0,250$ huevos/hora, fuera de los alimentos $1,25 \pm 0,447$ huevos/hora), lo que es similar a la tasa de puesta de huevos fuera de los alimentos *mctp-1(av112)* ($2,45 \pm 0,279$ huevos/hora, $p=0,17$). En los animales que expresan la copia silvestre del gen, La tasa de puesta de huevos con alimento *mctp-1(amt1); Ex[mctp-1(+)]* es similar a la de los animales de tipo silvestre ($p=0,47$) mientras que la tasa de puesta de huevos en los alimentos de *amt-1* fue ligeramente inferior a la tasa de puesta de huevos en los alimentos de tipo silvestre.

MCTP-1 modula la velocidad de la locomoción del gusano en medio sólido y líquido.

Los resultados obtenidos de los animales transgénicos que generamos para dilucidar el patrón de expresión sugieren que el promotor del gen *mctp-1* se expresa en neuronas motoras del cordón nervioso ventral (Figura 27A). Estos circuitos se conforman principalmente de neuronas GABAérgicas y colinérgicas que son responsables de la modulación y generación de los patrones de locomoción en los diferentes medios en los que se encuentran los gusanos. Dado el resultado del patrón de expresión mostrado en las Figuras 27, 31A se dedujo que MCTP-1 pudiese tener un papel relevante en estas neuronas, y los mutantes del gen reflejarían cambios en los patrones de movimiento (Zhen y Samuel, 2015).

Para probar si el MCTP-1 modula la función del desplazamiento de los gusanos en medio sólido, comparamos las velocidades de arrastre de los hermafroditas silvestres adultos y de los mutantes *mctp-1(amt1)*. Los resultados revelaron que los animales mutantes *mctp-1(amt1)* se desplazan a velocidades significativamente más lentas que los animales salvajes ($p < 0,001$, $N_2=200 \pm 32,1 \mu\text{m/s}$, $mctp-1(amt1)=146 \pm 34,5 \mu\text{m/s}$) (Figura 32B). Cabe mencionar que la expresión del *mctp-1* en el mutante *mctp-1(amt1)* bajo el control de su propio promotor rescató la velocidad de arrastre de los gusanos ($179 \pm 55,6 \mu\text{m/s}$), esto sugiere que la MCTP-1 es necesaria para la regulación de las velocidades de desplazamiento de los animales silvestres.

En medios líquido, los gusanos silvestres nadan con una alta frecuencia de coleteos (Pierce-Shimomura et al., 2008); este comportamiento está relacionado con la capacidad del gusano de percibir el entorno a través de las neuronas sensoriales ciliadas. Se ha reportado a otros mutantes con defectos en estas células ciliadas que redujeron la frecuencia de las curvaturas del cuerpo (Lebois et al., 2012). Para probar si los animales mutantes *mctp-1(amt1)* y *av112* presentan alteraciones en este comportamiento, llevamos a cabo ensayos del nado.

Cuando los animales se colocan en una gota de solución de M9, los gusanos mutantes *mctp-1(amt1)* tienen un promedio de $87,2 \pm 7,65$ coleteos por minuto, y el *mctp-1 (av112)* realiza $75,6 \pm 9,20$ coleteos por minuto, una reducción significativa en comparación con los animales silvestres que muestran un promedio de $112 \pm 7,00$ coleteos por minuto ($p < 0,0001$, $n=20$ animales silvestres y *mctp-1(amt1)* respectivamente) (Figura 32C). Esto sugiere que la MCTP-1 es necesaria para algunos aspectos mecanosensoriales o que su supresión afecta en la liberación de neurotransmisores (Hobson et al., 2011; Loria et al., 2004; Yu et al., 2013).

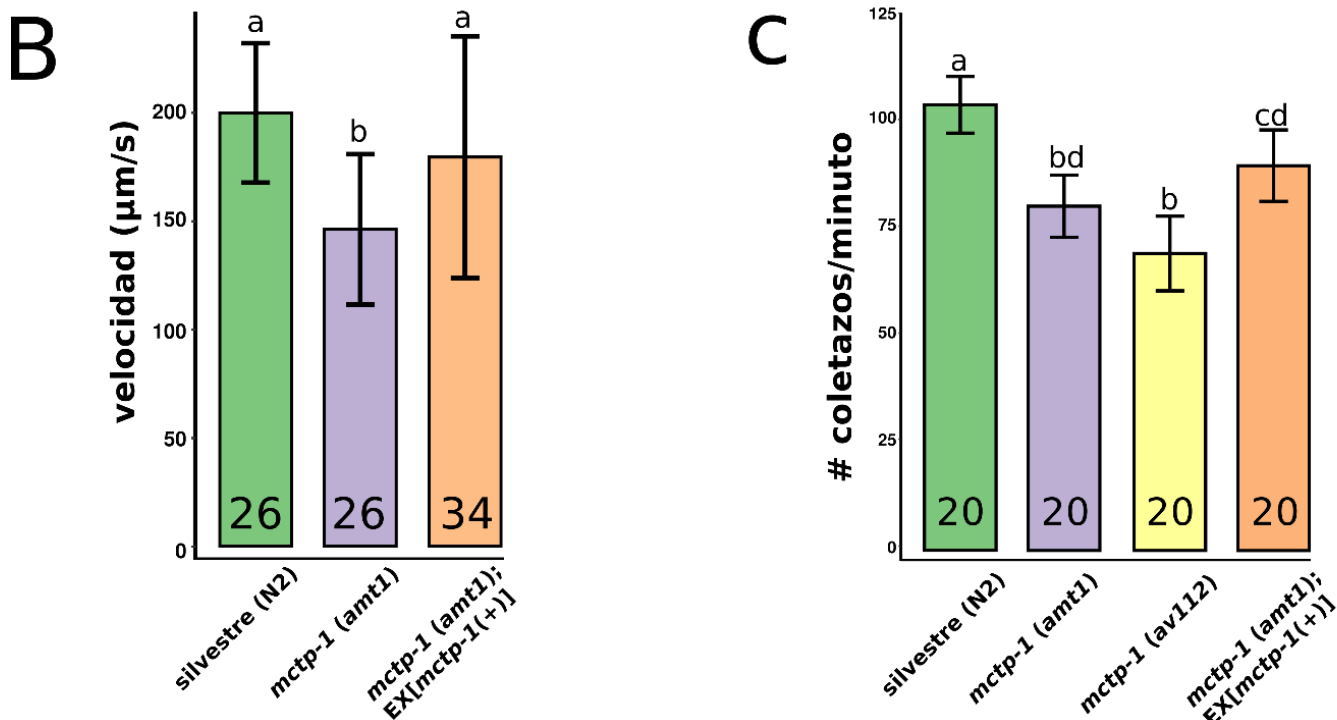
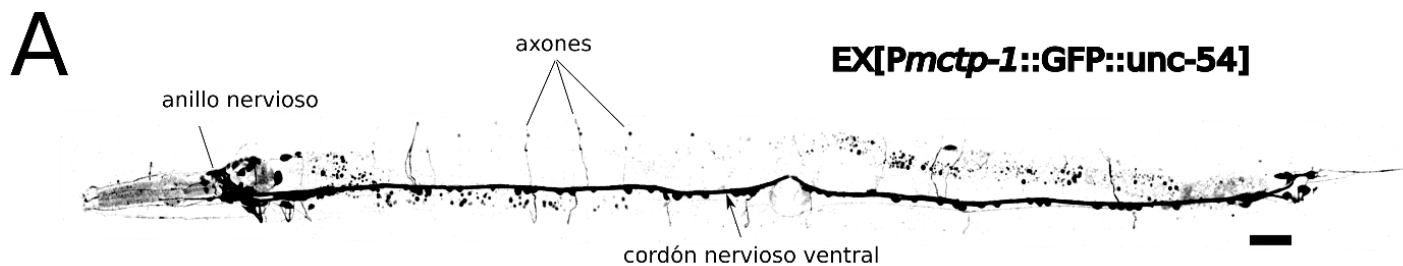


Figura 32 MCTP-1 se expresa en las neuronas motoras y regula la velocidad de movimiento del gusano en medio sólido y líquido.

(A) Expresión de *Pmctp-1b::GFP* en el hermafrodita adulto. Barra de escala, 50 μm. (B) Comparación de las velocidades en medio sólido de los gusanos. Los hermafroditas silvestres se desplazan a una velocidad media de $200 \pm 32,1$ μm/s, similar a la de los animales *mctp (amt1);Ex[mctp-1(+)]* $179 \pm 55,6$ μm/s ($p=0,10$). Los animales mutantes *mctp-1(amt1)* se arrastran a velocidades más lentas $146 \pm 34,5$ μm/s que los animales de tipo silvestre y los *mctp-1(amt1);Ex[mctp-1(+)]* (frente a los de tipo silvestre $p<0,001$, frente a los *mctp1(amt1);Ex[mctp-1(+)]* $p<0,01$). (C) El número de coletazos al nado de los animales hermafroditas silvestres es $112 \pm 7,00$ por minuto. Comparado con los gusanos silvestres, la frecuencia de los coletazos se reduce a $87,2 \pm 7,65$ en los mutantes *mctp-1(amt1)* ($p<0,0001$), y a $75,6 \pm 9,20$ en los mutantes *mctp-1(av112)* ($p<0,0001$). *mctp-1(amt1)*; Los animales *Ex[mctp-1(+)]* generan coletazos con una frecuencia de $97,2 \pm 9,05$, que es superior a la de los animales mutantes *amt1* y *av112* (frente a *amt1* $p<0,05$, frente a *av112* $p<0,0001$) y ligeramente inferior a los silvestres. Las letras minúsculas a-b indican grupos estadísticamente distintos basados en la prueba de Kruskal-Wallis con la corrección post hoc de Dunn y Bonferroni para comparaciones múltiples. Los números dentro de cada barra indican el número de animales cuantificados por grupo, n.

La ausencia de MCTP-1 afecta la tasa de liberación de los neurotransmisores

Se ha demostrado que el Ca^{2+} proveniente del retículo endoplasmático en las neuronas juega un papel fundamental en la transmisión sináptica. Aunado a ello, en un reporte reciente se ha demostrado la localización de MCTP en el retículo endoplasmático de neuronas motoras de *D. melanogaster* y la importancia en la amplitud del impulso nervioso en estas neuronas (Genc, 2017). Por lo tanto, nuestra hipótesis basada en los defectos encontrados en la locomoción en los animales mutantes *mctp-1(amt1)* se deben a defectos en la liberación de neurotransmisores por las neuronas presinápticas. Para probar esta hipótesis, utilizamos el inhibidor de la acetilcolinesterasa “aldicarb” que impide la degradación de la acetilcolina en los gusanos cuando se aplica a una concentración de 1mM (Figura 33A) (Blazie y Jin, 2018; Mahoney et al., 2006).

La exposición aguda de *C. elegans* al aldicarb da lugar a la acumulación de acetilcolina en la hendidura sináptica en las uniones neuromusculares de los gusanos (Figura 33A). Esto da lugar a una hiperestimulación de las células musculares postsinápticas y, en última instancia, a la parálisis (Figura 33B). Así pues, la tasa de liberación de neurotransmisores en la hendidura sináptica es inversamente proporcional a la tasa de parálisis de los gusanos (Mahoney y otros, 2006).

Partiendo de estas premisas, los resultados obtenidos con los mutantes para *mctp-1* muestran que cuando los gusanos se exponen al 1mM de aldicarb, el 50% de los animales silvestres se paralizan en $60 \pm 5,8$ mins; en contraste, los animales mutantes *mctp-1(amt1)* ($p < 0,05$, $119 \pm 4,5$ min) y los mutantes *mctp-1(av112)* ($p < 0,05$, $162 \pm 30,1$ min) se paralizan a un tiempo mayor (Figuras 34A, A'). Cabe mencionar que la microinyección en las gónadas del fragmento de ADN de 13 Kb que incluía el gen *mctp-1* y su promotor rescató la sensibilidad al aldicarb en el alelo *mctp-1(amt1)* ($76,3 \pm 2,10$ min) a niveles de tipo silvestre y revirtió parcialmente este fenotipo en los mutantes *mctp-1(av112)* ($134 \pm 11,8$ min) (Figuras 34A, A'). Estos resultados sugieren fuertemente que el MCTP-1 juega un papel en la liberación de neurotransmisores.

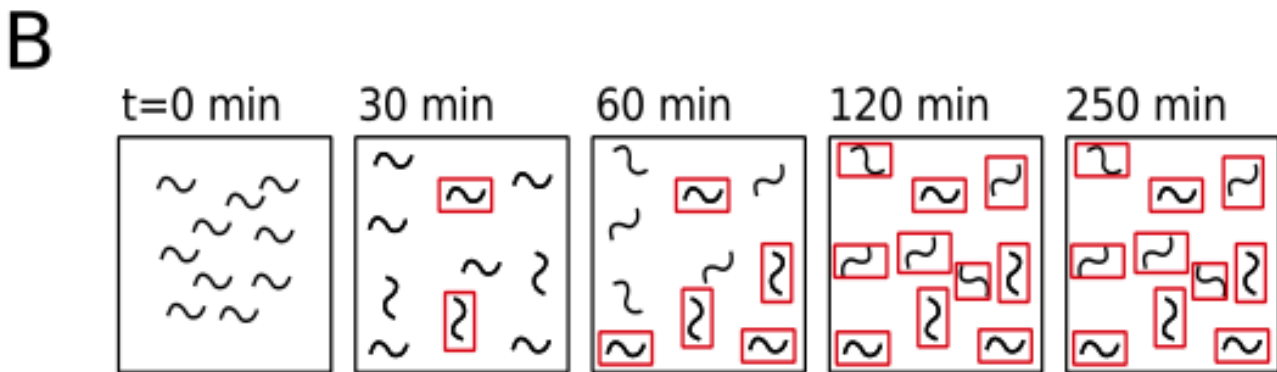
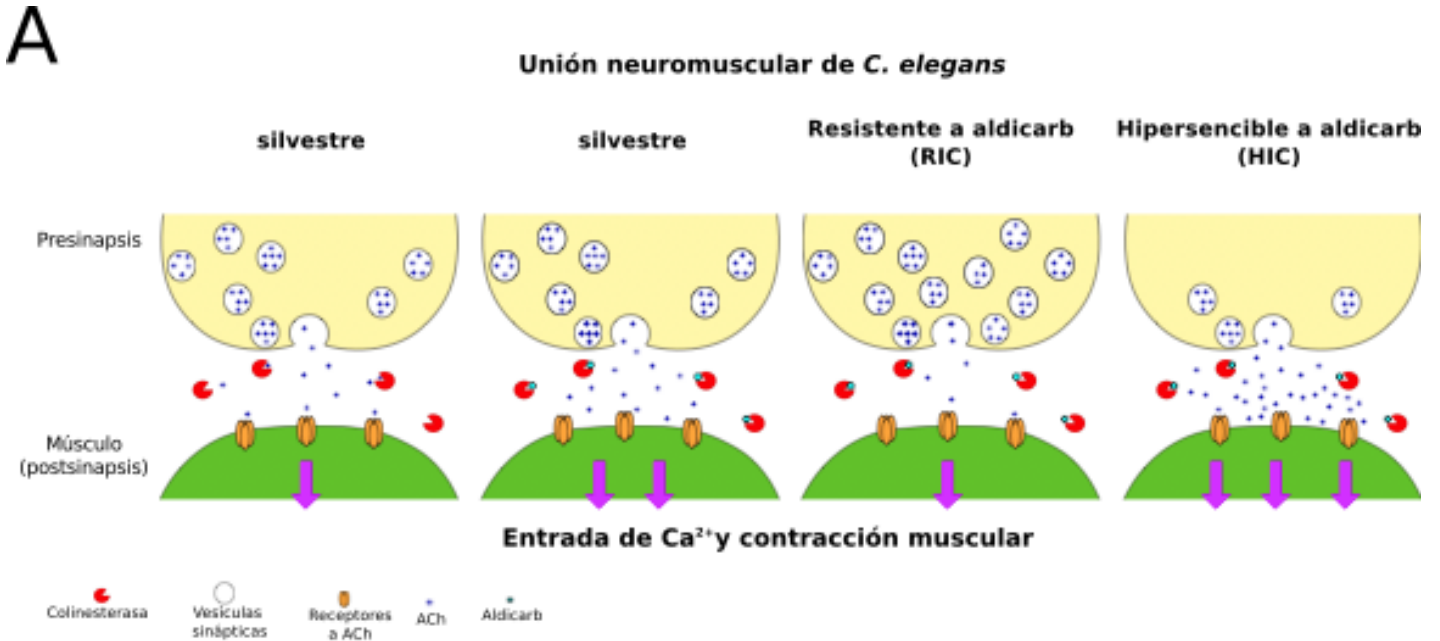


Figura 33 Diagrama que ilustra los mecanismos moleculares que subyacen a la parálisis inducida por el aldicarb en el nematodo *C. elegans*.

A) El aldicarb inhibe la actividad enzimática de la colinesterasa en las sinapsis neuromusculares. Esto induce a una falla en la degradación eficiente de la acetilcolina y promueve la acumulación de acetilcolina en las hendiduras sinápticas. Como resultado, los receptores colinérgicos localizados en el músculo son hiperactivados causando que los músculos se contraigan. Esta contracción hace que los gusanos se paralicen a determinado tiempo. El curso temporal de la parálisis inducida por el aldicarb depende de la eficacia de la transmisión sináptica en términos de la tasa de liberación del neurotransmisor. Por lo tanto, este ensayo es utilizado para evaluar la transmisión sináptica. Los gusanos mutantes de pérdida de función en los componentes responsables de la liberación del neurotransmisor tendrán menos acetilcolina y la acumulación en presencia de aldicarb genera un fenotipo resistente a aldicarb o Ric. Los gusanos Ric tardarán más tiempo que los animales silvestres en paralizarse por el aldicarb. Por el contrario, los gusanos que tienen una mayor liberación de neurotransmisores tendrán más acumulación de acetilcolina en presencia de aldicarb, generando un fenotipo hipersensible a aldicarb o Hic. Estos gusanos Hic se paralizarán más rápidamente que los silvestres. B) Representación esquemática de la estrategia para cuantificar la parálisis de los gusanos sometidos a los fármacos aldicarb y levamisol. Cada cuadro gris representa una imagen capturada en un intervalo de tiempo determinado de la placa de ensayo. Los gusanos paralizados, cuadros rojos, fueron contados usando las imágenes capturadas. El número acumulado de animales paralizados en el curso del tiempo fue trazado para producir los gráficos A y B de la figura 29.

Por otro lado, la resistencia al aldicarb de los animales mutantes de *mctp-1(amt1)* puede ser causada por defectos de la función postsináptica (Lewis et al., 1980). Por ejemplo, los defectos en la detección postsináptica de la acetilcolina también dan lugar a tasas de parálisis más lentas en comparación con las de los animales silvestres (Fleming et al., 1997; Rand, 2007). Para comprobar si los animales mutantes *mctp-1(amt1)* tienen esos defectos postinápticos, los expusimos al levamisol que es un agonista del receptor de acetilcolina (0,4 mM; Blazie y Jin, 2018; Giniatullin et al., 2005; Rand, 2007). Nuestros resultados indican que tanto los animales silvestres como los mutantes *mctp-1(amt1)* se paralizan a tiempos similares ($p=0,39$, N2 $76,7 \pm 13,5$ min, *mctp-1(amt1)* $101 \pm 19,04$ min) (Figuras. 34B, B'). Esto sugiere que la función postsináptica no se ve afectada por la pérdida de *mctp-1*. En conjunto, estos resultados sugieren que la MCTP-1 regula la tasa de liberación de los neurotransmisores de las neuronas presinápticas sin causar defectos importantes en la detección de acetilcolina en la terminal postsináptica.

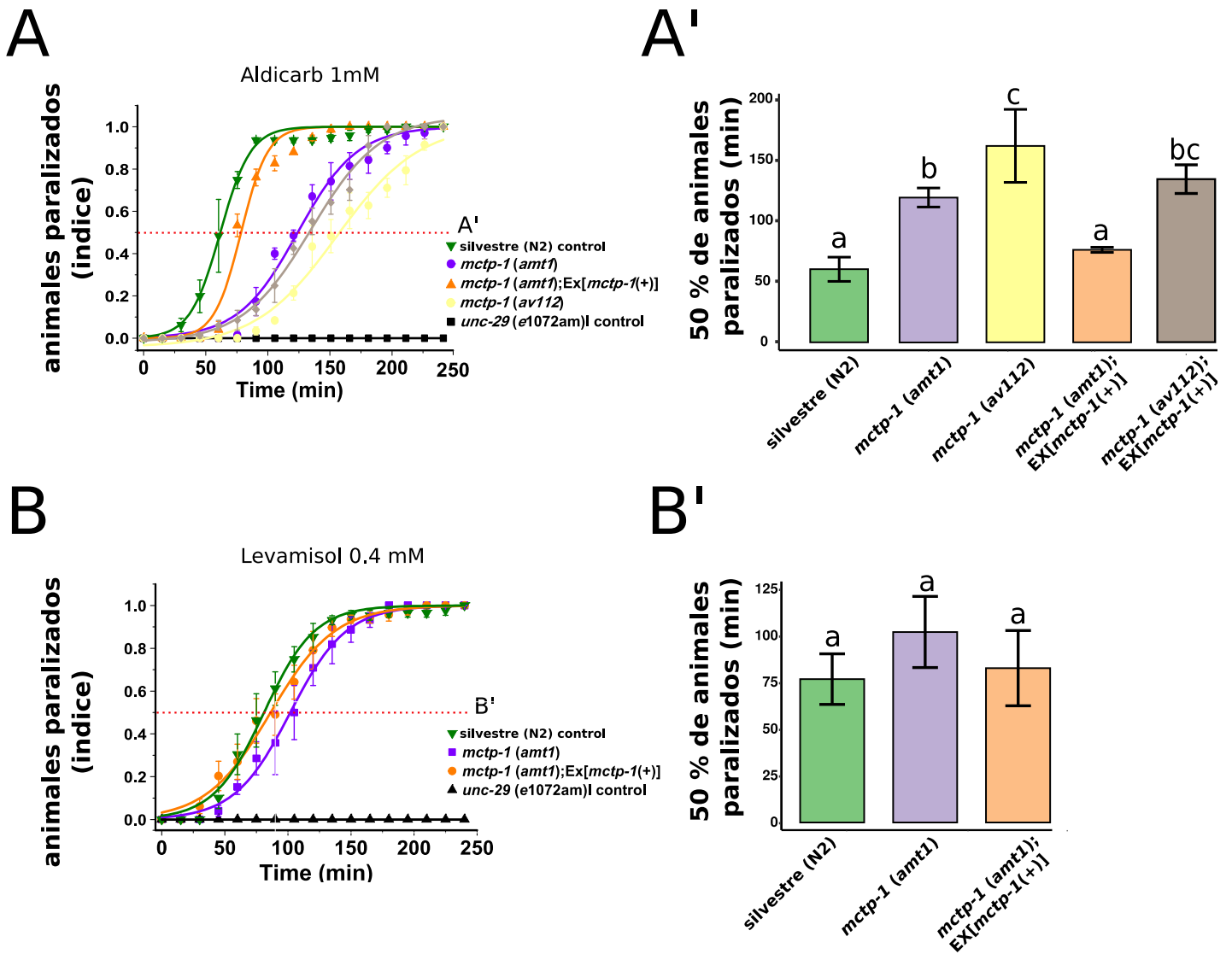


Figura 34 La mutación en *mctp-1* afecta la función presináptica pero no la postsináptica.

A) Comparación del porcentaje de parálisis cuando los gusanos están expuestos al inhibidor de la acetilcolinesterasa aldicarb. Los mutantes de *mctp-1(amt1)* son resistentes al aldicarb, lo que sugiere que los niveles de liberación de neurotransmisores están reducidos. La línea roja horizontal que cruza el eje señala el tiempo al que el 50% de animales se paralizan. La cuantificación de los datos se muestra en A'. (A') Comparación del tiempo que tarda el 50% de los gusanos en paralizarse cuando se exponen al aldicarb. El 50% de los animales silvestres se paralizan dentro de los 60 ± 5.8 mins de exposición al aldicarb. Tanto los mutantes *mctp-1(amt1)* como *mctp-1(av112)* tardan significativamente más tiempo que los animales silvestres (*amt1* 119 ± 4.5 minutos $p < 0.001$, y *av112* 161 ± 17.3 minutos $p < 0.001$). B) Comparación de las tasas de parálisis cuando se exponen al antagonista del receptor de acetilcolina levamisol. Los mutantes *mctp-1(amt1)* son sensibles al levamisol, lo que sugiere que las funciones post-sinápticas no están afectadas. La línea roja horizontal que intersecta el eje y en el 50% marca los datos cuantificados en B'. (B') Comparación de la duración que se toma para que el 50% de los gusanos se paralicen cuando se exponen de forma aguda al levamisol. Cuando se expone al levamisol, el 50% de los animales mutantes *mctp-1(amt1)* se paralizan en 101 ± 19.04 minutos. Esto es similar a lo que ocurre con los animales de tipo salvaje 76.7 ± 13.5 minutos ($p = 0.39$), y con los *mctp-1(amt1);* los animales *ex[mctp-1(+)]* 82.62 ± 20.1 ($p = 0.69$). Para ambos experimentos, las letras minúsculas indican grupos estadísticamente distintos por el ANOVA de una vía con el post hoc de Tukey y Bonferroni utilizado para corregir las múltiples comparaciones. Para cada grupo, el número de réplicas $N = 3$ y el número de gusanos por réplica $n = 25-30$ gusanos. Utilizamos el mutante del gen *unc-29 (e1072am)* como control negativo.

MCTP-1 no regula la formación de gotas de lípidos en el intestino de nematodos adultos en *C. elegans*.

Recientemente se reportó que un mutante del gene *mctp-1* de *C. elegans* (en el alelo *av112* reportado por Joshi et al 2018) tiene un número reducido de gotas de lípidos en el intestino. Debido a que nuestros hallazgos indicaban que *mctp-1* se expresa en el sistema nervioso y que los mutantes del gen exhiben cambios relacionados a alteraciones en la función neuronal, decidimos cotejar si la disminución del número de gotas de lípidos en el intestino es similar en el alelo que generamos por CRISPR/Cas9 (*amt1*). La figura 35A muestra fotografías al microscopio confocal de ejemplares de *av112*, *amt1* y de la cepa silvestre que fueron teñidos con el fluoróforo Bodipy, el cual marca selectivamente gotas de lípidos. En la figura 35B se graficó el número de gotas de lípido promedio de 10 gusanos de cada cepa, en donde el análisis estadístico no sugiere que existan diferencias entre cada una de las cepas. De estos ensayos se concluye que la mutación en *mctp-1* no genera cambios en la cantidad y distribución de gotas de lípidos.

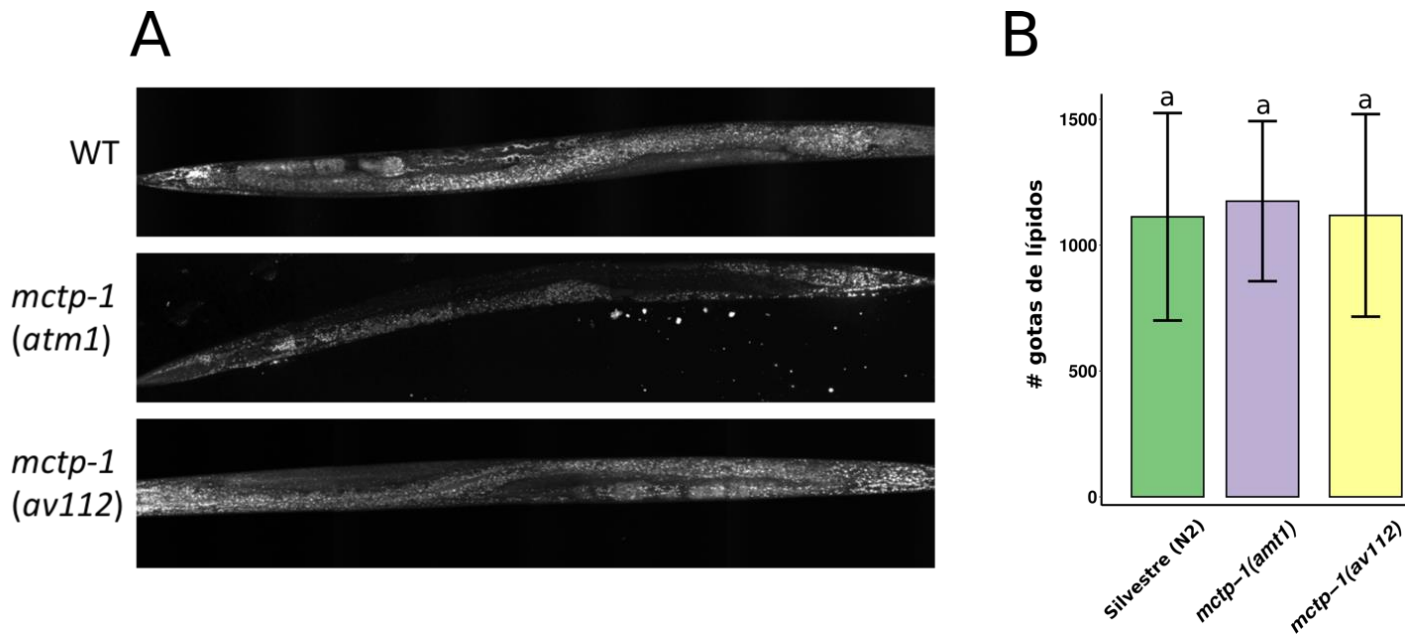


Figura 35 Comparación del número de gotas de lípidos en el intestino de animales adultos jóvenes

A) Imágenes representativas de cada genotipo analizado teñidos con Bodipy. B) Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en el número de gotas de lípidos promedio por grupo (N2 1113 ± 318 , *atm1* 1175 ± 318 , *av112* 1118 ± 402). Las letras minúsculas indican grupos estadísticamente similares por el ANOVA de una vía con el post hoc de Tukey y Bonferroni utilizado para corregir las múltiples comparaciones. Para cada grupo, el número gusanos $n=10$ gusanos.

Discusión

El presente trabajo constó de dos secciones: en la primera sección se realizaron análisis filogenéticos de los genes *mctp*, se generó un modelo estructural *in silico* de la proteína y se realizaron experimentos de acoplamiento molecular de los dominios C2 con moléculas de Ca^{2+} y PIP2, en la segunda sección se realizó un estudio funcional utilizando como modelo experimental al nematodo *C. elegans*.

Los papeles que desempeñan los dominios C2 en la transmisión sináptica están bien descritos en proteínas como las sinaptotagminas y las ferlinas; sin embargo, este no es el caso de las MCTP. En este trabajo, aportamos evidencia de que el gen *mctp-1* de *C. elegans* tiene dos promotores independientes que tienen una expresión diferencial en diferentes tejidos: *Pmctp-1b* en el sistema nervioso y *Pmctp-1a* en la espermateca. Al menos cuatro ARN mensajeros se expresan debido al uso de exones alternativos presentes en el N-terminal. Los mutantes del *mctp-1* mostraron defectos en la puesta de huevos, la velocidad de locomoción, el número de coleteos al nado y tienen resistencia al aldicarb. Estos resultados apoyan la posibilidad de que el MCTP-1 modula la tasa de liberación de neurotransmisores, y que la eliminación del MCTP-1 resulta en modificaciones de comportamiento.

El estudio de las estructuras de los genes *mctp* y las proteínas para las que codifican nos ofrece un recurso muy útil para plantear estudios funcionales y permite comprender con mayor detalle la evolución de esta familia de genes. En nuestro análisis *in silico* de los genes y proteínas MCTP, los criterios que utilizamos para considerarlos fueron: 1) presentar una región N terminal hacia el citosol, 2) tres dominios C2, 3) dos regiones transmembranales (Shin et al., 2005). Dentro de estos criterios no se incluyen a las MCTPs de plantas ya que tienen una variabilidad más amplia en el número de dominios C2 y segmentos transmembrana, aunque al menos tres de ellas, MCTP 11, 12 y 13 de *A. thaliana*, cuentan con los criterios (Liu et al, 2018); sin embargo, estas proteínas

se consideran más similares a las tricalbinas de *S. cerevisiae* y a la familia de las sinaptotagminas extendidas (E-Syt) (Fernandez-Busnadiego et al., 2015; Saheki y De Camilli, 2017). Partiendo de nuestros criterios de inclusión los resultados muestran que hay tres clases de MCTPs que se encuentran ampliamente distribuidas en los metazoarios: 1) MCTPi, 2) MCTP-1 y 3) MCTP-2, que surgieron de un antepasado común. Su distribución filogenética es diferente, MCTP-1 y MCTP-2 están presentes sólo en los vertebrados, mientras que la MCTPi se observó sólo en invertebrados. Resulta interesante que las MCTPs no se encuentren en organismos unicelulares. En contraste, otros sensores de Ca^{2+} , como las sinaptotagminas y las ferlinas, que participan en tráfico vesicular son hallados en estos organismos (Barber et al., 2009; Lek et al., 2012, 2010; Washington y Ward, 2006). Por tanto, las MCTPs posiblemente surgieron como una adaptación en los metazoarios; estudios más dirigidos nos permitirán entender su función ayudarán a entender cómo surgió esta familia de proteínas.

Se analizó la secuencia primaria de cada uno de los dominios C2 de las MCTPs. Para tratar de predecir su posible estructura y función, se estimó su estructura secundaria la cual se encuentra altamente conservada entre las MCTPs en distintas especies. Nuestros resultados fueron similares a los reportados por Shin et al. (2005) que mencionan que diferentes organismos presentan sustituciones en los residuos de aspartato en el dominio C2B, lo que sugiere que este dominio no une Ca^{2+} . Encontramos la sustitución de dos de estos residuos de aspartato en el dominio C2B de otras especies: *C. elegans*, *H. contortus*, *X. laevis*, *X. tropicalis*, *M. musculus* y *H. sapiens*. Si bien las MCTPs podrían unir el ion Ca^{2+} de manera independiente de los fosfolípidos (Shin et al., 2005), nuestros análisis identificaron que los dominios C2A y C2B tienen un motivo polibásico conformado por lisinas y residuos aromáticos. Este motivo ha sido identificado en diversas familias de proteínas con dominios C2, por ejemplo, en el dominio C2B de las sinaptotagmina-1 y 7 (Corbalan-Garcia and Gómez-Fernández, 2014) está vinculado con la interacción con lípidos como

inositol polifosfatos (IP4, IP5 y IP6) (Kojima, 1995) y PtdIns(4,5)P2, los cuales están directamente implicados en exocitosis, fusión de vesículas, tráfico de membranas, dinámica del citoesqueleto y transporte de proteínas de membrana como los canales iónicos (Di Paolo y De Camilli, 2006). También se ha propuesto que este motivo funciona como péptido señal para la localización en membranas en proteínas con dominios C2. En el caso de las MCTPs la presencia de este motivo sugiere que C2A y C2B podrían anclarse a membranas y unirse a lípidos.

Las dos regiones transmembranales de las MCTPs, (TMR1 y TMR2) constan de ~ 20 aminoácidos hacia el extremo C- terminal. El TMR2 está altamente conservado en los diversos organismos analizados, a diferencia del TMR-1 el cual no está presente en la isoforma 2 de la MCTP-2 de humanos. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por Shin et al. (2005), quienes mostraron que TMR1 se remueve por splicing alternativo del exón 17. Sin embargo, estos resultados contrastan por lo reportado por Joshi et al. (2018) quienes señalan que el extremo C terminal de la MCTP-2 que incluye las dos TMRs tiene un dominio homólogo al reticulón (RHD) relacionado con la biogénesis de lípidos e importante para deformar la curvatura del retículo endoplasmático. Consecuentemente, la isoforma de MCTP-1 que no incluye este segundo TMR no tendría la posibilidad de funcionar como modulador de la forma de este organelo.

La función que desempeña los dominios C2 en la transmisión sináptica está bien descrita en proteínas como las sinaptotagminas y las ferlinas; sin embargo, este no es el caso de las MCTP. Con nuestros resultados dejamos evidencia de que el gen que codifica para la proteína MCTP-1 está regulado por dos promotores independientes que dirigen la expresión diferencial en diferentes tejidos: *Pmctp-1b* en el sistema nervioso y *Pmctp-1a* en la espermateca. Derivado de eventos de splicing alternativo, se generan cuatro isoformas por el uso de exones alternativos en la región N-terminal. Los mutantes de *mctp-1* presentan defectos en diferentes comportamientos como son: decremento en el número de huevos puestos, reducción de la velocidad de locomoción,

disminución del número de coletazos al nado y son resistentes al aldicarb. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la MCTP-1 modula la tasa de liberación de neurotransmisores y dando lugar a modificaciones del comportamiento.

La estructura de las MCTP puede dividirse en dos partes conservadas: una N-terminal, que incluye tres dominios C2 en tándem, y una C-terminal con dos dominios transmembrana. Esta disposición de motivos funcionales se asemeja a otras proteínas sensores de calcio como las PKC, las sinaptotagminas y las sinaptotagminas extendidas implicadas en el transporte de membrana, la señalización de lípidos y la unión al calcio (Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2014). Las MCTP se expresan ampliamente en diferentes tejidos, sobre todo en el sistema nervioso y el corazón (Qiu y otros, 2015; Shin et al, 2005). En trabajos anteriores se ha reportado la localización de las MCTPs en vesículas intracelulares, en retículo endoplasmático y endosomas en neuronas de *D. melanogaster*, peces y ratas, lo que sugiere un papel en diversas vías de señalización (Espino-Saldaña et al, 2020; Genç et al, 2017; Qiu et al, 2015).

De manera general, Las características previamente reportadas de las MCTPs se encuentran altamente conservadas en las secuencias de la MCTP-1 de *C. elegans*. Por lo tanto, el estudio de MCTP-1 en este modelo biológico resulta de suma importancia ya que permite evaluar la función de esta proteína desde el nivel molecular hasta el impacto en el animal *in vivo*

Nuestros análisis *in silico* apuntan que en *C. elegans*, las distintas isoformas de MCTP-1 encontradas presentan un extremo N terminal heterogéneo y un alto grado de conservación de los dominios funcionales y regiones transmembranales en la porción C terminal. Esto sugiere que las distintas isoformas de MCTP-1 en *C. elegans* podrían interactuar o son transportadas a diferentes orgánulos a través de la N-terminal, que se encuentra frente al espacio citosólico (Schulz y Creutz, 2004). En el caso de los humanos, la MCTP-2 presenta una isoforma que carece de la primera región transmembrana; sin embargo, este cambio aparentemente dramático no interrumpe la

localización de la proteína (Qiu et al, 2015; Shin et al, 2005). En este estudio, no identificamos isoformas con sólo un segmento transmembrana, pero encontramos que la isoforma d de la MCTP-1 carece del dominio C2A, lo que indica que esta puede tener funciones diferentes a las de las otras isoformas (a-c). Los diferentes patrones de expresión regulados por los promotores Pmctp-1a y la Pmctp-1b indican que MCTP-1 en el nematodo podría desempeñar diferentes papeles en estos tejidos. Los promotores dirigen la expresión de MCTP-1 a las neuronas motoras localizadas en el cordón neuronal ventral y a un subconjunto de neuronas de la cabeza de *C. elegans*, incluyendo los cilios sensoriales, así como también en la espermateca. Los resultados sugieren que la reducción de la puesta de huevos podría ser un efecto combinado entre el componente neuronal por defecto de detección de alimentos y una disfunción de la MCTP-1 en la espermateca.

Estudios previos han reportado que la tasa de puesta de huevos está regulada por la presencia de comida. De hecho, en los animales silvestres se ha observado que, en presencia de abundantes fuentes de alimento, las tasas de puesta de huevos son significativamente más altas que las de los animales sin alimento (Hart, 2006; Schafer, 2005). Se ha descrito que este fenotipo está regulado por neuropéptidos que se expresan en las neuronas sensoriales (Li, 2008; Schafer, 2005). Además, las neuronas sensoriales comandan la función de las motoneuronas HSN y VC que, a su vez, modulan las contracciones de los músculos de la vulva al ovipositar. (Bany et al, 2003; Branicky et al, 2014; Brewer et al, 2019; Collins et al, 2016; Fenk y de Bono, 2015; Schafer, 2005; Zhanget et al, 2008). En *C. elegans*, mutaciones generadas en los dominios C2 de las ferlinas generan defectos en la fusión de la membrana espermateca dependiente de Ca^{2+} , por los que se reduce la fertilidad (Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2014; Washington y Ward, 2006). En nuestro trabajo, no encontramos ovocitos no fecundados que indique disfunción de la línea germinal masculina. Por lo tanto, la reducción de la tasa de puesta de huevos podría deberse

exclusivamente a la disfunción neuronal. Sin embargo, se necesitan más experimentos para demostrar la participación de cada tejido en este fenotipo.

En *C. elegans*, la locomoción está controlada por dos tipos de neuronas situadas en el cordón neuronal ventral: las neuronas GABAérgicas (inhibidoras) y las neuronas colinérgicas (excitadoras) que regulan los estados de excitación/inhibición de los músculos (Lewis et al, 1980; Schuske et al, 2004; Wen et al, 2012; Zhen y Samuel, 2015). Los mutantes *mctp-1* mostraron defectos de velocidad de arrastre y en el número de coletazos al nado. Por lo tanto, es razonable suponer que la supresión de la MCTP-1 afecta a los circuitos neuronales motores, lo que provoca disfunciones en la locomoción (Fleming et al, 1997; Gally et al, 2004; Jospin et al, 2009; Qi et al, 2013; Wen et al, 2012; Yeh et al, 2008). Estas observaciones indican un posible papel de MCTP-1 en la transmisión sináptica. En apoyo a esta hipótesis, los mutantes de *mctp-1* presentan resistencia al aldicarb, lo que indica que la tasa de liberación de neurotransmisores está reducida (Liu et al, 2005; Mahoney et al, 2006; Miller et al, 1996; Richmond, 2006a, 2006b). Cabe mencionar que un estudio en *D. melanogaster* mostró que la MCTP se expresa en neuronas motoras, donde modula la liberación de los neurotransmisores dependientes de Ca^{2+} en la unión neuromuscular (Genç et al., 2017). Por lo tanto, todas estas pruebas apoyan nuestra hipótesis de que la MCTP desempeña un papel en la señalización del Ca^{2+} en la terminal presináptica. Se ha detectado la MCTP1 en el músculo de los mamíferos (Shin et al., 2005), pero no se han aportado pruebas de su importancia funcional en este tejido. La supresión del gen no sugiere alteraciones asociadas con la función muscular en una línea de ratones que presentan una deleción espontánea en donde se localiza el gen *mctp-1* (Tarchiniet et al., 2018), es posible que en mamíferos la pérdida de *mctp-1* pueda ser compensada por la expresión de *mctp-2*. No encontramos evidencia de la expresión del MCTP-1 en el sistema muscular del gusano, por lo que no fue sorprendente no encontrar efecto del levamisol en los mutantes de *mctp-1*, aunque existe la posibilidad de que los niveles de expresión

de *mctp-1* en el sistema muscular de *C. elegans* son bajos y poco críticos para su función como para observar algún efecto.

Estudios anteriores señalan que el *RNAm* de *mctp-1* se expresa en el estadio larvario L2 (Cao et al., 2017) y que en el estadio adulto MCTP-1 se requiere en la biogénesis de las gotas de lípidos en el intestino (Joshi et al., 2018). Sin embargo, en el presente estudio no se observó la expresión de Pmctp-1a::GFP o Pmctp-1b::GFP en el intestino de animales adultos. Es posible que en la etapa L2, se de una expresión transitoria de ARN mensajero de *mctp-1* en el intestino, pero no en la etapa adulta.

En resumen, nuestros hallazgos pueden contribuir al estudio de enfermedades neurológicas asociadas con las vías de señalización del Ca^{2+} y defectos en la exocitosis neurotransmisores. Por otro lado, nuestro estudio aporta evidencia de que las proteínas MCTP están presentes en organismos eucariotes; cuyas características estructurales incluyendo los dominios funcionales se encuentran conservados entre especies incluyendo al nematodo *C. elegans*. En el nematodo, MCTP-1 regula la exocitosis de neurotransmisores y su supresión afecta a las neuronas sensoriales y motoras, que afectan a la locomoción y que conduce a defectos sensoriales. Estos cambios apoyan la idea de que la MCTP-1 desempeña un papel en la función neuronal; sin embargo, la MCTP-1 no está necesariamente limitada a este papel como sugiere su expresión en el músculo de los vertebrados y en la espermateca del gusano.

Conclusiones

Basados en el patrón de agrupamiento obtenidos en nuestro análisis filogenético proponemos que las proteínas MCTP se encuentran exclusivamente en los phyla de metazoarios; aunado a ello podemos decir que existen 3 diferentes tipos de MCTP, MCTPi en invertebrados y MCTP-1 y MCTP-2 en vertebrados.

Por otro lado, derivado de los análisis de las secuencias primarias y análisis *in silico* se propone que los sitios de unión a Ca^{2+} se encuentran conservados en los dominios C2A y C2C, mientras que un sitio de unión a lípidos fue identificado en C2A y C2B. Esto da pie a plantear la hipótesis que las MCTPs pudieran tener implicaciones en vías de señalización de Ca^{2+} localizadas adyacentes a la membrana plasmática en neuronas como podría ser la fusión de membranas. Dados los resultados obtenidos por el patrón de expresión podemos concluir que en *C. elegans*, los dos promotores regulan la expresión de cuatro isoformas de MCTP-1; el promotor Pmctp-1b dirige la expresión en el sistema nervioso, mientras que Pmctp-1a dirige la expresión en la espermateca. Encontramos defectos en la puesta de huevos que están directamente relacionados con la función neuronal en los mutantes de *mctp-1* y no derivan por anomalías derivadas de su falta de expresión en la espermateca. Finalmente, nuestros resultados demuestran que MCTP-1 es necesaria para la locomoción de los nematodos, probablemente asociada a exocitosis vesicular como mostramos en este trabajo en donde MCTP-1 modula la liberación de neurotransmisores en *C. elegans*.

Perspectivas

En el presente trabajo se caracterizó de manera muy puntual a las proteínas MCTP. Primero se proponen criterios muy específicos para su clasificación, distribución filogenética y sobre las regiones conservadas entre especies; aunado a ello se proveen resultados de observaciones *in silico* que apuntan a que los dominios C2 de las MCTPs pueden unirse a la membrana plasmática. Segundo, se resalta la importancia de MCTP-1 en la regulación de diversos circuitos neuronales que regulan comportamientos estereotipados; lo cual sugiere que MCTP-1 es importante en la regulación de la función neuronal. Sin embargo, para poder establecer de una manera más precisa la participación de esta proteína como sensor de Ca^{2+} y cómo regula la exocitosis de neurotransmisores proponemos las siguientes alternativas a explorar.

a) Disecar la localización intracelular de cada una de las isoformas derivadas de MCTP-1.

Para tal objetivo se propone generar animales transgénicos que co-expresan cada una de las isoformas fusionadas a un marcador fluorescente; en conjunto con diversos marcadores de organelos como por ejemplo: TRAM-1, PISY-1, e-COP, AMAN-2, RAB-6.2, SYX-6, RAB-5, RAB-11.1, RAB-7, SYN-13, LAMP-1, SNB-1, SNT-1,

b) Explorar si los residuos de unión a Ca^{2+} de los dominios C2 de MCTP-1 regulan la neurotransmisión.

Para este fin, proponemos realizar mutaciones puntuales de los residuos de aspartato de cada dominio y expresar estas quimeras mutantes en el alelo nulo *amt-1*. Para obtener resultados más claros y descartar posibles artefactos de sobreexpresión se propone hacer los rescates de fenotipo mediante las siguientes opciones: 1.- Generar una inserción de una sola copia del gen mutado mediante transposones (MossCI) y complementar mediante cruza. 2.- Generar nuevos alelos que contengan las mutaciones de manera directa utilizando CRISPR/Cas9. Una vez

obtenido los mutantes, analizar los potenciales miniatura y postsinápticos en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} en la unión neuromuscular mediante electrofisiología o por dinámica de Ca^{2+} en la postsinapsis.

c) Comprobar si los dominios C2 que presentan el motivo polibásico unen a lípidos.

Para ello proponemos co-expresar quimeras de cada dominio C2 silvestres o mutadas de la región polibásica fusionadas a un marcador fluorescente; en conjunto con un sensor específico de PIP2 como por ejemplo el dominio PH de la proteína PLC δ fusionado a un marcador fluorescente. En ambos casos se propone que sean marcadores para microscopía de súper-resolución por ejemplo Halo-tag, Snap-tag y TdEos para determinar si co-localizan y si las quimeras mutadas pierden su afinidad por los lípidos de la membrana plasmática.

Bibliografía

- Bacaj, T., Wu, D., Burré, J., Malenka, R.C., Liu, X., Südhof, T.C., 2015. Synaptotagmin-1 and -7 Are Redundantly Essential for Maintaining the Capacity of the Readily-Releasable Pool of Synaptic Vesicles. *PLoS Biol.* 13, e1002267. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002267>
- Bae, Y.-K., Barr, M.M., 2008. Sensory roles of neuronal cilia: cilia development, morphogenesis, and function in *C. elegans*. *Front. Biosci.* 13, 5959–74. <https://doi.org/10.2741/3129>
- Bany, I.A., Dong, M.-Q., Koelle, M.R., 2003. Genetic and Cellular Basis for Acetylcholine Inhibition of *Caenorhabditis elegans* Egg-Laying Behavior. *J. Neurosci.* 23, 8060–8069. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-22-08060.2003>
- Barber, C.F., Jorquera, R. a, Melom, J.E., Littleton, J.T., 2009. Postsynaptic regulation of synaptic plasticity by synaptotagmin 4 requires both C2 domains. *J. Cell Biol.* 187, 295–310. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903098>
- Bargmann, C., 2006. Chemosensation in *C. elegans*. *WormBook* 1–29. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.123.1>
- Blazie, S.M., Jin, Y., 2018. Pharming for Genes in Neurotransmission: Combining Chemical and Genetic Approaches in *Caenorhabditis elegans*. *ACS Chem. Neurosci.* 9, 1963–1974. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00509>
- Bolker, J. a, 2014. Model species in evo-devo: a philosophical perspective. *Evol. Dev.* 16, 49–56. <https://doi.org/10.1111/ede.12056>
- Branicky, R., Miyazaki, H., Strange, K., Schafer, W.R., 2014. The Voltage-Gated Anion Channels Encoded by *clh-3* Regulate Egg Laying in *C. elegans* by Modulating Motor Neuron Excitability. *J. Neurosci.* 34, 764–775. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3112-13.2014>
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.

- Brewer, J.C., Olson, A.C., Collins, K.M., Koelle, M.R., 2019. Serotonin and neuropeptides are both released by the HSN command neuron to initiate *Caenorhabditis elegans* egg laying. *PLoS Genet.* 15, e1007896. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007896>
- Brockie, P.J., Maricq, A. V, 2006. Ionotropic glutamate receptors: genetics, behavior and electrophysiology. *WormBook* 1–16. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.61.1>
- Burgoyne RD, Lee P. Haynes. Sense and specificity in neuronal calcium signalling. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Sep; 1853(9): 1921–1932. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.10.029
- Burgoyne RD, Helassa N, McCue HV, Haynes LP. Calcium Sensors in Neuronal Function and Dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019 May 1;11(5):a035154. doi: 10.1101/cshperspect.a035154
- Calahorra, F., Izquierdo, P.G., 2018. The presynaptic machinery at the synapse of *C. elegans*. *Invertebr. Neurosci.* 18, 4. <https://doi.org/10.1007/s10158-018-0207-5>
- Cao, J., Packer, J.S., Ramani, V., Cusanovich, D.A., Huynh, C., Daza, R., Qiu, X., Lee, C., Furlan, S.N., Steemers, F.J., Adey, A., Waterston, R.H., Trapnell, C., Shendure, J., 2017. Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science* (80-.). 357, 661–667. <https://doi.org/10.1126/science.aam8940>
- Chase, D.L., Koelle, M.R., 2007. Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*. *WormBook* 1–15. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.132.1>
- Chen, B., Liu, P., Hujber, E.J., Li, Y., Jorgensen, E.M., Wang, Z.-W., 2017. AIP limits neurotransmitter release by inhibiting calcium bursts from the ryanodine receptor. *Nat. Commun.* 8, 1380. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01704-z>
- Cho, W., Stahelin, R. V, 2006. Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 838–49.
- Collins, K.M., Bode, A., Fernandez, R.W., Tanis, J.E., Brewer, J.C., Creamer, M.S., Koelle, M.R., 2016. Activity of the *C. elegans* egg-laying behavior circuit is controlled by competing activation and feedback inhibition. *Elife* 5, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.21126>

- Corbalan-Garcia, S., Gómez-Fernández, J.C., 2014. Signaling through C2 domains: More than one lipid target. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838, 1536–1547. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.008>
- 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 - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761, 633–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.04.015>
- de Juan-Sanz, J., Holt, G.T., Schreiter, E.R., de Juan, F., Kim, D.S., Ryan, T.A., 2017. Axonal Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Content Controls Release Probability in CNS Nerve Terminals. *Neuron* 93, 867–881.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.010>
- Corsi, A.K., Wightman, B., Chalfie, M., 2015. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 200, 387–407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- Culetto, E., Sattelle, D.B., 2000. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum. Mol. Genet.* 9, 869–877. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.6.869>
- Cull-Candy, S.G., Miledi, R., Trautmann, A., Uchitel, O.D., 1980. On the release of transmitter at normal, myasthenia gravis and myasthenic syndrome affected human end-plates. *J. Physiol.* 299, 621–638. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013145>
- De Bono, M., Maricq, A.V., 2005. Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 451–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144259>
- Desper, R., Gascuel, O., 2004. Theoretical Foundation of the Balanced Minimum Evolution Method of Phylogenetic Inference and Its Relationship to Weighted Least-Squares Tree Fitting. *Mol. Biol. Evol.* 21, 587–598. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh049>
- Di Paolo, G., De Camilli, P., 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651–657. <https://doi.org/10.1038/nature05185>

- Dickinson, D.J., Ward, J.D., Reiner, D.J., Goldstein, B., 2013. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat. Methods* 10, 1028–1034. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2641>
- Djurovic, S., Le Hellard, S., Kähler, A.K., Jönsson, E.G., Agartz, I., Steen, V.M., Hall, H., Wang, A.G., Rasmussen, H.B., Melle, I., Werge, T., Andreassen, O.A., 2009. Association of MCTP2 gene variants with schizophrenia in three independent samples of Scandinavian origin (SCOPE). *Psychiatry Res.* 168, 256–258. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2008.08.007>
- Dupuy, D., Li, Q., Deplancke, B., Boxem, M., Hao, T., Lamesch, P., Sequerra, R., Bosak, S., Doucette-stamm, L., Hope, I. a, Hill, D.E., Walhout, A.J.M., Vidal, M., 2004. A First Version of the *Caenorhabditis elegans* Promoterome. *Genome Res.* 14, 2169–2175. <https://doi.org/10.1101/gr.2497604>
- Espino-Saldaña, A.E., Durán-Ríos, K., Olivares-Hernandez, E., Rodríguez-Ortiz, R., Arellano-Carbajal, F., Martínez-Torres, A., 2020. Temporal and spatial expression of zebrafish *mctp* genes and evaluation of frameshift alleles of *mctp2b*. *Gene* 738, 144371. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144371>
- Fenk, L.A., de Bono, M., 2015. Environmental CO₂ inhibits *Caenorhabditis elegans* egg-laying by modulating olfactory neurons and evokes widespread changes in neural activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E3525–E3534. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423808112>
- Fernandez-Busnadiego, R., Saheki, Y., De Camilli, P., 2015. Three-dimensional architecture of extended synaptotagmin-mediated endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503191112>
- Fleming, J.T., Squire, M.D., Barnes, T.M., Tornoe, C., Matsuda, K., Ahnn, J., Fire, A., Sulston, J.E., Barnard, E. a, Sattelle, D.B., Lewis, J. a, 1997. *Caenorhabditis elegans* Levamisole Resistance Genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* Encode Functional Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits. *J. Neurosci.* 17, 5843–5857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05843.1997>
- Frøkjær-Jensen, C., Wayne Davis, M., Hopkins, C.E., Newman, B.J., Thummel, J.M., Olesen, S.-P., Grunnet, M., Jorgensen, E.M., 2008. Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* 40, 1375–1383. <https://doi.org/10.1038/ng.248>

- Gally, C., Eimer, S., Richmond, J.E., Bessereau, J., 2004. A transmembrane protein required for acetylcholine receptor clustering in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 431, 578–582.
<https://doi.org/10.1038/nature02893>
- Genç, Ö., Dickman, D.K., Ma, W., Tong, A., Fetter, R.D., Davis, G.W., 2017. MCTP is an ER-resident calcium sensor that stabilizes synaptic transmission and homeostatic plasticity. *Elife* 6, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.22904>
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R.E., Li, C., Rosahl, T.W., Stevens, C.F., Südhof, T.C., 1994. Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79, 717–27.
- Gjorgjieva, J., Biron, D., Haspel, G., 2014. Neurobiology of *caenorhabditis elegans* locomotion: Where do we stand? *Bioscience* 64, 476–486. <https://doi.org/10.1093/biosci/biu058>
- Giniatullin, R., Nistri, A., Yakel, J., 2005. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci.* 28, 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.04.009>
- Grishin, N. V., 1995. Estimation of the number of amino acid substitutions per site when the substitution rate varies among sites. *J. Mol. Evol.* 41, 675–679.
<https://doi.org/10.1007/BF00175826>
- Guerrero-Valero, M., Ferrer-Orta, C., Querol-Audi, J., Marin-Vicente, C., Fita, I., Gomez-Fernandez, J.C., Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., 2009. Structural and mechanistic insights into the association of PKC -C2 domain to PtdIns(4,5)P2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 6603–6607.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0813099106>
- Gustavsson, N., Han, W., 2009. Calcium-sensing beyond neurotransmitters: functions of synaptotagmins in neuroendocrine and endocrine secretion. *Biosci. Rep.* 29, 245–59.
<https://doi.org/10.1042/BSR20090031>
- Hart, A., 2006. Behavior. *WormBook* 1–67. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.87.1>
- Hodgkin, J., Horvitz, H.R., Brenner, S., 1979. Nondisjunction Mutants of the Nematode *CAENORHABDITIS ELEGANS*. *Genetics* 91, 67–94.

- 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*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2285–2295. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.6.2285-2295.2000>
- Horii, T., Arai, Y., Yamazaki, M., Morita, S., Kimura, M., Itoh, M., Abe, Y., Hatada, I., 2014. Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Sci. Rep.* 4, 4513. <https://doi.org/10.1038/srep04513>
- Jones, D.T., 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 292, 195–202. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3091>
- Joshi, A.S., Nebenfuhr, B., Choudhary, V., Satpute-Krishnan, P., Levine, T.P., Golden, A., Prinz, W.A., 2018. Lipid droplet and peroxisome biogenesis occur at the same ER subdomains. *Nat. Commun.* 9, 2940. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05277-3>
- Jospin, M., Qi, Y.B., Stawicki, T.M., Boulin, T., Schuske, K.R., Horvitz, H.R., Bessereau, J.-L., Jorgensen, E.M., Jin, Y., 2009. A Neuronal Acetylcholine Receptor Regulates the Balance of Muscle Excitation and Inhibition in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* 7, e1000265. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000265>
- Jorgensen, E.M., 2005. Gaba. *WormBook* 1, 1–13.
- Kaletta, T., Hengartner, M.O., 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 387–98. <https://doi.org/10.1038/nrd2031>
- Katz, B.Y.B., Miledi, R., 1968. The Role of Calcium in Neuromuscular Facilitation. *J. Physiol.* 195, 481–492.
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., Xu, J., 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat. Protoc.* 7, 1511–1522. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.085>
- Kojima, T., 1995. Functional Diversity of C2 Domains of Synaptotagmin Family. *J. Biol. Chem.* 270, 26523–26527. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.44.26523>

- 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, 156–166. <https://doi.org/10.1002/gene.10018>
- Lalani, S.R., Ware, S.M., Wang, X., Zapata, G., Tian, Q., Franco, L.M., Jiang, Z., Bucasas, K., Scott, D.A., Campeau, P.M., Hanchard, N., Umaña, L., Cast, A., Patel, A., Cheung, S.W., McBride, K.L., Bray, M., Craig Chinault, A., Boggs, B.A., Huang, M., Baker, M.R., Hamilton, S., Towbin, J., Jefferies, J.L., Fernbach, S.D., Potocki, L., Belmont, J.W., 2013. MCTP2 is a dosage-sensitive gene required for cardiac outflow tract development. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4339–4348. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt283>
- Lebois, F., Sauvage, P., Py, C., Cardoso, O., Ladoux, B., Hersen, P., Di Meglio, J.-M., 2012. Locomotion Control of *Caenorhabditis elegans* through Confinement. *Biophys. J.* 102, 2791–2798. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.051>
- Lek, A., Evesson, F.J., Sutton, R.B., North, K.N., Cooper, S.T., 2012. Ferlins: Regulators of Vesicle Fusion for Auditory Neurotransmission, Receptor Trafficking and Membrane Repair. *Traffic* 13, 185–194. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01267.x>
- Lek, A., Lek, M., North, K.N., Cooper, S.T., 2010. Phylogenetic analysis of ferlin genes reveals ancient eukaryotic origins. *BMC Evol. Biol.* 10, 231. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-231>
- Lewis, J.A., Wu, C.H., Berg, H., Levine, J.H., 1980. The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 95, 905–28. <https://doi.org/10.1093/genetics/95.4.905>
- Li, C., 2008. Neuropeptides. *WormBook* 1–36. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.142.1>
- Liu, L., Li, C., Liang, Z., Yu, H., 2017. Characterization of Multiple C2 Domain and Transmembrane Region Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* pp.01144.2017. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01144>
- Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M., Sugimoto, A., 2001. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr. Biol.* 11, 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00052-5)

- Mahoney, T.R., Luo, S., Nonet, M.L., 2006. Analysis of synaptic transmission in *Caenorhabditis elegans* using an aldicarb-sensitivity assay. *Nat. Protoc.* 1, 1772–1777.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.281>
- Manford, A.G., Stefan, C.J., Yuan, H.L., MacGurn, J.A., Emr, S.D., 2012. ER-to-Plasma Membrane Tethering Proteins Regulate Cell Signaling and ER Morphology. *Dev. Cell* 23, 1129–1140.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.11.004>
- Mathews, E.A., Mullen, G.P., Crowell, J.A., Duerr, J.S., McManus, J.R., Duke, A., Gaskin, J., Rand, J.B., 2007. Differential expression and function of synaptotagmin 1 isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.01.009>
- McCue H. V., Haynes L. P., Burgoyne R. D. (2010b). The diversity of calcium sensor proteins in the regulation of neuronal function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a004085
10.1101/cshperspect.a004085
- McIntire, S.L., 2010. Ethanol. *WormBook* 1–6. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.40.1>
- M. Ikura, J.B. Ames, Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 1159–1164
- Miller, K.G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J.A., Johnson, C.D., Rand, J.B., 1996. A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 12593–12598. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12593>
- Min, S.-W., Chang, W.-P., Sudhof, T.C., 2007. E-Syts, a family of membranous Ca²⁺-sensor proteins with multiple C2 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3823–3828.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0611725104>
- Nalefski, E.A., Falke, J.J., 1996. The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Sci.* 5, 2375–2390. <https://doi.org/10.1002/pro.5560051201>
- Nguyen, M., Alfonso, A., Johnson, C.D., Rand, J.B., 1995. *Caenorhabditis elegans* mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase. *Genetics* 140, 527–35.

- Nonet, M.L., Holgado, A.M., Brewer, F., Serpe, C.J., Norbeck, B.A., Holleran, J., Wei, L., Hartweg, E., Jorgensen, E.M., Alfonso, A., 1999. UNC-11, a *Caenorhabditis elegans* AP180 Homologue, Regulates the Size and Protein Composition of Synaptic Vesicles. *Mol. Biol. Cell* 10, 2343–2360. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.7.2343>
- Nonet, M.L., Saifee, O., Zhao, H., Rand, J.B., Wei, L., 1998. Synaptic Transmission Deficits in *Caenorhabditis elegans* Synaptobrevin Mutants. *J. Neurosci.* 18, 70–80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-01-00070.1998>
- Papadopoulos, J.S., R., A., 2007. Sequence analysis COBALT : constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* 23, 1073–1079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm076>
- Parker, P., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M., Ullrich, A., 1986. The complete primary structure of protein kinase C--the major phorbol ester receptor. *Science* (80-.). 233, 853–859. <https://doi.org/10.1126/science.3755547>
- Petersen, L.K., Stowers, R.S., 2011. A Gateway MultiSite Recombination Cloning Toolkit. *PLoS One* 6, e24531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024531>
- Qi, Y.B., Po, M.D., Mac, P., Kawano, T., Jorgensen, E.M., Zhen, M., Jin, Y., 2013. Hyperactivation of B-Type Motor Neurons Results in Aberrant Synchrony of the *Caenorhabditis elegans* Motor Circuit. *J. Neurosci.* 33, 5319–5325. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4017-12.2013>
- Qiu, L., Yu, H., Liang, F., 2015. Multiple C 2 domains transmembrane protein 1 is expressed in CNS neurons and possibly regulates cellular vesicle retrieval and oxidative stress. *J. Neurochem.* 135, 492–507. <https://doi.org/10.1111/jnc.13251>
- Rand, J., 2007. Acetylcholine. *WormBook* 1–21. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.131.1>
- Reinke, V., 2013. Transcriptional regulation of gene expression in *C. elegans*. *WormBook* 1–31.
- Richmond, J., 2006a. Synaptic function. *WormBook* 1–15. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.69.1>
- Richmond, J., 2006b. Electrophysiological recordings from the neuromuscular junction of *C. elegans*. *WormBook* 1–8. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.112.1>

- Rizo, J., Sudhof, 1998. Ca²⁺-binding Domain *. J. Biol. Chem. 273, 15879–15882.
- Saheki, Y., De Camilli, P., 2017. The Extended-Synaptotagmins. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1864, 1490–1493. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.03.013>
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evo 4, 406–425. <https://doi.org/citeulike-article-id:93683>
- Schafer, W., 2016. Nematode nervous systems. Curr. Biol. 26, R955–R959. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.044>
- Schafer, W., 2005. Egg-laying. WormBook 1–7. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.38.1>
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C.P., 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 5857–5864. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.5857>
- Schulz, T.A., Creutz, C.E., 2004. The Tricalbin C2 Domains: Lipid-Binding Properties of a Novel, Synaptotagmin-Like Yeast Protein Family †. Biochemistry 43, 3987–3995. <https://doi.org/10.1021/bi036082w>
- Schuske, K., Beg, A. a, Jorgensen, E.M., 2004. The GABA nervous system in C. elegans. Trends Neurosci. 27, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.005>
- Schwartz, M.L., Jorgensen, E.M., 2016. SapTrap, a Toolkit for High-Throughput CRISPR/Cas9 Gene Modification in Caenorhabditis elegans. Genetics 202, 1277–1288. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.184275>
- Shin, O.-H., Han, W., Wang, Y., Südhof, T.C., 2005. Evolutionarily Conserved Multiple C 2 Domain Proteins with Two Transmembrane Regions (MCTPs) and Unusual Ca²⁺ Binding Properties. J. Biol. Chem. 280, 1641–1651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407305200>
- Stefan, C.J., Trimble, W.S., Grinstein, S., Drin, G., Reinisch, K., De Camilli, P., Cohen, S., Valm, A.M., Lippincott-Schwartz, J., Levine, T.P., Iaea, D.B., Maxfield, F.R., Futter, C.E., Eden, E.R., Judith, D., van Vliet, A.R., Agostinis, P., Tooze, S.A., Sugiura, A., McBride, H.M., 2017.

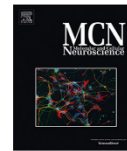
- Membrane dynamics and organelle biogenesis—lipid pipelines and vesicular carriers. *BMC Biol.* 15, 102. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0432-0>
- Südhof, T.C., 2014. The Molecular Machinery of Neurotransmitter Release (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed.* 53, 12696–12717. <https://doi.org/10.1002/anie.201406359>
- Südhof, T.C., Malenka, R.C., 2008. Understanding synapses: past, present, and future. *Neuron* 60, 469–76.
- Sutton, R.B., Davletov, B.A., Berghuis, A.M., Südhof, T.C., Sprang, S.R., 1995. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: A novel Ca^{2+} /phospholipid-binding fold. *Cell* 80, 929–938. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90296-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90296-1)
- Tarchini, B., Longo-Guess, C., Tian, C., Tadenev, A.L.D., Devanney, N., Johnson, K.R., 2018. A spontaneous mouse deletion in *Mctp1* uncovers a long-range cis-regulatory region crucial for NR2F1 function during inner ear development. *Dev. Biol.* 443, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.09.011>
- Téllez-Arreola, J.L., Estrada-Mondragón, A., Martínez-Torres, A., 2020. A phylogenetic analysis of MCTP proteins: from amino acid sequence to function. *BioRxiv* <https://doi.org/2020.01.13.904789>
- Train, C.M., Glover, N.M., Gonnet, G.H., Altenhoff, A.M., Dessimoz, C., 2017. Orthologous Matrix (OMA) algorithm 2.0: More robust to asymmetric evolutionary rates and more scalable hierarchical orthologous group inference. *Bioinformatics* 33, i75–i82. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx229>
- Trent, C., 1982. Genetic and behavioral studies of the egg-laying system in *Caenorhabditis elegans*. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA.
- Tunstall, N.E., Herr, A., de Bruyne, M., Warr, C.G., 2012. A Screen for Genes Expressed in the Olfactory Organs of *Drosophila melanogaster* Identifies Genes Involved in Olfactory Behaviour. *PLoS One* 7, e35641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035641>
- Ubach, J., Zhang, X., Shao, X., Südhof, T.C., Rizo, J., 1998. Ca^{2+} binding to synaptotagmin: how many Ca^{2+} ions bind to the tip of a C2-domain? *EMBO J.* 17, 3921–30.

- Waaaijers, S., Boxem, M., 2014. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome with CRISPR/Cas9. *Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.03.024>
- Waaaijers, S., Portegijs, V., Kerver, J., Lemmens, B.B.L.G., Tijsterman, M., van den Heuvel, S., Boxem, M., 2013. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 195, 1187–91. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.156299>
- Washington, N.L., Ward, S., 2006. FER-1 regulates Ca²⁺ -mediated membrane fusion during *C. elegans* spermatogenesis. *J. Cell Sci.* 119, 2552–2562. <https://doi.org/10.1242/jcs.02980>
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Wen, Q., Po, M.D., Hulme, E., Chen, S., Liu, X., Kwok, S.W., Gershow, M., Leifer, A.M., Butler, V., Fang-Yen, C., Kawano, T., Schafer, W.R., Whitesides, G., Wyart, M., Chklovskii, D.B., Zhen, M., Samuel, A.D.T., 2012. Proprioceptive Coupling within Motor Neurons Drives *C. elegans* Forward Locomotion. *Neuron* 76, 750–761. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.039>
- White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., Brenner, S., 1986. The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 314, 1–340. <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>
- Yeh, E., Ng, S., Zhang, M., Bouhours, M., Wang, Y., Wang, M., Hung, W., Aoyagi, K., Melnik-Martinez, K., Li, M., Liu, F., Schafer, W.R., Zhen, M., 2008. A Putative Cation Channel, NCA-1, and a Novel Protein, UNC-80, Transmit Neuronal Activity in *C. elegans*. *PLoS Biol.* 6, e55. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060055>
- Zhen, M., Samuel, A.D., 2015. *C. elegans* locomotion: small circuits, complex functions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 33, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.03.009>



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Neuroscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymcneMCTP-1 modulates neurotransmitter release in *C. elegans*José Luis Téllez-Arreola^{a,b}, Malan Silva^b, Ataulfo Martínez-Torres^{a,*}^a Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Boulevard Juriquilla 3001, C.P. 76215 Juriquilla, Querétaro, México^b School of Biological Sciences, University of Utah, Salt Lake City, United States

A B S T R A C T

Multiple C2 and Transmembrane Domain Proteins (MCTPs) are putative calcium sensors. Proteins that contain C2 domains play essential roles in membrane trafficking and exocytosis; however, MCTPs functions in neurotransmitter release are not known. Here we report that in *C. elegans* *mctp-1* is under the control of two promoters - one active in the nervous system and the second in the spermatheca. We generated and characterized a loss of function *amt1* mutant and compared it to a previously published loss of function mutant (*av112*). Loss of *mctp-1* function causes defects in egg-laying, crawling velocity, and thrashing rates. Both *amt1* and *av112* mutants are hyposensitive to the acetylcholinesterase blocker aldicarb, suggesting that MCTP-1 may play a role in synaptic vesicle release.

1. Introduction

C2 domains are ubiquitous coincidence detectors that integrate the presence of calcium and specific lipid forms (Corbalán-García and Gómez-Fernández, 2014). C2 domains are composed of eight β sheets and inter loops (Guerrero-Valero et al., 2009). Conserved calcium-binding residues are found in the loop region, and a membrane interacting face called the β groove is found between one set of β -sheets. The residues neighboring these interacting sites govern their overall face-charge and thus tune C2 domain sensitivity to these two factors (Corbalán-García and Gómez-Fernández, 2006). The functional diversity in C2 domains is yet to be fully appreciated. When C2 domains are found in conjunction with other catalytic domains, they confer spatial and temporal specificity to the encompassing protein. These domains were first characterized in protein kinase C (PKC) (Nalefski and Falke, 1996; Parker et al., 1986). In PKC, the C2 domain binds to the plasma membrane in a calcium-dependent manner (Corbalán-García and Gómez-Fernández, 2006; Guerrero-Valero et al., 2009). Neuronal proteins such as synaptotagmins, extended-synaptotagmins, and ferlins contain C2 domains (Di Paolo and De Camilli, 2006; Min et al., 2007; Sahelki and De Camilli, 2017; Stefan et al., 2017; Sutton et al., 1995). These proteins function at the synapse and are required for neurotransmitter exocytosis (Bacaj et al., 2015; Corbalán-García and Gómez-Fernández, 2014; Min et al., 2007; Südhof, 2014). However, the function of one class of C2 domain-containing proteins called MCTPs remains elusive.

Multiple C2 domains and Transmembrane regions Protein (MCTPs) were identified using bioinformatics approaches (Shin et al., 2005). These proteins are composed of three C2 domains in tandem, followed

by two transmembrane regions (Shin et al., 2005). MCTPs are found in multicellular invertebrates and higher organisms such as mammals (Téllez-Arreola et al., 2020). In vertebrates, MCTPs are expressed broadly in multiple tissues: kidneys, heart, liver, lungs, skeletal muscle, testis, spleen, and the central nervous system (Qiu et al., 2015; Shin et al., 2005; Espino-Saldaña et al., 2020). Within cells, these proteins are localized to intracellular vesicles of neuron bodies, neuron processes, and endoplasmic reticulum where they might perform vital functions (Genç et al., 2017; Qiu et al., 2015; Shin et al., 2005).

MCTPs are critical molecules. In humans, mutations in *mctp* genes are linked to bipolar disorder and schizophrenia, and developmental disorders such as congenital heart malformation (Djurovic et al., 2009; Lalani et al., 2013). Some MCTP mutations in *Drosophila melanogaster* are lethal during larval development, while others have defects in the regulation of neurotransmission, suggesting roles in both developing and mature nervous system (Genç et al., 2017; Tunstall et al., 2012). Consequently, the knockdown of *mctp-1* by RNAi in *C. elegans* results in 25% of the worms dying during embryonic development (Maeda et al., 2001). However, the complete expression pattern and phenotypic characterization of worm *mctp-1* have not yet been reported.

In this study, we analyzed the expression pattern of the worm *mctp-1* locus and found two alternative *mctp-1* promoters that drive distinct expression patterns. We then generated a CRISPR knockout mutant allele *mctp-1* (*amt1*), characterized the loss of function MCTP-1 phenotype and compared it to the previously described *mctp-1* (*av112*) mutant (Joshi et al., 2018). We discovered that MCTP-1 is expressed in a subset of sensory and motor neurons, is involved in functional food sensing and modulates the rate of neurotransmitter release.

* Corresponding author.

E-mail address: ataulfo@unam.mx (A. Martínez-Torres).<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103528>

Received 17 October 2019; Received in revised form 17 June 2020; Accepted 23 June 2020

Available online 07 July 2020

1044-7431/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044743120301512>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32650044/>



1-s2.0-S1044743120301512-main.pdf (Línea de comandos)

Tabla 1. Lista de Cepas

Cepa	Genotipo
N2	Bristol silvestre
ATM1	<i>mctp-1(amt1)</i> I
ATM2	<i>mctp-1(amt1)</i> I <i>amtEx[Pmctp-1a::GFP::unc-54]</i> <i>amtEx[Prab-3::mCherry::unc-54]</i>
ATM3	<i>amtEx[Pmctp-1b::GFP::unc-54]</i> <i>amtEx[Prab-3::mCherry::unc-54]</i>
ATM4	<i>mctp-1(amt1)</i> I <i>amtEx[mctp-1(+)]</i> <i>amtEx[Pmyo-3::YFP::Let-858; Pmyo-2::mCherry::unc-54]</i>
CB1072	<i>unc-29 (e1072am)</i> I <i>mctp-1(av112)</i> I
	<i>mctp-1(av112)</i> I <i>avEx[mctp-1(+)]</i> <i>avEx[Pmyo-3::YFP::Let-858; Pmyo-2::mCherry::unc-54]</i>
EG6207	<i>unc-119 (ed3)</i> III

Tabla 2. Lista de plásmidos

Plásmido	Resistencia	Descripción
pGEMT-Easy	Amp	Plásmido T (Promega)
pPD95.75	Amp	Promotorless vector GFP:: <i>unc-54</i>
pPD122.34	Amp	Promotorless 4xSV40-NLSGFP:: <i>let-858</i>
pPD136.15	Amp	<i>Pmyo-3::YFP::let-858</i>
pDONR-P1-P4	Kan	Gateway vector donador
pDONR-P2-P1	Kan	Gateway vector donador
pDONR-P2-P3	Kan	Gateway vector donador
pDEST-R4-R3	Amp	Gateway vector de destino
Cas9-pDD162	Amp	<i>Peft-3::cas9-SV40NLS::tbb-2</i> 39UTR
pMLS134	Amp	pU6:: <i>sgRNA</i>
pRL8	Kan	[1-2] Entry clone with Cb- <i>unc-119Cbr (+)</i> .
pGH8	Amp	pRAB-3:: <i>mCherry::unc-54utr</i>
pCFJ90	Amp	<i>Pmyo-2::mCherry::unc-54utr</i>

pJLT6	Kan	PCbr-unc-119::Cbr-unc-119::Cbr-unc-119 utr+eGFP::let-858 [1-2]
pJLT46	Kan	1.5 kb <i>mctp-1</i> RHA [2-3]
pJLT47	Kan	1.5 kb <i>mctp-1</i> LHA [4-1]
pJLT49	Amp	<i>mctp-1</i> sgRNA1 35 bp de LHA
pJLT50	Amp	<i>mctp-1</i> sgRNA2 75 bp de LHA
pJLT51	Amp	<i>mctp-1</i> sgRNA3 51 bp de LHA
pJLT63	Amp	Vector para CRISPR RHA::PCbr-unc-119::Cbr-unc-119::Cbr-unc-119::Cbr-unc-119 utr+eGFP::let-858 :: LHA

Lista de oligos

Nombre	Secuencia 5'-3'	objetivo
Ce. Prom B	Gtcgactgtcgagtgcgctgtagaatttag	Promotor

FD

Ce. Prom B Ggacccatggtttgtgtgttcgtcttc Promotor

RD

ojlt_46 GGGGACTGCTTTTTTGTAC pDonor 221

ojlt_47 tgtacaaaaaagcagctccccTGAGCCAATTTATCCAAG Unc-119

ojlt_48 tattcgtaaCAGTTGAAATTGAAAATGAGTTAAAG unc-119

ojlt_51 gaagaaataaTTAACCAGTGCCTCCACTAC GFP

ojlt_52 tgtacaagaaagctgtccccATGAGTACTAGCGGTGGC GFP

ojlt_53 GGGGACAGCTTTCTTGTAC pDonor 1-2

ojlt_59 GTGGTTTCAGTAAGAACTTGGC Genotipificar

ojlt_60 gtacaagaaagctgggtATGAGTACTAGCGGTGGC GFP

ojlt_61 tagtactCATACCCAGCTTTCTTGTACAAAG pDonor 1-2

ojlt_66 ggggacaactttgtatagaaaagttgtgtcgagtgcgctgtagaatttag Promotor

ojlt_67 Ggggactgctttttgtacaaactggtttgtgtgttcgtctctca Promotor

ojlt_68 caagttgtacaaaaaagcagctccccatgccgtgttgagttgattcgt cDNA

ojlt_104 ggggacagctttctgtacaaagtgcatattgcgtcaaccgtttgaaa RHA

ojlt_105 ggggacaactttgtataataaagttggattgaaaattataagaaatctaaac RHA

ojlt_106 ggggacaactttgtatagaaaagttgTGTAACAACATCCGCCAAAT LHA

ojlt_107 ggggactgctttttgtacaaactgCAGgttttcttttactttatt LHA

ojlt_108 TTGATGGAAGTTCGTCTTAAGAA sgRNA1

ojlt_109 AACTTCTTAAGACGAACTTCCAT sgRNA1

ojlt_110 TTGATGTGCAGAAACGGCAGAAC sgRNA2

ojlt_111 AACGTTCTGCCGTTTCTGCACAT sgRNA2

ojlt_112 TTGGATGTGGTTACTCTTTTGA sgRNA3

ojlt_113	AACTCAAAGAGTAACACATC	sgRNA3
ojlt_116	Ccactttgtacaagaaagctgtcccccacagatttattggtttattgactcg	Genotipificar
ojlt_125	atttcaactgCCAAGCGAGGACAATTCTcatcgt	Let-858 UTR
ojlt_126	cactgggTAAGGATGATCGACGCCaACGTCGTTG	Let-858 UTR
ojlt_147	Agaaaagttgtgtcagtgcgctgtagaatttag	Promotor
ojlt_148	Atggggactgctttttgtacaaactggttgt	Promotor
ojlt_149	Acaaaccaagtttgtacaaaaaagcagtcctccat	cDNA
ojlt_150	ACACTCAccactttgtacaagaaagctgtccccc	cDNA
ojlt_151	tgggggacagctttctgtacaaagtggTGAGTG	RFP:: let-858
ojlt_152	ttatcaactatgtataataaagttgCCAAGCGAG	RFP:: let-858
ojlt_153	CCTCGCTTGGcaactttattatacatagttgata	pDest CFJ150
ojlt_154	gcactcgacacaacttttctatacAAAGTTGATAGCTTG	pDest CFJ150
ojlt_163	CCTCCGAAATCTTTAGCGACC	Genotipificar
ojlt_164	Agccacgagaaaggcaataacg	Genotipificar
ojlt_165	Cgcgagctctgatagaaagt	Genotipificar
ojlt_166	Gccaattcatcccggtttctg	Genotipificar
ojlt_167	TTTGTATAGTTCATCCATGCCATG	Genotipificar
ojlt_197	Acgtttatcacatataatccgatgaa	Rescate
ojlt_198	Tttctccttactatttcccatat	Rescate
Ojlt_214	ATGCCGTGTTTGCAGTTGATTCGT	Fd isoforma b
ojlt_215	ATGCGAATTTCCACACTCGCTCGC	Fd isoforma c
ojlt_216	ATGGTGAATTTGAACCTAAAAAGTATTGTTCGA	Fd isoforma a
ojlt_217	ATGTCAACTGAGGATACTGATGAAGACG	FD isoforma d
ojlt_218	TCACAGATTTATTGGTTTATTGACTCGTCCAT	Rd todas las

Lista de secuencias identificadas para el análisis filogenético y su número de acceso en GeneBank.

1. Multiple C2 and Transmembrane region Protein family homolog [Caenorhabditis elegans] 736 aa protein NP_491909.2 GI:392885963

2. hypothetical protein CRE_28226 [Caenorhabditis remanei] 811 aa protein XP_003114743.1
GI:308505120

3. hypothetical protein GCK72_001812 [Caenorhabditis remanei] 770 aa protein KAF1769995.1
GI:1805551354

4. hypothetical protein CAEBREN_08494 [Caenorhabditis brenneri] 812 aa protein EGT38792.1
GI:341882857

5. hypothetical protein B9Z55_002513 [Caenorhabditis nigoni] 803 aa protein PIC52378.1
GI:1273548359

6. Hypothetical protein CBG12689 [Caenorhabditis briggsae] 800 aa protein XP_002640186.1
GI:268568194

7. hypothetical protein FL83_17440, partial [Caenorhabditis latens] 796 aa protein OZG05262.1
GI:1233652597

8. hypothetical protein B9Z55_002513 [Caenorhabditis nigoni] 843 aa protein PIC52377.1
GI:1273548358

9. Protein CBG12689 [Caenorhabditis briggsae] 813 aa protein CAP31633.2 GI:309360211

10. hypothetical protein FL81_13638 [Caenorhabditis remanei] 851 aa protein POM38040.1
GI:1338196734

11. hypothetical protein FL82_12360, partial [Caenorhabditis remanei] 851 aa protein OZF74930.1
GI:1233619430

12. hypothetical protein CAEBREN_28165 [Caenorhabditis brenneri] 725 aa protein EGT42243.1
GI:341886308

13. hypothetical protein B9Z55_002513 [Caenorhabditis nigoni] 722 aa protein PIC52376.1
GI:1273548357

14. unnamed protein product [Caenorhabditis bovis] 1963 aa protein CAB3408196.1
GI:1832384297

15. unnamed protein product [Caenorhabditis bovis] 1961 aa protein CAB3408195.1
GI:1832384296

16. hypothetical protein Y032_0369g76 [Ancylostoma ceylanicum] 781 aa protein EYB81997.1
GI:597832269
17. C2 domain protein, partial [Ancylostoma caninum] 710 aa protein RCN45613.1 GI:1432407481
18. C2 calcium-dependent membrane targeting domain containing protein [Haemonchus contortus]
739 aa protein CDJ95519.1 GI:560119858
19. hypothetical protein Angca_005104 [Angiostrongylus cantonensis] 716 aa protein
KAE9419062.1 GI:1782506367
20. hypothetical protein WR25_16111 isoform A [Diploscapter pachys] 719 aa protein
PAV83363.1 GI:1240372367
21. C2 domain protein [Teladorsagia circumcincta] 844 aa protein PIO73108.1 GI:1276846172
22. unnamed protein product [Heligmosomoides polygyrus] 645 aa protein VDO71328.1
GI:1530611247
23. Uncharacterized protein BM_BM3061 [Brugia malayi] 724 aa protein VIO96093.1
GI:1677413749
24. unnamed protein product [Wuchereria bancrofti] 752 aa protein VDM20535.1 GI:1528661599

25. Bm3061 [Brugia malayi] 689 aa protein CTP81764.1 GI:1009338563

26. hypothetical protein Y032_0369g76 [Ancylostoma ceylanicum] 541 aa protein EYB81996.1 GI:597832268

27. unnamed protein product [Dracunculus medinensis] 733 aa protein VDN50033.1 GI:1535183459

28. unnamed protein product [Brugia pahangi] 805 aa protein VDN83767.1 GI:1528772417

29. unnamed protein product [Haemonchus placei] 614 aa protein VDO38927.1 GI:1535225987

30. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1-like isoform X2 [Pomacea canaliculata] 938 aa protein XP_025076639.1 GI:1397739547

31. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1-like isoform X10 [Pomacea canaliculata] 695 aa protein XP_025076647.1 GI:1397739563

32. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1-like isoform X3 [Pomacea canaliculata] 933 aa protein XP_025076640.1 GI:1397739549

33. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X3 [Nematostella vectensis] 797 aa protein XP_032218133.1 GI:1806742494

34. predicted protein, partial [*Nematostella vectensis*] 662 aa protein EDO45740.1 GI:156224918
35. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [*Calypte anna*] 882 aa protein XP_008493993.1 GI:663268001
36. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X1 [*Geotrypetes seraphini*] 756 aa protein XP_033773479.1 GI:1835644655
37. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X8 [*Bubalus bubalis*] 956 aa protein XP_025149794.1 GI:1408541775
38. PREDICTED: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 [*Calidris pugnax*] 863 aa protein XP_014792325.1 GI:960955496
39. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X2 [*Microcaecilia unicolor*] 718 aa protein XP_030049257.1 GI:1716976684
40. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X5 [*Nematostella vectensis*] 778 aa protein XP_032218135.1 GI:1806742498
41. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X1 [*Microcaecilia unicolor*] 756 aa protein XP_030049256.1 GI:1716976682

42. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X1 [Nematostella vectensis] 817 aa protein XP_032218131.1 GI:1806742490
43. unnamed protein product [Nippostrongylus brasiliensis] 507 aa protein VDL83891.1 GI:1529633075
44. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X10 [Mus musculus] 731 aa protein XP_030103329.1 GI:1720376091
45. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X3 [Bubalus bubalis] 976 aa protein XP_025149789.1 GI:1408541765
46. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X4 [Bubalus bubalis] 969 aa protein XP_025149790.1 GI:1408541767
47. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [Amazona aestiva] 703 aa protein KQK79002.1 GI:944212327
48. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 [Rhinolophus ferrumequinum] 878 aa protein XP_032956275.1 GI:1823898892
49. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X12 [Mus musculus] 718 aa protein XP_006517534.1 GI:568983825

50. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 [Alligator sinensis]
908 aa protein XP_006027756.2 GI:944346911
51. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform 1 [Mus musculus] 951 aa
protein NP_084450.3 GI:1783658042
52. PREDICTED: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2-like [Xenopus
laevis] 876 aa protein XP_018110786.1 GI:1069342631
53. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [Pipra filicauda] 881 aa
protein XP_027575693.1 GI:1558356210
54. hypothetical protein XELAEV_18020477mg [Xenopus laevis] 881 aa protein
OCT86788.1 GI:1050384594
55. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 [Pteropus vampyrus]
880 aa protein XP_011355580.1 GI:759111785
56. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X8 [Homo sapiens] 694 aa
protein XP_016865350.1 GI:1034646159
57. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X12 [Homo sapiens] 732
aa protein XP_005272147.1 GI:530380169

58. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X3 [Serinus canaria] 899 aa protein XP_030084406.1 GI:1720472744
59. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Mustela erminea] 878 aa protein XP_032198028.1 GI:1804854706
60. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 [Pteropus alecto] 880 aa protein XP_006924195.1 GI:586538705
61. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [Xenopus tropicalis] 876 aa protein XP_002933357.1 GI:301607516
62. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X6 [Mus musculus] 938 aa protein XP_006517530.3 GI:1039744379
63. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Callithrix jacchus] 878 aa protein XP_002749137.1 GI:296203986
64. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Lontra canadensis] 878 aa protein XP_032698232.1 GI:1820917760
65. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [Cyanistes caeruleus] 725 aa protein XP_023789632.1 GI:1341023411

66. PREDICTED: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Cebus capucinus imitator] 878 aa protein XP_017373675.1 GI:1044341669
67. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [Piliocolobus tephrosceles] 712 aa protein XP_026311232.1 GI:1482595963
68. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X11 [Homo sapiens] 734 aa protein XP_006714755.1 GI:578810560
69. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X3 [Pan troglodytes] 878 aa protein XP_016782966.1 GI:1034108660
70. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X9 [Mus musculus] 751 aa protein XP_006517532.1 GI:568983821
71. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [Athene cunicularia] 881 aa protein XP_026712230.1 GI:1495912055
72. PREDICTED: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 [Apaloderma vittatum] 896 aa protein XP_009867437.1 GI:699593893
73. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Myotis lucifugus] 879 aa protein XP_023599912.1 GI:1335178830

74. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Corvus cornix cornix]
898 aa protein XP_010389311.1 GI:726998122
75. PREDICTED: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Sturnus vulgaris] 894 aa protein XP_014730089.1 GI:959054496
76. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [Strigops habroptila]
895 aa protein XP_030353864.1 GI:1728929543
77. multiple C2 domain and transmembrane region protein, isoform G [Drosophila melanogaster]
912 aa protein NP_001303357.1 GI:939619788
78. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [Meleagris gallopavo]
883 aa protein XP_031411201.1 GI:1776488798
79. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Pongo abelii] 878 aa
protein XP_002825913.1 GI:297697542
80. PREDICTED: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Calidris pugnax] 881 aa protein XP_014799758.1 GI:960969724
81. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform 6 [Homo sapiens] 784 aa
protein NP_001371936.1 GI:1864355906

82. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Tyto alba alba] 880 aa
protein XP_032850157.1 GI:1822568135

83. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Corvus moneduloides]
898 aa protein XP_031978815.1 GI:1799868725

84. multiple C2 domain and transmembrane region protein, isoform E [Drosophila melanogaster]
954 aa protein NP_001036559.2 GI:442624167

85. multiple C2 domain and transmembrane region protein, isoform D [Drosophila melanogaster]
982 aa protein NP_001261078.1 GI:442624165

86. multiple C2 domain and transmembrane region protein, isoform F [Drosophila melanogaster]
893 aa protein NP_001286590.1 GI:665401984

87. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 [Parus major]
895 aa protein XP_015494903.1 GI:998714173

88. PREDICTED: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1
[Pseudopodoces humilis] 918 aa protein XP_005521655.2 GI:929433994

89. PREDICTED: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2, partial [Merops
nubicus] 726 aa protein XP_008945923.1 GI:675634351

90. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Xenopus tropicalis]
899 aa protein XP_031755096.1 GI:1785357971
91. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [Antrostomus carolinensis] 881 aa protein XP_010168472.1 GI:704319104
92. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [Oxyura jamaicensis]
897 aa protein XP_035192022.1 GI:1865194261
93. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Oxyura jamaicensis]
910 aa protein XP_035192021.1 GI:1865194259
94. PREDICTED: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1
[Nipponia nippon] 881 aa protein XP_009468330.1 GI:694853789
95. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1-like isoform X6 [Gadus morhua]
880 aa protein XP_030209799.1 GI:1721900565
96. PREDICTED: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [Egretta garzetta] 881 aa protein XP_009633357.1 GI:697825810
97. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1-like isoform X2 [Gadus morhua]
909 aa protein XP_030209795.1 GI:1721900557

98. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1-like isoform X1 [Danio rerio] 859 aa protein XP_002663716.2 GI:528493112
99. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Anas platyrhynchos] 910 aa protein XP_027321846.1 GI:1540387827
100. PREDICTED: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Anser cygnoides domesticus] 897 aa protein XP_013037376.1 GI:902896195
101. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Falco cherrug] 881 aa protein XP_005436681.1 GI:541962510
102. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X7 [Homo sapiens] 784 aa protein XP_024305750.1 GI:1370466931
103. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform 1 [Homo sapiens] 878 aa protein NP_060819.3 GI:227496440
104. PREDICTED: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 [Pterocles gutturalis] 668 aa protein XP_010071037.1 GI:704470734
105. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform S [Homo sapiens] 778 aa protein NP_001002796.1 GI:50582996

106. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X1 [Homo sapiens] 793 aa protein XP_005272139.1 GI:530380153
107. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Homo sapiens] 866 aa protein XP_016877892.1 GI:1034591267
108. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X1 [Danio rerio] 855 aa protein XP_021333398.1 GI:1207180943
109. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform 3 [Homo sapiens] 692 aa protein NP_001284706.1 GI:663071074
110. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X2 [Danio rerio] 844 aa protein XP_021333399.1 GI:1207180945
111. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform 2 [Mus musculus] 688 aa protein NP_001364037.1 GI:1783658109
112. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 [Mus musculus] 878 aa protein NP_001019874.1 GI:85701536
113. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X7 [Mus musculus] 895 aa protein XP_017171132.1 GI:1039744381

114. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform 2 [Homo sapiens] 823 aa
protein NP_001153115.1 GI:227496489

115. multiple C2 domain and transmembrane region protein, isoform B [Drosophila melanogaster]
596 aa protein NP_001036560.1 GI:116007724

116. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 [Danio rerio]
927 aa protein XP_690870.6 GI:528508026

117. multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2 isoform X9 [Homo sapiens] 466
aa protein XP_005255017.1 GI:530407238.