



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

**“Evidencia funcional de la posible interacción de las proteínas MCTP y WDFY-2
de *Caenorhabditis elegans*”**

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

PRESENTA:

JOEL GALLARDO CAMINO

TUTORES:

DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES (INB, UNAM).

DR. LUIS ROBERTO RODRÍGUEZ ORTIZ (INB, UNAM).

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA (INB, UNAM).

DR. CARLOS SALDAÑA GUTIÉRREZ (FCN, UAQ).

Juriquilla, Querétaro

Noviembre, 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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Joel Gallardo Camino, cuyo título es: “**Evidencia funcional de la posible interacción de las proteínas MCTP y WDFY-2 de *Caenorhabditis elegans***”. Se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Alfredo Varela Echavarría

Secretario (Tutor)

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Vocal

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Suplente

Dra. Teresa Edith Garay Rojas

Suplente

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

RESUMEN

Las MCTP's (Multiple C2 Domain and Transmembrane Region Protein) son proteínas con tres dominios C2 que permiten la unión a Ca^{2+} y dos regiones transmembranales. La similitud de MCTP's con otras proteínas como las sinaptotagminas, sinaptotagminas extendidas y ferlinas, sugiere que podrían estar relacionadas con la fusión de membranas, el tráfico vesicular y la exocitosis. Con el fin de dilucidar la función de estas proteínas, se han realizado varios estudios en donde se han localizado en el retículo endoplásmico y en endosomas y se le ha asociado con la homeostasis presináptica y el tráfico de membranas en diferentes tipos celulares. Por otra parte, la proteína WDFY-2 (WD repeat and FYVE domain-containing protein 2), se caracteriza por tener cinco secuencias repetidas WD que le permiten interactuar con otras proteínas y un dominio FYVE que le permite anclarse a compartimientos celulares cuyas membranas sean ricas en fosfatidilinositol 3-fosfato. Esta proteína al igual que MCTP ha sido ubicada en endosomas y participa en los procesos de tráfico vesicular y de transducción de señales. Para determinar la posible interacción de ambas proteínas, en este proyecto se utilizó como modelo experimental al nematodo *Caenorhabditis elegans* y se analizaron varios comportamientos en cepas mutantes del gen *mctp-1* y mutantes del gen *wdfy-2*, así como de la cepa doble mutante *mctp-1; wdfy-2*. Se encontró que la ausencia de función de los genes *mctp-1* y *wdfy-2* generan cambios en la longitud del nematodo, en las tasas de endocitosis y de ovoposición, en la velocidad de movimiento, en el número de coleteos, en el comportamiento, en la distribución de lípidos y en la actividad sináptica. Estos hallazgos ayudan a comprender la importancia de estos genes en diversas funciones biológicas del nematodo.

ABSTRACT

MCTP's (Multiple C2 Domain and Transmembrane Region Protein) are proteins with three C2 domains that allow binding to Ca^{2+} and two transmembrane regions. The similarity of MCTP's to other proteins such as synaptotagmins, extended synaptotagmins and ferlins, suggests that they could be related to membrane fusion, vesicular traffic and exocytosis. In order to determine the function of these proteins, several studies have localized these proteins in the endoplasmic reticulum and endosomes and has been associated with presynaptic homeostatic control and membrane trafficking in different cell types. On the other hand, the WDFY-2 (WD repeat and FYVE domain-containing protein 2), is a protein characterized by having five repeated WD sequences that allow it to interact with other proteins and a FYVE domain that allows it to be anchored to cell compartments whose membranes are rich in phosphatidylinositol 3-phosphate. This protein, like MCTP, has been located in endosomes and is involved in vesicular traffic and signal transduction. To determine the potential interaction of both proteins, in this project we used the nematode *Caenorhabditis elegans* as experimental model and several behaviors were analyzed in mutant strains of the *mctp-1* gene and *wdfy-2* gene as well as the double mutant strain *mctp-1/wdfy-2*. It was found that the loss of the function of the *mctp-1* and *wdfy-2* genes caused changes in nematode length, endocytosis and oviposition rates, in the speed of movement, in the number of thrashes, in behavior, in lipid distribution and synaptic activity

ABREVIATURAS

Ca²⁺	Ion calcio
E-Syts	Sinaptotagminas extendidas
MCTP	Multiple C2 Domain and Transmembrane Region Protein
PI3P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
GFP	Green fluorescent protein
SNARE	Soluble NSF attachment receptor
TMR	Transmembrane region
WDFY-2	WD repeat and FYVE domain-containing protein 2

AGRADECIMIENTOS

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

Tutores:

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

Comité tutor:

Dr. Rogelio Arellano Ostoa y Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez.

Jurado del examen:

Dr. Alfredo Varela Echavarría, Dr. Ataúlfo Martínez Torres, Dr. Fausto Arellano Carbajal, Dra. Teresa Edith Garay Rojas y Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez.

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

Dra. Ángeles Edith Espino Saldaña (técnico académico) y Sra. Marina Ramírez Romero (Auxiliar de laboratorio).

Unidad de microscopía:

Elsa Nydia Hernández Ríos y Ma. Lourdes Palma Tirado.

Unidad de proteogenómica:

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

Unidad de enseñanza:

Dra. Nury Aranda López

Biblioteca:

Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela.

Videoconferencia:

Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Becario No. 924520, Proyectos CONACYT AS7659. PAPIIT-DGAPA:IN204520

Compañeros del laboratorio y del instituto.

A todos, en especial a los de la worm station

DEDICATORIA

A mis padres quienes siempre me han brindado su apoyo incondicional, gracias por su paciencia, sus consejos, por creer en mí y sobre todo gracias por su amor.

A mis hermanos que siempre me han apoyado y motivado para lograr las metas que me propongo, gracias por los tiempos que hemos compartido juntos, por estar al pendiente durante esta etapa.

A mi tía Belén gracias por el amor que me ha dado, y por el apoyo que me ha brindado, gracias también por compartir su vida a nuestro lado.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Proteínas con dominios C2	4
Estudios en MCTPs	6
El interactoma de <i>C. elegans</i> predice la interacción de MCTP-1 con WDFY-2.....	9
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MATERIAL	14
Material biológico	14
Plásmidos.....	15
Soluciones	16
METODOLOGÍA	17
Sincronización de <i>C. elegans</i>	17
Análisis de la longitud.....	17
Análisis de la tasa de endocitosis.....	18
Evaluación morfológica de la probóscide mediante microscopía electrónica de barrido	18
Análisis de la ovoposición.....	19
Análisis del movimiento.....	19
Análisis del comportamiento social.....	20
Análisis de la distribución de lípidos.....	21
Evaluación farmacológica de la actividad sináptica	21
Análisis estadístico	23
Microscopía de epifluorescencia y confocal.....	23
RESULTADOS	24
Cambios en la longitud	24
Cambios en la tasa de endocitosis	27

Evaluación morfológica de la probóscide	29
Cambios en la tasa de ovoposición	33
Cambios en el comportamiento social	34
Cambios en la distribución de rojo Nilo	38
Resistencia a aldicarb y levamisol.....	40
<i>DISCUSIÓN</i>	42
<i>CONCLUSIÓN</i>	52
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	53
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	60
<i>ANEXOS</i>	61

INTRODUCCIÓN

El ion Ca^{2+} es fundamental para la propagación del impulso nervioso. La interacción de este ion con proteínas que permiten ejecutar la liberación de los neurotransmisores empaquetados en vesículas sinápticas se lleva a cabo a través de dominios de interacción con Ca^{2+} llamados dominios C2. Entre las proteínas que incluyen este dominio se encuentran las sinaptotagminas, ferlinas y rabfilina (Guillen et al., 2013). Estas proteínas con dominios C2 forman complejos estructurales con otras proteínas de diversas familias que permiten el control de la liberación de neurotransmisores. Existen varias otras proteínas con dominios C2 cuyo papel no ha sido ampliamente explorado y tampoco se conoce sobre sus interacciones y cómo podrían estar involucradas en la neurotransmisión. En este trabajo se estudió la función de una de estas proteínas: la proteína MCTP (multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions) y su posible interacción con la proteína de andamiaje WDFY-2 (WD repeat and FYVE domain-containing protein 2). Para abordar este estudio se utilizó como modelo experimental al nematodo *Caenorhabditis elegans*.

Las proteínas MCTP contienen tres dominios C2 (C2A, C2B y C2C) localizados en el citosol que incluyen residuos de aspartato en su estructura y permiten la unión del Ca^{2+} , además tienen dos regiones transmembranales (TMRs) que anclan a la proteína a vesículas intracelulares. Entre TMR1 y TMR2 se forma un bucle que se localiza en el lumen vesicular, como en el retículo endoplásmico y endosomas (Shin et al., 2005, Espino-Saldaña et al 2020, Téllez-Arreola et al., 2020).

Estudios recientes mostraron que el gen *mctp-1* del nematodo *C. elegans* tiene dos promotores funcionales, uno que dirige la expresión en el sistema nervioso y otro en células de la espermateca (Téllez-Arreola et al., 2020). La delección del gen *mctp-1* reduce la tasa de ovoposición, velocidad de desplazamiento y la curvatura del gusano (Téllez-Arreola et al., 2020). Adicionalmente, los mutantes son resistentes al bloqueador de la acetilcolinesterasa aldicarb, lo que sugiere un papel en la función presináptica, similar al que se le ha atribuido en *Drosophila melanogaster* (Genç et al., 2017). Sin

embargo, actualmente no se conoce con certeza cuál es el papel funcional de las proteínas MCTP.

Por otro lado, el interactoma de *C. elegans* (Boxem et al., 2008) revela que MCTP-1 posiblemente interacciona con una proteína que se localiza en endosomas, la proteína WDFY-2. Esta proteína contiene sitios de unión a lípidos en su dominio FYVE y cinco repeticiones del dominio WD40, los cuales forman hélices β que funcionan como dominios de interacción con otras proteínas. En otros trabajos se han identificado interacciones de WDFY2 con otras proteínas como las cinasas Akt y PKC ζ/λ , así como con las proteínas VAMP2 y VAMP3 (Fritzius et al., 2006, 2007; Walz et al., 2010; Sneegen et al., 2019). La función de WDFY2 apenas se está esclareciendo y existe evidencia de que regula el reciclaje de endosomas hacia la membrana plasmática (Sneegen et al., 2019.)

En el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del INB se cuenta con una cepa de *C. elegans* mutante de *wdfy-2* que porta una deleción parcial de este gen en la cual se preservan sólo los dominios WD1 y WD2, y se remueven los dominios WD3 - WD5, así como el dominio FYVE, por lo que se predice que corresponde a un alelo nulo, aunque esta cepa no presenta un fenotipo aparente. En una serie de experimentos en nuestro grupo de investigación, se mostró que el promotor del gen *wdfy-2* induce la expresión de un gen reportero en el sistema nervioso de *C. elegans*, por lo que la interacción con *mctp-1* predicha por el interactoma es factible (Boxem et al., 2008). Además, recientemente se generó en el laboratorio un doble mutante *mctp-1; wdfy-2* con el que se podrán estudiar alteraciones funcionales y morfológicas derivadas de la pérdida de la función de estos genes y se podrá probar si existe una interacción genética entre ellos. Este tipo de interacciones revelan relaciones funcionales entre genes o sus vías de señalización y se observan cuando las mutaciones en dos genes producen un fenotipo diferente en relación a las mutaciones de los genes individuales.

Debido a la expresión neuronal de los genes *mctp-1* y *wdfy-2* en *C. elegans*, a la ubicación de las proteínas MCTP y WDFY-2 en endomembranas, particularmente a su colocalización en endosomas, y a su interacción física prevista por el estudio del

interactoma del nematodo, se piensa que estas cumplen alguna función en la transmisión sináptica, ya sea de manera individual o conjunta. Por ello en este trabajo se determinó si la doble mutante *mctp-1; wdfy-2* presenta un fenotipo que permita discernir la función de estas proteínas en la neurotransmisión. Para ello se abordó el estudio de los cambios morfológicos y funcionales de esta doble mutante.

ANTECEDENTES

La liberación de neurotransmisores desde la terminal presináptica requiere de la entrada de Ca^{2+} a través de canales sensibles a voltaje que son selectivos a este ion. También se puede inducir experimentalmente la liberación de neurotransmisores mediante la microinyección de Ca^{2+} en la neurona presináptica. Por tanto, este ion es necesario para desencadenar una cascada de eventos que resultan en la liberación de neurotransmisores que son fundamentales para la propagación del potencial de acción (Miledi, 1973).

La liberación evocada por potenciales de acción es el principal mecanismo de comunicación interneuronal, aunque la liberación “espontánea” de neurotransmisores, la cual ocurre en ausencia de la llegada de un potencial de acción, también es un mecanismo importante para la función y estructura de la sinapsis. Para ambos mecanismos se han identificado componentes moleculares que interaccionan con el Ca^{2+} y que permiten la fusión de vesículas sinápticas cargadas con neurotransmisores a la membrana plasmática. Entre estos componentes se encuentran las siguientes familias de proteínas: sinaptotagminas, ferlinas y sinaptotagminas extendidas (E-Syts) (Guillen et al., 2013). Estas tres familias de proteínas cuentan con un dominio de interacción a Ca^{2+} llamado dominio C2. El dominio C2 no es exclusivo de proteínas involucradas en neurotransmisión y también se encuentra en proteínas que tienen otros papeles, desde enzimas hasta proteínas asociadas a tráfico de membranas. Adicionalmente, este dominio C2 se encuentra en la proteína MCTP, que es central para el tema de este trabajo y cuya función no se ha estudiado ampliamente.

Proteínas con dominios C2

Sinaptotagminas

Son una familia de trece proteínas que se encuentran en las terminales sinápticas. Se caracterizan por presentar dos dominios C2 citoplasmáticos y una región transmembranal en el extremo N-terminal (Chapman, 2002). En esta familia destaca la sinaptotagmina-1, la cual se encuentra anclada a vesículas exocíticas mediante una región transmembranal y sus dominios C2 interaccionan con fosfolípidos de membrana como el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, así como con proteínas del complejo SNARE en respuesta al aumento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} (Tang et al., 2006). Esta interacción facilita la fusión entre la membrana de la vesícula exocítica con la membrana plasmática, lo que eventualmente permite la liberación de los neurotransmisores al espacio sináptico (Sutton et al., 1995; Ubach et al., 1998).

Ferlinas

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

Sinaptotagminas extendidas (E-Syts)

Estas proteínas presentan en su estructura solo una región transmembranal. Se denominan así, debido a su similitud con las sinaptotagminas y han sido implicadas en la formación de sitios de contacto entre retículo endoplásmico y membrana plasmática en respuesta a señalización por Ca^{2+} a través de sus dominios C2; participan en el transporte de fosfolípidos desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática mediante un dominio SMP (Min et al., 2007).

MCTP (Multiple C2 domain and transmembrane region protein).

Estas proteínas están muy conservadas evolutivamente y se pueden encontrar en vertebrados e invertebrados. Su estructura está conformada por tres dominios C2 (C2A, C2B y C2C) localizados en el citosol que incluyen residuos de aspartato y permiten la unión de iones Ca^{2+} , además tiene dos segmentos transmembranales (TMRs) que anclan a la proteína a vesículas intracelulares (Figura 1). Entre TMR1 y TMR2 se forma un bucle que se localiza en el lumen de las vesículas como las del retículo endoplásmico y endosomas (Téllez-Arreola et al., 2020). A diferencia de las sinaptotagminas, E-Syts y ferlinas, las proteínas MCTP tienen la capacidad de unir Ca^{2+} sin aparentemente asociarse a fosfolípidos (Shin et al., 2005).

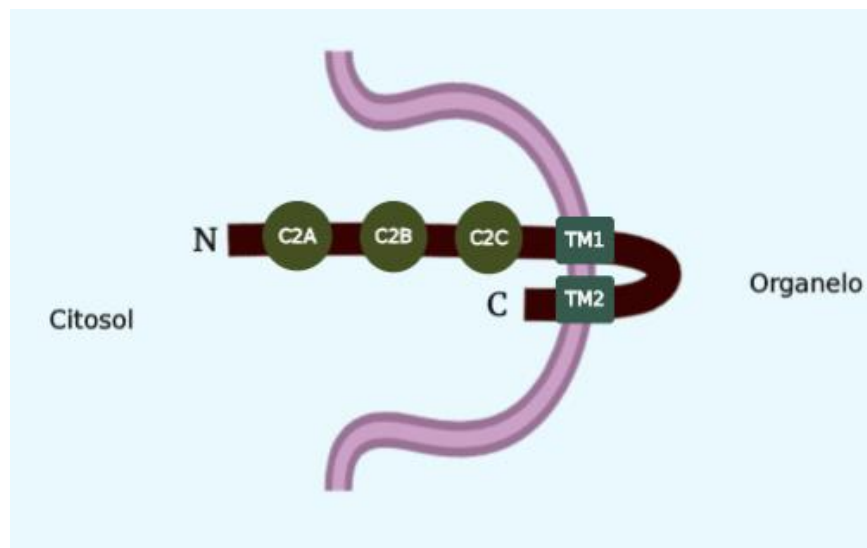


Figura 1: Modelo de la estructura de las MCTPs (Modificada de Espino-Saldaña et al., 2020).

El modelo se predice del análisis de hidrofobicidad Kyte-Doolittle y por su homología con otras proteínas que incluyen dominios C2. Las proteínas MCTP se encuentran en endomembranas, tres dominios C2 se disponen hacia el citoplasma y dos regiones transmembranales (TM) anclan a la proteína a las endomembranas, entre estos dos TM se forma un bucle que se dispone hacia el interior de las vesículas.

Estudios en MCTPs

Se ha encontrado que los genomas de invertebrados como *C. elegans* y *D. melanogaster* presentan un solo gen *mctp* que puede codificar para distintas variantes de la proteína. En el nematodo (Figura 2a), el gen tiene dos promotores, *Pmctp-1a* y *Pmctp-1b*. El primero dirige la expresión en la espermateca, mientras que el segundo dirige la expresión hacia el sistema nervioso. El gen incluye 17 exones que por selección alternativa de promotores y splicing alternativo genera 4 isoformas (*mctp-1a - 1d*, Figura 2b, Téllez-Arreola et al., 2020).

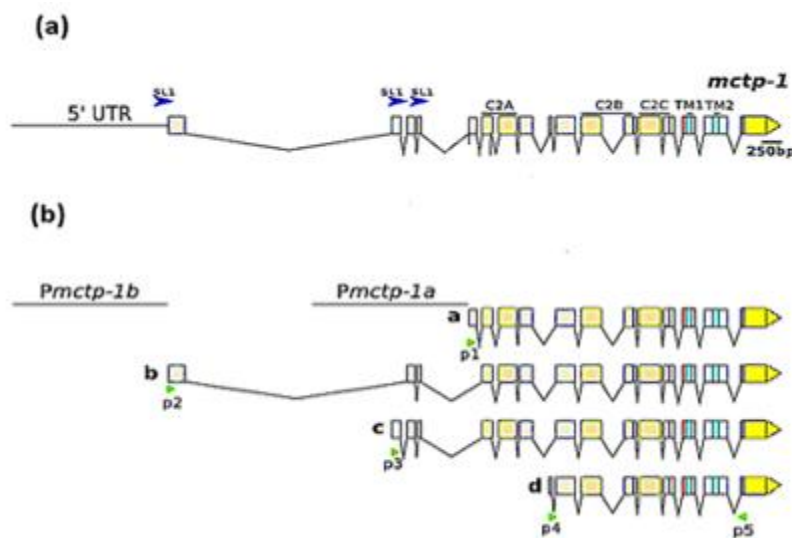


Figura 2: El gen *mctp-1* codifica para una proteína con múltiples dominios C2 y dos regiones transmembranales.

(a). Estructura del gen *mctp-1*. Los recuadros son exones. Los recuadros color naranja son los exones que codifican para los dominios C2 y los azules son los que codifican para los segmentos transmembranales. Los recuadros amarillos representan el extremo UTR 3'. (b). El gen *mctp-1* por selección alternativa de promotores y splicing alternativo genera 4 isoformas denominadas *mctp-1a*, *mctp-1b*, *mctp-1c* y *mctp-1d* (Téllez-Arreola et al., 2020).

En mamíferos se encuentran dos genes *mctp* (*mctp1* y *mctp2*) que a su vez presentan eventos de splicing alternativo que codifican para distintas isoformas mientras que en el pez cebra *Danio rerio*, se ubicaron cuatro genes *mctp*: *mctp1a*, *1b*, *2a* y *2b*; en esta especie se encontraron al menos ocho variantes derivadas de splicing alternativo y otras isoformas producto de polimorfismos de nucleótidos únicos (Qiu et al., 2015; Espino-Saldaña et al., 2020).

En vertebrados, los RNAm de *mctp*'s tienen amplia distribución ya que se expresan en diferentes tejidos incluyendo el músculo esquelético, músculo cardiaco, riñón, hígado y cerebro (Shin et al., 2005, Espino-Saldaña et al., 2020); particularmente se ha localizado *mctp-1* en neuronas del giro dentado del hipocampo, en la amígdala, en cerebelo y en la corteza. En estas neuronas, la proteína MCTP1 fue ubicada en las terminales de axones presinápticos, en vesículas sinápticas, en el retículo endoplasmático y endosomas (Qiu et al., 2015). En *D. rerio*, *Mctp* se encontró asociada a endosomas tardíos, retículo endoplásmico y lisosomas y se excluyó su presencia en membrana plasmática y aparato de Golgi (Espino-Saldaña et al., 2020)

En invertebrados los RNAm de *mctp*'s se han encontrado principalmente en neuronas. Por ejemplo, en *D. melanogaster* se ubicó en el retículo endoplasmático de motoneuronas, en donde se considera que su función es necesaria para el control homeostático de la liberación de neurotransmisores (Genç et al., 2017). En *C. elegans*, se determinó que el gen *mctp-1* tiene dos promotores funcionales: *mctp-1a* dirige la expresión en la espermateca y *mctp-1b* la dirige en el sistema nervioso central (Figura 3, Téllez-Arreola et al., 2020).

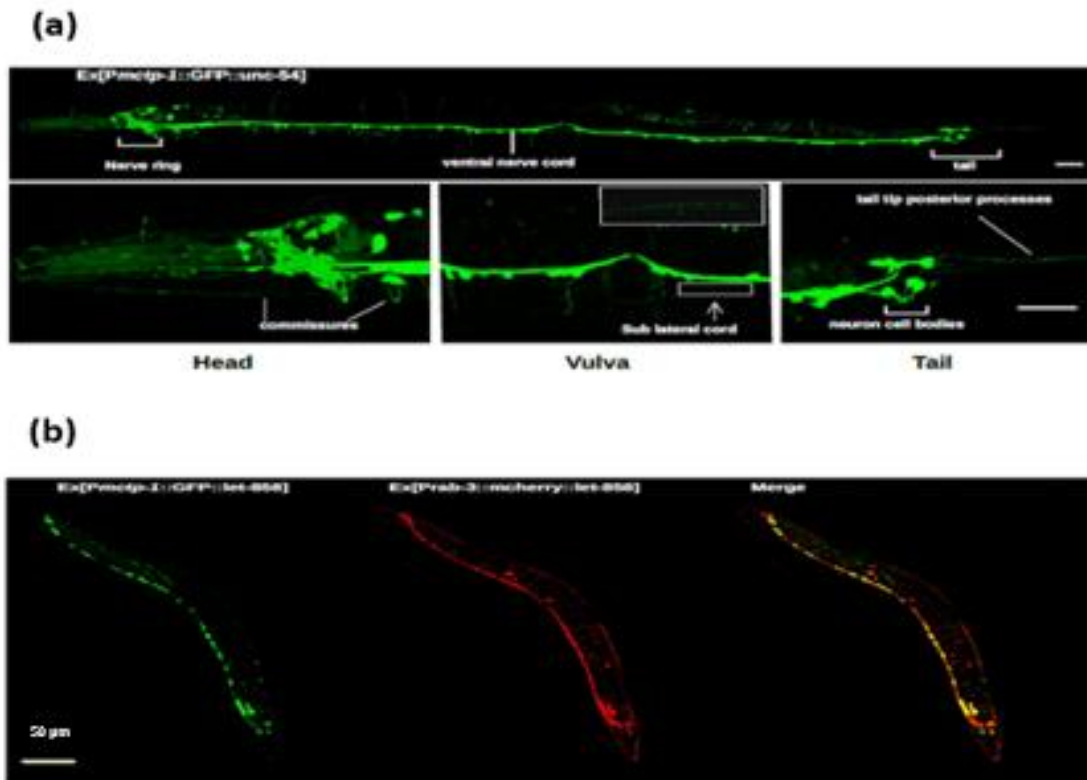


Figura 3: El promotor de *mctp-1* es activo en el tejido neuronal en *C. elegans*.

(a). Expresión de *Pmctp::GFP::unc-54*, con la amplificación correspondiente a la cabeza, vulva y cola. **(b).** Co-expresión de *Pmctp::GFP* y el marcador neuronal *Prab-3::mCherry* (Télez-Arreola et al., 2020).

En humanos, mediante análisis metagenómicos se mostró la asociación de los genes *mctp* con enfermedades neuropsiquiátricas como el desorden bipolar (Scott et al., 2009; Djurovic et al., 2010) y esquizofrenia (Djurovic et al., 2009). Por otro lado, mutaciones en el gen *MCTP2* humano están vinculadas con la coartación de la aorta y el síndrome del corazón hipoplásico (Lalani et al., 2013). Individuos que presentan deleciones en la región cromosómica 15q26, en donde se ubica el gen *mctp-2* presentan esta enfermedad cardíaca; de manera interesante se ha determinado experimentalmente que el bloqueo de la expresión del gen *mctp-2* durante el desarrollo temprano de la rana *Xenopus laevis*, conduce a alteraciones en el desarrollo, así como a defectos en la función del corazón

(Lalani et al., 2013).

Los diversos estudios que asocian al gen *mctp-1* con la función de la proteína son pocos y no se tiene un consenso sobre su papel. Por ejemplo, mientras que mutantes del gen *mctp-1* inducidos por transposición en *D. melanogaster* son letales durante el desarrollo (Tunstall et al., 2012), otros alelos tienen alterado el control homeostático de la función presináptica (Genç et al., 2017). Por otro lado, la microinyección de RNAi de *mctp-1* en *C. elegans* mostró que la supresión de la expresión de este gen es letal durante el desarrollo embrionario (Maeda et al., 2001), mientras que, Joshi et al.,(2017), sugieren que *mctp-1* está asociado a la biogénesis de gotas de lípidos en la interfase del retículo endoplásmico y peroxisomas. Sin embargo, estos autores no muestran cuál es el patrón de expresión del gen ni hacen una caracterización exhaustiva de la cepa mutante.

El interactoma de *C. elegans* predice la interacción de MCTP-1 con WDFY-2.

Se ha logrado la identificación sistemática de interacciones inter-proteína aplicando la técnica de “Doble híbrido” en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En esta técnica se expresan dominios o módulos funcionales de múltiples proteínas y se aíslan los genes cuyos productos interactúan físicamente (Boxem et al., 2008). De este modo, se han identificado muchas interacciones funcionales en *C. elegans*; como por ejemplo de factores de transcripción (Malinow et al., 2019, Wu et al., 2017), proteínas del complejo mitótico de los cromosomas o proteínas asociadas a la división celular (Michael, 2016; Portegijs et al., 2016).

La base de datos pública del interactoma de *C. elegans* (http://interactome.dfci.harvard.edu/C_elegans/) predice que MCTP-1 interactúa con la proteína WDFY-2 (Figura 4a). WDFY-2 se caracteriza por la presencia de cinco secuencias repetidas WD (dipéptido aspartato-triptófano) y un dominio FYVE (Figura 4b) (Fritzius et al., 2006, Walz et al., 2010), el cual es un dominio específico para compartimentos celulares que tienen fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) en sus membranas (Fritzius et al., 2006). La proteína WDFY-2 se ubica en endosomas, es decir, en uno de los organelos en donde se ha ubicado MCTP.

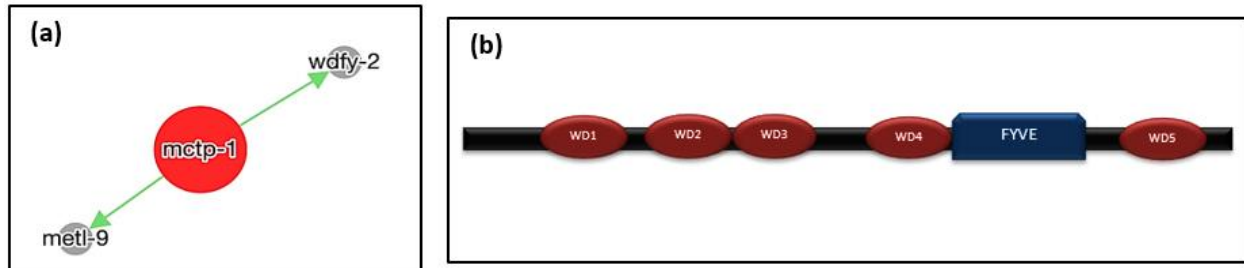


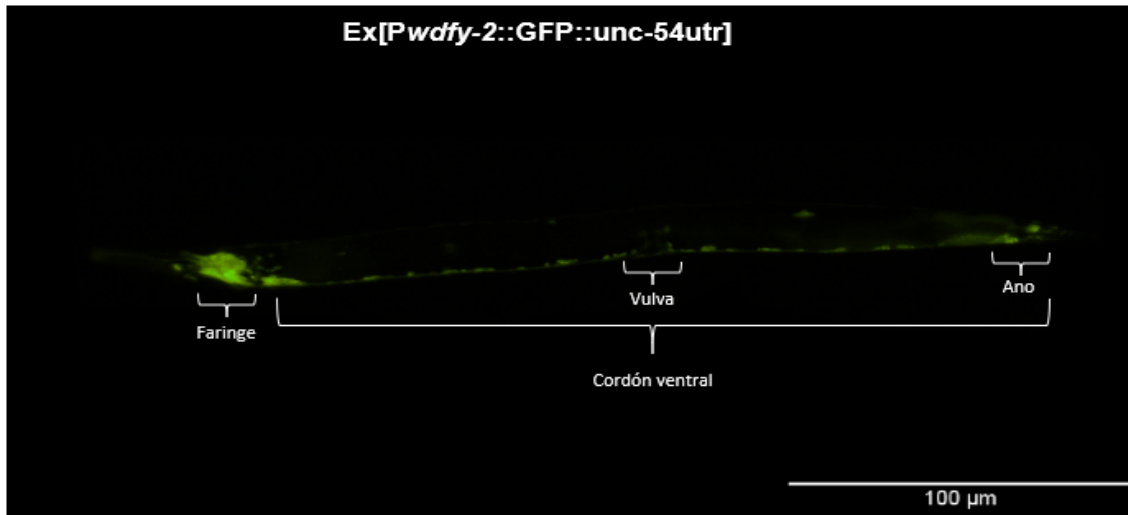
Figura 4: Análisis *in silico* de la Interacción entre *mctp-1* y *wdfy-2* y modelo de la estructura de la proteína WDFY-2.

(a). El interactoma de *C. elegans* mostró la interacción física entre *mctp-1* y *wdfy-2*. Asimismo, también se encontró una posible interacción con una enzima similar a las metiltransferasas tipo 9 codificada por el gen *metl-2*, pero su función es desconocida. **(b).** La proteína WDFY-2 presenta cinco repeticiones del dominio WD-40 (WD1-5), los cuales están involucrados en interacciones proteína-proteína y un dominio FYVE que interacciona con el fosfatidilinositol 3-fosfato, fosfolípido presente en endomembranas.

En mamíferos, la proteína WDFY2 participa en la vía endocítica y tiene un papel crítico en la modulación de la transducción de señales ya que interacciona con la PKC ζ/λ y la enzima Akt-2. Las Akt's tienen múltiples funciones en el metabolismo, la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y supervivencia. En estos estudios se mostró que células depletadas de WDFY2 tienen disminuida la capacidad de absorción de glucosa estimulada por insulina, así como una atenuación global en la fosforilación de Akt2 (Walz et al., 2010).

Por otro lado, estudios realizados en el laboratorio en el nematodo *C. elegans* determinaron que el promotor del gen *wdfy-2* dirige la expresión de un gen reportero en el sistema nervioso del nematodo (Figura 5).

(a)



(b)

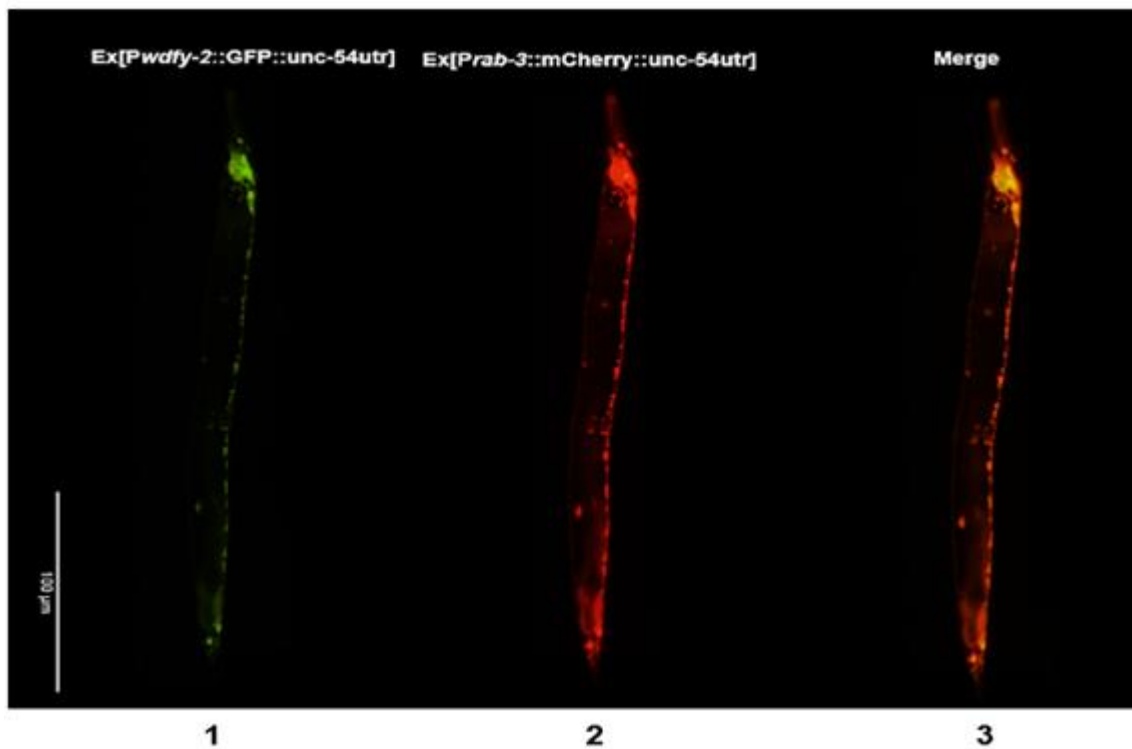


Figura 5: El promotor de *wdfy-2* está activo en neuronas de *C. elegans*.

(a). Imagen al microscopio de epifluorescencia del transgénico *Pwdfy-2::GFP::unc-54utr*, se indica la localización de la faringe, vulva y ano. (b). Co-expresión de *Pwdfy-2::GFP::unc-54utr* (1) y el marcador neuronal *Prab-3::mCherry::unc-54utr* (2) colocalización *Pwdfy-2/Prab-3* (3). Los patrones de expresión muestran que *wdfy-2* se expresa en neuronas del nematodo.

La supresión por RNAi de la expresión del gen *wdfy-2* de *C. elegans* muestra inhibición en la función de la endocitosis (Hayakawa et al., 2006); sin embargo, el mutante de delección del gen (cepa RB2580, Figura 6 y apéndice 1) no parece presentar cambios aparentes en su morfología y función. WDFY-2 fue ubicada en endosomas tempranos y en el compartimento de la membrana periciliar en neuronas sensoriales de *C. elegans* (Scheidel et al., 2018). Así, aparentemente WDFY-2 juega un papel, aún no definido en el proceso de reciclaje de endosomas hacia la membrana plasmática.

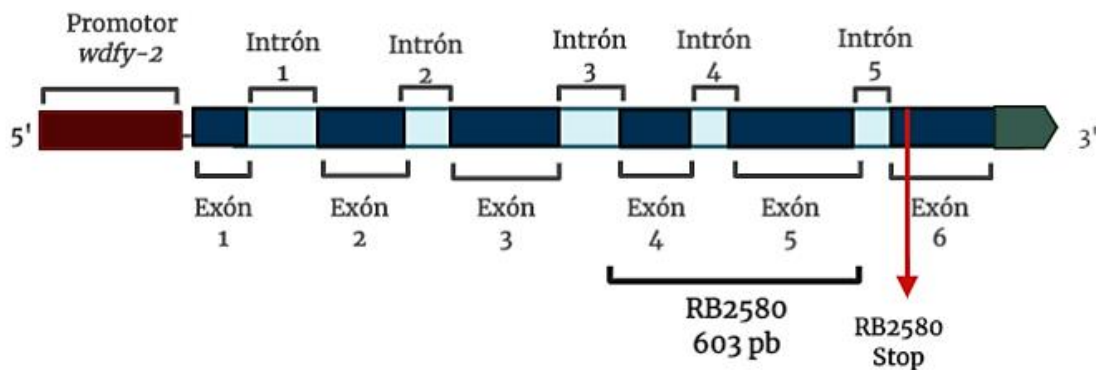


Figura 6: El gen *wdfy-2* codifica para una proteína con múltiples dominios WD y un dominio FYVE.

La estructura del gen *wdfy-2* y localización de la delección (línea negra) en la cepa RB2580. Los cuadros color azul oscuro representan los exones. Los exones 2-6 codifican para los dominios WD, adicionalmente el exón 5 codifica para el dominio FYVE, la flecha en gris representa el extremo 3'UTR. La cepa RB2580 tiene una delección de 603 pb e introduce un codón de paro prematuro en el exón 6, generando una proteína trunca de 218 aminoácidos, la cual conserva únicamente los primeros dos dominios WD.

En general las funciones de las proteínas MCTPs y la proteína WDFY-2 están asociadas a procesos de la vía endocítica y/o exocítica y, en particular para MCTPs en la función del retículo endoplásmico en el control homeostático de la inhibición presináptica. El papel de endosomas, vesículas exocíticas y del retículo endoplásmico es fundamental para la transmisión sináptica, y es importante la identificación de nuevos componentes moleculares en estos compartimentos celulares y sus interacciones físicas para entender mejor cómo se lleva a cabo la liberación controlada de neurotransmisores.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la expresión neuronal de los genes *mctp-1* y *wdfy-2* en *C. elegans*, y a los cambios en la actividad motora que presentan los mutantes del gen *mctp-1* y a la ubicación de las proteínas MCTP-1 y WDFY-2 en sistema nervioso, se prevé que estas cumplen alguna función en la transmisión sináptica, ya sea de manera individual o conjunta. El estudio de estos genes y de su posible interacción es importante para comprender mejor los mecanismos celulares y moleculares de la neurotransmisión y su papel en algunas patologías a las que se les ha relacionado.

HIPÓTESIS

La ausencia individual y combinada de la función de los genes *mctp-1* y *wdfy-2* de *C. elegans* generan cambios en la actividad neuronal.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar morfológica y funcionalmente la doble mutante *mctp-1; wdfy-2*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar los cambios en la anatomía del gusano inducidos por la doble mutación *mctp-1*; *wdfy-2*.
- 2) Determinar si la doble mutante presenta cambios funcionales: locomoción, curvatura y ovoposición.
- 3) Evaluar si en la doble mutante hay cambios en la actividad sináptica por medio de las pruebas farmacológicas de sensibilidad a aldicarb y levamisol.

MATERIAL

Material biológico

***E. coli* OP50:** Es una cepa de *E. coli* auxótrofa para uracilo. Se emplea como fuente de alimentación para *C. elegans*.

Medio de cultivo para *E. coli*: Medio nutritivo LB: Para el cultivo de *E. coli* se utiliza el medio Luria-Bertani (Sambrook et al., 2001), su composición por litro de agua destilada es: 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona y 5 g de NaCl, pH = 7.

Medio de crecimiento para *C. elegans* (NGM): (0.5 ml de CaCl₂ 1M, 0.5 ml de colesterol 5mg/ml en etanol, 0.5 ml de MgSO₄ 1M y 12.5 ml de solución amortiguadora de KPO₄ 1M. En 500 ml de medio LB).

N2: Cepa silvestre de *C. elegans*.

ATM-1 (*mctp-1(amt1) I*): Cepa que porta en homocigosis una delección en el gen *mctp-1* inducida por la técnica de CRISPR/Cas9 (apéndice 2). La mutación introduce un codón de paro prematuro en el dominio C2A y se caracteriza por tener cambios en la actividad motora, disminución en la tasa de ovoposición y disminución en el número de coleteos en medio líquido (Téllez-Arreola et al., 2020).

RB2580 (*wdfy-2(ok3592) II*): Cepa obtenida del *Caenorhabditis* Genetics Center y se caracteriza por tener una delección de 645 pb en el gen *wdfy-2* en homocigosis. (Figura 6 y apéndice 1).

ATM-6 (*mctp-1(amt1) I; wdfy-2(ok3592) II*): Cepa doble mutante obtenida mediante la cruce de la cepa ATM-1 y RB2580, que contiene en homocigosis alelos mutantes de *mctp-1* y *wdfy-2* (apéndice 3-c)

CB193 (*unc-29(e193) I*): Cepa obtenida del *Caenorhabditis* Genetics Center, se caracteriza por portar un alelo nulo en el gen *unc-29* y se utilizó como control en los experimentos de resistencia a aldicarb y levamisol.

Plásmidos

pGH8: Plásmido donado por Erik Jorgensen (University of Utah). Se construyó mediante la técnica de Gibson assembly® y se caracteriza por tener el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación ColE1, el promotor de Rab-3 fusionado con mCherry. Este plásmido se utilizó como marcador pan-neuronal y se coinyectó junto con el pEDR-1 en *C. elegans*.

pEDR-1: Plásmido construido en la Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del INB mediante la técnica de Gibson assembly®, se caracteriza por tener el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación ColE1 y el promotor del gen *wdfy-2* fusionado con GFP. Este plásmido se utilizó para determinar el patrón de expresión del gen *wdfy-2* en *C. elegans* (apéndice 4).

Soluciones

Aldicarb 1mM: (1.92 gr de aldicarb (PESTANAL®), diluir en 10 ml de etanol al 70% V/V, tomar 1 ml de la dilución de aldicarb [1M] y diluir 1:1000 en etanol al 70% V/V).

Buffer M9: (KH_2PO_4 22 mM, Na_2HPO_4 42 mM, NaCl 8 mM, NH_4Cl 18 mM).

Buffer de cacodilato [0.2M]: (4.28 gr de cacodilato, 100 ml de agua destilada).

Dil (1,1', dioctadecil-3,3,3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato): (100mg de Dil en 16.5ml de DMSO, 1ml de Dil 6mg/ml en dilución 1:3 con bacterias).

Glutaraldehído 3% V/V: (1 ml de glutaraldehído 50% en agua destilada, diluir en 16.6 ml de agua destilada).

Hipoclorito de sodio [0.3 M]: 27.5 ml de agua destilada, 12.5 ml de NaOH [1M], 10 ml de NaClO al 4% P/V.

Levamisol [0.4 mM]: (2.04 gr de levamisol en 10 ml de buffer M9, tomar 1 μl del levamisol 1M y diluir 1:1000 en buffer M9, tomar 1 μl del levamisol de esa solución y diluir 1:2.5 en buffer M9).

Tetraóxido de Osmio: (1ml de OsO_4 1M, 99 ml de buffer de cacodilato 0.1M).

Rojo Nilo [2.3 mM]: (7.5 mg de rojo Nilo en 16.4 ml de acetona, diluir en isopropanol al 40% (V/V) en una relación de 1:0.6).

METODOLOGÍA

Sincronización de *C. elegans*

Para todos los estudios se utilizaron gusanos sincronizados a la misma edad. Para lograr la sincronización se utilizó el método de hipoclorito de sodio (Porta-de-la-Riva et al.,2012), Esta técnica consiste en depositar 20 µl de la solución de hipoclorito de sodio [0.3 M] en una placa con medio NGM y *E. coli* OP50, posteriormente se colocaron gusanos adultos grávidos en la gota de la solución de hipoclorito de sodio, se dejó secar la gota de la solución de hipoclorito de sodio, finalmente se incubaron las placas a 20°C.

Análisis de la longitud

Para realizar el análisis de la longitud se sincronizaron los gusanos y se dejaron a 20°C/56 h y 20°C/96 h (hasta el comienzo de la etapa L4 y en etapa de adultos grávidos, respectivamente). Posteriormente se tomaron 80 gusanos por cada cepa y se colocaron por 30 min en una placa con medio NGM sin *E. coli* OP50, transcurridos los 30 min se lavaron, para ello se colocaron los gusanos en un tubo Eppendorf con 1ml de medio M9, luego se centrifugaron los cuatro tubos a 112 x g y se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur (el procedimiento de lavado se repitió dos veces más). Una vez finalizados los lavados se añadieron 100 µl de azida de sodio 25 mM a cada uno de los tubos con su cepa correspondiente, se incubaron a temperatura ambiente por 20 min; luego se colocaron en un portaobjetos al cual se le agregaron 10 µl de azida de sodio 25 mM, posteriormente se montaron los portaobjetos en el microscopio invertido CKX41 (OLYMPUS®) y se utilizó el software DP Controller para la obtención de las imágenes. Las imágenes fueron tomadas en campo claro con un aumento de 4X y 10X (hasta el comienzo de la etapa de L4 y en etapa de adultos grávidos, respectivamente), y un tiempo de exposición de 1/1300 segundos, la resolución de las imágenes fue de 2040x1536 pixeles y la imagen final fue el resultado de un promedio de 3 imágenes. Este procedimiento se replicó para cada una de las cuatro cepas y por varias ocasiones hasta completar una n=45 (gusanos por cepa para los gusanos en el comienzo de la etapa de L4) y n=30 gusanos por cepa para los adultos grávidos.

Análisis de la tasa de endocitosis

El análisis de la tasa de endocitosis se realizó sincronizando los gusanos con hipoclorito de sodio y dejándolos a una temperatura de 20°C/72 horas, es decir hasta la etapa de adultos.

Las placas para realizar el análisis de la endocitosis se prepararon disolviendo un mililitro de Dil [6mg/ µl] en 3 mililitros de *E. coli* OP50, posteriormente se agregaron 80µl de esta solución y se incubaron a 20°C/24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación de los gusanos, se tomaron 50 gusanos y se colocaron 30 min en una placa con medio NGM sin *E. coli* OP50, después se colocaron en la placa sembrada con 80 µl de *E. coli* OP50-Dil 15°C/15 min. Posteriormente se recuperaron los gusanos en un tubo Eppendorf con un mililitro de M9, se centrifugaron a 2800 x g y se desechó el sobrenadante con una pipeta Pasteur (este procedimiento se repitió dos veces más), luego se agregaron 200µl de azida de sodio 25mM y se incubaron a temperatura ambiente por 20 min. Por último, se montaron en los portaobjetos para observar en el microscopio invertido CKX41 (OLYMPUS®). Para la obtención de las imágenes se utilizó el software DPController. Las imágenes fueron tomadas en epifluorescencia con un aumento 40x y un tiempo de exposición de 1/3 seg, la resolución de las imágenes fue de 2040x1536 pixeles y la imagen final fue el resultado de un promedio de 3 imágenes. Este procedimiento se replicó varias veces con cada una de las cepas hasta completar una n = 30 gusanos por cepa.

Evaluación morfológica de la probóscide mediante microscopía electrónica de barrido

Se sincronizaron gusanos de las cepas N2 y ATM-6 con hipoclorito de sodio y se dejaron a 20°C/96 h. Posteriormente se tomaron 100 gusanos de cada cepa y se colocaron por 1 h en cuatro placas (50 gusanos por placa), con medio de cultivo NGM sin *E. coli* OP50, se colocaron los gusanos de cada cepa en un tubo Eppendorf con 1 ml de M9, se centrifugaron a 112 x g y se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur (el procedimiento de lavado se repitió dos veces más). Una vez finalizados los lavados se

agregaron 300 µl de glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos al 0.2M y se incubaron a 4°C/4 h. Se realizó un lavado con buffer de cacodilatos por 15 min y se centrifugó a 112 x g (este procedimiento se repitió dos veces más). Una vez terminados los lavados se añadieron 300 µl de tetraóxido de osmio al 1%, se incubó a 4°C/ 1h. Posteriormente se realizaron dos lavados con buffer de cacodilatos por 15 min y se centrifugó a 112 x g. Finalizados los lavados se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (10%, 20%...70%,100%), para lo cual se agregaron 300µl del alcohol correspondiente, se incubó a 4°C/ 15 min y se centrifugó a 112 x g (este procedimiento se repitió dos veces con la misma concentración de alcohol), las muestras se montaron sobre cinta de carbón de doble cara adhesiva y colocaron en el secador CDP 300 (LEICA®), en el que se realizó el secado a punto crítico para después colocarlas en el recubridor DESK II (DENTON VACCUM®), en el cual se recubrieron con oro, luego se colocaron las muestras sobre el revolver del microscopio EVO-50 (ZEISS®), por último con el software SmartSEM (ZEISS®), se capturaron las imágenes en alto vacío, con una distancia de trabajo de 4 mm en N2 y 3.5 mm en ATM-6.

Análisis de la ovoposición

Los ensayos de puesta de huevos se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Korb, (2010). Para ello se sincronizaron gusanos y se dejaron a 20°C/70 h, posteriormente se tomaron 60 gusanos en L4, se colocaron en una placa con medio NGM y *E. coli* OP50 y se incubaron a 20°C/24 h, se colocaron 10 gusanos adultos en una placa con medio NGM y *E. coli* OP50, se incubaron a 20°C/8 h. Se retiraron los gusanos y se realizó el conteo de huevos en el estereoscopio SZX7 (OLYMPUS®). Este procedimiento se realizó utilizando 10 gusanos por placa y 5 placas por ensayo para cada cepa. El ensayo se repitió 5 veces, obteniéndose una n=250 gusanos por cepa.

Análisis del movimiento

El análisis del movimiento se realizó con 60 nematodos adultos previamente sincronizados de cada una de las cepas. Éstos se colocaron por 30 min en una placa con medio NGM sin *E. coli* OP50, posteriormente se tomaron 5 gusanos y se colocaron en otra placa con medio NGM sin *E. coli* OP50 y con un aro de cobre de 1 cm de diámetro,

se les permitió que se habituaran por 5 min, se registró el movimiento durante 1 min y por último se les dejó en habituación post registro por 30 seg. Este procedimiento se repitió de manera similar para todas las cepas hasta completar una n=20 individuos por cepa. Los videos se tomaron con la cámara PCO® Edge 4.2 m, y un rastreador múltiple de gusanos a 10 fps, luego se analizaron con el software Wormlab3.1.

El análisis de los coleteos se realizó con 80 nematodos adultos previamente sincronizados de cada una de las cepas. Estos se colocaron por 30 min en una placa con medio NGM sin *E. coli* OP50, posteriormente se agregaron 350 µl de Buffer M9 en cada uno de los pocillos de la placa de 96 pocillos, se colocó 1 gusano en cada pocillo y se les permitió que se habituaran por 5 min, se registraron los coleteos durante 1 min, por último, se les dejó en habituación post registro por 30 seg. Este procedimiento se repitió de manera similar para todas las cepas hasta completar una n=60 individuos por cepa. Los videos se tomaron con la cámara PCO® Edge 4.2 m, y un rastreador múltiple de gusanos a 10 fps.

Análisis del comportamiento social

El análisis del comportamiento social se realizó después de sincronizar los gusanos con hipoclorito de sodio y dejándolos a una temperatura de 20°C/72 h, es decir hasta la etapa de adultos, se tomaron 60 gusanos de cada una de las cepas y se colocaron por 45 min en una placa con medio NGM sin *E. coli* OP50, posteriormente se tomaron 5 gusanos y se colocaron en otra placa con medio NGM sin OP50 y con un aro de cobre de 1 cm de diámetro, se les permitió que se habituaran por 5 min, se registraron durante 10 min, durante los cuales se observaron y registraron los comportamientos: **1. Asociación:** cuando dos o más gusanos convergen en un punto, se unen completamente y siguen una misma dirección durante por al menos tres segundos; **2. Colisión:** cuando dos o más gusanos convergen en un punto, no se unen, o se unen parcialmente y no siguen una misma dirección (Winter et al., 2016). Por último, se les dejó en habituación post registro por 30 seg. Este procedimiento se repitió de manera similar para todas las cepas hasta completar una n=50 individuos por cepa. Los videos se tomaron con la cámara PCO®

Edge 4.2, y un rastreador múltiple de gusanos a 10 fps, luego se analizaron con el software Wormlab3.1.

Análisis de la distribución de lípidos

En primera instancia se sincronizaron las cuatro cepas y se dejaron a 20°C/56 h, es decir, hasta el comienzo de la etapa de L4, posteriormente se dejaron 30 min en una placa con medio NGM, luego se tomaron 100 gusanos por cada cepa y se colocaron otros 30 min en una placa con medio NGM sin *E. coli* OP50, una vez transcurridos los 30 min se realizó un lavado, para ello se colocaron los gusanos en un tubo Eppendorf con 1ml de medio M9, luego se centrifugaron los cuatro tubos a 112 x g y se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur, se repitieron los lavados dos veces más. Una vez finalizados los lavados se le añadieron 100µl de isopropanol al 40% a cada uno de los tubos y se incubaron 3 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 2800 x g y se retiró el sobrenadante. Después, en la obscuridad, se añadieron 600 µl de rojo Nilo [2.3 mM], a cada tubo, se incubaron a temperatura ambiente y con agitación por 2 h. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaron a 2800 x g, se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur, se añadieron 600 µl de M9 y se incubaron a temperatura ambiente y con agitación por 30 min. Posteriormente se centrifugaron a 2800 x g, se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se montaron en portaobjetos para observarse en el microscopio invertido CKX41 (OLYMPUS®). Para la obtención de imágenes se utilizó el software DPController. Las imágenes fueron tomadas con epifluorescencia con el objetivo de 10X y con un tiempo de exposición de 1/8 segundos, la resolución de las imágenes fue de 2040x1536 pixeles y la imagen final fue el resultado de un promedio de 3 imágenes. Este procedimiento se repitió varias ocasiones hasta tener una n=36 gusanos por cepa.

Evaluación farmacológica de la actividad sináptica

Para evaluar la actividad presináptica con aldicarb, se sincronizaron los gusanos y se dejaron a 20°C/56 h, es decir hasta el comienzo de la etapa de L4, posteriormente se tomaron 80 gusanos y se colocaron en dos placas (40 gusanos por placa), con medio de cultivo NGM y *E. coli* OP50 y se incubaron a 20°C/24 horas.

Previo a los ensayos se prepararon placas con medio de cultivo NGM, *E. coli* OP50 y aldicarb, para ello en placas con medio de cultivo NGM, se colocan 37.5 µl de aldicarb 1.0 mM y con ayuda de un asa se distribuyó por toda la placa hasta secar el líquido, posteriormente se agregan 25 µl de *E. coli* OP50 y se esperó a que secan, por último, se incubó a 20°C/24 h.

Transcurridas las 24 h se tomaron 25 gusanos en etapa de adultos jóvenes y se colocaron en una placa de NGM con aldicarb, y en el estereoscopio SZX7 (OLYMPUS®), se registró el número de gusanos paralizados cada 15 min por 4 h. Para verificar si los gusanos se habían paralizado se realizó la estimulación de estos con un asa de platino, con la cual se les dio un par de estímulos a manera de presión en la cabeza y en la cola. Este ensayo se realizó en días distintos a la misma hora y se repitió 5 veces por cada cepa obteniendo una n=125 gusanos por cepa.

Para los ensayos de levamisol, se realizó la sincronización de los gusanos con hipoclorito de sodio y se dejaron a 20°C/56 h, es decir hasta el comienzo de la etapa de L4, posteriormente se tomaron 80 gusanos y se colocaron en dos placas (40 gusanos por placa), con medio de cultivo NGM y *E. coli* OP50 y se incubaron a 20°C/24 h.

Para evaluar la actividad postsináptica, primero se prepararon placas con medio de cultivo NGM, *E. coli* OP50 y levamisol. Para ello en placas con medio de cultivo NGM, se colocaron 37.5 µl de levamisol 0.4 mM y con ayuda de un asa se distribuyó por toda la placa hasta que seque el levamisol, posteriormente se agregaron 25 µl de *E. coli* OP50 y se esperó a que secan, por último, se incubaron a 20°C/24 horas.

Una vez transcurridas las 24 h se tomaron 25 gusanos en etapa de adultos jóvenes y se colocaron en la placa con levamisol, y en el estereoscopio SZX7(OLYMPUS®), se registró el número de gusanos paralizados cada 15 min por 4 h como se indica arriba. Este ensayo se realizó en días distintos y se repitió 5 veces por cada cepa obteniendo una n=125 gusanos por cepa.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad-Prism, a los datos se les aplicó la prueba de normalidad de normalidad Shapiro-Wilk, y si se encontraba que los datos se distribuían de manera normal se realizó la prueba de ANOVA de una vía para saber si había diferencias significativas y la prueba *post hoc* de Tukey para determinar entre qué cepas se encontraban esas diferencias. Para los datos que no pasaron la prueba de normalidad se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar si había diferencias significativas y la prueba *post hoc* de Dunn para determinar entre qué cepas se encontraban esas diferencias. Los datos de los ensayos farmacológicos se normalizaron, se ajustaron y se les aplicó la función de Boltzmann para determinar el tiempo medio de parálisis de cada cepa.

Microscopía de epifluorescencia y confocal

Para la obtención de las imágenes, los gusanos se inmovilizaron en una gota de 50 μ l de poliestireno con azida de sodio 25 mM, posteriormente se colocaron en agarosa al 2%. Para observar el patrón de expresión del gen *wdfy-2*, las imágenes se tomaron al microscopio confocal LSM 780 (ZEISS®) con un objetivo plan-Apochromat 10X/0.8 NA 1 mm Korr. Las imágenes fueron procesadas utilizando el software ImageJ.

RESULTADOS

Cambios en la longitud

Para identificar si existen diferencias en la cepa doble mutante de *mctp1*; *wdfy-2*, ATM-6, se tomaron imágenes al microscopio durante el desarrollo larvario y la vida adulta, registrando cualquier anomalía evidente en su anatomía y comportamiento. Se encontró que la doble mutante es más pequeña con respecto a la cepa de referencia N2, así como con respecto a las mutantes ATM-1 y RB2580, por lo que se realizó un análisis más detallado de la longitud de estas cepas en el estado larvario L4 y en la etapa adulta.

La Figura 7a muestra imágenes representativas de las cuatro cepas justo 1 h después de haber entrado a L4. En estas fotografías, tomadas en campo oscuro para mejorar el contraste y tratar de evidenciar modificaciones en el interior del nematodo, es clara la menor longitud de las larvas L4 de ATM-6 (N2 = $730.2 \pm 13.48 \mu\text{m}$ y ATM-6 = $680.4 \pm 20.23 \mu\text{m}$). Inesperadamente, observamos que ATM-1 presentaba una longitud promedio de $780.6 \pm 16.28 \mu\text{m}$ y RB2580 de $780.7 \pm 16.69 \mu\text{m}$; por lo que son ligeramente más largas que N2 (Figura 7b).

Para determinar si esos cambios se mantenían en la vida adulta se analizaron 10 gusanos en ensayos por triplicado. Las observaciones mostraron que la cepa ATM-6 sigue siendo más pequeña en la vida adulta que la cepa de referencia (N2 = $1000 \pm 11.74 \mu\text{m}$ y ATM-6 = $890 \pm 15.27 \mu\text{m}$) (Figura 8a), mientras que ATM-1 y RB2580 alcanzaron una longitud promedio similar a la cepa silvestre (Figura 8b).

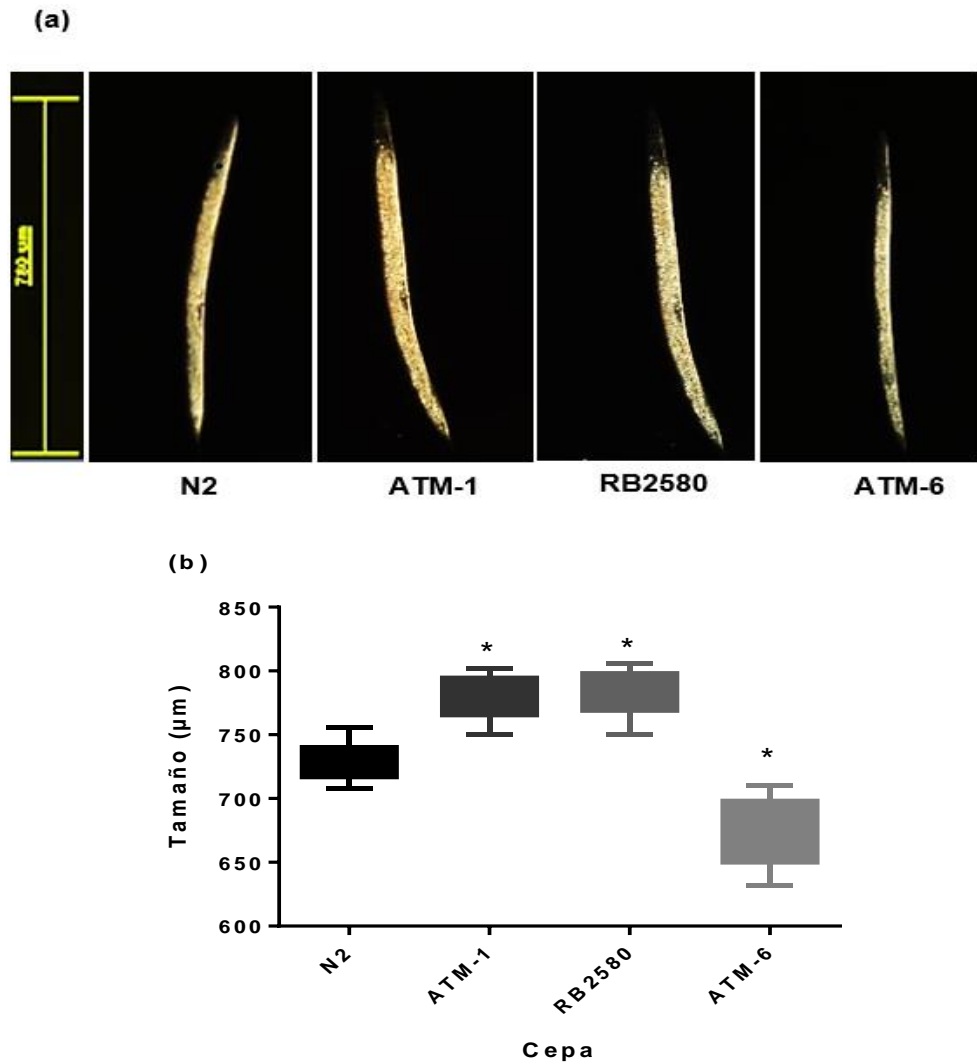


Figura 7: Las mutantes de *mctp-1*, *wdfy-2* y la doble mutante muestran cambios en longitud en el estado larvario L4.

(a). Imágenes tomadas una hora después de que las larvas entraron al estado L4. Es evidente que ATM2 es relativamente más corta que N2 y se aprecia un aumento apenas aparente en la longitud de ATM-1 y RB2580. (b). Longitud promedio de las cepas en estudio y las diferencias significativas con respecto a la cepa de referencia, ATM-1 y RB2580 son más largas y ATM2 más corta. La prueba de Kruskal-Wallis y la prueba *post hoc* de Dunn se realizaron para identificar diferencias entre los grupos. * $p < 0.05$, $n = 45$.

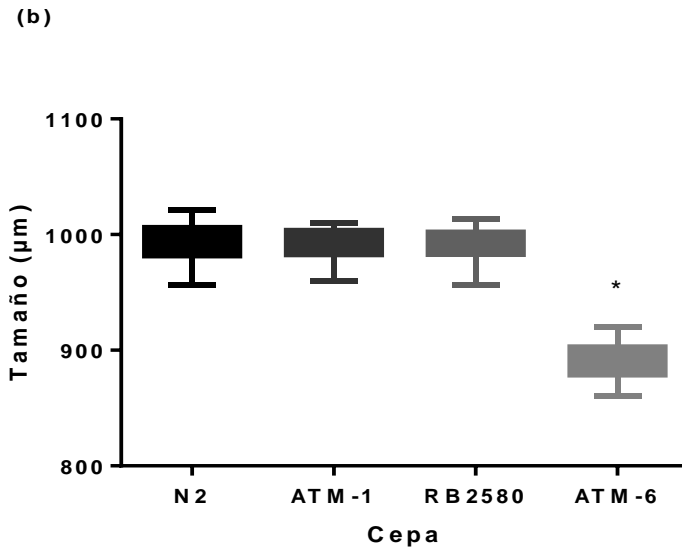
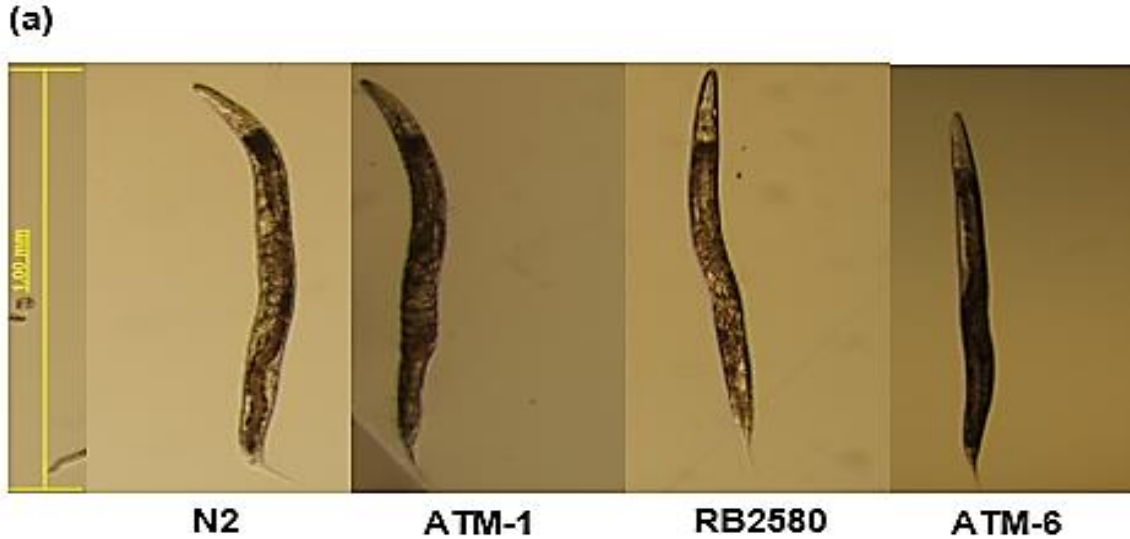


Figura 8: En la vida adulta los mutantes de *mctp-1*, *wdfy-2* tienen un tamaño promedio normal mientras el doble mutante es más corto.

(a). Adultos grávidos en los que es evidente la menor longitud de la cepa ATM-6, mientras que N2, ATM-1 y RB2580 son similares. (b). Longitud promedio de las cepas en estudio. En la vida adulta ATM-6 es más corta que la cepa de referencia, en esta etapa ATM-1 y RB2580 tienen una longitud similar a N2. La prueba de Kruskal-Wallis y la prueba *post hoc* de Dunn se realizaron para identificar diferencias entre los grupos. * $p < 0.05$, $n = 30$.

Estos resultados sugieren que las mutantes sencillas, *mctp-1* (ATM-1) y *wdfy-2* (RB2580) parecen tener un desarrollo más acelerado, al menos en lo que respecta a la longitud de los ejemplares; mientras que la doble mutante (ATM-6) se desarrolla más lentamente y no alcanza la longitud promedio normal de la cepa N2.

Cambios en la tasa de endocitosis

Debido a que encontramos diferencias en la longitud del nematodo, se decidió investigar si la alteración en el desarrollo podría ser consecuencia de una captación anormal de los nutrientes ya que Sneeggen et al (2019) reportaron la ubicación de WDFY-2 en endosomas tempranos y propusieron que esta proteína podría estar implicada en la regulación del tráfico vesicular. Adicionalmente, Scheidel et al (2018), mostraron la localización de WDFY2 en la membrana ciliar de las neuronas anfidas; estas son neuronas quimiosensitivas cuyos somas están localizados alrededor de la faringe y sus dendritas se extienden hacia la sección más anterior del animal en donde terminan formando un cilio el cual queda expuesto al ambiente externo (Figura 9a). Su función es fundamental para la localización de alimento, desarrollo, mecano y quimiosensación (Figura 9b). Nuestros resultados mostraron cambios en el llenado longitudinal total de los procesos neuronales de las anfidas (Figura 9c), lo que concuerda con lo reportado por Sneeggen et al (2019), e indica alteraciones en el proceso de tráfico vesicular en la cepa RB2580 y ATM-6. El porcentaje promedio del llenado de los procesos celulares (Figura 9d) fue de (N2= 68.86 ± 13.50 %, ATM-1= 60.91 ± 8.94 %, RB2580= 41.05 ± 6.39 % y ATM-6= 45.91 ± 10.57 %).

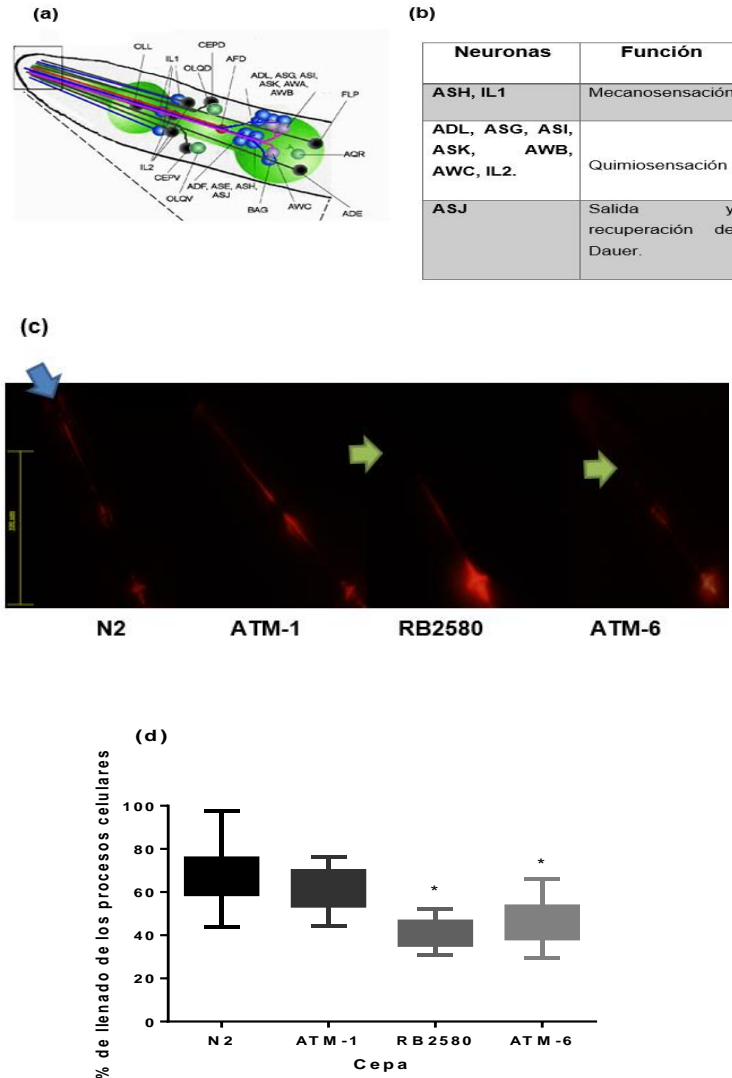


Figura 9: Cambios en la tasa de endocitosis de Dil.

(a). Organización de las neuronas de la anfile, se esquematiza la region anterior del gusano con los núcleos y las proyecciones de los distintos tipos de neuronas (Evans et al., 2006). (b). Función de las neuronas que aparecen en (a) y que se observan con la tinción de Dil. (c). Imagen al microscopio de epifluorescencia. Las imágenes fueron tomadas en la etapa adulta, la flecha azul indica la region anterior del nematodo. Se aprecian cambios en el llenado longitudinal con Dil (fluorescencia en rojo) de los procesos celulares de las neuronas de la anfile. La mutación del gen *mctp-1* en la cepa ATM-1 no genera cambios significativos en el llenado de los procesos celulares de la probóscide. Sin embargo, la mutación del gen *wdfy-2* en la cepa RB2580 y el doble mutante (ATM-6) sí generan una reducción en el llenado de dichos procesos evidentes por zonas

oscuras que son señalados con flechas verdes **(d)**. ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey se realizaron para identificar diferencias entre los grupos. * $p < 0.05$, $n = 30$.

Evaluación morfológica de la probóscide

Debido a que encontramos diferencias en la longitud del nematodo y el llenado de los procesos celulares, se decidió determinar si existía algún correlato anatómico que permitiera explicar ambos hallazgos. Por ello se realizó la evaluación morfológica de la probóscide de las cepas N2 y ATM-6, ya que en esta estructura proyectan neuronas de la anfile que participan en el desarrollo del nematodo mediante la modulación de la vía TGF- β (Tuck, 2014), por lo que si la probóscide presentaba alteraciones morfológicas podríamos inferir que eran consecuencia de alteraciones en las neuronas de la anfile, lo que contrastaría con los defectos del desarrollo y el llenado de sus procesos celulares observados.

Nuestros resultados no revelaron alteraciones morfológicas aparentes en las estructuras que conforman la probóscide (Figura 10), por lo que es posible suponer que estas alteraciones sólo tienen un correlato funcional como consecuencia de eventos a nivel molecular.

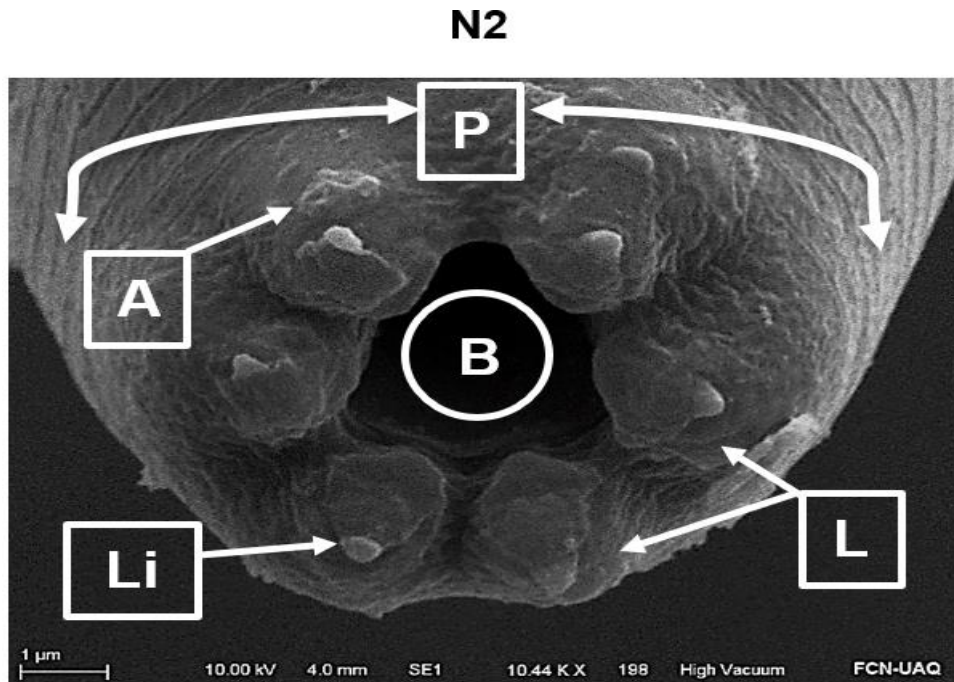


Figura 10: Las mutaciones de los genes *mctp-1* y *wdfy-2* no generan alteraciones morfológicas de la probóscide.

El análisis por SEM no reveló cambios morfológicos en la probóscide (P), en el número y simetría de los labios (L), en la parte interna de los labios (Li), o en las en las anafides (A). n=10.

Cambios en la locomoción, longitud de onda y el número de coleteos

Con el propósito de analizar la biomecánica del desplazamiento de *C. elegans*, se evaluaron varios movimientos estereotipados y las velocidades promedio de desplazamiento en medio sólido de cada una de las cepas. En nuestros estudios no se observaron cambios en la formación de omegas y movimientos en reversa durante el desplazamiento. Sin embargo, observamos que, en la vida adulta, el doble mutante ATM-6 se desplaza más lentamente que la cepa silvestre N2 (N2 = $102.1 \pm 16.15 \mu\text{m/s}$ y ATM-6 = $87.4 \pm 11.38 \mu\text{m/s}$ * $p < 0.005$ n = 20). Este resultado es consistente con el hallazgo de que ATM-6 es alrededor del 10 % más pequeño que N2, una relación aproximada a la disminución de su velocidad. Inesperadamente, las mutantes sencillas resultaron ser también más lentos que N2 ya que ATM-1 se desplazó a $80.90 \pm 19.39 \mu\text{m/s}$ y RB2580 a $81.63 \pm 21.34 \mu\text{m/s}$ (Figura 11a), lo que sugiere que la disminución en la velocidad no se debe al cambio de longitud sino a diferencias en la actividad motora.

Por otro lado, el análisis de la longitud de onda del cuerpo del nematodo no arrojó diferencias significativas (N2 = $174.9 \pm 24.7 \mu\text{m}$, ATM-1= $172.4 \pm 20.36 \mu\text{m}$, RB2580 = $167.0 \pm 16.32 \mu\text{m}$ y ATM-6 = $181.1 \pm 16.26\mu\text{m}$) (Figura 11b). No obstante, al analizar los coleteos en medio líquido, se observó una disminución en las cepas ATM-1, RB2580 y ATM-6 respecto a la cepa control. Curiosamente la cepa doble mutante presentó un ligero incremento en el número de coleteos respecto a las cepas mutantes simples (Figura 11c). El promedio de coleteos por cepa fue de N2 = 109.4 ± 13.72 , ATM-1= 89.98 ± 9.34 , RB2580 = 88.75 ± 10.44 y ATM-6 = 93.67 ± 8.91 .

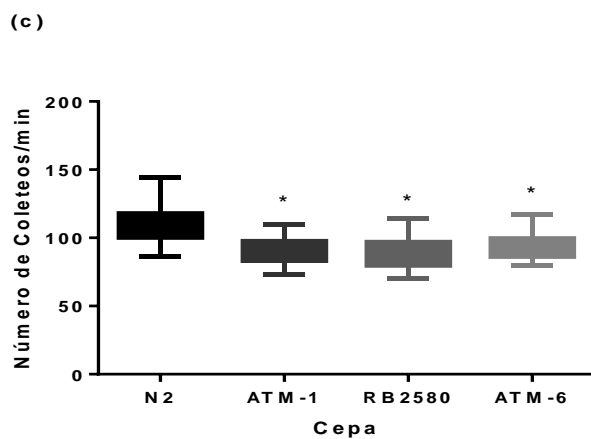
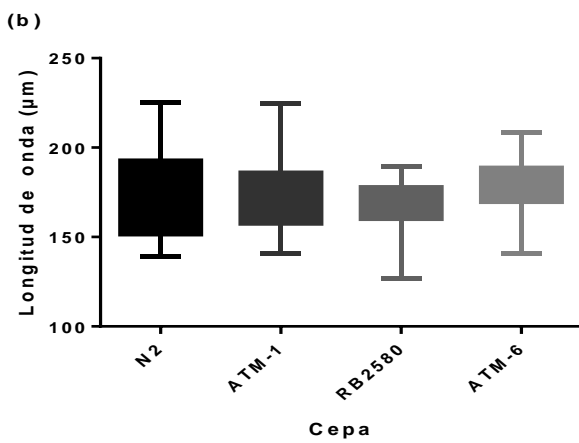
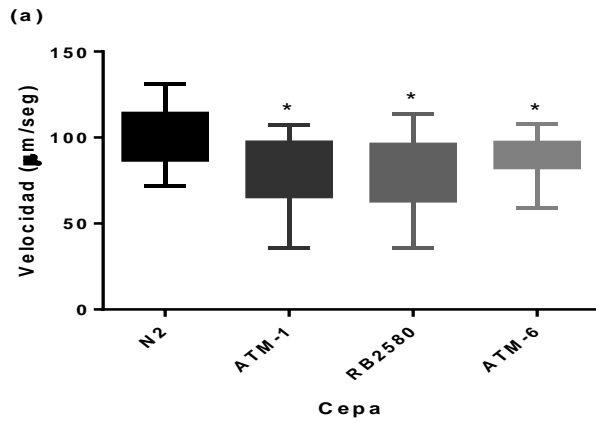


Figura 11: Las mutantes simples y la doble mutante se desplazan más lentamente, no exhiben cambios en la longitud de la onda, pero si en el número de coiletos.

(a). Velocidad promedio de las cepas en estudio. En la vida adulta las cepas ATM-1, RB2580 y

ATM-6 presentan una velocidad de desplazamiento menor que la cepa de referencia. **(b)**. Longitud de onda promedio de las cepas en estudio, no se detectaron diferencias en la longitud de la onda entre las cepas. **(c)** Promedio de coleteos en medio líquido de las cepas en estudio. En la vida adulta las cepas ATM-1, RB2580 y ATM-6 presentan un número menor de coleteos que la cepa de referencia. ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey se realizaron para identificar diferencias entre los grupos. * $p < 0.005$, $n = 20$ (velocidad y longitud de onda), $n = 60$ (número de coleteos).

Cambios en la tasa de ovoposición

Las observaciones previas mostraron que ATM-1 y RB2580 parecen alcanzar una longitud mayor que N2 en L4, por el contrario, ATM-6 no alcanza la longitud normal de la cepa de referencia. Esto sugería que podría haber cambios en la reproducción de las cepas mutantes, por lo que se evaluó la tasa de ovoposición, la cual depende tanto del estado del desarrollo del nematodo como del funcionamiento correcto de la transmisión sináptica.

Para ello, se observaron y cuantificaron los huevos depositados, en los cuales no se encontró evidencia de muerte prematura, y se registraron los siguientes resultados de la tasa de ovoposición: cepa de referencia N2 = 90.48 ± 13.20 huevos, ATM-1 = 74.24 ± 15.69 huevos, RB2580 = 142.3 ± 19.21 huevos y ATM-6 = 61.24 ± 17.08 huevos (Figura 12). La gráfica ilustra que los mutantes de un solo gen muestran resultados opuestos, mientras que ATM-1 disminuye la tasa de ovoposición, RB2580 la incrementa (* $p < 0.05$). Por su parte, la doble mutante ATM-6 disminuyó sustancialmente la tasa de ovoposición, la cual fue aún menor que la de ATM-1.

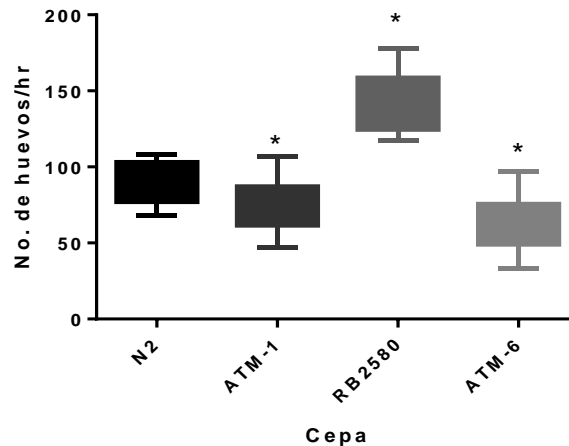


Figura 12: Cambios en la tasa de ovoposición.

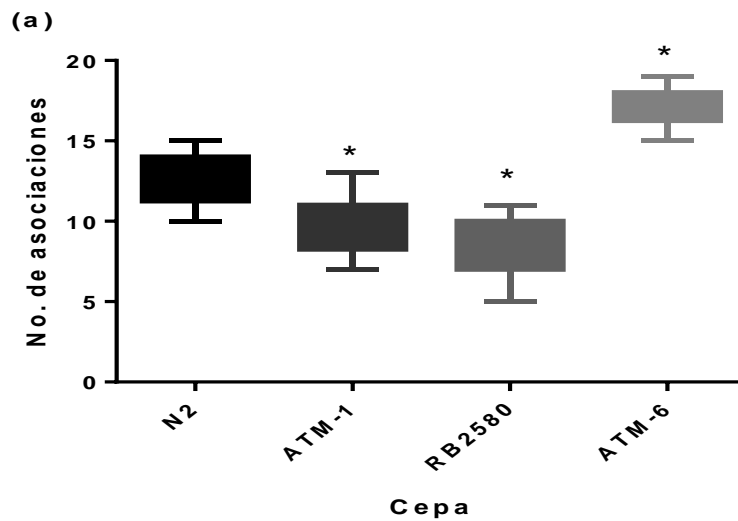
En contraste con la cepa de referencia N2, cada una de las cepas mutantes mostró diferencias en la tasa de ovoposición: ATM-1 disminuyó el número de huevos, contrario a RB2580, en la cual aumentó. El doble mutante ATM-6 también disminuyó la tasa de ovoposición. ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey se realizaron para identificar diferencias entre los grupos. * $p < 0.05$, $n = 250$.

Cambios en el comportamiento social

Como se mencionó previamente, para determinar si existen diferencias aparentes en la doble mutante ATM-6 se tomaron imágenes al microscopio durante el desarrollo larvario y la vida adulta, registrando cualquier anomalía evidente en su anatomía y comportamiento. La segunda evidencia de un cambio fue la frecuente convergencia en las trayectorias de desplazamiento, las cuales definimos como **asociaciones**, cuando dos o más gusanos convergen en un punto, se unen completamente y siguen una misma dirección por al menos tres segundos o **colisiones**, cuando dos o más gusanos convergen en un punto, no se unen, o se unen parcialmente y no siguen una misma dirección (Winter et al., 2016).

La Figura 13a, muestra que los mutantes de un solo gen, ATM-1 y RB2580, disminuyen significativamente el número de asociaciones en el periodo de tiempo registrado, mientras que el doble mutante lo incrementa significativamente ($N2 = 12.75 \pm 6.82$

asociaciones, ATM-1 = 9.75 ± 9.09 asociaciones, RB2580 = 8.37 ± 9.96 asociaciones y ATM-6 = 17.13 ± 4.64 asociaciones). De manera concordante, el tiempo promedio de duración de las asociaciones disminuyó para ATM-1 y RB2580 y se incrementó para ATM-6. (N2 = 77.50 ± 21.88 s, ATM-1 = 59.75 ± 14.50 s, RB2580 = 40.63 ± 13.0 s y ATM-6 = 119.40 ± 31.63 s) (Figura 13b). Esto muestra que en los mutantes de un solo gen no solo disminuyen el número de asociaciones, sino que también el tiempo en el que se mantienen se reduce; al contrario, en la doble mutante las asociaciones son más frecuentes y perduran por más tiempo.



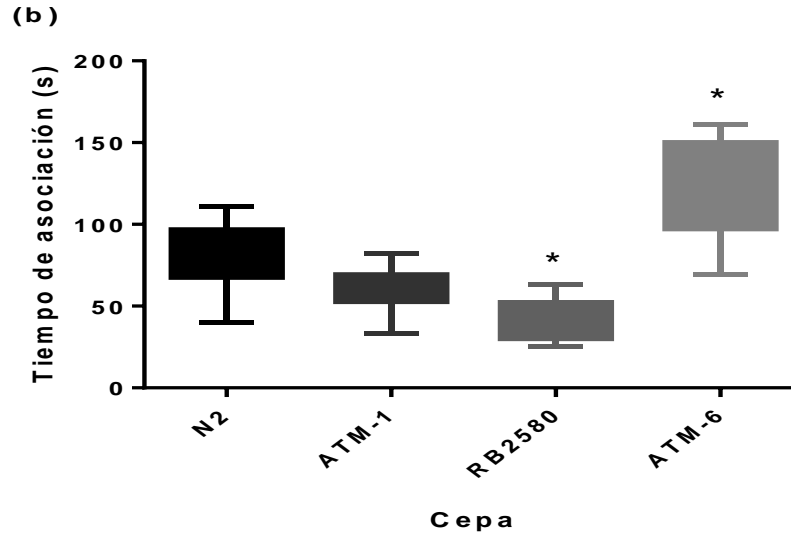
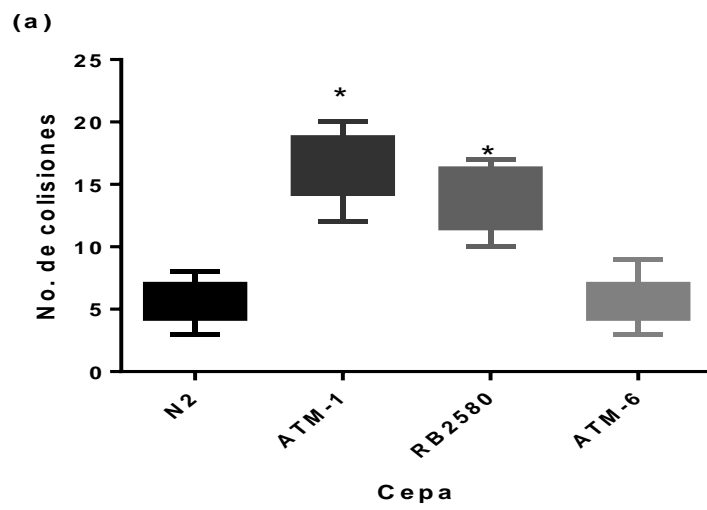


Figura 13: Cambios en el número y el tiempo de las asociaciones.

(a) ATM-1 y RB2580 disminuyen el número y duración de las asociaciones (b), mientras que el doble mutante ATM-6 lo incrementa. ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey se realizaron para identificar diferencias entre los grupos. * $p < 0.05$, $n = 50$.

Por otro lado, el número de colisiones registradas aumentaron en los mutantes de un solo gen, mientras que en el doble mutante ATM-6 se mantuvieron igual que en la cepa de referencia N2. (N2 = 5.87 ± 7.21 colisiones, ATM-1 = 16.38 ± 6.69 colisiones, RB2580 = 13.75 ± 4.93 colisiones y ATM-6 = 5.87 ± 8.88 colisiones) (Figura 14a). Finalmente, el tiempo promedio de duración de las colisiones disminuyó significativamente en los mutantes de un solo gen, pero el cambio en la disminución fue más dramático en el doble mutante (N2 = 53.25 ± 12.04 s, ATM-1 = 36.63 ± 5.73 s, RB2580 = 37.38 ± 6.96 s y ATM-6 = 13.13 ± 5.96 s) (Figura 14b).



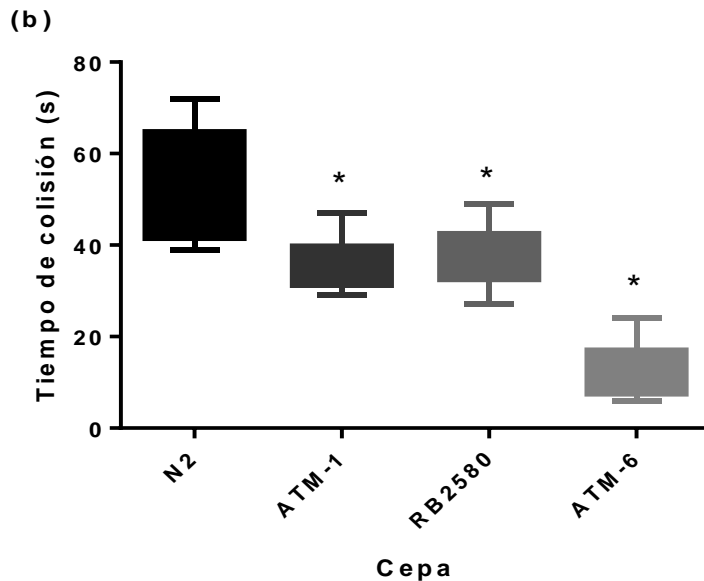


Figura 14: Cambios en el número y el tiempo de las colisiones.

(a) Incremento en el número de colisiones en las mutantes simples (b). Disminución en el tiempo de duración de las colisiones en las mutantes simples y la doble mutante. ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey se realizaron para identificar diferencias entre los grupos. * $p < 0.05$, $n = 50$.

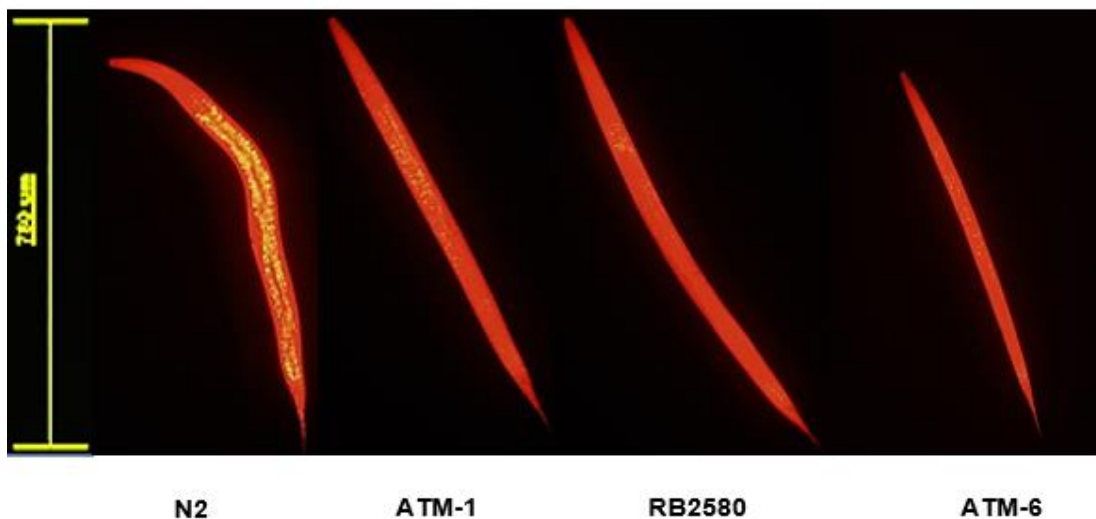
Cambios en la distribución de rojo Nilo

Como se explicó en la sección de antecedentes, algunas evidencias indican que MCTP-1 puede jugar un papel en la generación de gotas de lípidos en *C. elegans* (Joshi et al., 2018). Aunque la evidencia no es contundente, decidimos evaluar si existen diferencias en la acumulación de los lípidos en las cepas mutantes mediante el ensayo de integración de rojo Nilo y su análisis por microscopía de epifluorescencia. Este ensayo tiene sus bemoles pues algunos reportes sugieren que el rojo Nilo marca lisosomas o más precisamente organelos similares a lisosomas o LSO (O'Rourke et al., 2009). De cualquier forma, la observación sería interesante pues recientemente se describió la

localización de Mctp en los lisosomas de neuronas de pez cebra *in vivo* y en células HEK 293 (Espino-Saldaña et al., 2020).

En la cepa silvestre N2 se logró observar la acumulación de rojo Nilo a lo largo del conducto intestinal del gusano. Los cúmulos se evidencian como vesículas amarillas ya que el colorante incrementa su fluorescencia en este color cuando se encuentra en un ambiente hidrofóbico. En las tres cepas mutadas se observó claramente una disminución en la fluorescencia amarilla (Figura 15a), y para analizarlas cuantitativamente se determinó el área que ocupa esta fluorescencia en pixeles. N2 = $56,325 \pm 5,323$, ATM-1 = $32,033 \pm 7,423$, RB2580 = $25,543 \pm 6,067$ y ATM-6 = $23,229 \pm 6,408$. Además, la densidad óptica integrada arrojó resultados similares: N2 = $7.035e+006 \pm 650,459$, ATM-1 = $3.277e+006 \pm 761,912$, RB2580 = $2.475e+006 \pm 594,343$ y ATM-6 = $2.433e+006 \pm 608,372$ (Figuras 15b y c).

(a)



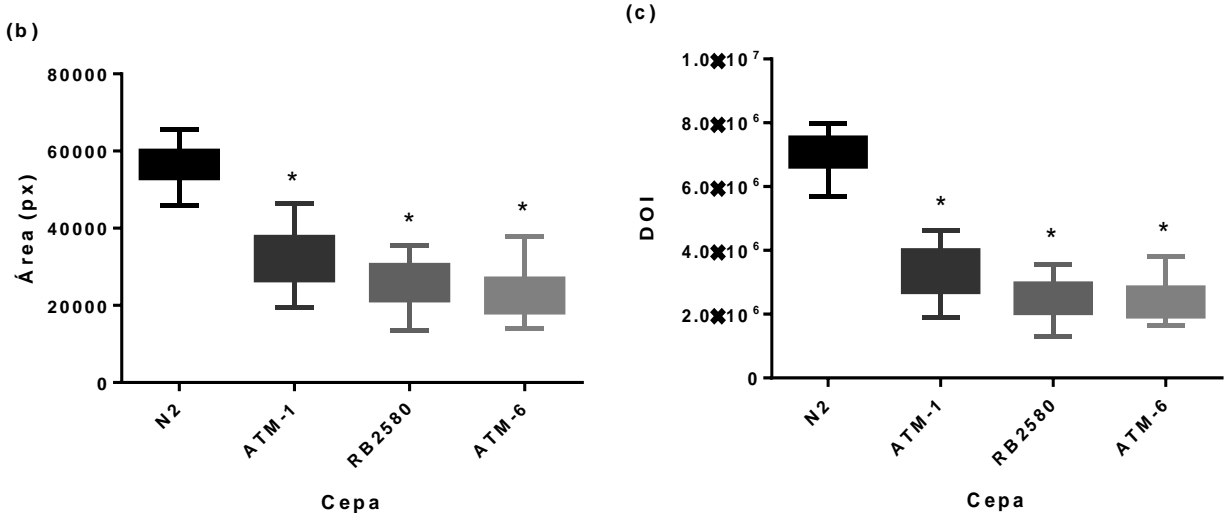


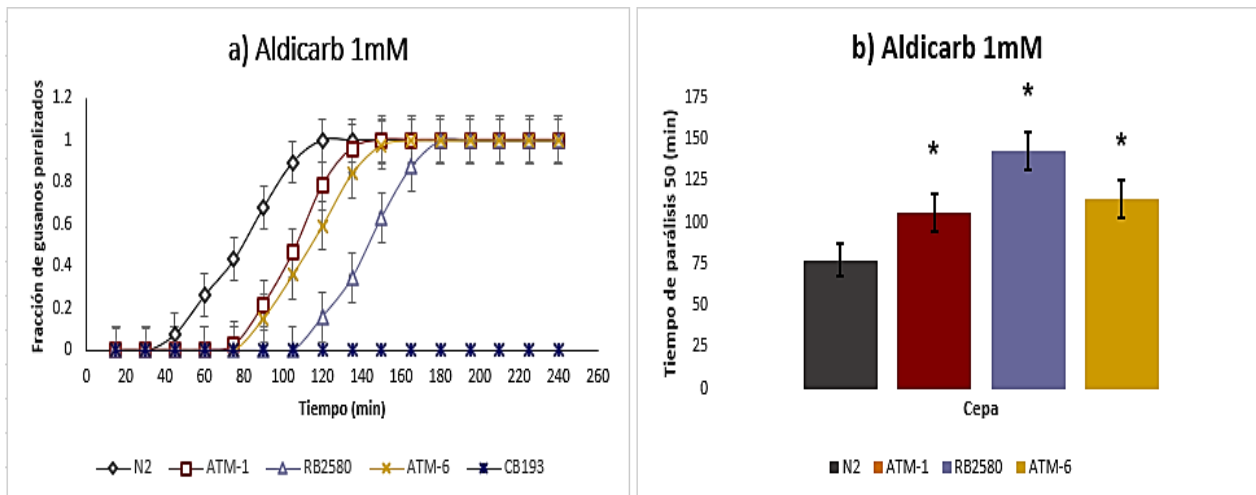
Figura 15: Cambios en la distribución de fluorescencia de rojo Nilo.

(a). Distribución de los lípidos en las cuatro cepas en etapa de L4 (una hora). (b). La delección del gen *mctp-1* en la cepa ATM-1, la mutación del gen *wdfy-2* en la cepa RB2580 y el producto de la cruce de estas dos cepas (ATM-6) inducen cambios en la distribución de los lípidos. (c). Disminución de la concentración de los lípidos en las cuatro cepas en etapa de L4 (una hora). * $p < 0.05$, $n = 36$.

Resistencia a aldicarb y levamisol

Con el propósito de evaluar los efectos en la actividad presináptica y postsináptica, se evaluó la resistencia a aldicarb levamisol, respectivamente. En la primera parte (Figura 16a y b), y consistente con estudios previos, se encontró que en ATM-1 el tiempo para llegar al 50% de animales paralizados es significativamente mayor que en la cepa de referencia ($N2 = 77.31 \pm 10.15$ min, $ATM-1 = 105.8 \pm 11.58$ min). La mutante de *wdfy-2* (RB2580) demoró 142.9 ± 11.61 min, en llegar al 50 % de animales paralizados, por lo que es menos sensible que la mutante *mctp-1*. Por su parte, la doble mutante ATM-6 (113.6 ± 10.53 min), se comporta de manera similar a ATM-1. Esto indica que WDFY-2 parece jugar un papel en el control de la liberación de neurotransmisor, pero el problema inducido en su ausencia en la cepa RB2580 se compensa parcialmente al no estar presente MCTP-1.

La evaluación de la función postsináptica por la resistencia a levamisol mostró que el mutante de *mctp-1* (ATM-1) tiene una ligera tendencia a paralizarse más lentamente pero no es estadísticamente significativo (N2 = 75.16 ± 10.02 min, ATM-1 = 90.51 ± 9.68 min), lo que descarta su papel en la postsinapsis (Figura 16 c y d). Por otro lado, el mutante de *wdfy-2* (RB2580), y el doble mutante ATM-6 muestran tendencias similares en su resistencia al levamisol que indican cierto efecto que no es acumulativo en su susceptibilidad al fármaco (RB2580 = 125.1 ± 11.68 min y ATM-6 = 122.4 ± 11.04 min, n=125), sugiriendo su papel en la postsinapsis. El papel postsináptico de WDFY2 fue inesperado ya que el papel de distribución sugerido por la expresión de su promotor sugiere una distribución principalmente neuronal, aunque existe la posibilidad de que se requieran más elementos del promotor que dirijan fielmente su expresión o bien se produzca a bajos niveles en el músculo.



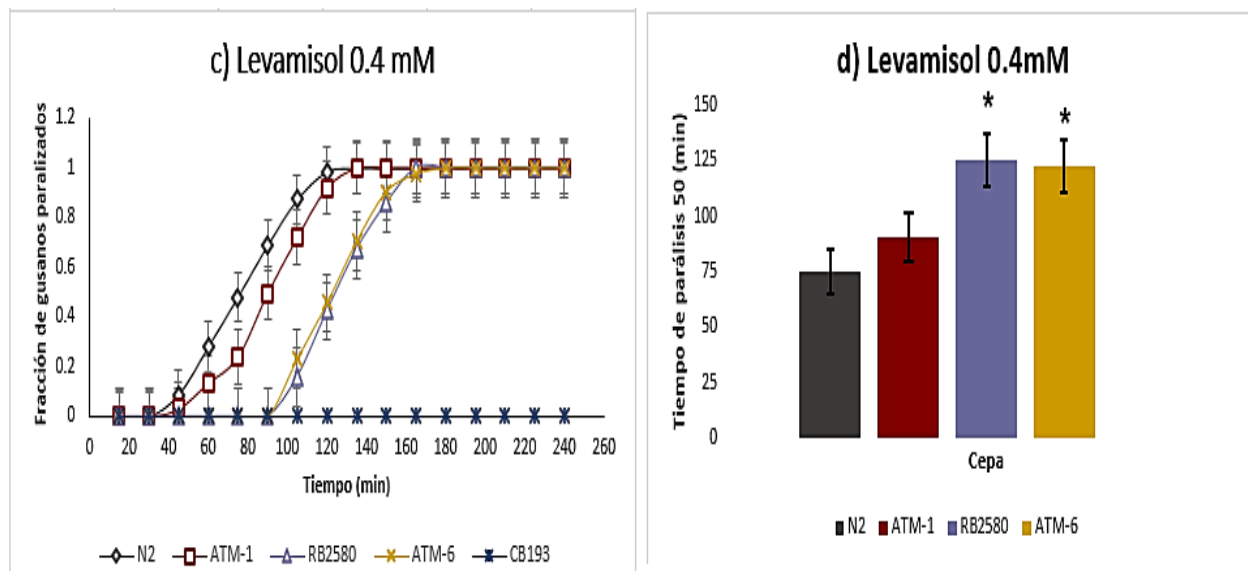


Figura 16: Cambios en la susceptibilidad a aldicarb y levamisol.

(a). Las cepas mutantes son resistentes al aldicarb. **(b),** La cepa RB2580 presentó mayor resistencia al aldicarb. **(c).** Las cepas RB2580 y ATM-6 son resistentes al levamisol. **(d).** Entre las cepas RB2580 y ATM-6 no se encontraron diferencias significativas en resistencia a levamisol. * $p < 0.05$, $n = 125$.

DISCUSIÓN

El presente proyecto se realizó con el propósito investigar y describir si las mutaciones individuales o combinadas de los genes *mctp-1* y *wdfy-2* de *C. elegans* generan cambios morfológicos o funcionales en la transmisión sináptica. Previamente se obtuvo evidencia que mostró que los promotores tanto de *mctp-1b* (Télez-Arreola et al., 2020), como de *wdfy-2* (Figura 5), dirigen la expresión del reportero GFP en el sistema nervioso de *C. elegans*. Pese a que no proveemos evidencias sobre la función celular y/o molecular de *mctp-1* y *wdfy-2*, logramos determinar que las mutaciones de estos genes de manera individual y en conjunto conducen a alteraciones en la función sináptica y a modificaciones en diversos comportamientos del nematodo. Estos efectos se pueden

explicar por un fenómeno de epistasis, como se discutirán en los siguientes párrafos.

El primer abordaje experimental evidenció que en el estado larvario L4 la cepa doble mutante (ATM-6) es más pequeña con respecto a la cepa silvestre (N2), mientras que las mutantes ATM-1 y RB2580 mostraron mayor longitud que la silvestre. Sin embargo, en la vida adulta se encontró que únicamente la cepa ATM-6 presentó una longitud menor a la cepa N2 y que las cepas ATM-1 y RB2580 presentaron una longitud normal. Por ello es posible deducir que los genes *mctp-1* y *wdfy-2* desempeñan funciones en el desarrollo del nematodo, ya que de manera individual o conjunta las mutantes muestran crecimiento reducido o asincrónico con respecto a la cepa control. Estas alteraciones pueden ser consecuencia de alteraciones en la vía TGF- β , ya que se ha reportado que mutaciones en componentes de esta vía genera cambios en el tamaño de los nematodos debido a un desarrollo postembrionario reducido, por lo que a pesar de tener el mismo número de células que las cepas silvestres, el tamaño de las células en las mutantes es menor y no alcanzan el tamaño promedio normal (Savage-Dunn et al., 2003).

Es posible explicar las diferencias en los fenotipos de las mutantes simples y la doble mutante en términos de epistasis entre los genes *mctp-1* y *wdfy-2*. Así, la pérdida de la función ocasionada por la mutación en *mctp-1* en la cepa ATM-1 es, al menos parcialmente, compensada por el gen *wdfy-2* mientras que en la cepa RB2580 ocurriría el fenómeno complementario. Sin embargo, en la cepa ATM-6 al estar mutados ambos genes su función individual no puede ser compensada ocasionando un desarrollo anormal.

Por otra parte, se ha reportado que mutantes con defectos en la alimentación causados por alteraciones en la anatomía de la faringe, una tasa de bombeo reducida o deficiente y una absorción ineficiente de nutrientes por defectos en la endocitosis presentan una disminución en la longitud corporal y el almacenamiento de lípidos (Mörck & Pilon, 2006). Asimismo, se ha propuesto que WDFY-2 participa en procesos de tráfico vesicular incluyendo los procesos de endocitosis y exocitosis (Sneeggen et al., 2019), por lo que decidimos explorar si las cepas presentaban cambios en la tasa de endocitosis ya que, de ser así, podríamos atribuir los defectos en el desarrollo a alteraciones en el proceso de endocitosis. Nuestros resultados mostraron una disminución en el llenado longitudinal

de las neuronas anfidas en las cepas RB2580 y ATM-6, mientras que la cepa ATM-1 no presentó cambios significativos con respecto a la cepa control. Estos resultados son consistentes con la función repostada de WDFY2 por Sneegen et al. (2019), el proceso de tráfico vesicular, ya que su ausencia en las cepas RB2580 y ATM-6 ocasiono una disminución en el llenado longitudinal de las anfides, lo cual no se observó en la cepa ATM-1 mutante de *mctp-1*. Asimismo, se decidió determinar si además de la alteración funcional existía un correlato anatómico, fue por ello que se evaluó por medio de microscopía electrónica de barrido la morfología de la probóscide de las cepas N2 y ATM-6, basándonos en la premisa de que en esta estructura proyectan neuronas sensoriales ciliadas de la anfile, las cuales modulan el desarrollo del gusano vía TGF- β (Tuck, 2014). Nuestros resultados no mostraron alteraciones morfológicas evidentes en las estructuras que conforman la probóscide, por lo que es posible suponer que los defectos en el desarrollo en la cepa ATM-6 tienen un correlato funcional (disminución en la tasa de endocitosis) que aparentemente no repercute en la morfología de la probóscide.

Posteriormente se decidió explorar la biomecánica del desplazamiento de *C. elegans*, la cual es controlada por neuronas colinérgicas (excitatorias) y GABAérgicas (inhibitorias) distribuidas a lo largo del cordón ventral y que regulan patrones estereotípicos de movimiento del nematodo mediante el equilibrio excitación/inhibición. Decidimos explorar este comportamiento basándonos en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, en los cuales se ha encontrado que la mutante del gen *mctp-1* (ATM-1), presenta alteraciones en la ovoposición, la velocidad del arrastre, el número de coleteos y en la sensibilidad al aldicarb (Télez-Arreola et al., 2020). Por ello que se exploró si las cepas RB2580 y ATM-6 presentaban alteraciones en estos comportamientos. Nuestros resultados mostraron que las cepas mutantes son más lentas y presentan menos coleteos respecto a la cepa N2, como se esperaba, sin embargo, de manera inesperada encontramos que la cepa ATM-6 es más rápida y presenta más coleteos con respecto a las mutantes individuales. Estos resultados sugieren que de alguna manera tanto *mctp-1* como *wdfy-2* participan en la actividad motora y podrían explicarse en términos de la epistasis ya propuesta entre los genes *mctp-1* y *wdfy-2*, ya que en la cepa N2 estos genes podrían participar en una vía que module negativamente la velocidad y la generación de

coleteos del nematodo y en la cual ambos genes se inhiban mutuamente permitiendo la locomoción normal del nematodo, mientras que en las cepas ATM-1 y RB2580 al no estar *mctp-1* ni *wdfy-2* (respectivamente), no se genera la inhibición favoreciendo la expresión del gen que sí está presente ocasionando una disminución en la velocidad de movimiento, entre tanto, en la cepa ATM-6 al estar mutados ambos genes, no hay inhibición ni sobreexpresión, por lo cual la velocidad y el número de coleteos es mayor que en las mutantes simples.

Con base a que encontramos alteraciones en la velocidad de movimiento, se exploró si también se presentaban cambios en la longitud de la onda del cuerpo durante el desplazamiento, en el cual, la transmisión sináptica permanece en constante equilibrio de excitación/inhibición y que al ser alterado incide sobre las características de la onda del cuerpo, particularmente las motoneuronas de la clase B y D, las cuales se ha demostrado que se encargan de mediar el desplazamiento (Gottschling, 2017). Si se alteran las funciones de las motoneuronas de la clase B, se observarían ondas del cuerpo con una longitud reducida (Huang et al., 2008), mientras que si sólo se expresa en las motoneuronas de la clase D, se observaría una contracción corporal prolongada y un menor tiempo de movimiento, así como una descoordinación en el arrastre (Donnelly et al., 2013). En este estudio no se encontraron diferencias en la longitud de la onda del cuerpo, por lo cual se puede inferir que *mctp-1* y *wdfy-2* no están involucrados en la formación y características morfológicas de la onda del cuerpo del nematodo durante el arrastre.

Otro comportamiento que guarda relación con la locomoción es la ovoposición, la cual ocurre a través de un programa motor en el que intervienen células musculares lisas especializadas, cuya contracción abre la vulva y comprime el útero para expulsar los huevos. Existen tres modelos alternativos sobre la relación funcional de las neuronas HSNs y VC (1-6) en la regulación de la ovoposición y en estos tres está involucrada la liberación de acetilcolina y dopamina (Alkema et al., 2005). Se han reportado ciertas mutaciones que causan disminución en la ovoposición u ovoposición hiperactiva por un incremento en la misma (Brundage et al., 1996), los cuales tienen defectos en el desarrollo, en la señalización neuronal o en los músculos involucrados en este proceso

(Gitai et al., 2003). Además, se ha demostrado la existencia de otros factores que regulan la ovoposición, como la regulación por neuronas sensoriales anfidas y fasmidias, las cuales incrementan o disminuyen los patrones motores de la ovoposición conforme a la disponibilidad de alimento (Fenk & de Bono, 2015; Collins et al., 2016). Estas neuronas sensoriales también regulan la función de las motoneuronas HSNs y VC (Zhang et al., 2008; Brewer et al., 2019). Otro factor es el defecto en las espermátidas, los cuales pueden reducir la fertilidad. Entre estos defectos se incluyen aquellos generados por mutaciones en el gen que codifica para la proteína disferlina (*fer-1*), proteína sensora de calcio con un dominio C2 necesaria para la fusión de vesículas (Corbalan-Garcia & Gómez-Fernández, 2014). Se encontró que la mutante sencilla ATM-1 y la doble mutante ATM-6 presentan una menor tasa de ovoposición respecto a la cepa control N2, no así la mutante sencilla RB2580, la cual presentó una tasa de ovoposición aún mayor que la cepa control, por lo cual se sugiere que *mctp-1* y *wdfy-2* participan en el control de la oviposición. Por otra parte, sugerimos que los cambios en la tasa de ovoposición en las cepas mutantes se pueden deber a una epistasis entre los genes *mctp-1* y *wdfy-2*, en la cual *mctp-1* modula positivamente este comportamiento, mientras que *wdfy-2* lo modula negativamente, ya que en la cepa mutante del gen *mctp-1* (ATM-1), se observa una disminución en la tasa de ovoposición, la cual puede ser generada por la pérdida de la función del gen, pero también porque el gen que modula negativamente este comportamiento está presente y es por ello que se observa una disminución en la tasa de ovoposición. Al analizar la cepa RB2580, mutante del gen *wdfy-2* se observa un incremento en la tasa de ovoposición, el cual puede ser por la pérdida de la función del gen, pero también porque el gen que modula positivamente este comportamiento está presente y es por ello que se observa ese incremento en la tasa de ovoposición, por otra parte en la cepa ATM-6 al estar mutados ambos genes, no se encuentra ni el modulador negativo, ni el modulador positivo, por lo que la tasa de ovoposición se ve disminuida.

Otro de los comportamientos que se estudió fue el de agregación ya que, durante el análisis del movimiento de los nematodos, se observó que los nematodos de la cepa ATM-6 tendían a agregarse entre ellos. Cabe señalar que el comportamiento de agregación se encuentra relacionado con la quimiosensación, la locomoción y la ovoposición. En general, los nematodos presentan un comportamiento individual o

solitario, sin embargo, pueden presentar un comportamiento social o de agregación asociado a varios factores, entre los cuales se encuentra variación en el gen *npr-1*, el cual codifica un receptor similar a los receptores de neuropéptido Y (NPY) de vertebrados. Mutaciones en *npr-1* cambian el comportamiento de los nematodos de solitarios a sociales, lo cual indica que NPR-1 actúa suprimiendo el comportamiento social (de Bono & Bargmann, 1998). El comportamiento social también está regulado por los neuromoduladores que se expresan en las neuronas quimiosensitivas ASI que se encuentran en la anfidias, cuya expresión se encuentra regulada por la densidad de población, la disponibilidad de alimento y por la feromona daumona (de Bono, 2003). Asimismo, se ha reportado que mutaciones con pérdida de la función en *daf-7* inducen a los nematodos a cambiar su comportamiento de solitario a social (de Bono, 2003). Nuestros resultados mostraron que las mutantes de un solo gen, ATM-1 y RB2580, disminuyen el número y el tiempo de duración de las asociaciones, mientras que la doble mutante incrementa el número y el tiempo de duración de las asociaciones con respecto a la cepa control. Por otro lado, al analizar el comportamiento de colisión, encontramos una relación inversa entre el número y el tiempo de duración de las colisiones, ya que el primer parámetro aumentó y el segundo disminuyó en los mutantes de un solo gen, mientras que en el doble mutante ATM-6 el número de colisiones fue similar al de la cepa de referencia N2, no así el tiempo de duración de las colisiones, ya que este presentó un decremento de manera significativa. El hecho de no haber encontrado diferencias en el número de colisiones de la cepa ATM-6 con respecto a la cepa control y el haber encontrado una disminución en el tiempo de duración de estas en la misma cepa nos indica que ATM-6 tiende a comportarse de manera social, mientras que las otras cepas presentan un comportamiento solitario. Estos resultados sugieren una posible epistasis entre *mctp-1* y *wdfy-2* de tal manera que en la cepa N2 estos genes participen en vías paralelas, por lo que los nematodos presentan un comportamiento solitario, mientras que en la cepa ATM-1 la pérdida de la función ocasionada por la mutación de *mctp-1* es compensada por el gen *wdfy-2*, por lo que no se presentan alteraciones en el comportamiento. En la cepa RB2580 la pérdida de la función ocasionada por la mutación del gen *wdfy-2* es compensada por *mctp-1* y tampoco se observan alteraciones en el comportamiento, sin embargo, en la cepa ATM-6 al no estar ambos genes la función no

puede ser compensada ocasionando un cambio en el comportamiento pasando de solitario a social.

Debido a que Joshi et al. (2018) reportaron que MCTP-2 está implicada en la biosíntesis de lípidos y que el mutante de *mctp-1* de *C. elegans* presentó una disminución en el número, tamaño y distribución de gotas de lípidos, en este estudio exploramos esta posibilidad. En principio, no encontramos una relación aparente entre la expresión del gen *mctp-1* con los sitios de biosíntesis y distribución de lípidos que están a lo largo del intestino del nematodo. Sin embargo, en nuestro trabajo encontramos una disminución en el número, tamaño, distribución y concentración de los cúmulos lipídicos en las cepas ATM-1, RB2580 y ATM-6. Estos resultados concuerdan al menos con la mutante *mctp-1* con los reportados por Joshi et al. (2018) en los cuales se atribuye que MCTP-2 está implicada en la biosíntesis de lípidos por medio de su dominio RHD. No obstante, la función que desempeña WDFY-2 en este bioproceso es aún desconocida. Estos hallazgos sugieren una epistasis entre *mctp-1* y *wdfy-2* de tal manera que en la cepa N2 ambos genes podrían participar en la biosíntesis, almacenamiento o distribución de lípidos, ya que en la cepa ATM-1 la mutación de *mctp-1* ocasionó alteraciones en estos procesos, al igual que en la cepa RB2580, en la cual las alteraciones fueron más perceptibles. Por otra parte, las alteraciones observadas en la cepa ATM-6 fueron similares a las de la cepa RB2580, lo cual indica que ambos genes participan en este proceso y que *wdfy-2* lo hace en algún punto río arriba de *mctp-1*.

En las figuras 3 y 5 se demuestra que los promotores de *mctp-1b* y *wdfy-2* se expresan en el sistema nervioso del nematodo, por lo que decidimos tratar de dilucidar las posibles implicaciones de las mutaciones de los genes *mctp-1* y *wdfy-2* de manera individual y en conjunto en el sistema nervioso de *C. elegans*, con base en la premisa de que la mutación de *mctp-1* confiere resistencia a aldicarb, pero no a levamisol (Téllez-Arreola et al., 2020). Por ello exploramos la posible implicación funcional que podría tener la mutación de *wdfy-2* y la doble mutación *mctp-1; wdfy-2* en la actividad sináptica. Los resultados con aldicarb mostraron que en ATM-1 el tiempo para llegar al 50% de animales paralizados es mayor que en la cepa control N2, lo cual es consistente con estudios previos. También se encontró que el mutante de *wdfy-2* (RB2580) demoró más tiempo en llegar al 50% de

animales paralizados, mientras que el doble mutante ATM-6 se comporta de manera similar a ATM-1. Por otra parte, los resultados con levamisol mostraron que en la mutante de *mctp-1* el tiempo para llegar al 50% de nematodos paralizados fue ligeramente mayor, pero no estadísticamente significativo que en la cepa control N2, mientras que la mutante de *wdfy-2* (RB2580), y la doble mutante ATM-6 tardaron más tiempo para llegar al 50% de nematodos paralizados y mostraron un comportamiento similar. Esto indica que MCTP-1 participa en procesos de exocitosis, ya que la cepa ATM-1 presentó resistencia al aldicarb, pero no al levamisol, mientras que WDFY-2 parece estar jugando un papel a nivel postsináptico y presináptico. Posiblemente WDFY-2 favorece el tráfico, la inserción o la funcionalidad de los receptores en la membrana, ya que la cepa RB2580 fue resistente tanto a aldicarb como a levamisol.

Por otra parte, encontramos que la cepa ATM-6 en aldicarb se comporta como la cepa ATM-1, mientras que en levamisol como la cepa RB2580. Estos resultados sugieren también una epistasis entre los genes *mctp-1* y *wdfy-2*, en la cual la pérdida de la función ocasionada por la mutación del gen *mctp-1* en la cepa ATM-1 sea compensada por el gen *wdfy-2*, mientras que la pérdida de la función ocasionada por mutación del gen *wdfy-2* en la cepa RB2580 no es compensada por *mctp-1*, sino pareciera que modula negativamente la postsinapsis, Por otra parte, en la cepa ATM-6 al estar mutados ambos genes, no hay compensación, pero tampoco modulación negativa, por lo que presenta una ligera recuperación en su fenotipo.

Estudios realizados en el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular (INB, UNAM) en *D. rerio* mostraron la existencia de cuatro genes distintos de *mctp* en este organismo: *mctp1a*, *mctp1b*, *mctp2a* y *mctp2b*; los cuales codifican para al menos nueve distintas isoformas de las proteínas Mctp. También se determinó que los ARNm de los cuatro genes se encuentran presentes desde los estados embrionarios hasta la edad adulta. Asimismo, se determinó que tres de los cuatro genes identificados presentan splicing alternativo en las regiones ubicadas entre los dominios C2, lo cual sugiere que todas las isoformas podrían ser funcionales. Además, por hibridación *in situ* se determinó que los ARNm codificados por los cuatro genes *mctp* se expresan de manera diferenciada en el sistema nervioso y muscular del pez 24 h post fertilización (Espino-Saldaña et al., 2020).

Esto sugiere que la proteína MCTP puede estar implicada en procesos sinápticos en la unión neuromuscular de vertebrados coordinando la actividad motora. También se ha demostrado que la supresión de la expresión de *Mctp2b* por medio de CRISPR/Cas9 induce modificaciones en el desarrollo larvario del pez y posteriormente su muerte, lo cual sugiere la importancia de esta proteína (Espino-Saldaña et al., 2020). El mecanismo por el cual la supresión de la expresión de este gen induce muerte larvaria en *D. rerio* son desconocidos. De manera concordante, nuestros resultados muestran que *mctp-1* interviene en procesos de crecimiento y posiblemente en la ovogénesis, sin embargo, la delección del gen no es letal en *C. elegans*.

Pese a que no mostramos evidencia de la función celular de MCTP-1 ni de WDFY-2, los ensayos farmacológicos sugieren que ambos participan en la función sináptica, lo cual, al menos en MCTP-1 parece concordar con aquellos realizados en la unión neuromuscular de *D. melanogaster* en la cual la mutación del gen *Mctp* causó un decremento en la amplitud de los potenciales mini postsinápticos excitatorios (mEPSP) debido a una liberación basal de vesículas exocíticas disminuida, además, MCTP fue localizada en retículo endoplásmico y cercana a zonas activas de motoneuronas (Genç et al., 2017), posiblemente relacionados con la disponibilidad de vesículas de liberación facilitada, mediante una vía rápida que permite la recuperación de la membrana y la traslocación rápida de receptores que se activa a bajos niveles de Ca^{2+} , que es independiente del Golgi y necesaria para la plasticidad presináptica (Bernatchez et al., 2009; Lek et al., 2012). Por último, basándonos en nuestros hallazgos, es posible especular que existe una interacción entre MCTP-1 y WDFY-2 en el proceso de tráfico vesicular, la cual se daría como resultado de la convergencia de ambas proteínas en algún organelo celular que incluya fosfatidilinositol en su membrana, dicho organelo podrían ser los endosomas, ya que en él se ha encontrado a ambas proteínas y a que estos se encuentran más cerca de la membrana plasmática, lo cual concuerda con la ubicación de MCTP-1. Con base en los resultados de las pruebas de sensibilidad a aldicarb y levamisol se propone que WDFY-2 se ubicaría en la presinapsis y postsinapsis mientras que MCTP-1 en la presinapsis (Figura 17). La evidencia experimental no define si convergen en procesos endocíticos o exocíticos.

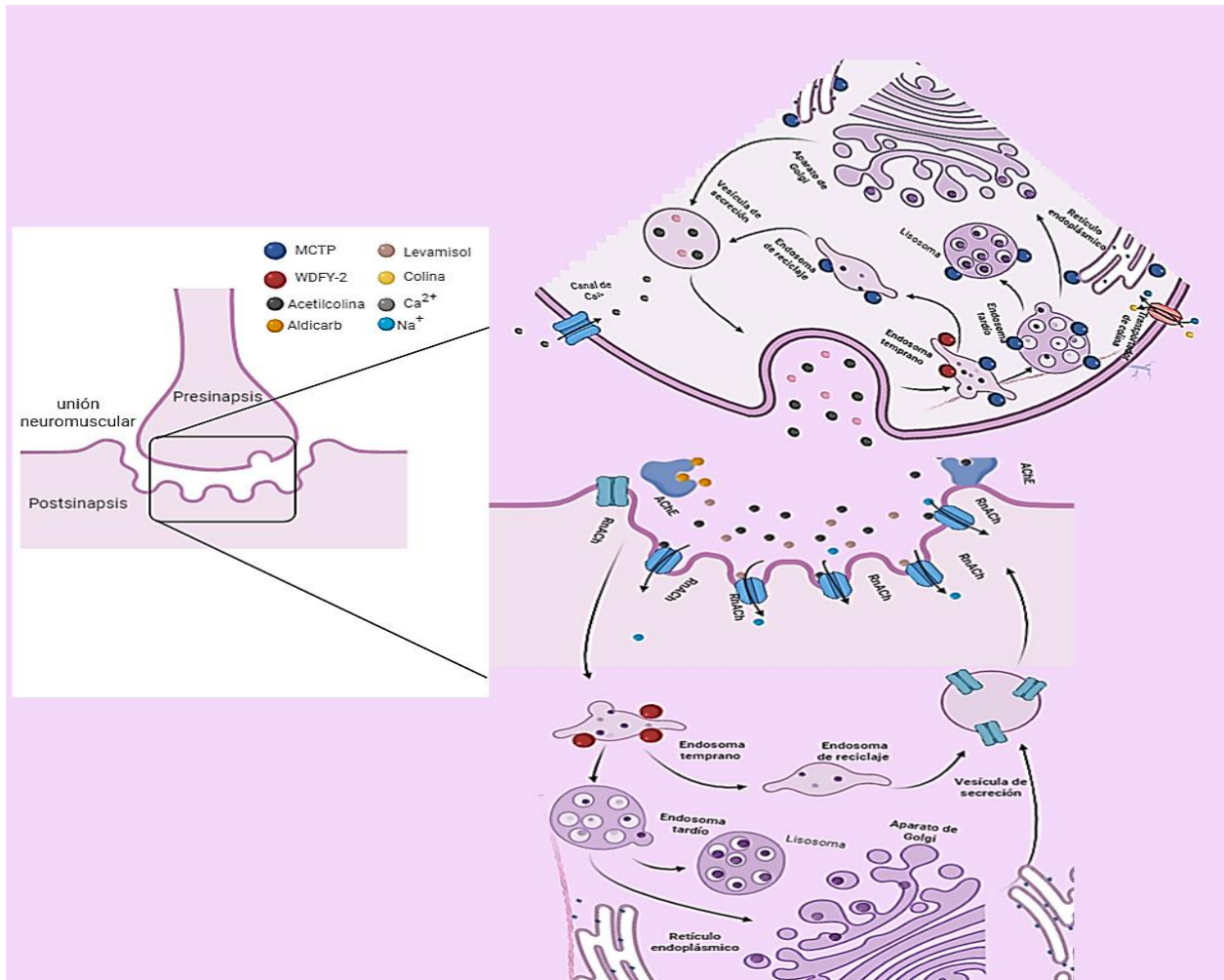


Figura 17: Modelo de la interacción entre MCTP-1 y WDFY-2.

En el modelo se indica la ubicación de la proteína WDFY-2 con esferas rojas y MCTP con esferas azules. En la cepa silvestre N2 MCTP y WDFY-2 están presentes permitiendo el funcionamiento normal de la sinapsis. En ATM-1 no está MCTP ocasionando alteraciones en la presinapsis. En RB2580 no está WDFY-2, ocasionando alteraciones en la presinapsis y postsinapsis. En ATM-6 no se encuentra ninguna de las dos proteínas, por lo que existen alteraciones en la presinapsis y postsinapsis. El modelo supone la colocalización de ambas proteínas en endosomas de la presinápsis, pero no en la postsinápsis.

Finalmente, los hallazgos de este estudio revelan la complejidad genética en la interacción entre *mctp-1* y *wdfy-2*, y la importancia de las interacciones por epistasis. En este proyecto, fue posible comprobar el pleiotropismo de los dos genes, para los cuales se encontraron distintas interacciones entre ellos, así como eventos independientes. Esto es posible debido al contexto celular en el que se expresan, ya que ambos genes se encuentran en neuronas mientras que *wdfy-2* también se podría tener actividad en la postsinapsis.

CONCLUSIONES

La mutación de manera individual y en conjunto de los genes *mctp-1* y *wdfy-2* de *C. elegans*.

- Genera cambios en la longitud del nematodo en la etapa de L4, los cuales en la vida adulta únicamente se reflejan en la cepa ATM-6.
- Disminuye la tasa de endocitosis sin alterar la morfología de la probóscide.
- Genera cambios en la tasa de ovoposición.
- Genera cambios en la velocidad de movimiento, más no en la longitud de la onda.
- Genera cambios en el número de coleteos.
- Genera cambios en el comportamiento de agregación, ya que la cepa ATM-6 pasa de solitaria a social.
- Genera cambios en la distribución de lípidos en las mutantes simples y en la doble mutante.
- *mctp-1* participa en funciones a nivel presináptico mientras que *wdfy-2* a nivel tanto presináptico como postsináptico.

BIBLIOGRAFÍA

Alkema, M. J., Hunter-Ensor, M., Ringstad, N., & Horvitz, H. R. (2005). Tyramine functions independently of octopamine in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Neuron*, 46(2), 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.02.024>

Bernatchez, P. N., Sharma, A., Kodaman, P., & Sessa, W. C. (2009). Myoferlin is critical for endocytosis in endothelial cells. *Am J of Physiol Cell Physiol*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00498.2008>

Boxem, M., Maliga, Z., Klitgord, N., Li, N., Lemmens, I., Mana, M., Vidal, M. (2008). A Protein Domain-Based Interactome Network for *C. elegans* Early Embryogenesis. *Cell*, 134(3), 534–545. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.009>

Brewer, J.C., Nayanarapanicker, C.O., Anilkumar, M.C., Ray, R.K., (2019). Serotonin and neuropeptides are both released by the HSN command neuron to initiate *Caenorhabditis elegans* egg laying. *PloS Genet*. 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007896>

Brundage L., Avery L., Katz A., Kim U.J., Mendel J.E., Sternberg P.W., Simon M.I. (1996). Mutations in a *C. elegans* Gqalpha gene disrupt movement, egg laying, and viability. *Neuron* 16:999 –1009.336:638–646. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80123-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80123-3)

Chapman, E. R. (2002). Synaptotagmin: A Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Bio*, 3(7), 498–508. <https://doi.org/10.1038/nrm85>

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*, 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*; 1838(6): 1536-1547. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.008>

De Bono, M. (2003). Molecular approaches to aggregation behavior and social attachment. *J Neurobiol*, 54(1), 78–92. <https://doi.org/10.1002/neu.10162>

De Bono, M., & Bargmann, C. I. (1998). Natural variation in a neuropeptide Y receptor homolog modifies social behavior and food response in *C. elegans*. *Cell*, 94(5), 679–689. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81609-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81609-8)

Djurovic, S., Gustafsson, O., Mattingsdal, M., Athanasiu, L., Bjella, T., Tesli, M., ... & Andreassen, O. A. (2010). A genome-wide association study of bipolar disorder in Norwegian individuals, followed by replication in Icelandic sample. *J Affective disorders*, 126(1-2), 312-316. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2010.04.007>

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(3), 256–258. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2008.08.007>

Donnelly, J. L., Clark, C.M., Leifer, A. M., Pirri, J. K., Haburcak, M. (2013). Monoaminergic orchestration of motor programs in a complex *C. elegans* behavior. *PLoS Biol*. 11: e1001529. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001529>

Espino-Saldaña, A. E., Durán-Ríos, K., Olivares-Hernandez, E., Rodríguez-Ortiz, L.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>

Evans J.E., Snow J.J., Gunnarson A.L., Ou G., Stahlberg H., McDonald K.L., and Scholey J.M. (2006). Functional modulation of IFT kinesins extends the sensory repertoire of ciliated neurons in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 172, 663–669. <https://doi.org/10.1083/jcb.200509115>

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 USA*, 112 (27) E3525-E3534. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423808112>

Fritzius, T., Burkard, G., Haas, E., Heinrich, J., Schweneker, M., Bosse, M., ... Moelling, K. (2006). A WD-FYVE protein binds to the kinases Akt and PKC ζ/λ . *Biochem J*, 399(1), 9–20. <https://doi.org/10.1042/BJ20060511>

Fritzius, T., Frey, A. D., Schweneker, M., Mayer, D., & Moelling, K. (2007). WD-repeat-propeller-FYVE protein, ProF, binds VAMP2 and protein kinase C ζ . *FEBS J*, 274(6), 1552–1566. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05702>

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>

Gottschling, D. (2017). Locomotion Behavior Is Affected by the G α_s Pathway. *Genetics*, 206(1): 283–297. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.195669/-/DC1.1>

Guillen, J., Ferrer-Orta, C., Buxaderas, M., Perez-Sanchez, D., Guerrero-Valero, M., Luengo-Gil, G., Corbalan-Garcia, S. (2013). Structural insights into the Ca²⁺ and PI (4,5)P₂ binding modes of the C2 domains of rabphilin 3A and synaptotagmin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(51), 20503–20508. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316179110>

Hayakawa, A., Leonard, D., Murphy, S., Hayes, S., Soto, M., Fogarty, K., Standley, C., Bellve, K., Lambright, D., Mello, C., & Corvera, S. (2006). The WD40 and FYVE domain containing protein 2 defines a class of early endosomes necessary for endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(32), 11928–11933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508832103>

Huang, K. M., Cosman, P., and Schafer, W.R. (2008). Automated detection and analysis of foraging behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci Meth*, 171: 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.027>

Korb, J. (2010). Locomotive Activity as an Indicator of Acute Chlorpyrifos Toxicity in *C. elegans*. *WormBook*, 0–1. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.87.1>

Lalani S.R., Ware M.S., Wang X., Zapata G., Tian Q., Franco M.L., Jiang Z., Bucasas K., Scott A.D., Campeau M.P., Hanchard N., Uman L., Cast A., Patel A., Cheung WS., Lebrand C, Corti M, Goodson H, Cosson P. (2013). Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *EMBO J*. 21(6): 1289–1300. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.6.1289>

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(2), 185–194. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01267.x>

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(3), 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00052-5)

Malinow R.A., Ying P., Koorman T., Boxem M., Jin Y., Kim KW. (2019). Functional Dissection of *C. elegans* bZip-Protein CEBP-1 Reveals Novel Structural Motifs Required for Axon Regeneration and Nuclear Import. *Front Cell Neurosci*, 31;13:348.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00348>

Michael W. M. (2016). Cyclin CYB-3 controls both S-phase and mitosis and is asymmetrically distributed in the early *C. elegans* embryo. *Development*. 1;143(17):3119-27. <https://doi.org/10.1242/dev.141226>

Miledi, R. (1973). Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 183(1073), 421–425. <https://doi.org/10.1098/rspb.1973.0026>

Mörck, C., & Pilon, M. (2006). *C. elegans* feeding defective mutants have shorter body lengths and increased autophagy. *BMC Dev Biol*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-39>

Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., & Cerón, J. (2012). Basic *Caenorhabditis elegans* methods: Synchronization and observation. *J Vis Exp*, (64), 1–9. <https://doi.org/10.3791/4019>

Portegijs V., Fielmich L.E., Galli M., Schmidt R., Muñoz J., van Mourik T., Akhmanova A., Heck A.J., Boxem M., van den Heuvel S. (2016). Multisite Phosphorylation of NuMA-Related LIN-5 Controls Mitotic Spindle Positioning in *C. elegans*. *PLoS Genet*, 6;12(10): e1006291. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006291>

Qiu L., Yu H, Liang F. (2015). “Multiple C2 domains transmembrane protein 1 is expressed in CNS neurons and possibly regulates cellular vesicle retrieval and oxidative stress”. *J Neurochem*. Pp.492-507. <https://doi.org/10.1111/jnc.13251>

Sambrook, J. (Cold S. H. L. P., Russell, D., & Press), (Cold Spring Harbour Laboratory. (2001). *A Laboratory Manual*, Volume 1, 2, 3 | Books and Publications - Gate2Biotech.com. Retrieved from <http://www.gate2biotech.com/molecular-cloning-a-laboratory-manual>

Savage-Dunn C., Maduzia L.L., Zimmerman C.M., Roberts A.F., Cohen S., Tokarz R.,

Padgett R.W. (2003). Genetic screen for small body size mutants in *C. elegans* reveals many TGFbeta pathway components. *Genesis*. Apr;35(4):239-47. doi: 10.1002/gene.10184. PMID: 12717735.

Scheidel, N., Kennedy, J., & Blacque, O. E. (2018). Endosome maturation factors Rabenosyn-5/VPS45 and caveolin-1 regulate ciliary membrane and polycystin-2 homeostasis. *EMBO J*, 37(9), 1–17. <https://doi.org/10.15252/emj.201798248>

Scott L.J., Muglia P., Kong X.Q., Guan W., Flickinger M., Upmanyu R., Tozzi F., Li J.Z., Burmeister M., Absher D., Thompson R.C., Francks C., Meng F., Antoniadou A., Southwick A.M., Schatzberg A.F., Bunney W.E., Barchas J.D., Jones E.G., Day R., Matthews K., McGuffin P., Strauss J.S., Kennedy J.L., Middleton L., Roses A.D., Watson S.J., Vincent J.B., Myers R.M., Farmer A.E., Akil H., Burns D.K., Boehnke M. (2009). Genome-wide association and meta-analysis of bipolar disorder in individuals of European ancestry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 116 (18): 7501–7506. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813386106>

Shin O.H., Han W., Wang Y., Südhof T.C. (2005). Evolutionarily conserved multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions (MCTPs) and unusual Ca²⁺ binding properties. *J Biol Chem*, 280: 1641–51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407305200>

Sneeggen, M., Pedersen, N. M., Campsteijn, C., Haugsten, E. M., Stenmark, H., & Schink, K. O. (2019). WDFY2 restrains matrix metalloproteinase secretion and cell invasion by controlling VAMP3-dependent recycling. *Nat Commun*, 10(1), 2850. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10794-w>

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 Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell*, 80(6), 929–938. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90296-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90296-1)

Tang, J., Maximov, A., Shin, O. H., Dai, H., Rizo, J., & Südhof, T. C. (2006). A Complexin/Synaptotagmin 1 Switch Controls Fast Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cell*,

126(6), 1175–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.030>

Téllez, J. L. (2014). Patrón de expresión y diversidad estructural del gen D2092.1 de *C. elegans*. (Tesis Maestría no publicada). México: Instituto de Neurobiología, Universidad Autónoma de México.

Téllez-Arreola, J.L., Malan S., & Martínez-Torres, A. (2020). MCTP-1 regulates synapse function and behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Mol and Cell Neurosci*, <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103528>

Tuck, S. (2014). The control of cell growth and body size in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Cell Res*, 321(1), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.11.007>

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(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035641>

Ubach J., Zhang X., Shao X., Sudhof T.C., Rizo J. (1998). Ca²⁺ binding to synaptotagmin: how many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain. *EMBO J*, 17 (14): 3921–3930. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3921>

Walz, H. A., Shi, X., Chouinard, M., Bue, C. A., Navaroli, D. M., Hayakawa, A., ... Corvera, S. (2010). Isoform-specific regulation of akt signaling by the endosomal protein WDFY2. *J Biol Chem*, 285(19), 14101–14108. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110536>

Wu C.W., Wang Y., Choe K.P. (2017). F-Box Protein XREP-4 Is a New Regulator of the Oxidative Stress Response in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 206(2):859-871. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.200592>

Zhang, M., Chung, S.H., Fang-Yen, C., Craig, C., Kerr, R.A., Suzuki, H., Samuel, A.D.T., Mazur, E., Schafer, W.R. (2008). A Self-Regulating Feed-Forward Circuit Controlling *C. elegans* Egg-Laying Behavior. *Curr. Biol*, 18(19):1445–1455.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de la estructura de las MCTPs	5
Figura 2: El gen <i>mctp-1</i> codifica para una proteína con múltiples dominios C2 y dos regiones transmembranales.	6
Figura 3: El promotor de <i>mctp-1</i> es activo en el tejido neuronal en <i>C. elegans</i>.	8
Figura 4: Análisis in silico de la Interacción entre <i>mctp-1</i> y <i>wdfy-2</i> y modelo de la estructura de la proteína WDFY-2.	10
Figura 5: El promotor de <i>wdfy-2</i> está activo en neuronas de <i>C. elegans</i>.	11
Figura 6: El gen <i>wdfy-2</i> codifica para una proteína con múltiples dominios WD y un dominio FYVE.	12
Figura 7: Las mutantes de <i>mctp-1</i>, <i>wdfy-2</i> y la doble mutante muestran cambios en longitud en el estado larvario L4.	25
Figura 8: En la vida adulta los mutantes de <i>mctp-1</i>, <i>wdfy-2</i> tienen un tamaño promedio normal mientras el doble mutante es más corto.	26
Figura 9: Cambios en la tasa de endocitosis de Dil.	28
Figura 10: Las mutaciones de los genes <i>mctp-1</i> y <i>wdfy-2</i> no generan alteraciones morfológicas de la probóscide.	30
Figura 11: En la vida adulta los mutantes de <i>mctp-1</i>, <i>wdfy-2</i> y el doble mutante se desplazan más lentamente, no exhiben cambios en la longitud de la onda, pero si en el número de coleteos en medio líquido.	32
Figura 12: Cambios en la tasa de ovoposición.	34
Figura 13: Cambios en el número y el tiempo de las asociaciones.	36
Figura 14: Cambios en el número y el tiempo de las colisiones.	38
Figura 15: Cambios en la distribución de fluorescencia de rojo Nilo.	40
Figura 16: Cambios en la susceptibilidad a aldicarb y levamisol.	42
Figura 17: Modelo de la interacción entre MCTP-1 y WDFY-2.	51

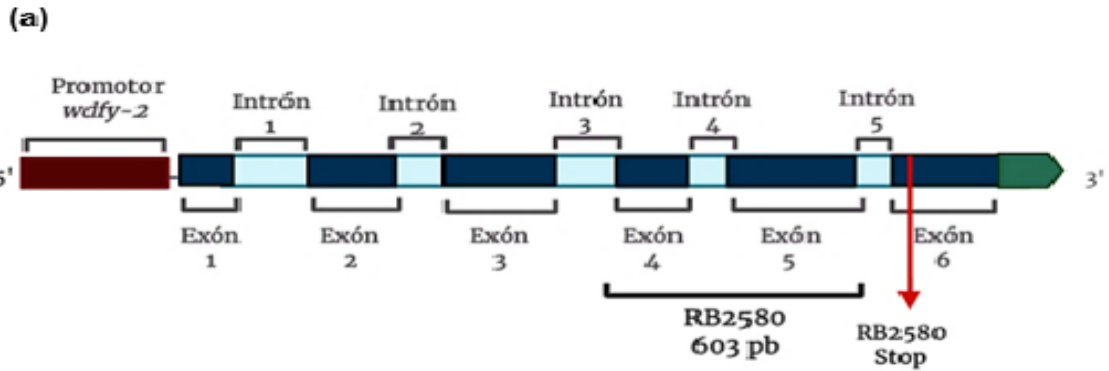
ANEXOS

Tabla 1: Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Genotipo
N2	Bristol aislado silvestre
ATM-1	<i>(mctp-1(amt1) I)</i>
ATM-6	<i>(mctp-1(amt1) I; Wdfy-2(ok3592) II)</i>
CB193	<i>(unc-29(e193) I)</i>
RB2580	<i>(wdfy-2(ok3592) II)</i>

Tabla 2: Plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Gen de resistencia	Descripción
pGH8	Ampicilina	<i>Prab-3::mCherry::unc-54utr</i>
pEDR1	Ampicilina	<i>Pwdfy-2::GFP::unc-54utr</i>



(b)

```

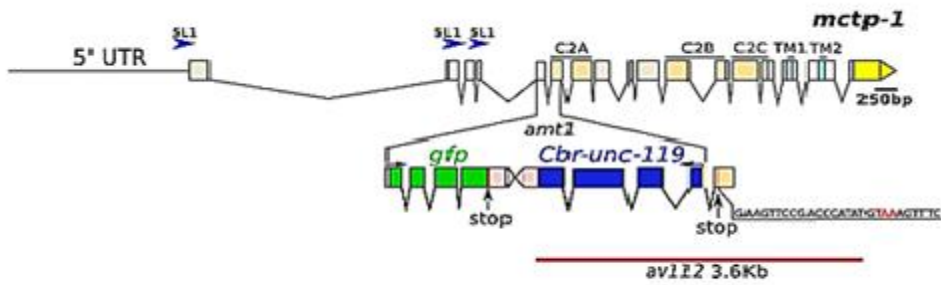
ATGGCTGCAATAATCAATCAACGCGTCGAACAGGGCGAATCAAGTATGGGAGGAGCCAAACCAggttggtgaattgaaaacgaac
catttgattccataacctgtgtaattttcgaaattattttaattttcagCTCTTCTTACAGAAATCACTGGCCACGTGGCTCGTATCAATGACGTC
ATTTTACTATCAAAAAGACGAAGGAGTCTGGACTGCAAGTGATGATAGATCCGTTTCGCCTGTACTTAAAAAGAGATAATGAT
CAATTTTGCCGTCAATTCATCATTTCATGCCAGTTGCTCCAACAAGTCTTTATTACAGTGAAGAAAATTATAAgtagtttaaagt
ttaaactggtttattttttaaaatttttaattttttattcaGGCTGCTCGTGGACTTATCAATGGAAATGTCTATGAATTCAGTGTGCCGATG
ACTTTAACAGTATGACAGAATCCCGAAAAATGGACATGTCACGCTGGACCAATCTCTGGACTCGGCTTGGCACTCTCCTCCGA
GCTCATTTTCAGCTGTCTCGAGATAAATCTATCGTCTGGCATTGTTTCAGAAAAATCAAAATAAGATGGGAAGTTATCTTTTGG
AAAAATAGTTGTACAGCAATGGTCATTGATCTCCATTTGTATTTCGTTGGAGATCATGTGGGCATGTCAGTCTCTCGTATT
GTCGATAATCAACCAAATCTTGTCAGCAAGCTTAGTGACATACGAgtgagttttatcgtattctttttttgagtaaaatattaattcgaaat
tttaaactgatcgtgctcctaggaaaatattgttaagtataacattccagtaattcctgaaatccccacaatcaatacaattagtaattgggttgaaat
ataatttttcaaATGCAATCACCTCGCTCACATGGGACGGAAATAAGAAAAGTTTGTATTCTGGAAGCAGTGATCATCTCATCA
AATGTGGGATACTGGAGGAGGAAGAGGAGAAGCTTATGAGCTTAAataaatatattttctagaatttcataatatttcaaaaatatta
atatttttcaaacacaaaatataatttaatttaaaatataatttttccaaatttaaaaatatttttttcaacCGGACACAATGGAAAAGTGACAA
CACTATGCGCAGCTCCAGCAGCCAAACGCTCTGTTCTCGGCTGACGAACACGGAAAAGCTCATGTGCTGGGACATGAAATGCA
AGAGAGTTGAGACTCCTGAATGGAAAACTTCGGAATGCTGTGCAAAAATGCAATCAACCGTCTTCTGGAATCTTCAAGCAA
GTGGCAGAGGAAAAGTGGTCCGATTGAGACAACATCACTGCAGAACTGTGGATCAGCAGTCTGTGGAATCTTGTGACAA
CTGGACCACCTATCCAACCAATGGGATATGAGACGAAAAATTCGCATTTGTAATGACTGCAATGCAAGAAATGAAAAGATAATCCA
CAGAAATTTCAAgtagttgtaaaagcaaatgactgatgaaactattttcaatttttagCCTTACTCCACTTGCAATCCACATGAAATCCACT
GGAATCACTGCTATGCATCTCCAGGAAACTCTCGGACTTCTAGTTACCAGTGAGACAGAATCGTGTGATTATGATTTGGGATG
TTGGAAGTGTGCTCTGCCCCCTTCTGGATCACAATATAAcaattgcttctactctcgaatttctcataattctttgatttcaactaatttattcct
ctccttctattttgtatattcaactcaaaatgccatccttcccaagaccattgtgtcaaatcaagaccttcaaaaactaaccaatatttcccgataccctgac
aggtgtcctgaaatagtgattgattcttctcctaatcccgaataattcctagtttttcgactgtaaattgtatttttaacaacaagtttg

```

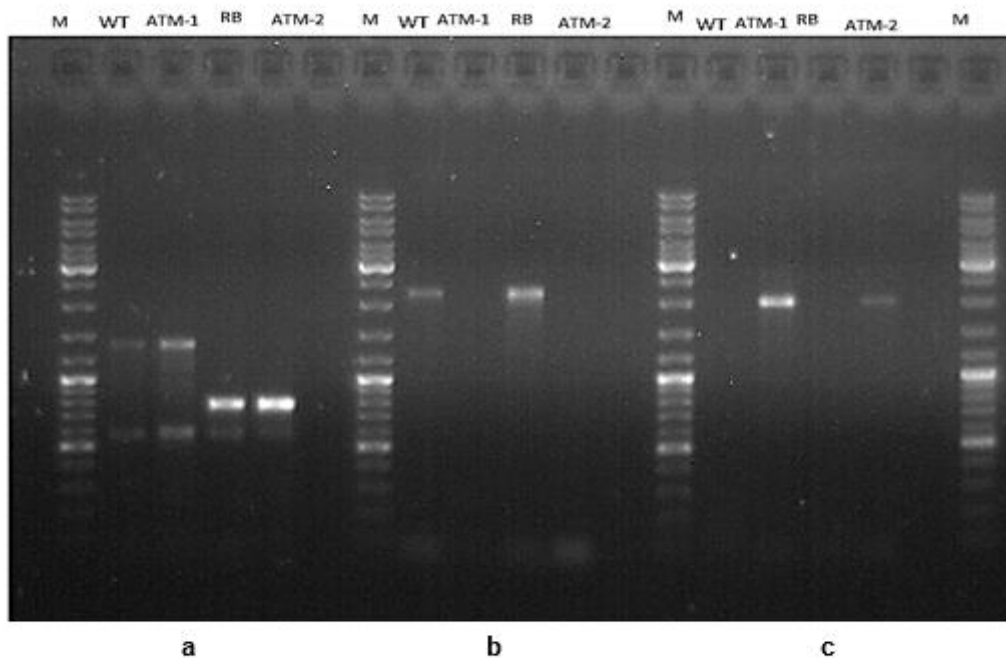
- Exones
- Intrones
- Delección (603 pb)

Apéndice 1: Organización del gen *wdfy-2* y mutación en la cepa RB2580

(a). Estructura del gen *wdfy-2* en la que el cuadro rojo representa el promotor, los cuadros azules representan los exones y los cuadros en blanco representan los intrones, la línea negra representa la localización de la delección de 603 pb en la cepa RB2580 y la línea roja un codón de paro. (b). Secuencia del gen *wdfy-2* en la que el subrayado en amarillo se representan los exones, el gris los intrones y el rojo la delección de 603 pb.

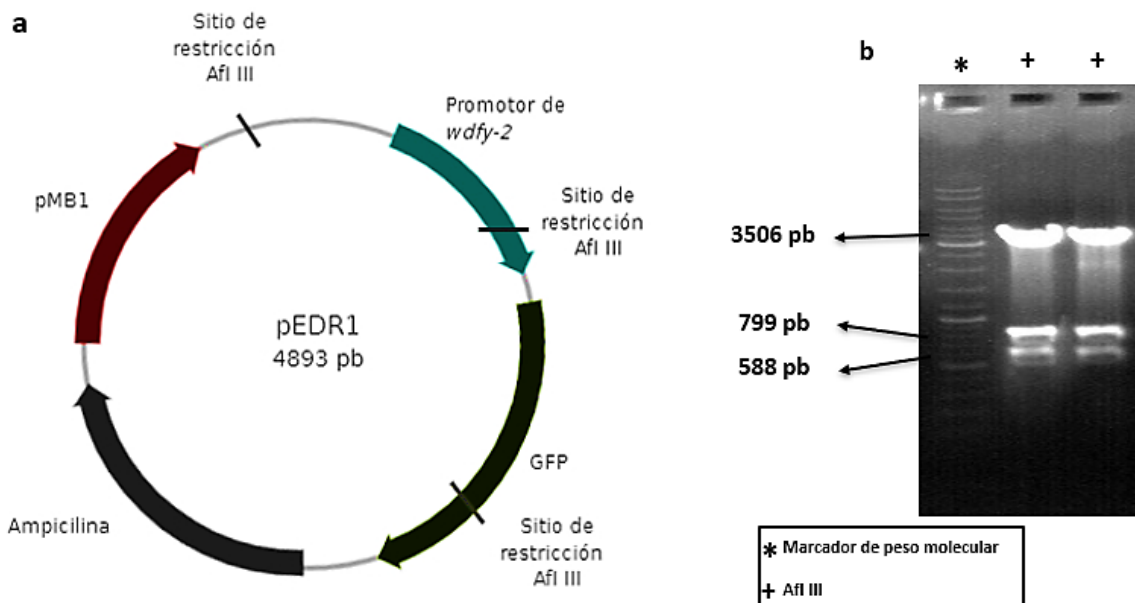


Apéndice 2: Estructura del alelo ATM-1. El gen que codifica para *gfp* se introdujo por CRISPR/Cas9 entre el intrón 4 y el exón 6 de *mctp-1*, generando un codón de paro prematuro dando lugar a un alelo nulo (Télez-Arreola et al., 2020) *av112* se refiere a una delección introducida en el alelo utilizado por Joshi et al. (2018).



M: Marcador de peso molecular, WT: N2, ATM-1: $\Delta mctp-1$, RB2580: $\Delta wdfy-2$,
ATM-6: $\Delta mctp-1$; $\Delta wdfy-2$

Apéndice 3: Genotipificación de las cepas mutantes (a). Amplificación del gen silvestre *wdfy-2* (1403 pb/ 800pb), las cepas WT y ATM-1 tienen presente el gen silvestre *wdfy-2*, mientras que las cepas RB2580 y ATM-6 presentan la delección de 603 pb. **(b).** Amplificación gen silvestre *mctp-1* (2260pb), las cepas WT y RB2580 presentan el gen silvestre *mctp-1*, mientras que las cepas ATM-1 y ATM-6 no lo presentan. **(c).** Amplificación de la inserción en *mctp-1* (2006pb), las cepas ATM-1 y ATM-6 presentan la inserción en el gen *mctp-1*, mientras que las cepas WT y RB2580 no.



Apéndice 4: pEDR1: (a). Mapa funcional del plásmido pEDR1, en el que se muestra el promotor de *wdfy-2* (411 pb), GFP, el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación pMB1, asimismo se muestran los sitios de restricción de la enzima Afl III **(b)**. Gel de agarosa mostrando los productos predichos de la restricción con Afl III. (José Eduardo Díaz Rodríguez, memoria de estancia técnica, Universidad Tecnológica de Corregidora).