



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Respuesta del mutante del gen *mctp-1* de *Caenorhabditis elegans* al estímulo
optogenético de sus neuronas colinérgicas.

Opción de titulación
Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

Tovilla Loza Fernando Iván

Querétaro, Qro. 2020.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Respuesta del mutante del gen *mctp-1* de *Caenorhabditis elegans* al estímulo optogenético de sus neuronas colinérgicas.

Opción de titulación
Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Licenciado en Biología

Presenta:

Tovilla Loza Fernando Iván

Dirigido por:

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Ataúlfo Martínez Torres
Presidente

Firma

Fausto Arellano Carbajal
Secretario

Firma

Carlos Saldaña Gutiérrez
Vocal

Firma

Moisés Pérez Mendoza
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro. 2020.

RESUMEN

La comunicación entre la mayor parte de las neuronas de *C. elegans* es mediante sinapsis químicas. Para que se produzca la liberación de neurotransmisores en estas, es necesaria la entrada de iones calcio a las neuronas, el calcio interacciona con proteínas que contienen dominios de interacción con este ion, incluyendo los dominios C2. Dentro de las neuronas hay varias familias de proteínas caracterizadas por la presencia de dominios C2, la mayoría de estas proteínas están involucradas en la transducción de señales y en el tráfico de membranas; un ejemplo de proteínas neuronales con dominios C2, son las sinaptotagminas, las cuales están involucradas en el tráfico de vesículas con neurotransmisores.

Otra familia de proteínas con múltiples dominios C2 son las MCTP's (Multiple C2 domain proteins with two transmembranal regions), originalmente descubiertas por medio de análisis bioinformáticos, cuyo papel sigue siendo incierto. Para el estudio de las sinapsis y sus componentes el nematodo *Caenorhabditis elegans* ofrece un gran potencial y es un excelente modelo experimental. Es fácil de cultivar, es pequeño, transparente y de ciclo de vida corto, el adulto hermafrodita contiene 959 células somáticas, de las cuales 302 son neuronas y no es complicado manipularlo genéticamente. Por otra parte, el uso de métodos optogenéticos en *C. elegans* permite una manipulación no invasiva de la actividad neuronal.

En el presente trabajo nos enfocamos en comparar la respuesta a la estimulación optogenética en las neuronas colinérgicas de gusanos tipo silvestre y mutantes para el gen *mctp-1* de *C. elegans*. Los resultados obtenidos en conjunto con otros estudios sugieren que las proteínas MCTP en *C. elegans* tienen un papel en la transmisión sináptica, en particular modulando la actividad de la presinapsis.

ABSTRACT

Communication between most of the neurons of *C. elegans* is through chemical synapses. For the release of neurotransmitters to occur in these, the entry of calcium ions into the neurons is necessary, calcium interacts with proteins that contain domains of interaction with this ion, including the C2 domains. Within neurons there are several families of proteins characterized by the presence of C2 domains. Most of these proteins are involved in signal transduction and in membrane trafficking; an example of neuronal proteins with C2 domains are synaptotagmins, which are involved in the trafficking of vesicles with neurotransmitters.

Another family of proteins with multiple C2 domains are the MCTPs (Multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions), originally discovered through bioinformatic analysis, but whose role remains uncertain. For the study of synapses and their components, the nematode *Caenorhabditis elegans* offers great potential and is an excellent experimental model. It is easy to grow, it is small, transparent and has a short life cycle. The adult hermaphrodite contains 959 somatic cells, of which 302 are neurons and it is not complicated to manipulate it genetically. The use of optogenetic methods in *C. elegans* allows a non-invasive manipulation of neuronal activity.

In the present work we focus on comparing the response to optogenetic stimulation in cholinergic neurons of wild-type and mutant worms for the *C.elegans* *mctp-1* gene. The results obtained in conjunction with other studies suggest that MCTP proteins in *C. elegans* have a role in synaptic transmission, in particular by modulating the activity of presynapsis.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	9
2.1 DOMINIOS C2.....	9
2.2 PROTEÍNAS CON DOMINIOS C2	9
2.3 PROTEÍNAS TRANSMEMBRANALES CON DOMINIOS C2.....	11
2.4 MCTPs (Multiple C2 domains and TMR proteins)	13
2.5 MCTPs en <i>C. elegans</i>	13
2.6 OPTOGENÉTICA.....	16
2.7 OPTOGENÉTICA en <i>C. elegans</i>	16
2.8 SISTEMA COLINÉRGICO EN <i>C. elegans</i>	17
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	18
4.1 OBJETIVO GENERAL	18
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 CRUZA DE CEPAS	21
5.2 GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS	23
5.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	24
5.4 ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA Y VIDEO GRABACIÓN	25
5.5 ANÁLISIS DE VIDEO Y DATOS	25
6. RESULTADOS	26
7. DISCUSIÓN	31
8. CONCLUSIONES	35
9. BIBLIOGRAFÍA	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del dominio C2 en sinaptotagmina (A) y en PLC ₅ 1	10
Figura 2. Modelos de las estructuras de proteínas que tienen múltiples dominios C2 y presentan regiones transmembranales	12
Figura 3. Organización del gen <i>mctp-1</i> y su patrón de expresión en <i>C. elegans</i>	15
Figura 4. Representación esquemática del gen <i>mctp-1</i> , sus dos promotores y las cuatro isoformas de la proteína	21
Figura 5. Cruzas de cepas	23
Figura 6. Gel de electroforesis de genotipificación de F3 con los oligonucleótidos Ojlt163 y Ojlt166.....	28
Figura 7. Genotipificación de la línea 1	29
Figura 8. Ángulo de flexión desde el punto medio.....	30
Figura 9. Comparación del ángulo de punto medio, antes y durante el estímulo..	31
Figura 10. Exocitosis y endocitosis en la terminal nerviosa y posible papel de <i>mctp-1</i>	34
Figura S1. Foto de cepa ATM5 a microscopio de epifluorescencia.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para PCR	25
Tabla 2. Protocolo para PCR.....	25
Tabla S1. Lista de cepas.....	41

1. INTRODUCCIÓN

La comunicación entre la mayor parte de las neuronas de *Caenorhabditis elegans* es mediante sinapsis químicas, es decir, dos neuronas que no se encuentran en contacto se comunican a través de la liberación de neurotransmisores contenidos en vesículas (White et al., 1986). Para la liberación de neurotransmisores es necesaria la entrada de iones calcio a las neuronas a través de canales de calcio dependientes de voltaje. El calcio interacciona con proteínas que contienen dominios de interacción con este ion, incluyendo los dominios C2. Algunas de estas proteínas están embebidas en vesículas sinápticas y gracias a la unión con calcio y su capacidad para interactuar con fosfolípidos se pueden fusionar con la membrana plasmática permitiendo así la liberación de neurotransmisores (Geppert et al., 1994).

Hay diferentes familias de proteínas caracterizadas por la presencia de dominios C2, la mayoría de estas proteínas están involucradas en la transducción de señales y en el tráfico de membranas; además, se sabe que las proteínas con estos dominios tienen la capacidad de formar complejos de fosfolípidos de forma dependiente o independiente de calcio (Shin et al., 2005). Se ha observado que las proteínas implicadas en transducción de señales generalmente tienen un solo dominio C2, mientras que aquellas involucradas en el tráfico de membranas tienen por lo menos dos dominios C2; un ejemplo de proteínas neuronales con dominios C2, son las sinaptotagminas, las cuales contienen múltiples dominios C2 y están involucradas en el tráfico de vesículas sinápticas (Perin et al., 1991; Chapman, 2008).

Se tienen registros de proteínas con dominios C2 que actúan como sensores de calcio, este ion es un segundo mensajero en células eucariotas. Las proteínas que están implicadas en su dinámica pueden tener una importancia significativa en el estado metabólico de la célula (Alberts et al., 2011). Una familia de proteínas con múltiples dominios C2 son las MCTP's (Multiple C2 domain proteins with two transmembranal regions), originalmente descubiertas por medio de análisis bioinformáticos (Shin et al., 2005), pero cuyo papel ha sido poco estudiado.

Para el estudio de las sinapsis y sus componentes el nematodo *Caenorhabditis elegans* ofrece un gran potencial. Se trata de un pequeño nematodo de vida libre. Tiene un tiempo de generación de aproximadamente 3.5 días en el que pasa por cuatro estadios larvales antes de llegar a ser un adulto con una longitud de 1.3 mm, además es hermafrodita y puede autofecundarse (White et al., 1986). *C. elegans* es un excelente organismo modelo, es pequeño, transparente, el adulto hermafrodita contiene alrededor de 1000 células somáticas, es fácil de cultivar y en comparación con otros organismos, no es complicado manipularlo genéticamente (Brenner, 1974).

De las 959 células somáticas que contiene el adulto hermafrodita, 302 son neuronas, este número es invariante entre animales (Sultzon y Horvitz, 1977; White et al., 1986). Sus neuronas han sido agrupadas en 118 clases utilizando criterios como la morfología y conectividad, por lo tanto *C. elegans* tiene una gran variedad de tipos de neuronas en comparación con organismos de tamaño más grande y mayor número celular. Estas neuronas tienen morfologías simples, no ramificadas, pocas tienen más de dos procesos y muchas son monopolares con un solo proceso (White et al., 1986).

El uso de métodos optogenéticos en *C. elegans* es una herramienta poderosa para el estudio de la transmisión sináptica y circuitos neuronales (Husson et al., 2013). La optogenética consiste en la manipulación no invasiva mediante la expresión selectiva de proteínas que responden a diferentes longitudes de onda que permiten la manipulación de la actividad neuronal. En el presente trabajo nos enfocamos en comparar las respuestas a la estimulación de las neuronas colinérgicas en gusanos mutantes y no mutantes para el gen *mctp-1*, todo esto con la finalidad de saber más sobre el papel de las proteínas de la familia MCTP en las neuronas.

2. ANTECEDENTES

DOMINIOS C2

Los dominios C2 fueron identificados por primera vez en la proteína quinasa C (Nishizuka, 1988), estos se caracterizan por tener de 80 a 160 residuos que se pliegan de forma independiente y se unen a calcio y fosfolípidos (Rizo y Südhof, 1998). La unión a fosfolípidos de muchos de estos dominios está regulada por calcio; algunos C2 de diversas proteínas no cumplen con esta premisa ya que se han separado evolutivamente en formas dependientes e independientes de calcio (Rizo y Südhof, 1998).

PROTEÍNAS CON DOMINIOS C2

La mayor parte de las proteínas con dominios C2 funcionan en la transducción de señales o el tráfico de membrana (Shin et al., 2005; Rizo y Südhof, 1998). Dentro de aquellas que funcionan en la transducción de señales, se encuentran proteínas involucradas en la generación de segundos mensajeros (Como la fosfolipasa C o PLC) (Figura 1), en la fosforilación de proteínas (Coussens et al., 1986), en la activación de GTPasas y en la ubiquitinación (Rizo y Südhof, 1988). Dentro de aquellas que están relacionadas con el tráfico de membrana podemos encontrar a las sinaptotagminas (Figura 1).

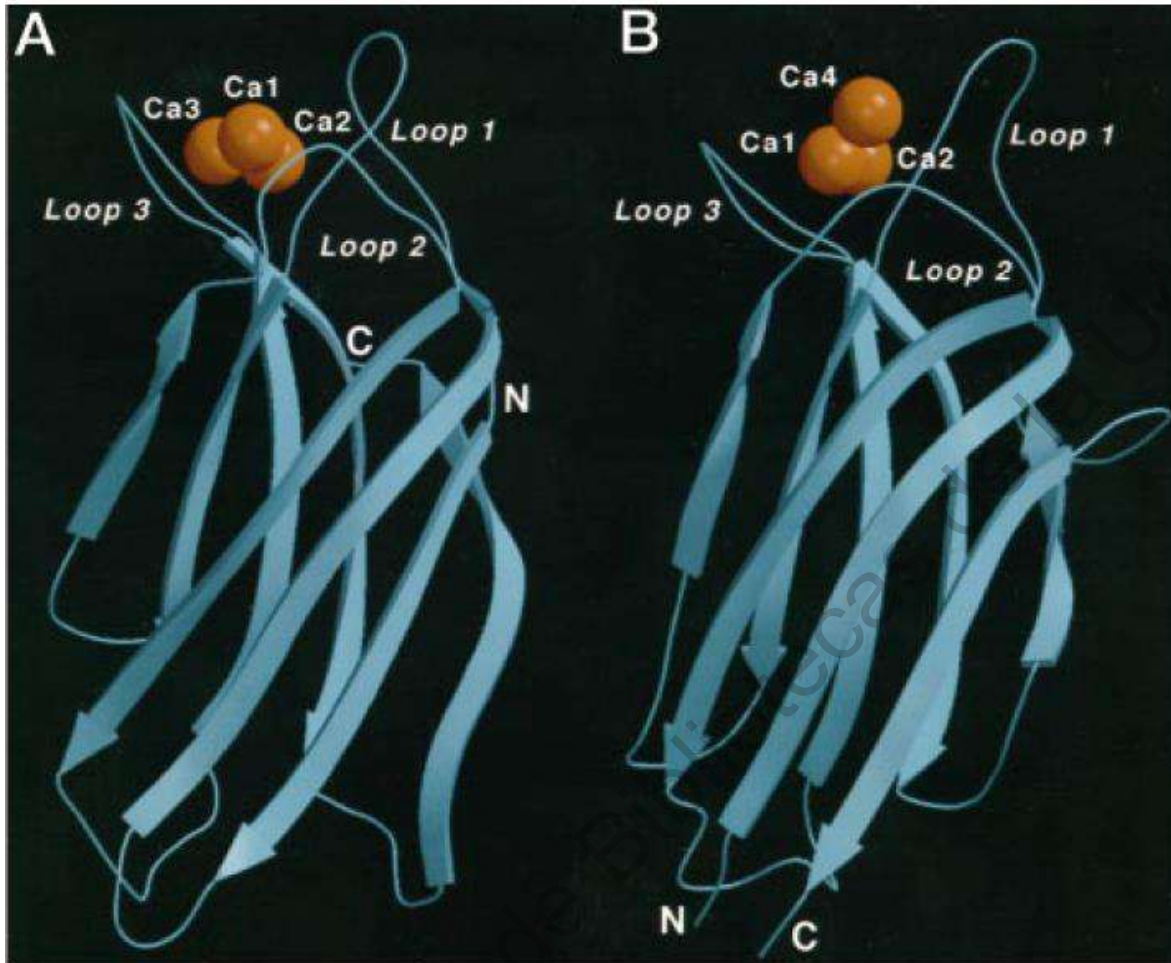


Figura 1. Estructura del dominio C2 en sinaptotagmina (A) y en PLC₅₁ (B). Están indicados los fragmentos amino y carboxilo terminales en ambos dominios con N y C respectivamente, también están indicados los sitios que interactúan con calcio, el cual está representado por las esferas de color naranja, tomado de Rizo y Südhof (1988).

PROTEÍNAS TRANSMEMBRANALES CON DOMINIOS C2

Las proteínas de tráfico de membrana con múltiples dominios C2 o bien no tienen regiones transmembranales (RTM) o tienen una sola RTM en el extremo amino, como por ejemplo las sinaptotagminas (Südhof, 2002); o en el extremo carboxilo, por ejemplo las ferlinas (Bansal y Campbell, 2004) (Figura 2).

La proteína transmembranal con dominios C2 más estudiada es la sinaptotagmina 1 (Figura 2), esta proteína contiene dos dominios C2 (C2A y C2B) (Rizo y Südhof, 1988), se localiza en las vesículas sinápticas y tiene un papel importante en su interacción con el calcio para desencadenar la liberación de los neurotransmisores de las vesículas sinápticas (Geppert et al., 1994). Las funciones de otras proteínas transmembranales con múltiples dominios C2 como las MCTPs (Figura 2) no están ampliamente estudiadas; sin embargo, podrían ser similares (Rizo y Südhof, 1988).

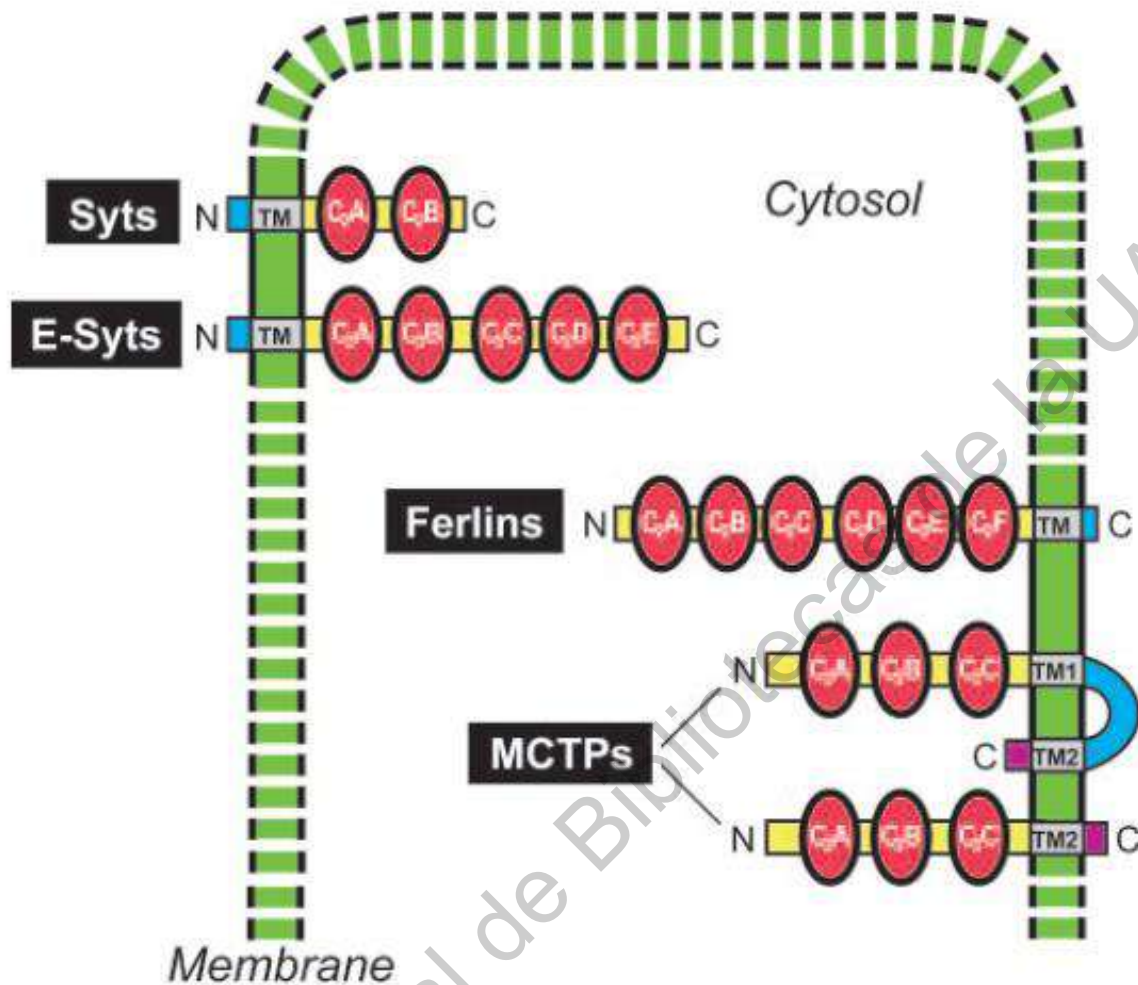


Figura 2. Modelos de las estructuras de proteínas que tienen múltiples dominios C2 y presentan regiones transmembranales. Syts (sinaptotagmina), E-Syts (sinaptotagmina extendida), Ferlins (ferlinas) y MCTPs (proteínas con múltiples dominios C2). La membrana vesicular está representada en color verde, regiones transmembranales representadas en color gris y con la leyenda TM, regiones no citoplasmáticas de las proteínas representadas de color azul, mientras que las regiones citoplasmáticas representadas con color amarillo, además de los dominios C2 que están representados en color rojo, tomado de Shin et al., (2005).

MCTPs (Multiple C2 domains and TMR proteins)

Son una familia de proteínas que contienen tres dominios C2 citoplasmáticos los cuales están separados por regiones muy cortas y son seguidos de dos regiones transmembranales (Figura 2) (Shin et al., 2005). Se tiene evidencia de que estas proteínas están localizadas en vesículas intracelulares y en retículo endoplasmático (Genç et al., 2017).

En vertebrados las proteínas MCTPs se expresan en tejidos como el sistema nervioso central, corazón y músculo (Qiu et al., 2015; Shin et al., 2005; Espino et al., 2020). A nivel intracelular se han encontrado en retículo endoplasmático, endosomas tardíos, endosomas de reciclaje y lisosomas (Durán, 2019; Espino et al., 2020). Variantes de los genes MCTP en humanos han sido relacionados a esquizofrenia (Djurovic et al., 2009). Además, un decremento en la expresión de MCTP2 en la rana *Xenopus laevis* provoca malformaciones en el corazón (Lalani et al., 2013).

Shin y colaboradores (2005) compararon las secuencias de proteínas MCTPs entre *Homo sapiens*, *C. elegans* y *Drosophila melanogaster*, encontrando que están altamente conservadas, exceptuando el extremo amino terminal que es más variable. Entre estas especies se encontraron mayores porcentajes de homología en los dominios C2, en el segundo pase transmembranal y en el carboxilo terminal.

MCTPs en *C. elegans*

Nematodos tratados con ARN interferente para bloquear la expresión del gen *mctp-1*, mostraron letalidad en el estado larvario en un porcentaje de la población tratada (Maeda et al., 2001), lo que sugería un importante papel de esta proteína durante el desarrollo de *C. elegans*. Sin embargo, y en contraste con estas observaciones, otros estudios donde se han generado mutantes knockout para el gen *mctp-1* son viables (Joshi et al., 2018; Téllez et al., 2020). Estos contrastes son frecuentes ya que la aplicación de ARNi no tiene una penetrancia completa en el fenotipo y su

administración puede resultar en letalidad por el bloqueo no específico de la expresión de otros genes (Perrimon y Mathey, 2007).

El gen *mctp-1* en *C. elegans* está bajo el control de dos promotores, y cada uno de los promotores forma dos isoformas diferentes de la proteína (Tellez et al, 2020) (Figura 4). El patrón de expresión del gen *mctp-1* en *C. elegans*, incluye neuronas alrededor de la faringe, a lo largo del cordón ventral y en la espermateca (Téllez, 2014; Téllez et al, 2020) (Figura 3). Téllez y colaboradores (2020) analizaron las diferencias en el coleteo (*thrashing*) entre la cepa ATM-1 (mutante para el gen *mctp-1*) y la cepa silvestre, encontrando diferencias significativas entre estos; además, se encontraron diferencias en la tasa de ovoposición. También, se realizaron pruebas farmacológicas con aldicarb y levamisol, para determinar si hay un fallo en la función de las sinapsis y, por su sensibilidad a aldicarb los resultados apuntan a que el fallo es a nivel presináptico (Téllez et al., 2020). Aunque, el papel de esta proteína sigue siendo incierto, las evidencias tanto de su patrón de expresión como de la alteración en el comportamiento de *C. elegans*, podrían estar relacionados con un posible papel de esta proteína en la sinapsis.

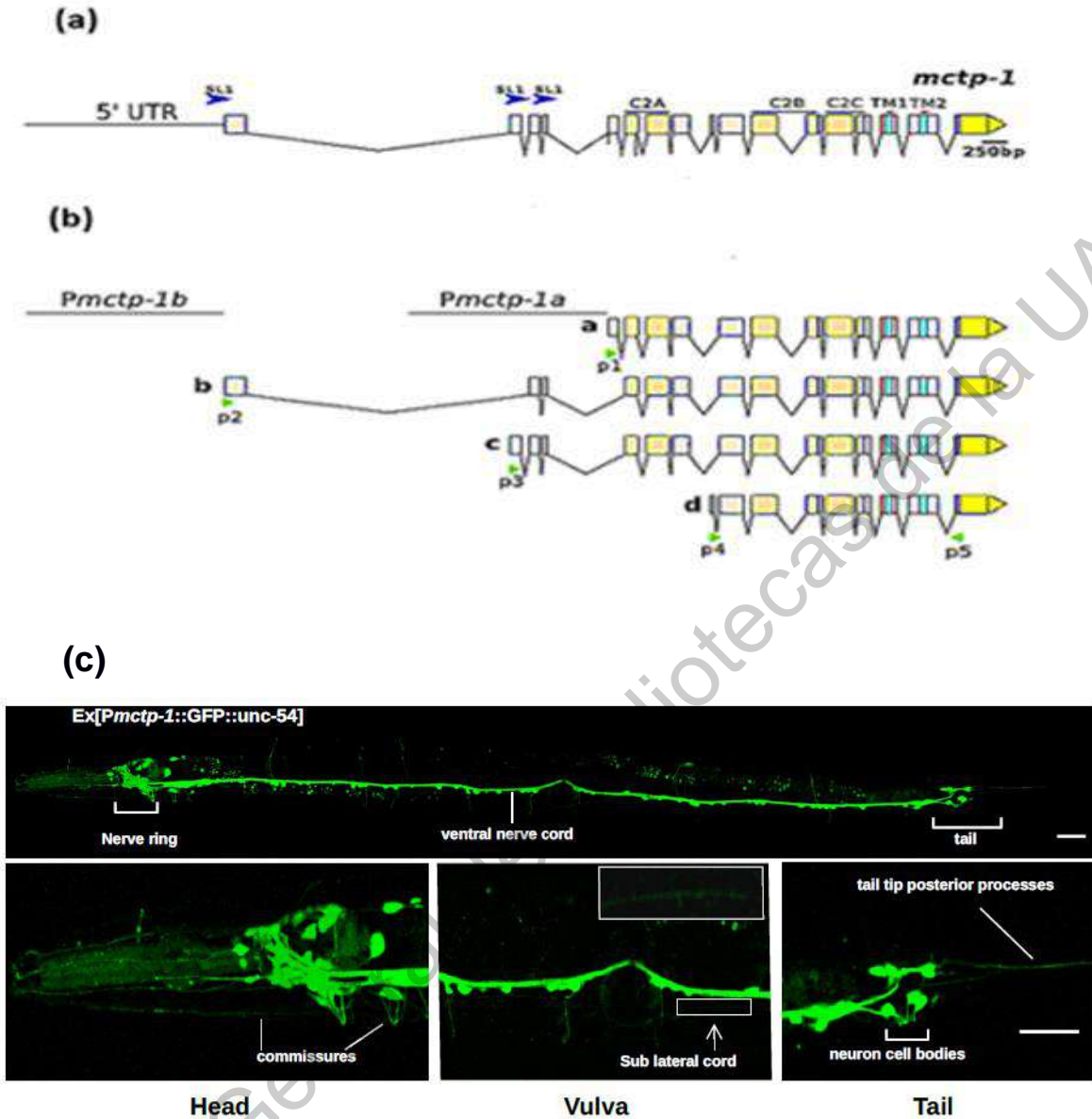


Figura 3. Organización del gen *mctp-1* y su patrón de expresión en *C. elegans*. A. El gen *mctp-1* cuenta con dos promotores y 17 exones que son empalmados de forma diferencial para generar cuatro isoformas. En naranja, se muestran los segmentos que codifican para los dominios C2, en azul, los segmentos TM, las tres secuencias líder predichas (SL-1 se indican con flechas azules). En este estudio, se utilizó una mutante del gen *mctp-1* generada por CRISPR/Cas 9 (cepa ATM1), en esta se insertaron los genes GFP y *unc-119* que generan una "knockout" funcional de *mctp-1* (Télez Arreola et al 2020). B. Las cuatro isoformas de *mctp-1* (*mctp1a-d*). p1-p5 se refiere a los "primers" usados para amplificar los ARNm de *mctp-1* en el artículo original (Télez et al, 2020). C. Patrón de expresión de *mctp-1* en el adulto hermafrodita, en color verde las neuronas donde se expresa el gen reportero GFP, tomado de (Télez et al, 2020).

OPTOGENÉTICA

La optogenética consiste en la manipulación no invasiva de neuronas u otras células mediante proteínas que responden a diferentes longitudes de onda. El cuerpo transparente del nematodo, la facilidad de su manipulación genética y la consistencia de la organización neuronal de un gusano a otro lo hacen un modelo idóneo para la manipulación optogenética (Husson et al., 2013).

Dentro de las proteínas utilizadas para optogenética las hay con características diferentes, una de las más utilizadas es la canalrodopsina, proteína que responde a longitudes de onda (λ) alrededor de los 450nm y es selectiva al ion sodio principalmente (Husson et al., 2013), sin embargo, es permeable a K^+ , H^+ y algunos cationes divalentes como el calcio (Nagel et al., 2005). Al incidir una fuente de luz con una λ de 450 nm, se induce la despolarización de la membrana de las neuronas que expresan la canalrodopsina, lo que consecuentemente induce la excitación de las células,

OPTOGENÉTICA EN *C. elegans*

Desde el primer reporte de aplicaciones de optogenética se utilizó a *C. elegans* como principio de prueba para aplicaciones en neurociencia (Zhang et al 2007), más recientemente, Bergs y colaboradores (2018), expresaron diferentes canalrodopsinas en la cepa N2 de *C. elegans* con un promotor para músculo, midieron el tiempo que permanecía la despolarización después de estímulos de luz de 2 segundos y encontraron que en la canalrodopsina estándar (H134R) permanecía afectando la longitud del cuerpo alrededor de 10 segundos después de la estimulación.

Liewald y colaboradores (2008) expresaron canalrodopsina en neuronas colinérgicas bajo el promotor *unc-17* (Promotor del gen que codifica para el transportador vesicular de acetilcolina), y después de la estimulación optogenética, observaron que los individuos se contraían y alcanzaban el punto máximo de la contracción después de 200 o 300 ms.

Hwang y colaboradores (2016), expresaron canalrodopsina en neuronas colinérgicas bajo el promotor *unc-17*, colocaron gusanos en un dispositivo de microfluídica y estimularon con luz azul (440 - 490 nm) en lapsos desde 5 a 30 s, y no observaron diferencias significativas en la contracción a partir de los 15 s.

Estos estudios son solo ejemplos del potencial que ofrece la combinación del modelo biológico *C. elegans* y la optogenética para descifrar procesos importantes de la transmisión sináptica y la manera en que se pueden cuantificar los procesos alterados por la manipulación con luz: longitud del cuerpo y contracción muscular, por ejemplo.

SISTEMA NERVIOSO COLINÉRGICO EN *C. elegans*.

El grupo de Pereira y colaboradores (2015), generaron nematodos transgénicos que reportaran la expresión de los genes *unc-17* (transportador vesicular de acetilcolina), *cha-1* (acetiltransferasa), *cho-1* (transportador de colina), *ace-1*, *ace-2*, *ace-3* y *ace-4* (acetilcolinesterasas) y así cartografiaron todas las células que usan acetilcolina como neurotransmisor. Se encontró que 159 de las 302 neuronas del hermafrodita adulto son colinérgicas, lo que convierte a este neurotransmisor en el más abundante en el sistema nervioso del nematodo.

El sistema colinérgico ha sido asociado a la regulación de la locomoción, puesta de huevos, bombeo faríngeo, defecación y apareamiento (Thomas, 1990; Bany et al., 2003; Winnier et al., 1999; McKay et al., 2004; Liu y Sternberg, 1995). Además, el exceso de acetilcolina, que puede ser inducido farmacológicamente con la aplicación de aldicarb, causa una parálisis por hipercontracción (Hosono et al., 1989; Bany et al., 2003).

Considerando que *mctp-1* se expresa prácticamente en todas las neuronas del sistema nervioso del nematodo y que las mutantes de este gen producen un fallo en la presinapsis, en este trabajo se abordó la pregunta de si la sobreactivación de las neuronas colinérgicas por medio de optogenética induce respuestas diferentes en una cepa mutante del gen *mctp-1*.

3. HIPÓTESIS

La cepa mutante del gen *mctp-1* presenta cambios en su actividad motora durante la activación optogenética.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la mutación del gen *mctp-1* provoca cambios en la actividad motora inducida por la estimulación optogenética.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener una cepa homocigota para la delección del gen *mctp-1* y que exprese la canalrodopsina en el sistema nervioso.
2. Estandarizar el protocolo de inducción optogenética.
3. Determinar los cambios funcionales inducidos por la activación optogenética.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

MANTENIMIENTO DE CEPAS DE *C. elegans*

Las cepas de *C. elegans* se mantuvieron en cajas Petri de 60 x 15 mm, con medio de crecimiento para nematodos (NGM) y sembradas con 80µl de *Escherichia coli* (OP50) a temperaturas entre 15 y 25 °C. Las cajas para los individuos utilizados para la estimulación optogenética fueron adicionada con retinaldehído (all trans-Retinal), para su preparación se mezcló 1 ml de bacteria *E. coli* OP50 con 5µl de una solución 100 mM de all trans-Retinal (Número de catálogo R2500 en SIGMA).

CEPAS

EG5096: Esta cepa tiene una inserción genómica de mCherry, canalrodopsina y *lin-15* bajo el promotor del gen *unc-17*, el cual codifica para el transportador vesicular de acetilcolina y por tanto marca todas las neuronas colinérgicas del nematodo.

DR466: Esta cepa tiene una mutación en el gen *him-5* la cual provoca una mayor frecuencia de no disyunción del cromosoma X e incrementa hasta un 33% la cantidad de machos.

ATM-1: Esta cepa tiene una inserción de 3522pb en el gen *mctp-1*, la cual incluye un codón de paro y genera un alelo nulo (Figura 4). Ver tabla suplementaria 1 para más detalles de las cepas.

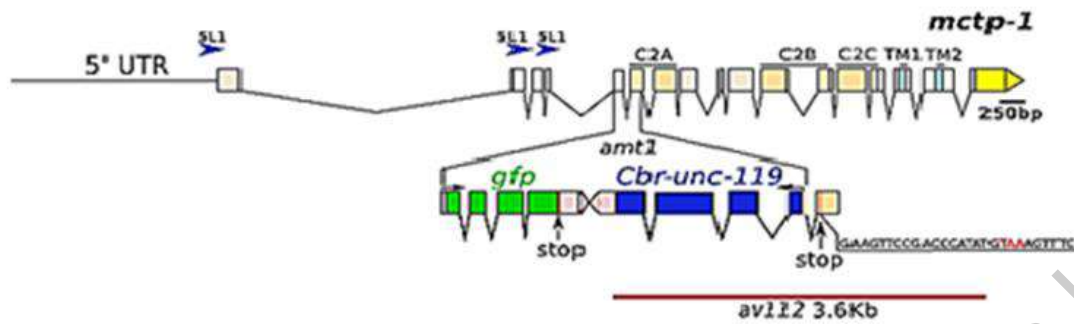


Figura 4. Representación esquemática del gen *mctp-1* y el alelo ATM1. El gen que codifica para *gfp* se introdujo por CRISPR/Cas9 entre el intrón 4 y el exón 6 de *mctp-1*, generando un codón de paro prematuro dando lugar a un alelo nulo (Télez-Arreola et al., 2020). *av112* se refiere a una deleción introducida en el alelo utilizado por Joshi et al. (2018). Tomado de Télez (2018).

CRUZA DE CEPAS

Se utilizaron machos de la Cepa DR466 y se cruzaron con hermafroditas de la cepa EG5096, se obtuvieron machos que presentaron fluorescencia en sus neuronas colinérgicas, posteriormente se cruzaron estos machos con hermafroditas de la cepa ATM-1 y de los hermafroditas resultantes (F1) se separaron 4 que presentaran fluorescencia, se dejaron autofecundarse y se observó la progenie (F2), se seleccionó aquella progenie que no presentara machos (es decir, que la mutación de *him-5* no estuviera presente en el parental), y presentara fluorescencia en sus neuronas colinérgicas; de estos hermafroditas se seleccionaron 12 que se separaron individualmente y se observó su progenie (F3), se seleccionaron aquellos individuos en los que toda la población presentara fluorescencia y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa para confirmar la homocigosis de la mutación en el gen *mctp-1*. Un esquema general de este procedimiento se muestra en la Figura 5.

- EG5096 – AABbCc
- DR466 – aaBBCC
- ATM-1 – aabbcc

A. DR466 ♂ x EG5096 ♀ (F1)

	ABc
aBC	AaBBcC

Fluorescencia y generación de machos.

A – mCherry y canalrodopsina
 b – Delección de gen *mctp-1*
 C – Mutación en gen *him - 5*

B. AaBBcC ♂ x ATM-1 ♀ (F2)

	ABC	ABc	aBC	aBc
abc	AaBbCc	AaBbcc	aaBbCc	aaBbcc

Fluorescencia y heterocigotos para la delección.

Descendencia sin machos.

C. AaBbcc ♀ (F3)

	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

Doble homocigoto.

Figura 5. Cruzas de cepas. A. Cruza de macho DR466 con hermafrodita EG5096. B. Cruza de machos obtenidos en crusa anterior y hermafrodita de ATM-1. C. Cruza de doble heterocigoto y selección por fluorescencia.

GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS

Para confirmar la presencia de la variante mutada del gen *mctp-1* se realizó PCR. Primero, se colectaron gusanos de la generación F3, se realizó lisis de diez individuos; se agregaron 20µl del buffer Phusion GC (número de catálogo B0519S NEB), 80µl de agua desionizada y 2.5µl de proteinasa K (número de catálogo P2308 SIGMA). Para la lisis de los individuos se tomaron 10µl del buffer de lisis y se agregaron 10 individuos adultos, se congelaron por media hora, posteriormente se colocaron en el termociclador, una hora a 60°C y 30 min. a 95°C, se lisaron gusanos de las 12 poblaciones resultado de las hermafroditas seleccionadas de la F3, también gusanos de tipo silvestre (N2) y de la cepa ATM-1, y del resultante se tomó 1µl como molde para realizar PCR.

Para la PCR se prepararon dos mezclas con 176.5µl de agua desionizada, 25µl de 10x PCR Buffer (número de catálogo P2192 en SIGMA), 7.5µl de MgCl₂ 50mM (número de catálogo 11699113001 en SIGMA), 5µl de desoxinucleótidos 100mM (número de catálogo DNTP100 en SIGMA), 12.5µl del oligonucleótido ojlt163 10µM y 12.5µl del oligonucleótido ojlt164 10µM (Mix. 1) (Tabla 1). Por otro lado, se mezclaron 12.5µl del oligonucleótido ojlt163 10µM y 12.5µl del oligonucleótido ojlt166 10µM (Mix. 2). Los oligonucleótidos ojlt163 y ojlt164 sirven para confirmar la presencia del gen sin modificación y amplifican un total de 2260 pb., mientras que los oligonucleótidos ojlt 163 y ojlt166 sirven para confirmar la presencia del gen mutado y amplifican un total de 2006 pb. Del Mix. 1 se tomaron 8.9µl para cada reacción y se agregó 1µl de la lisis de los gusanos (N2, ATM-1 y 12 poblaciones producto de la F3) y 0.1µl de Taq polimerasa 5U/µl (número de catálogo D1806 en SIGMA), es decir, se tuvieron un total de 14 tubos, y se siguió el protocolo presentado en la Tabla 2.

Para confirmar la homocigosidad de la variante mutante del gen *mctp-1* en la población 1 y las posteriores generaciones, se realizó lisis de diez individuos con el buffer de lisis mencionado anteriormente, se tomaron 10µl del buffer de lisis y se agregaron 10 individuos adultos, se congelaron durante media hora, posteriormente se colocaron en el termociclador 1 h a 60°C y 30 min a 95°C, se lisaron gusanos

de la población 1, del tipo silvestre (N2) y de la cepa ATM-1, y del resultante se tomó 1µl como molde para realizar PCR.

Para la PCR se tomaron 8.9µl de los mix mencionados anteriormente, se agregó 1µl del resultante de la lisis de los individuos y 0.1µl de Taq polimerasa 5U/µl (número de catálogo D1806 en SIGMA) y se siguió el protocolo presentado en la tabla 2.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para PCR

Oligos	Secuencia de oligonucleótidos
Ojlt163	5'CCTCCGAAATCTTTAGCGACC3'
Ojlt164	5'AGCCACGAGAAAGGCAATAACG3'
Ojlt166	5'GCCAATTCATCCCGGTTTCTG3'

Tabla 2. Protocolo PCR

	Temperatura	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
Inicio	94°C	3	1
Desnaturalización	94°C	0:45	30
Alineamiento	59°C	0:30	
Extensión	72°C	2:30	
Extensión final	72°C	5	1

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los productos obtenidos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Se cargaron las muestras en los pozos, y se realizó electroforesis a 110 volts durante 40 min, el marcador de peso molecular utilizado para confirmar el peso de las moléculas fue Gene Ruler DNA ladder mix.

ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA Y VIDEO GRABACIÓN

Para analizar el efecto de la estimulación optogenética, se colocaron 5 individuos en una caja Petri con NGM y una rondana de cobre con 1cm de diámetro, se dejaron 10 min en habituación y después se tomó video de los individuos durante 1 min (30 seg. sin estímulo y 30 seg. con estímulo). El estímulo fue realizado con un LED de alta potencia con longitud de onda de 450nm, el foco de emisión fue colocado a 6.4 cm de distancia del centro de la caja y con un ángulo de incidencia de 45°. Los videos fueron tomados con una cámara PCO. Edge 4.2 a una frecuencia de 10fps.

ANÁLISIS DE VIDEOS Y DATOS

Los videos fueron analizados en Wormlab (<https://www.mbfbioscience.com/wormlab>), y se obtuvieron datos del ángulo de flexión desde el punto medio, se obtuvieron un total de 600 datos, ya que los videos fueron tomados a 10 fps, 300 de estos datos fueron correspondientes a los 30 s. anteriores al estímulo, y los otros 300 a los 30 s. durante el estímulo.

Los datos por individuo fueron separados en los periodos: antes y durante el estímulo. Cada grupo de datos fue promediado, de tal forma que se obtuvieron dos datos por individuo, uno antes del estímulo y otro durante el estímulo, estos datos fueron agrupados por cepa y por periodo, y posteriormente comparados con una Anova de una vía y una prueba pos hoc de Tukey. Es importante mencionar que se realizó una prueba de poder, para calcular el número de muestreo necesario, y el resultado fue de 11 individuos por cepa. También se realizó una prueba de Shapiro-Wilk, para verificar la normalidad de los datos, y todos los grupos presentaron una distribución normal. Los datos fueron graficados en R, mediante boxplot.

6. RESULTADOS

Generación de una cepa que porta la delección de *mctp-1* y expresa canalrodopsina.

La primera parte de este estudio consistió en generar una cepa de gusanos transgénicos que expresara la canalrodopsina en las neuronas colinérgicas adicionado al alelo mutado en *mctp-1* ATM1. Debido a la dificultad para obtener machos de EG5096, primero se construyó una cepa que portara el transgen que expresa canalrodopsina bajo un fondo *him* (cepa DR466) que permitiera generar machos con mayor eficiencia. La cepa resultante, que llamamos ATM-5 (*ox/s364 X; him-5(e1490)V*), expresa canalrodopsina y produce aproximadamente un 33% de machos.

Posteriormente se cruzó la cepa ATM-5 con ATM-1 y para determinar si la versión mutada del gen *mctp-1* estaba presente en las siguientes generaciones se seleccionaron 12 hermafroditas en F3 y se realizó PCR con el par de oligonucleótidos Ojlt163 y Ojlt166, que amplifican 2006pb, si está presente la versión mutada del gen, y no hay amplificación en la versión silvestre de gen.

Parte de los resultados de la genotipificación de la F3 se muestra en la figura 6. Como se puede observar, de las seis muestras analizadas en este gel, sólo una presenta la mutación en el gen *mctp-1* (carril 1).

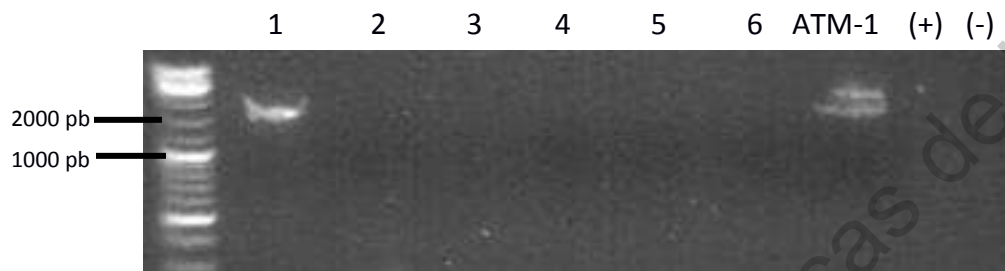


Figura 6. Gel de electroforesis de genotipificación de F3 con los oligonucleótidos Ojlt163 y Ojlt166. Se indica la banda de 2006pb que corresponde a la inserción de GFP y *unc-119* en el gen *mctp-1*. Primer pozo marcador de peso molecular, siguientes pozos (1-6) corresponden a las muestras seleccionadas en F3, pozo ATM-1 es el control positivo de amplificación y noveno pozo control negativo. Sólo la línea 1 mostró amplificación positiva para la versión mutante de *mctp-1*.

Después de 10 generaciones, se realizó la genotipificación para confirmar que la mutación fuera estable, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7. Como se puede observar, la muestra 1 fue positiva para la versión mutada del gen, y negativa para la versión silvestre; es importante mencionar que durante estas 10 generaciones, la muestra presentó la fluorescencia en el 100% de los individuos (Figura S1).

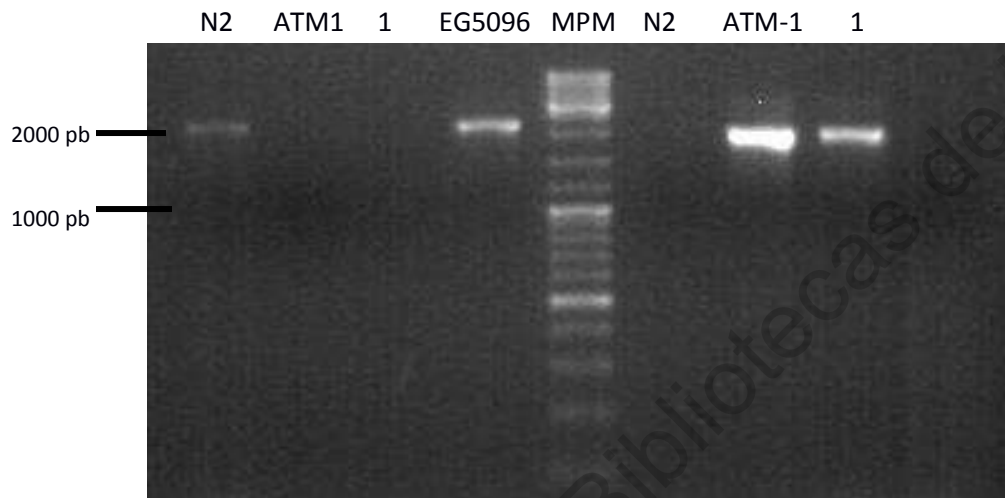


Figura 7. Genotipificación de la línea 1. En el carril MPM, se encuentra el marcador de peso molecular. En los primeros cuatro carriles, se amplificó la versión silvestre del gen *mctp-1* (oligos Ojlt163 y Ojlt164). En los últimos 4 carriles, se amplificó la versión mutante del gen *mctp-1* (oligos Ojlt163 y Ojlt166). N2, cepa silvestre, ATM1 porta el alelo mutado en *mctp-1*, 1, refiere a la nueva línea de gusanos transgénicos que portan el alelo mutado en *mctp-1*, y EG5096 corresponde al transgénico que expresa la canalrodopsina en las neuronas colinérgicas. Los resultados indican que la línea 1 porta el alelo mutado de *mctp-1* como en la cepa ATM1.

Inducción de la actividad neuronal por optogenética.

Una vez obtenida la cepa, que porta el alelo mutado en *mctp-1* y expresa la canalrodopsina en las neuronas colinérgicas, de aquí en adelante referida como cepa ATM5 (*oxIs364 X; him-5(e1490)V; mctp-1 (amt1)*) se realizó la estimulación optogenética y captura de videos, y se procedió a analizar los datos obtenidos del ángulo de flexión desde el punto medio (Bending angle midpoint) (Figura 8). Cabe mencionar que ATM5 tiene un fenotipo aparentemente silvestre, no se observaron cambios evidentes en su actividad motora ni agregación de los individuos.

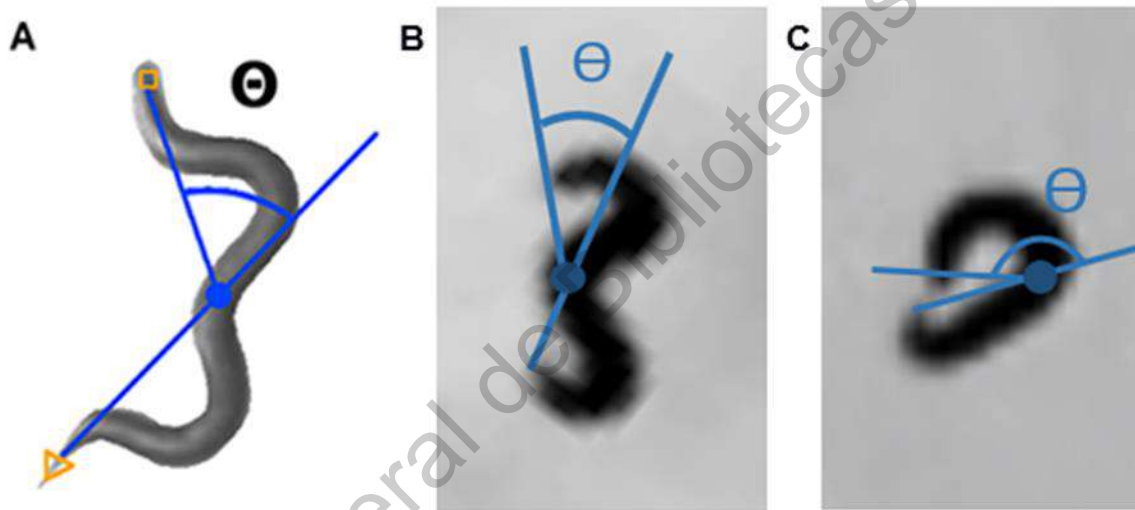


Figura 8. Ángulo de flexión desde el punto medio. (A) Ángulo de flexión desde el punto medio (Bending angle midpoint). Tomado de (Angstman et al., 2016). (B) Ángulo de punto medio de cepa EG5096. (C) Ángulo de punto medio de cepa ATM5.

Los datos obtenidos fueron analizados y graficados en R, los resultados se muestran en la Figura 9. Los datos y los análisis realizados demuestran que no hay diferencia significativa en los ángulos en la cepa EG5096 antes y durante el estímulo, en contraste, sí hay diferencia significativa al comparar los ángulos de la cepa ATM5 antes y durante el estímulo.

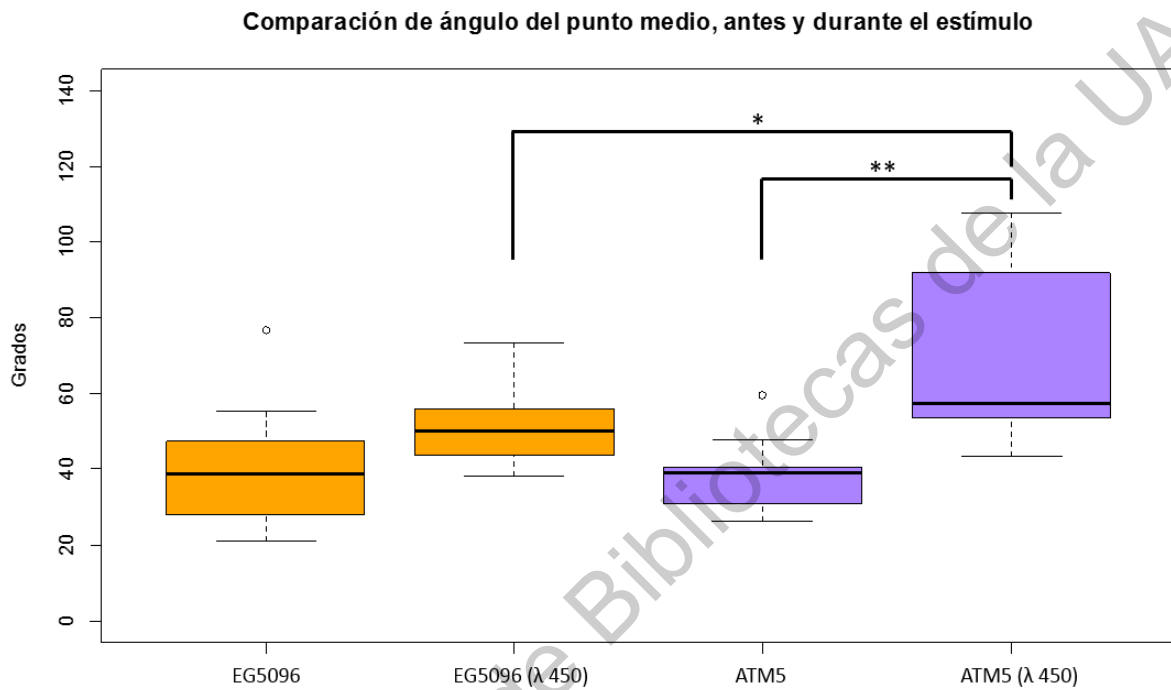


Figura 9. Comparación del ángulo de punto medio, antes y durante el estímulo. Gráfica de comparación de ángulos de punto medio. En el eje Y, se muestran los grados de la curvatura, y en el eje X las cepas, los datos durante el estímulo son indicados con (λ 450). Código de significancia: '*' $p < 0.05$, '**' $p < 0.01$.

7. DISCUSIÓN

Estudios previos mostraron que la cepa ATM1 mutante del gen *mctp-1* en *C. elegans* muestra problemas asociados a la actividad presináptica, ya que es menos sensible al dicarb que la cepa silvestre (Téllez et al., 2020). Asimismo, un trabajo previo del grupo de investigación, mostró que la mutación en *mctp-1* no genera cambios en la frecuencia de eventos de calcio asociados a la actividad sináptica en las neuronas del cordón nervioso (Avilés, 2019). En el presente trabajo se contemplaba que la mutación en *mctp-1* induce cambios sutiles en la actividad sináptica por lo que se tenía la hipótesis de que, si este es el caso, la exacerbación de la actividad sináptica por estimulación optogenética haría evidentes los cambios en la presinapsis y se reflejaría por diferencias en la respuesta motora. Sin embargo, durante la experimentación se observó que la mayoría de los individuos de la cepa ATM5 no se paralizaban al incidir la luz a $\lambda 450$ nm, en cambio lo que se observó consistentemente fue que durante todo el estímulo había periodos de contracción y relajación que no se observaron en la cepa control EG5096; fue por esto que se decidió comparar el ángulo de flexión desde el punto medio (Figura 8), ya que refleja la intensidad de la contracción de los individuos antes y durante el estímulo.

Al comparar los datos obtenidos antes del estímulo, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, al comparar los datos obtenidos durante el estímulo, se encontraron diferencias significativas, la cepa ATM5 presentó valores más altos de ángulo de contracción que la cepa EG5096 (Figura 9). Esto indica que el mutante de *mctp-1* muestra problemas asociados a la actividad sináptica. Hace falta una exacerbación de la actividad sináptica para poder observarlos. Con respecto al incremento en el ángulo de flexión desde el punto medio en la cepa mutante, no se puede dilucidar si *mctp-1* está involucrado en procesos de exocitosis o endocitosis en la sinapsis, lo que sí se puede afirmar es que hay diferencias en el funcionamiento sináptico al carecer de la proteína MCTP.

Otros estudios han mostrado que la localización intracelular de las proteínas MCTP están en retículo endoplasmático, endosomas tardíos, endosomas de reciclaje y lisosomas, organelos involucrados en endocitosis (Espino, 2020; Durán, 2019; Genc

et al., 2017). Es importante mencionar que hay diferentes tipos de endocitosis para el reciclamiento de vesículas en la actividad sináptica (Watanabe et al., 2013; Soykan et al., 2016) y la más involucrada con los organelos en los que se ubican las proteínas MCTP es la endocitosis ultra rápida (UFE) (Figura 10), cuya presencia se ha demostrado en las uniones neuromusculares de *C. elegans* (Watanabe et al., 2013).

Tomando en cuenta los estudios farmacológicos con aldicarb (Télez et al., 2020), cuyos resultados demuestran que la cepa mutante es menos sensible a la inhibición de la acetilcolinesterasa, es decir, que la cepa mutante de *mctp-1* le lleva más tiempo llegar a concentraciones de acetilcolina en la unión neuromuscular que provoquen una parálisis en el individuo, es evidente que esta cepa presenta un fallo en la actividad presináptica. Lo que aún no queda claro es en qué nivel, sin embargo, con las evidencias de localización de MCTP en endosomas, y el papel de algunos de estos organelos en la endocitosis ultrarápida (Watanabe et al., 2013), es probable que las proteínas MCTP estén involucradas directamente con exocitosis o con el reciclamiento o formación de vesículas sinápticas, lo que probablemente llevaría a cambios en la tasa de liberación de neurotransmisores y a observaciones como las que se obtuvieron en este trabajo.

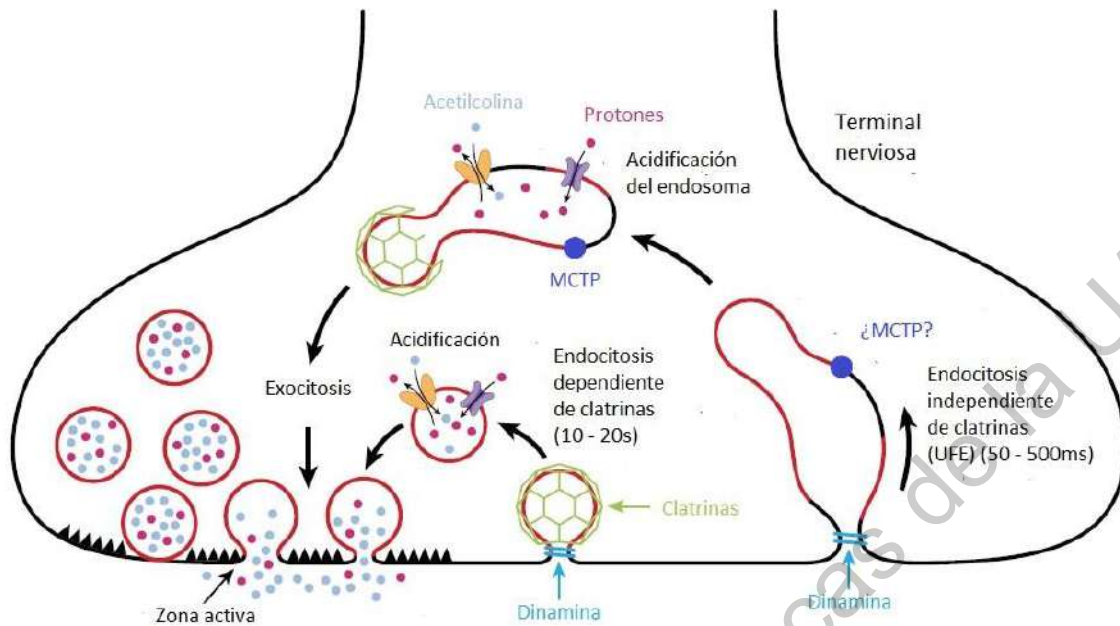


Figura 10. Exocitosis y endocitosis en la terminal nerviosa y posible papel de *mctp-1*. Durante la exocitosis, las vesículas sinápticas (círculos rojos) se fusionan con la membrana en la zona activa para liberar las moléculas de neurotransmisores (acetilcolina; azul pálido) y protones (rojo) en la hendidura sináptica. Las vesículas sinápticas que se fusionaron con la membrana plasmática son recicladas para hacer nuevas vesículas, en un proceso que involucra endocitosis lenta (al centro de la imagen) o rápida (a la derecha de la imagen derecha). La endocitosis lenta requiere de proteínas llamadas clatrina (verde), una vez formadas estas se acidifican con un transportador de protones (morado), y posteriormente un transportador proteico (amarillo) carga acetilcolina en las vesículas a cambio de protones. La endocitosis rápida involucra la producción de largas estructuras que son endosomas de morfología peculiar, que poco a poco se acidifican gracias a la acción de una bomba de protones, posteriormente un transportador proteico carga el endosoma de acetilcolina, intercambiándola por protones. Las nuevas vesículas sinápticas son formadas a partir del endosoma en un proceso que requiere de clatrina. Ambos modos de endocitosis requieren dinamina. Las proteínas MCTP (círculo azul) han sido localizadas en endosomas, sin embargo, su posible ubicación en el proceso de formación de endosomas a partir de la membrana plasmática, no ha sido demostrado. (Tomado y modificado de Gross y Gersdorff, 2016).

Por otro lado, se debe señalar que la localización intracelular de MCTP no es solamente en endosomas, sino también en otros organelos que han sido involucrados en el transporte de proteínas directamente desde el retículo endoplasmático hacia la membrana plasmática, y esto podría interferir en la generación de nuevas vesículas sinápticas (Espino et al., 2020; Bowen et al., 2017); además, algunos estudios en *Danio rerio* encontraron picos de expresión de ARNm de MCTP en diferentes estadios de desarrollo, en regiones caracterizadas por una gran migración celular y liberación de moléculas al medio extracelular durante el desarrollo (Espino et al., 2020), por lo que el papel de estas proteínas, si bien parecen estar involucradas en procesos de tráfico de membranas, no es claro.

Dirección General de Bibliotecas de la UNQ

8. CONCLUSIONES

Se generó una nueva cepa (ATM5) de *C. elegans* que porta la delección del gen *mctp-1* y expresa canalrodopsina en el sistema colinérgico.

Se estandarizó la técnica de estimulación optogenética en *C. elegans*.

La mutación en *mctp-1* induce cambios en el funcionamiento sináptico deducidos por su respuesta motora exacerbada durante la inducción optogenética.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

9. BIBLIOGRAFIA

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff. M., Roberts, K. y Walter, P. 2011. Introducción a la biología celular. D.F., México: Editorial médica panamericana S.A. de C.V.

Avilés, A. 2019. Análisis de la dinámica de calcio en neuronas motoras del *knock out* del gen *mctp-1* en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Universidad Nacional Autónoma de México. Santiago de Querétaro, Qro.

Bansal, D. y Campbell, K. 2004. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol.* 14, pp. 206–213

Bany, I., Dong, M., y Koelle, M. 2003. Genetic and cellular basis for acetylcholine inhibition of *Caenorhabditis elegans* egg-laying behavior. *J. Neurosci.* 23, pp.8060–8069.

Bergs, A., Schultheis, C., Fisher, E., Tsunoda, S., Erbguth, K., Husson, S., Govorunva, E., Spudich, L., Nagel, G., Gottschalk, A. y Liewald, J. 2018. Rhodopsin optogenetic toolbox v2.0 for light sensitive excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 13(2): e0191802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191802>

Bowen, A., Bourke, A., Hiester, B., Hanus, C. y Kennedy, M. 2017. Golgi-independent secretory trafficking through recycling endosomes in neuronal dendrites and spines. *eLife.* 6.

Brenner, S. 1974. The genetic of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77, pp. 71 – 94.

Chapman, E. 2008. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu Rev Biochem*, 77:615-41

Coussens, L., Parker, P., Rhee, L., Yang, T., Chen, E., Waterfield, M., Francke, U., Ullrich, A. 1986. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science*, 233, pp. 859 – 866.

Djurovic, S., Le, S., Kähler, A., Jönsson, E., Agartz, I., Steen, V., Hall, H., Wang, A., Rasmussen, H., Melle, I., Werge, T. y Andreassen, O. 2009. Association of MCTP2

gene variants with schizophrenia in three independent samples of Scandinavian origin (SCOPE). *Psychiatry Res.* 168, pp. 256–8.

Durán, K. 2019. Localización intracelular de la proteína Mctp en neuronas del sistema nervioso central de *Danio rerio*. Universidad Nacional Autónoma de México. Santiago de Querétaro, Qro.

Genç, Ö., Dickman, D., Ma, W., Tong, A., Fetter, R. y Davis, G. 2017. MCTP is an ER-resident calcium sensor that stabilizes synaptic transmission and homeostatic plasticity. *Elife*, 6, pp. 1-23.

Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R., Li, C., Rosahl, T., Stevens, C., y Südhof, T. 1994. Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79, pp. 717–727.

Gross, O. y Gersdorff, H. 2016. Recycling at synapses. *eLife* ;5:e17692.

He, F. 2011. Making Males of *C. elegans*. *Bio-protocol* Bio101: e58.

Hosono, R., Sassa, T., y Kuno, S. (1989). Spontaneous mutations of trichlorfon resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Zool. Sci.*, 6, pp. 697–708.

Husson, S., Gottschalk, A. y Leifer, A. 2013. Optogenetic manipulation of neural activity in *C. elegans*: From synapse to circuits and behaviour. *Cell*, 105, pp. 235 – 250.

Hwang, H., Dawn, E., Matsunaga, Y., Benian, G., Ono, S., y Lu, H. 2016. Muscle contraction phenotypic analysis enabled by optogenetics reveals functional relationships of sarcomere components in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, pp 1-10.

Perrimon, N. y Mathey, P. (2007). Applications of High-Throughput RNA Interference Screens to Problems in Cell and Developmental Biology. *GENETICS*, 175, pp 7-16.

Lalani, S., Ware, S., Wang, X., Zapata, G., Tian, Q., Franco, L., Jiang, Z., Bucasas, K., Scott, D., Campeau, P., Hanchard, N., Umaña, L., Cast, A., Patel, A., Cheung,

S., McBride, K., Bray, M., Chinault, A., Boggs, B., Huang, M., Baker, M., Hamilton, S., Towbin, J., Jefferies, J., Fernbach, S., Potocki, L., Belmont, J. 2013. MCTP2 is a dosage-sensitive gene required for cardiac outflow tract development. *Human Molecular Genetics*, 22, pp. 4339–4348.

Liu, K. y Sternberg, P. 1995. Sensory regulation of male mating behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron*, 14, pp. 79–89.

Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. y Sugimoto. 2001. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current Biology*, 11, pp. 171-176.

McKay, J., Raizen, D., Gottschalk, A., Schafer, W., y Avery, L. 2004. eat-2 and eat-18 are required for nicotinic neurotransmission in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Genetics*, 166, pp. 161–169.

Nagel, G., Brauner, M., Liewald, J., Adeishvili, N., Bamberg, E. y Gottschalk, A. 2005. Light Activation of Channelrhodopsin-2 in Excitable Cells of *Caenorhabditis elegans* Triggers Rapid Behavioral Responses. *Current Biology*, Vol. 15, pp. 2279–2284.

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

Pereira, L., Kratsios, P., Serrano, E., Sheftel, H., Mayo, A., Hall, D., White, J., LeBoeuf, B., Garcia, L., Alon, U. y Hobert, O. 2015. A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans*. *eLIFE*, 4:e12432.

Perin, M., Johnston, P., Ozcelik, T., Jahn, R., Francke, U. y Südhof, T. 1991. Structural and functional conservation of synaptotagmin (p65) in *Drosophila* and humans. *J Biol Chem*. 266(1):615-22.

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*, 135, pp. 492–507.

Rizo, J. y Südhof, T. 1998. C2-domains, Structure and Function of a Universal Ca²⁺-binding Domain. *The journal of biological chemistry*, 273, pp. 15879-15882.

Shin, O., Han, W., Wang, Y. y Südhof, T. 2005. Evolutionarily conserved multiple c2 domain proteins with two transmembrane regions (MCTPs) and unusual Ca²⁺-binding properties. *The journal of biological chemistry*, 280, pp. 1641 – 1651.

Soykan, T., Maritzen, T. y Haucke, V. 2016. Modes and mechanisms of synaptic vesicle recycling. *Current Opinion in Neurobiology*, 39, pp.17–23

Südhof, T. 2002. Synaptotagmins: why so many?. *J. Biol. Chem.* 277, pp. 7629–7632

Sultzon, J., Horvitz, H. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, 56, pp. 110-156.

Téllez, J. 2014. Patrón de expresión y diversidad estructural del gen D2092.1 de *C. elegans*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Téllez, J. y Martínez, A. 2018. Altered rhythmic locomotion of mutants of the gene *mctp-1* of *Caenorhabditis elegans*.

Thomas, J. 1990. Genetic analysis of defecation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 124, pp. 855–872.

Towbin, J., Jefferies, J., Fernbach, S., Potocki, L. y Belmont, J. 2013. MCTP2 is a dosage-sensitive gene required for cardiac outflow tract development. *Hum. Mol. Genet.* 22, pp. 4339–4348.

Watanabe, S., Liu, Q., Davis, M., Hollopeter, G., Thomas, N., Jorgensen, N. y Jorgensen, E. 2013. Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *Elife*, 2:e00723.

White, J., Southgate, E., Thomson, J. y Brenner, S. 1984. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond B*, 314, pp.1–340.

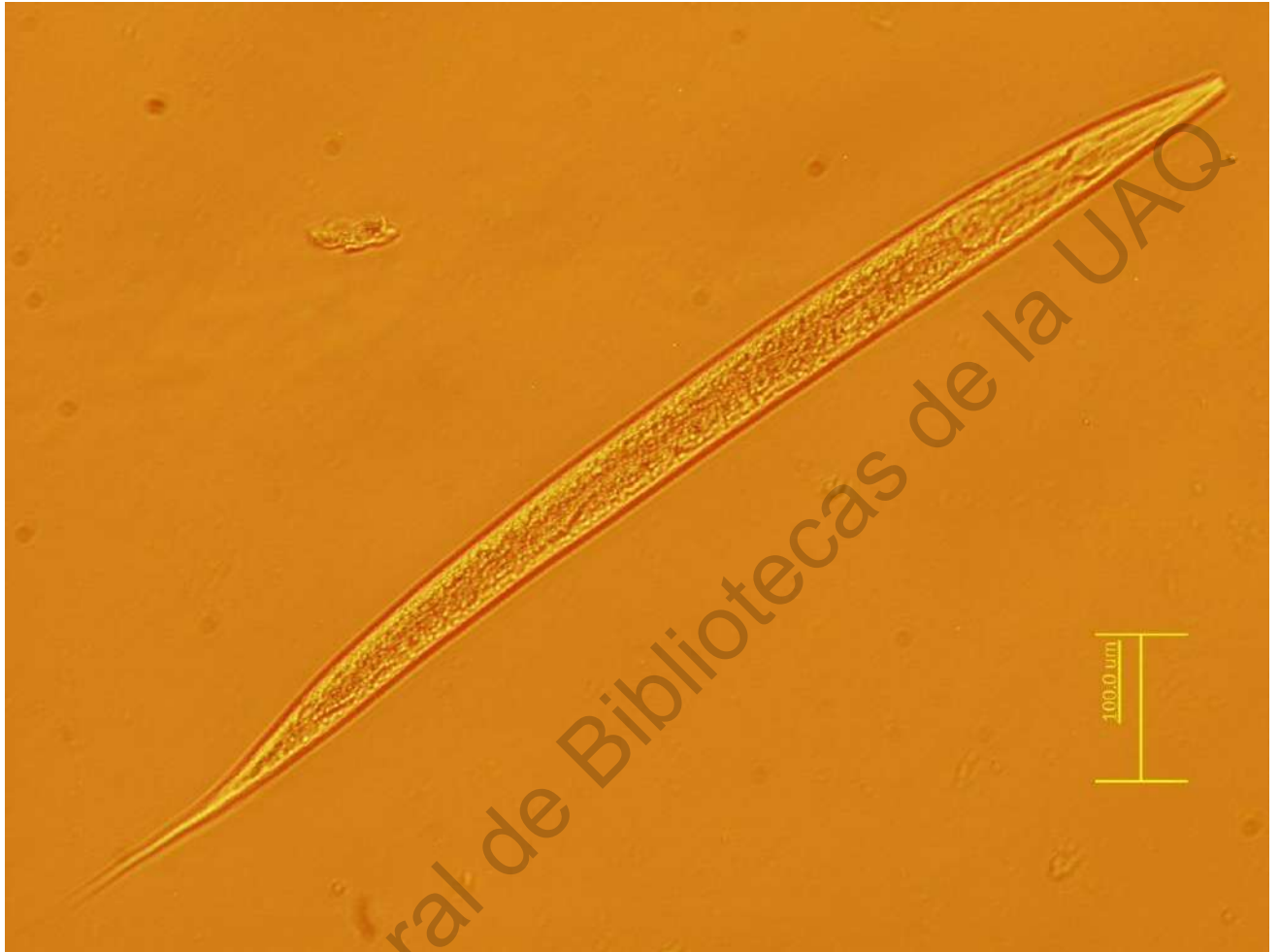
Winnier, A., Meir, J., Ross, J., Tavernarakis, N., Driscoll, M., Ishihara, T., Katsura, I., y Miller, D. 1999. UNC-4/UNC-37-dependent repression of motor neuron-specific genes controls synaptic choice in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.*, 13, pp. 2774–2786.

Zhang, F., Wang, L., Brauner, M., Liewald, J., Kay, K., Watzke, N., Wood, P., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A. y Deisseroth, K. 2007. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*. Apr 5;446(7136):633-9.

Tabla S1. Lista de Cepas

Cepa	Genotipo
N2	Bristol wild-isolate
ATM1	mctp-1(amt1) I
EG5096	oxIs364 [unc-17p::channelrhodopsin::mCherry + lin-15(+)+ Litmus].
DR466	him-5(e1490) V.
ATM5	mctp-1(amt1) I; oxIs364 [unc-17p::channelrhodopsin::mCherry + lin-15(+)+ Litmus].

A



B

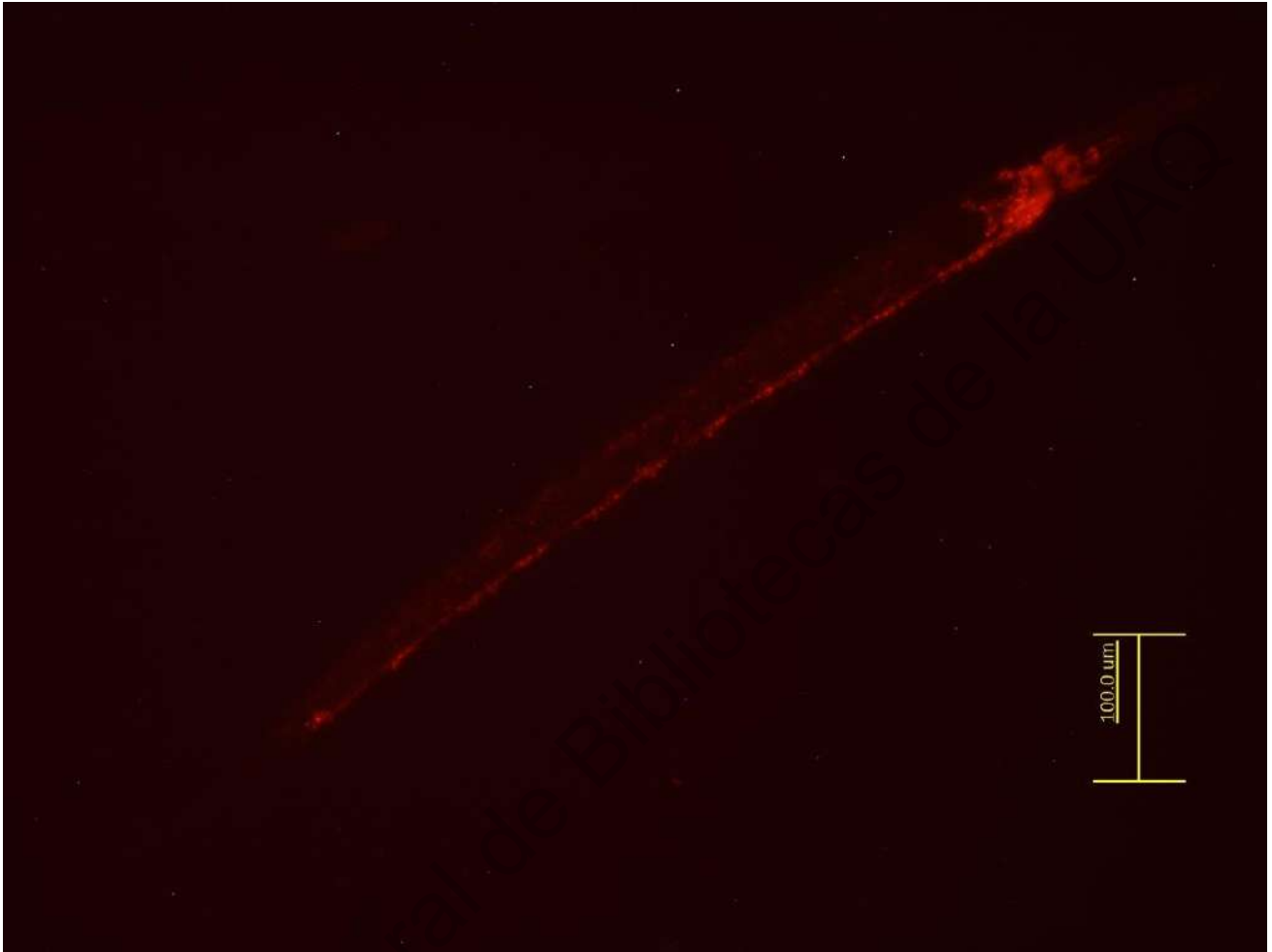


Figura S1. Foto de cepa ATM5 a microscopio de epifluorescencia. A) Tomada a microscopio de epifluorescencia en campo claro. B) Tomada a microscopio de epifluorescencia con excitación de 530nm. En rojo las neuronas donde se expresa el gen reportero (mCherry) y que coinciden con la expresión de la canalrodopsina en esta cepa.