



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Análisis de la dinámica de calcio en neuronas motoras del *knock out* del
gen *mctp-1* en el nematodo *Caenorhabditis elegans*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta

Alma Leticia Avilés García

Dirigido por:

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Co-Director:

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Querétaro, Qro. a 15 de noviembre de 2019



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

Análisis de la dinámica de calcio en neuronas motoras del *knock out* del
gen *mctp-1* en el nematodo *Caenorhabditis elegans*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta

Alma Leticia Avilés García

Dirigido por:

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Co-Director:

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Carlos Saldaña Gutiérrez
Presidente.

Ataúlfo Martínez Torres
Secretario

Fausto Arellano Carbajal
Vocal

Angelina Rodríguez Torres
Suplente

Teresa Edith Garay Rojas
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario a noviembre de 2019

México

DEDICATORIA

A mi familia

Mis padres Mario Avilés Torres y Marta Susana García Díaz.

Mis hermanas Ma. Susana y Ana Lucía Avilés García.

Mis mayores logros han sido por ustedes que a donde quiera que vaya y me encuentre jamás me siento sola porque los llevo conmigo.

A las nuevas y futuras generaciones, una parte importante que me impulso a realizar esto, fue por la inquietud de descubrir nuevas ramas de estudio, nuevos mundos y nuevos pensamientos. Seamos muchas o pocas las personas que debamos ver por el fortalecimiento y mejoramiento de nuestro país México y de nuestro bello hogar la Tierra, en la formación de nuevos maestros quienes impartirán y conducirán a las próximas generaciones para el desarrollo de nuevos descubrimientos y tecnologías en diferentes áreas de la investigación.

Dirección General de Bibliotecas UJAQ

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro por darme la oportunidad de formar parte de la maestría en Ciencias Biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme apoyo para llevar a cabo y concluir este proyecto siendo becaria de su programa con el CVU/Becario 857433.

Al Laboratorio D15 de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por ofrecerme un espacio de trabajo y los equipos necesarios para la realización de este trabajo.

Al Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS-UAQ y LAVIS-UNAM); Ing. Luis Alberto Aguilar Bautista, MC Alejandro de León Cuevas; Lic. Carlos Sair Flores Bautista, por su valiosa ayuda en el procesamiento de imágenes.

A mis directores de tesis el Dr. Carlos Saldaña y al Dr. Ataúlfo Martínez Torres, por permitirme ser parte de un proyecto de investigación y enseñarme lo maravilloso que es la biología y lo mucho que se puede aprender de ella, gracias por sus atenciones, cuidados, tolerancia y participación hacia nuestro trabajo.

A mi comité tutorial, integrado por la Dra. Angelina Rodríguez Torres, la Dra. Teresa Edith Garay Rojas y el Dr. Fausto Arellano Carbajal por su apoyo y aportación durante mi formación como maestra en ciencias. Por ser grandes ejemplos y por darme el ánimo de seguir hacia adelante con prudencia y constancia.

A mis compañeros y amigos de laboratorio; en especial a las futuras doctoras Edith Espino Saldaña por su dedicación e interés en apoyar y enseñarme nuevos temas que yo desconocía, a Gabriela Gómez, por llamarme la atención cuando lo necesitaba por mis distracciones y empujarme a no detener el paso jamás, a Berenice Soria por brindarme más que un hogar a lado de ella y sus hijos, por hacerme participe de una pequeña familia y cuidar de mí, a Elizabeth Pereida mi buena amiga Freya Heldrasil, a quien le debo mucho, no sé cómo expresarle lo tan agradecida que estoy con ella, sin duda, siempre estuviste ahí para mí y prometo siempre estar yo para ti. A mis amigos de la Worm Station Eduardo Díaz, Iván Tovilla,

Mario Vázquez, Marco González, Joel Gallardo y José Luis Téllez; Miguel Camarena y Eduardo Olivares; en verdad gracias chicos por hacerme pasar gratos, divertidos e interesantes momentos.

A todos ustedes...Gracias por cruzarse en mi vida :)

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES	4
i. MCTPs en <i>C. elegans</i>	4
ii. El nematodo <i>C. elegans</i> como modelo experimental.....	7
iii. Sistema nervioso de <i>C. elegans</i>	8
iv. Dinámica de Ca ²⁺	9
III. HIPÓTESIS	10
IV. OBJETIVOS.....	11
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
i. Mantenimiento de <i>C. elegans</i>	12
ii. Cruza <i>atm1</i> con transgénico LX1960.....	12
iii. Genotipificación de <i>atm-1</i> /LX1960.....	13
iv. Secuenciación de DNA genómico de <i>knock out (atm1)</i>	14
v. Preparación de nematodos para microscopía.....	14
vi. Videograbación al microscopio de epifluorescencia	15
vii. Análisis de imágenes.....	15
viii. Análisis de datos.....	16
ix. Estadística descriptiva.....	16
VI. RESULTADOS.....	17
i. Genotipificación cepa <i>atm-1</i> /LX1960.....	17
ii. Registro de la actividad neuronal.....	18
iii. Número e intervalo de eventos de Ca ²⁺	20
VII. DISCUSIÓN.....	22

VIII. CONCLUSIONES	24
IX. BIBLIOGRAFÍA	25
X. SUPLEMENTARIAS	29

Dirección General de Bibliotecas UAQ

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Representación topológica de la proteína MCTP.	4
Figura 2. Estructura del gen <i>mctp-1</i> de <i>C. elegans</i>	5
Figura 3. Expresión de <i>mctp-1</i> en el sistema nervioso de <i>C. elegans</i>	5
Figura 4. Efectos sobre la actividad motora de la supresión del gen <i>mctp-1</i>	6
Figura 5. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	7
Figura 6. Sistema Nervioso de <i>C. elegans</i>	8
Figura 7. Cepas de <i>C. elegans</i>	12
Figura 8. Lista de oligos para genotipificación de <i>knock out</i> y cepa silvestre.	13
Figura 9. Compuestos de la PCR.	14
Figura 10. Protocolo de PCR.	14
Figura 11. Fijación del nematodo	15
Figura 12. Electroforesis y patrón de expresión de mCherry de <i>atm1/LX1960</i>	17
Figura 13. Captura de imagen de calcio.	18
Figura 14. Normalización de la señal de calcio ($\Delta F/F_0$).....	19
Figura 15. Número de eventos promedio de las VCn	20
Figura 16. Tiempo promedio entre eventos de las neuronas	21
Figura Suplementaria 1. Secuencia de fragmento del gen <i>unc-119</i>	31

RESUMEN

Existe una familia de proteínas denominadas MCTPs (Proteínas con múltiples dominios C2 y regiones transmembranales) que presentan tres dominios C2 y dos regiones transmembranales. Las MCTPs están relacionadas estructuralmente con otras proteínas que presentan dominios C2 como las sinaptotagminas y ferlinas de las cuales se sabe ejercen funciones importantes en la transmisión sináptica, la transducción de señales y tráfico de membrana, en donde los dominios C2 actúan como sensores de la concentración del ion calcio (Ca^{2+}). No obstante, hasta ahora se sabe poco acerca de la función general de las MCTPs. En estudios recientes en el nematodo *Caenorhabditis elegans* se ha demostrado que el promotor del gen *mctp-1* dirige la expresión de un gen reportero GFP en la mayoría de las neuronas y que su supresión mediante la técnica de CRISPR/Cas9 genera cambios motores que se reflejan en el comportamiento de coleteos en medio líquido y una reducción de la tasa de huevos; por lo que se infiere que la proteína MCTP-1 pudiese jugar un papel en la transmisión sináptica. El objetivo del presente proyecto ha sido determinar si la actividad sináptica se ve modificada cuando se suprime el gen *mctp-1* en *C. elegans*. Para ello se utilizó un sensor de la concentración de calcio genéticamente codificado (GCaMP5) que es expresado en las neuronas motoras VC del nematodo. Al reportar los cambios en la concentración de Ca^{2+} , GCaMP5 indica *in vivo* el estado de la actividad neuronal. Para determinar la actividad de GCaMP5 se utilizó microscopía de epifluorescencia y una cámara de alta sensibilidad. Las observaciones mostraron que en el *knock out* de *mctp-1* no hay modificaciones aparentes en las oscilaciones de Ca^{2+} , ni en el número ni en el tiempo entre eventos. Además, no se modificaron en la misma medida al exponer a los nematodos a soluciones de alta o baja osmolaridad. Estos resultados sugieren que pese a la no expresión neuronal de *mctp-1* y la clara alteración en conductas motoras y tasa de ovoposición, el número y la frecuencia de transitorios de Ca^{2+} sugieren que no hay alteraciones evidentes en la transmisión sináptica, por lo que MCTP-1 podría estar jugando un papel río abajo a los eventos de exocitosis implicados en la liberación de neurotransmisores.

Palabras clave: *Caenorhabditis elegans*, MCTP-1, motoneuronas, calcio.

ABSTRACT

There is a family of proteins called MCTPs which have three C2 domains and two transmembrane regions. These proteins are structurally related to other proteins that have C2 domains such as synaptotagmins and ferlins which are known to exert important functions in synaptic transmission, signal transduction and membrane traffic, where C2 domains act as concentration sensors of the calcium ion (Ca^{2+}). However, so far little is known about the general function of MCTPs. Recent studies in *Caenorhabditis elegans* have shown that the *mctp-1* gene promoter directs the expression of a reporter gene GFP in most neurons, and that its suppression by CRISPR/Cas9 technique generates motor changes that are reflected in the thrashing in a liquid medium and a reduction in the rate of eggs. Therefore it can be inferred that the MCTP-1 protein could play a role in synaptic transmission. The objective of this project has been to determine if synaptic activity is modified when the *mctp-1* in *C. elegans* is suppressed. To do so, a genetically encoded calcium concentration sensor (GCaMP5) was used, which is expressed in the VC motor neurons of the nematode. When reporting changes in Ca^{2+} concentration, GCaMP5 indicates the state of neuronal activity *in vivo*. To determine the activity of GCaMP5, an epifluorescence microscopy with a high sensitivity camera were used. The observations showed that in the *knockout* of *mctp-1* there are no apparent modifications in the oscillations of Ca^{2+} , neither in the number nor in the time between events. In addition, they were not modified to the same extent by exposing the nematodes to solutions of high or low osmolarity. These results suggest that despite the not neuronal expression of *mctp-1* and the clear alteration in motor behaviors and oviposition rate, the number and frequency of transients of Ca^{2+} suggest that there are no evident alterations in synaptic transmission, so MCTP-1 could be playing a role downstream to exocytosis events involved in the release of neurotransmitters.

Key words: *Caenorhabditis elegans*, MCTP-1, motor neurons, calcium.

I. INTRODUCCIÓN

El ion Ca^{2+} es fundamental para la neurotransmisión ya que es determinante su participación para la liberación vesicular de neurotransmisores. La liberación vesicular depende de diversas proteínas que requieren para su acción la interacción con Ca^{2+} (Clapham, 2007) y aunque se conoce la estructura y función de muchas de estas proteínas, aún existen otras cuyo papel no ha sido estudiado.

Las proteínas como las sinaptotagminas, ferlinas y las sinaptotagminas extendidas presentan dominios C2 quienes coordinan la unión de dos a tres iones Ca^{2+} , permitiéndoles ejercer funciones importantes como la liberación vesicular, así como otros papeles en la transducción de señales y el tráfico de membranas (Sutton *et al.*, 1995; Min *et al.*, 2007). En 2005 se identificó a una familia de proteínas que presentan en su estructura tres dominios C2, así como dos regiones transmembranales denominadas proteínas MCTPs; también se demostró que estas proteínas unen Ca^{2+} aún en ausencia de fosfolípidos y se ha reportado que las MCTPs se expresan en músculo cardíaco y esquelético, y en el sistema nervioso central (Shin *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2015).

En el nematodo *Caenorhabditis elegans* el promotor del gen *mctp-1* dirige la expresión del gen reportero GFP en neuronas del cordón nervioso ventral (Téllez, 2019), y se ha demostrado que la supresión total o parcial del gen *mctp-1* induce alteraciones motrices y de ovoposición en el nematodo (Maeda *et al.*, 2001; Téllez, 2019), sugiriendo que MCTP podría participar en la regulación de la comunicación neuronal; y que pudiesen jugar un papel en el control de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} .

Por otra parte, se tiene evidencia de que MCTP se localiza en el retículo endoplásmico y endosomas, principalmente endosomas de reciclaje, en donde ocuparía un sitio importante para la regulación de procesos de transmisión sináptica como la endocitosis y el control homeostático de la plasticidad sináptica (Genç *et al.*, 2017). No obstante, su papel funcional no ha sido descrito a detalle.

El nematodo *C. elegans* ha servido de modelo experimental para llevar a cabo diversos estudios sobre alteraciones de circuitos neuronales y que derivan en cambios en comportamientos generados por la modificación experimental en la expresión de uno o varios genes. Estos estudios son facilitados, gracias a que *C. elegans* es un organismo hermafrodita que se desarrolla en tres días, es transparente y tiene un sistema nervioso simple, que se compone por 302 neuronas en el adulto (Kerr, 2006; Nguyen *et al.*, 2015).

En el presente proyecto se demostró que la ausencia de *mctp-1* no altera la actividad sináptica.

II. ANTECEDENTES

i. MCTPs en *C. elegans*

Las proteínas MCTP presentan en su estructura tres dominios C2 (C2A, C2B, C2C) y dos regiones transmembranales (TM) (Shin *et al.*, 2005) Figura 1. Los dominios C2 unen Ca^{2+} y funcionan como sensores de la concentración de este ion, de manera peculiar las MCTPs parecen no requerir de la unión a fosfolípidos para asociarse al Ca^{2+} , aunque estas observaciones no se han probado en toda la variedad de fosfolípidos presentes en las membranas celulares (Sutton *et al.*, 1995; Min *et al.*, 2007; Corbalan-Garcia and Gómez-Fernández, 2014). Las MCTPs están evolutivamente conservadas entre vertebrados e invertebrados como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el nematodo *C. elegans* quienes poseen un único gen (Shin *et al.*, 2005) a diferencia de los mamíferos que poseen dos genes (Djurovic *et al.*, 2009) y cuatro genes en el caso del pez cebra *Danio rerio* (Espino, 2019).

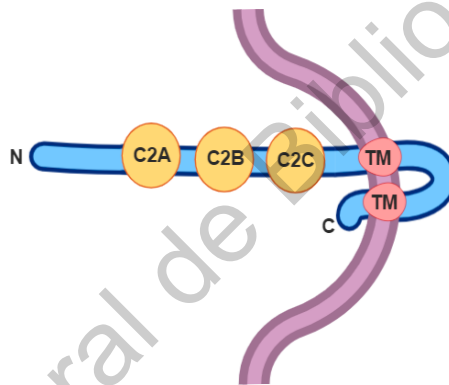


Figura 1. Representación topológica de la proteína MCTP.

Existen datos refiriendo la distribución de las MCTPs en hipocampo, músculo esquelético, corazón, riñón e hígado de rata. Por otro lado, su localización a nivel celular se ha mostrado en endosomas de reciclaje, así como en el retículo endoplásmico de neuronas motoras de *Drosophila* (Shin *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2015; Genç *et al.*, 2017).

Un *screening* de alto rendimiento utilizando RNAi en el nematodo *C. elegans* mostró que la supresión de la expresión de *mctp-1* es letal en etapas tempranas del desarrollo (Maeda *et al.*, 2001). Sin embargo, el trabajo por Maeda y colaboradores no ofrece una explicación del mecanismo molecular o función de la proteína MCTP. Ese mismo estudio contrasta con hallazgos recientes del laboratorio que mostraron que los nematodos que portan una delección parcial o la supresión total del gen *mctp-1* mediante CRISPR/Cas9 son viables. Muy posiblemente estas diferencias en los resultados son producto de que las estrategias que utilizan RNAi tienen muchas variaciones en sus resultados (Pollard *et al.*, 2017).

En *C. elegans*, el gen *mctp-1* codifica para cuatro isoformas *a*, *b*, *c* y *d* producto de la actividad de dos promotores independientes (Figura 2) que dirigen la expresión hacia las neuronas del cordón ventral del nematodo y de la faringe ilustradas en la Figura 3 (Téllez, 2019)

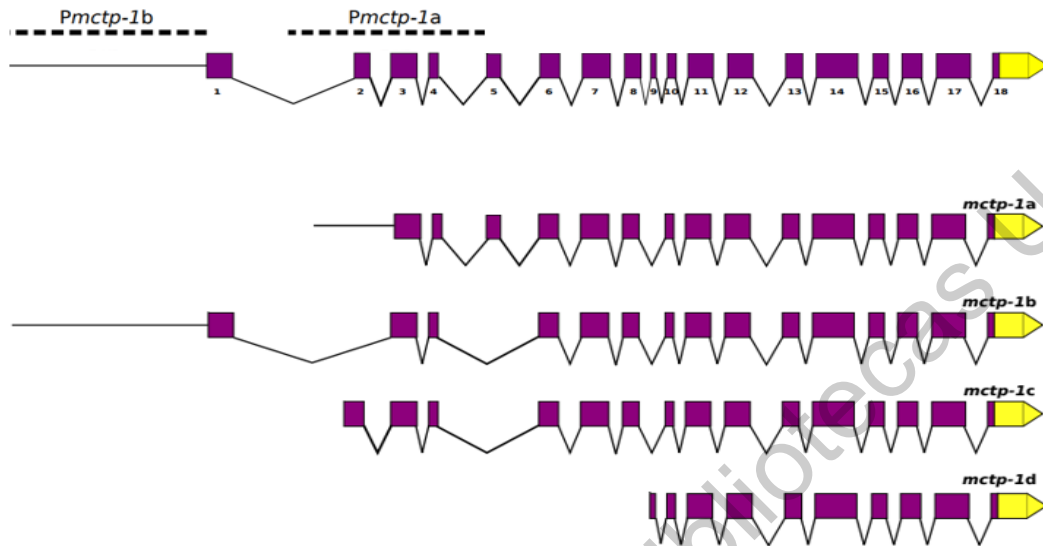


Figura 2. Estructura del gen *mctp-1* de *C. elegans* (cuadros en color morado representan los exones); isoformas *a*, *b*, *c* y *d* (Téllez, 2019).

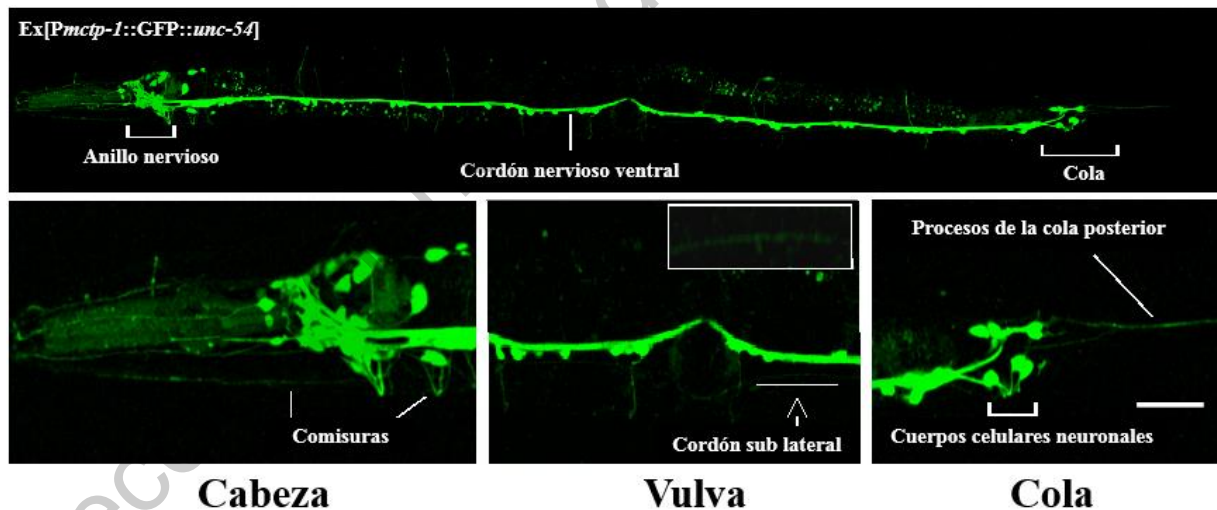


Figura 3. Expresión de *mctp-1* en el sistema nervioso de *C. elegans*. Parte superior, un ejemplar adulto joven expresando GFP bajo la regulación del promotor de *mctp-1* (*Pmctp-1::GFP::unc-54*). Parte inferior, ampliación de cabeza, vulva y cola del gusano. Expresión de GFP en cuerpos y proceso neuronales. Escala = 50 μ m (Téllez, 2019).

La remoción del gen *mctp-1* por medio de la técnica de CRISPR/Cas9 mediante el cual se generó la cepa *atm1* muestra cambios en la actividad locomotora en comparación con la cepa silvestre, habiéndose observado en dos pruebas: 1) puesta de huevos en presencia y ausencia de alimento y 2) en el número de coleteos en medio líquido (*thrashing*); los resultados

obtenidos por Téllez (2019) se muestran en la Figura 4. Así mismo, los fenotipos observados en la cepa *atm1* fueron parcialmente rescatados al expresar el gen completo de *mctp-1* (+) no observándose cambios significativos respecto a la cepa silvestre

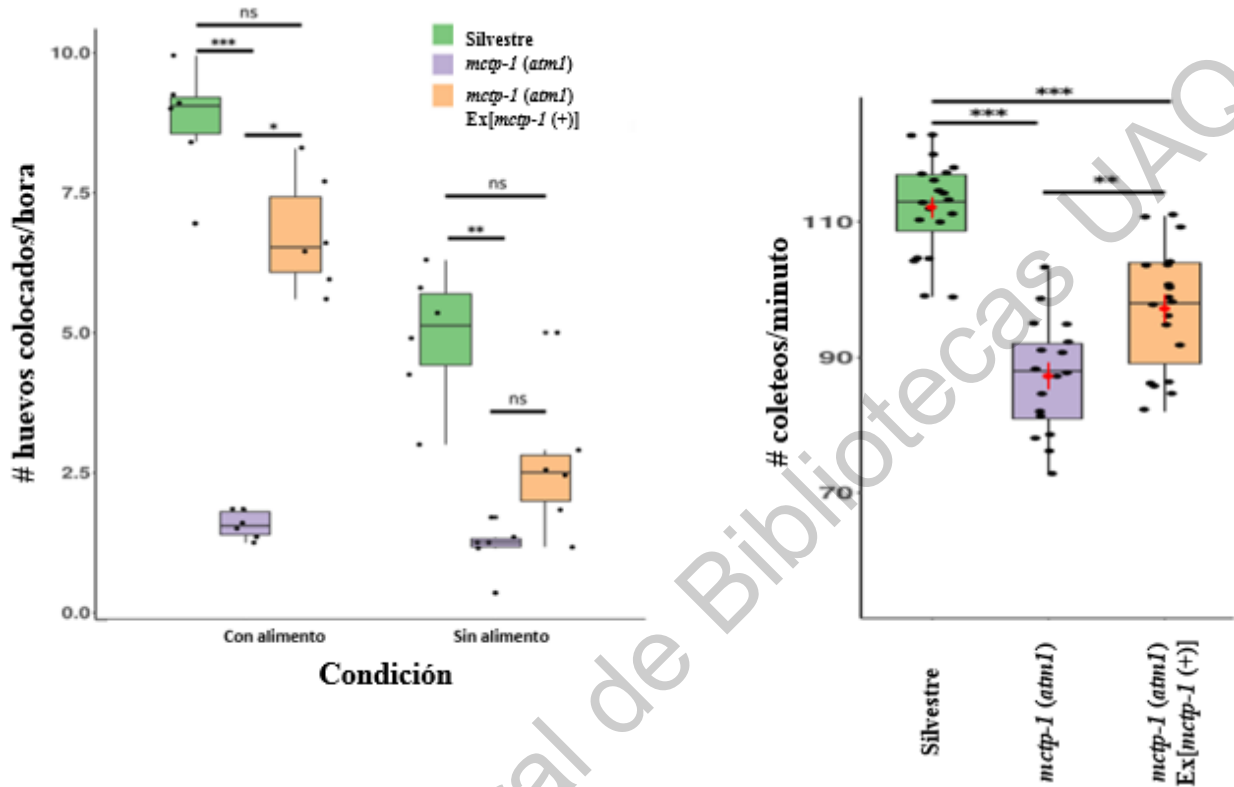


Figura 4. Efectos sobre la actividad motora de la supresión del gen *mctp-1* en dos pruebas: ovoposición y coleteos (Téllez, 2019).

ii. El nematodo *C. elegans* como modelo experimental

C. elegans es considerado un modelo experimental para las áreas de biología molecular y celular, pues existe un gran número de trabajos publicados en donde se ha empleado para entender procesos como la meiosis y la apoptosis, así como el estudio de enfermedades neurodegenerativas (Conradt, 2005; Calahorro and Ruiz-Rubio, 2011; Nigon and Felix, 2013). *C. elegans* es un nematodo de vida libre, su ciclo de vida es relativamente corto (3 días) y en condiciones normales a temperatura de 25 °C el huevo se desarrolla en aproximadamente 14 h, continuando su crecimiento en sus cuatro etapas larvarias (L1-L4) la Figura 5 muestra un esquema del ciclo, en donde también se muestra el estado de letargo en ausencia de alimento denominado “dauer” permitiendo la sobrevivencia del nematodo por ~4 meses (Jorgensen y Mango, 2002).

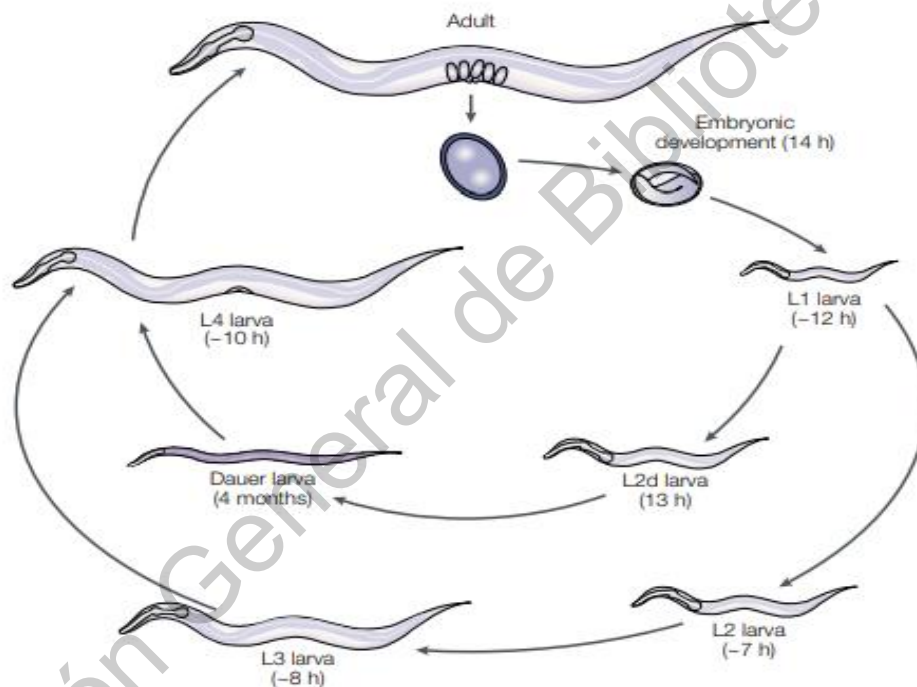


Figura 5. Ciclo de vida de *C. elegans* (Tomada de Jorgensen y Mango, 2002).

C. elegans es hermafrodita lo que le permite preservarse por generaciones en tan poco tiempo, entre otras de sus características es que es transparente y pueden llegar a visualizarse procesos celulares *in vivo*, es de fácil mantenimiento debido a su pequeño tamaño de ~1 mm en etapa adulta y en condiciones de laboratorio se alimenta de bacteria *Escherichia coli* (Wood *et al.*, 1988; Corsi *et al.*, 2015). Mediante ingeniería genética se han generado una gran cantidad de mutantes, *knockouts* y *knockins* permitiendo el estudio del papel y estructura de diversos genes (Brenner, 1974; Consortium, 2012).

iii. Sistema nervioso de *C. elegans*

El sistema nervioso de *C. elegans* es ampliamente conocido y estudiado, está dividido en dos sistemas: sistema nervioso somático y uno específico de la faringe (White y Chalfie, 1988). Posee un total de 302 neuronas que se distribuyen por todo el organismo, presentando una diversidad de tipos celulares. La clasificación de las neuronas se da por su morfología, posición y conectividad; por lo que se clasifican en neuronas sensoriales, interneuronas y neuronas motoras (White *et al.*, 1986). Recientemente Cook y colaboradores (2019) dieron a conocer las conexiones nerviosas que modulan y conforman el sistema nervioso del nematodo a través de una reconstrucción por microscopía electrónica (Figura 6) siendo de utilidad para posteriores trabajos en el entendimiento de los comportamientos del nematodo durante el arrastre, nado, puesta de huevos entre otros que ya se han venido estudiando.

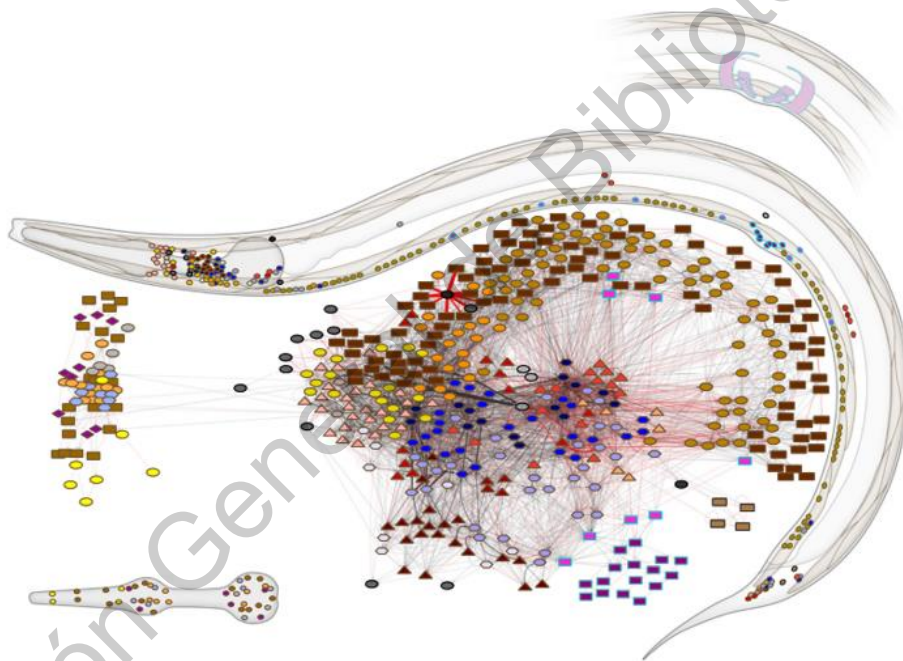


Figura 6. Sistema Nervioso de *C. elegans* hermafrodita adulto. Neuroanatomía y conectividad (Tomada de Cook *et al.*, 2019)

Algunos trabajos como los de Zhang y colaboradores (2008); Collins y su equipo de trabajo (2016) han presentado resultados sobre uno de los circuitos más simples del nematodo *C. elegans*, el de la ovoposición, y explican la interacción que existe entre las células involucradas en dicho comportamiento, tanto de las células musculares como de las neuronas motoras, a través de imagen de Ca^{2+} *in vivo* y su correlación con estímulos farmacológicos o mediante cambios en el genoma del gusano y sus efectos. Varias obras publicadas sobre el estudio de la actividad del sistema nervioso, compuesto por circuitos, células y moléculas

responsables de los comportamientos se ven apoyados en base a distintas herramientas que permiten comprender y tener un acercamiento en la función de este sistema, entre estas herramientas se encuentran la fabricación de cámaras o la evocación de estímulos físicos, químicos o mecánicos que ayudan a obtener registros *in situ* o *in vivo* de la actividad de distintos circuitos neuronales (Arellano-Carbajal *et al.*, 2011; Nekimken *et al.*, 2018).

iv. Dinámica de Ca^{2+}

El ion Ca^{2+} juega un papel importante como segundo mensajero en todos los niveles de organización de las células, y llega a mediar las funciones celulares cuando se presentan señales de Ca^{2+} que pueden ocupar todo el citoplasma de la célula y viajar en ondas a través de ella (Pollard *et al.*, 2017). Procesos dependientes de Ca^{2+} , incluyen la liberación de neurotransmisores cargados por las vesículas que fueron fusionadas en la membrana plasmática; así como la transducción de señales extracelulares que van al interior de las células (Katz y Miledi, 1968; Richmond, 2007). Existe una concentración basal de Ca^{2+} intracelular de 100 nM, mediada por su almacenamiento en vesículas u organelos intracelulares y que a su vez es regulado por varios tipos de proteínas como la calmodulina, que al percibir las señales de Ca^{2+} , induce un cambio conformacional que le permite modificar su actividad (Zarain-herzberg, 2010).

Para entender cómo el Ca^{2+} participa en la ejecución de estos procesos y monitorear su dinámica en células vivas existen indicadores fluorescentes como los GCaMPs; proteínas genéticamente codificadas que mediante cambios en la intensidad de su fluorescencia permiten observar la dinámica de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Akerboom *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013). En *C. elegans* se han utilizado cepas transgénicas que expresan reporteros GCaMPs o camaleones fluorescentes para determinar las fluctuaciones de Ca^{2+} en neuronas y su relación con cambios en comportamientos (Kerr *et al.*, 2000; Arellano-Carbajal *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2013a; Nguyen *et al.*, 2015).

Como se refirió previamente, el gen *mctp-1* está ampliamente distribuido en neuronas de *C. elegans* y al suprimir su expresión hay cambios en la actividad motora del nematodo. Aunado a estos antecedentes las MCTPs tienen dominios de unión a Ca^{2+} y están presentes en endosomas de reciclaje y en el retículo endoplásmico, por lo que es lógico sugerir su participación en el proceso de neurotransmisión. Por estas razones en este trabajo se planteó determinar si la supresión del gen *mctp-1* de *C. elegans* exhibe cambios en la actividad sináptica que fue medida mediante la detección de los cambios en la actividad de un sensor de calcio genéticamente codificado (GCaMP5) aplicando microscopía de epifluorescencia *in vivo*.

III. HIPÓTESIS

La supresión del gen *mctp-1* de *C. elegans* produce una reducción en la frecuencia y el intervalo entre los transitorios de elevación de Ca^{2+} en neuronas motoras.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IV. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto fue determinar si los transitorios de Ca^{2+} de las neuronas motoras VCn sufren alteraciones cuando se suprime el gen *mctp-1*.

Objetivos particulares:

1. Generación de una cepa que porta la delección del gen *mctp-1* y el reportero de Ca^{2+} GCaMP5 en un set de neuronas motoras del cordón ventral.
2. Adquisición de videos de la actividad de GCaMP5 por microscopía de epifluorescencia.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

V. MATERIAL Y MÉTODOS

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto de Neurobiología (INB) campus UNAM laboratorio D-15 ubicado en Boulevard Juriquilla, 3001, Querétaro, 76230, México.

i. Mantenimiento de *C. elegans*

Las cepas de *C. elegans* se mantuvieron en cajas Petri y medio de crecimiento para nematodos (NGM) sembradas con 80 μ l de *Escherichia coli* (OP50) a temperaturas de entre 15 y 20 °C. Durante este proyecto fueron utilizadas las cepas mostradas en la Figura 7; como grupo control la cepa transgénica LX1960 que porta el sensor de calcio GCaMP5 y mCherry en un set de neuronas motoras VCn (VC1-VC6); y como grupo experimental al *knock out* del gen *mctp-1* (cepa *atm1*).

Se utilizaron 12 nematodos por experimento que fueron sincronizados a 20 °C en etapa L4 tardío para ser utilizados 24 h después de la sincronización. Con la intención de evocar una señal y visualizar el reportero de Ca^{2+} y en base a la literatura se optó por embeber en dos tipos de soluciones; M9 (3 g Na_2HPO_4 , 1.5 g KH_2PO_4 , 2.5 g NaCl, 0.125 g $MgSO_4$ 1M, 500 ml H_2O) y sacarosa (0.06846 g y 2 ml H_2O) con distintas concentraciones de osmolaridad durante las grabaciones de video.

CEPA	GENOTIPO
LX1960	<i>vsIs172; lite-1(ce314)lin-15(n765ts) X</i>
<i>atm1</i>	<i>mctp-1+ GFP::let-858+unc-119</i>
<i>atm1/LX1960</i>	<i>mctp-1+ GFP::let-858+unc-119 + vsIs172; lite-1(ce314)lin-15(n765ts) X</i>

Figura 7. Cepas de *C. elegans*.

ii. Cruza *atm1* con transgénico LX1960

Para la obtención del *knock out* con el reportero de calcio GCaMP5 se realizó la cruce de machos de la cepa LX1960 con hermafroditas (L4 tardío) de la cepa *atm1*. La generación de machos se llevó a cabo bajo el siguiente protocolo: en ~6 cajas se colocaron cinco hermafroditas de la cepa LX1960 en estadio L4 cada una; posteriormente se sometieron a choque térmico dentro de una incubadora a 30 °C durante 6 h, una vez pasado ese tiempo se restableció la temperatura a 15 °C durante cuatro días. Se obtuvieron entre dos a tres machos por caja.

Para las cruzas y la obtención del *knock out* con GCaMP5 se realizaron los siguientes procedimientos: a) Selección y pase de seis a ocho machos de la cepa LX1960 en una caja Petri con OP50; b) Selección de dos hermafroditas (L4) de la cepa *atm1* que fueron colocadas en la caja que contiene los machos; c) 24 h después se separan las hermafroditas y se dejan a que ovopositen por dos a tres días en cajas individuales; d) Observar la presencia de machos y el fenotipo de las F1; e) Selección de cinco F1s de cada caja que muestran fluorescencia; f) Esperar de dos a tres días para obtener F2; g) Selección de F2 posibles candidatos y separación en cajas individuales. Dejar ovopositar por dos a tres días y h) Selección de F3. Realización de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) por cada filial, para confirmar genotipo.

iii. Genotipificación de *atm-1/LX1960*

Para confirmar el genotipo de la cepa *atm1* con el sensor GCaMP5 se realizó la técnica de PCR para amplificar un fragmento del gen *mctp-1* y parte de la inserción del gen *unc-119* utilizando los oligos ojlt_166 y ojlt_163 dando como resultado una banda de 2006 bp totales (Figura 8). Mientras que para la genotipificación de la cepa control o silvestre; se utilizaron los oligos ojlt_164 y ojlt_163 que amplificaron una banda de 2260 bp. Para la reacción se utilizó DNA genómico extraído con buffer de lisis (proteínasa K).

ID Oligo	Secuencia	Tamaño de fragmento
ojlt_163	ggtcgctaaagatttcggagg	2260 bp y 2006 bp
ojlt_164	agccacgagaaaggcaataacg	2260 bp
ojlt_166	gccattcatcccggtttctg	2006 bp

Figura 8. Lista de oligos para genotipificación de *knock out* y cepa silvestre.

Los compuestos para la PCR se muestran en la Figura 9 usando la enzima *Taq* DNA polimerasa; la Figura 10 señala las condiciones de la PCR de acuerdo al protocolo del producto (Invitrogen) llevada a cabo en el termociclador SelectCycler.

Reactivo	Volumen (μ l)
10X PCR Buffer,	12.5
50 mM MgCl ₂	3.75
10 mM dNTPs	2.5
10 μ M Forward primer	6.5
10 μ M Reverse primer	6.5
DNA molde	5.0
Taq DNA Polimerasa concentración	0.5
Agua destilada	88.25
Volumen final	125.5

Figura 9. Compuestos de la PCR.

	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Número de ciclos
Temperatura inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	45 seg	
Alineamiento	59	30 seg	30
Extensión	72	2.30 min	
Extensión final	72	7 min	1

Figura 10. Protocolo de PCR.

iv. Secuenciación de DNA genómico de *knock out* (*atm1*)

Para confirmar que el *knock out* presenta la inserción del gen *unc-119* se purificó el producto de PCR obtenido del DNA genómico de la cepa *atm1* siguiendo el protocolo del kit de Quiagen y se determinó su secuencia en la unidad de proteogenómica del INB, UNAM.

v. Preparación de nematodos para microscopía

Se fijaron los animales en etapa de adultos jóvenes en camas de agarosa al 5%, colocando una gota de agarosa entre dos cubreobjetos circulares de 8 mm. Posteriormente sobre la cama se agregó 2 μ l de buffer M9 (320 mOsm) o sacarosa (100 mOsm) para transferir los nematodos (1 nematodo por cama). Una vez que la gota del buffer se consume en la agarosa, se permite que el nematodo se arrastre un poco para después ser fijados con adhesivo tisular

tópico de N-butil cianocrilato y octilo (GLUture®) aplicado sobre el dorso de los nematodos (Figura 11). Finalmente, y para mantener a los nematodos en las condiciones de osmolaridad se colocó una gota del buffer e inmediatamente se procedió a la toma de imágenes.

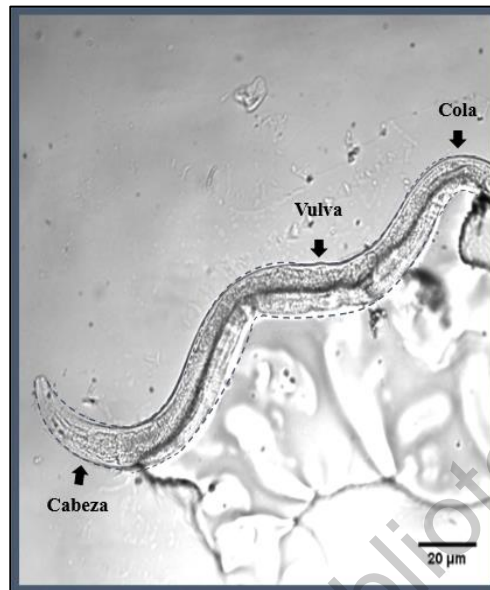


Figura 11. Fijación del nematodo

vi. Videograbación al microscopio de epifluorescencia

La captura de imágenes se realizó con una cámara de alta resolución (pco. edge 4.2) montada sobre un microscopio vertical de platina fija (Olympus BX51WI); objetivo 20x de inmersión y apertura numérica de 1.0 W. La longitud de onda utilizada para observar el GCaMP5 fue de 488 nm y para la observación del marcador rojo mCherry se incidió con una longitud de 565 nm.

Los tiempos de exposición y captura de video fueron establecidos con el software Micro-Manager durante un período de 5 min con un intervalo entre imágenes a 10 fps.

vii. Análisis de imágenes

Las imágenes de Ca^{2+} se analizaron con el programa ImageJ, extrayendo la fluorescencia media de las células de estudio, tomando manualmente la región de interés o ROI para su posterior análisis. Las respuestas se presentan en $\Delta F/F_0$, donde F_0 es la fluorescencia basal de las células y ΔF es el cambio relativo en la fluorescencia sobre los niveles basales.

viii. Análisis de datos

Los cambios de la fluorescencia (ΔF) en función del tiempo fueron exportados y graficados en Microsoft Excel y analizados en Origin Pro 8. Para los eventos de Ca^{2+} espontáneos en buffer M9 (320 mOsm) y la evocación de eventos en sacarosa (100 mOsm), se obtuvo un promedio de $\Delta F \pm 2.5$ veces la desviación estándar ($n=12$) cepa LX1960 y ($n=12$) cepa *atm1/LX1960*. Los datos se normalizaron con base en la fórmula $\Delta F - F_0 / F_0$; es decir, mediante la sustracción del fondo o *back-ground* menos las intensidades de las células, dividiendo el resultado por el promedio de fluorescencia basal, resultando como el incremento de la fluorescencia relativa. La fluorescencia basal se definió como la fluorescencia mínima presente en la duración del experimento.

ix. Estadística descriptiva

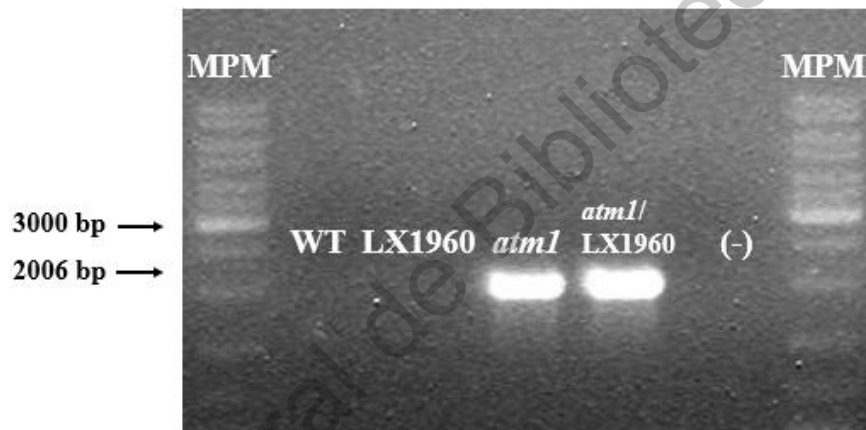
Para el análisis estadístico se utilizaron tanto pruebas paramétricas como la prueba *t* de *Student* y no paramétricas como la prueba *Mann-Whitney* dependiendo de los resultados arrojados por la prueba de normalidad (*Shapiro-Wilk*).

VI. RESULTADOS

i. Genotipificación cepa *atm-1/LX1960*

Después de cruzar las cepas *atm-1* y LX1960 y haber obtenido la filial final se separaron 5 candidatos independientes a los que se les aisló DNA genómico para determinar por PCR la presencia del casete que incluye *unc-119*. Una muestra del PCR de uno de los transgénicos (*atm1/LX1960*) se muestran en la Figura 12 que presenta una banda de 2006 bp que indica que porta el casete de GFP::*let-858+unc-119*. La identidad de la cepa se corroboró mediante la secuenciación del mismo fragmento (Figura Suplementaria 1). Adicionalmente se comprobó que *atm1/LX1960* expresa correctamente mCherry en las neuronas motoras VCn (Figura 12).

A)



B)

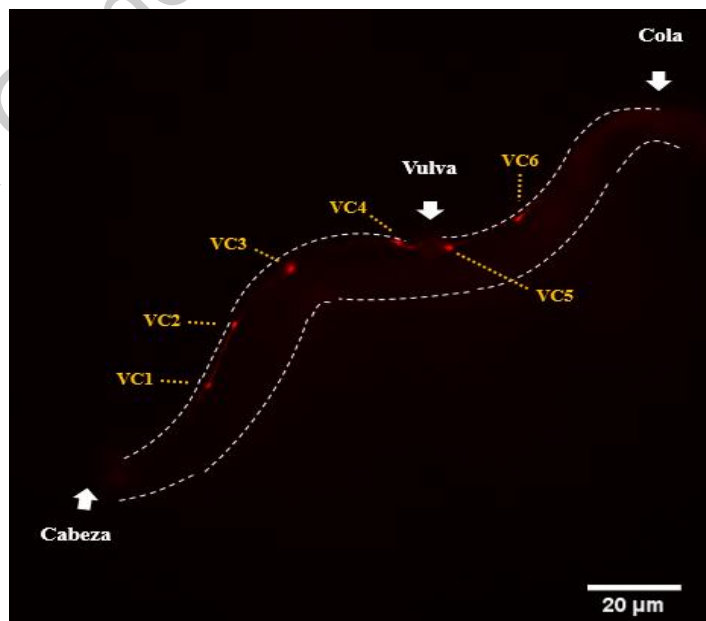


Figura 12. Electroforesis y patrón de expresión de mCherry de *atm1/LX1960*. A) Imagen del gel de agarosa de las bandas obtenidas para la genotipificación del transgénico *atm1/LX1960*. B) Patrón de expresión de mCherry en VCn (VC1-VC6).

ii. Registro de la actividad neuronal

La Figura 13 (A y B) muestra una imagen representativa de un nematodo en el que se puede observar la fluorescencia de GCaMP5 en el set de neuronas motoras VCn. El mismo nematodo es observado en campo claro y en epifluorescencia. En la Figura 14 (A) se observan los registros de la actividad de Ca^{2+} a través de los cambios en la fluorescencia del GCaMP5 en la cepa LX1960 en las dos condiciones de osmolaridad; M9 (320 mOsm) y sacarosa (100 mOsm). Esta última condición permitió aumentar el número de transitorios de Ca^{2+} y determinar si la delección de *mctp-1* interfiere con esta inducción. En la Figura 14 (B) se aprecia la actividad en *atm1/LX1960* también en ambas condiciones. Estos ensayos mostraron la factibilidad de realizar los estudios de dinámica de Ca^{2+} en las condiciones estandarizadas.

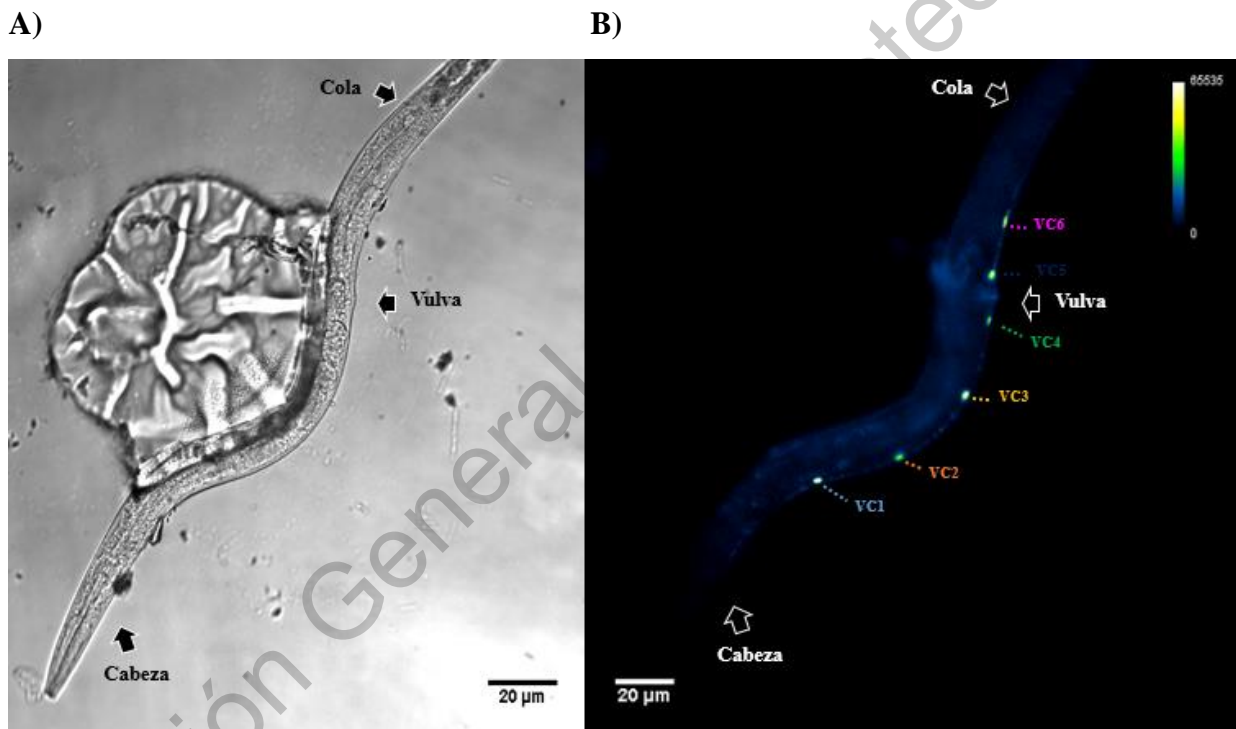
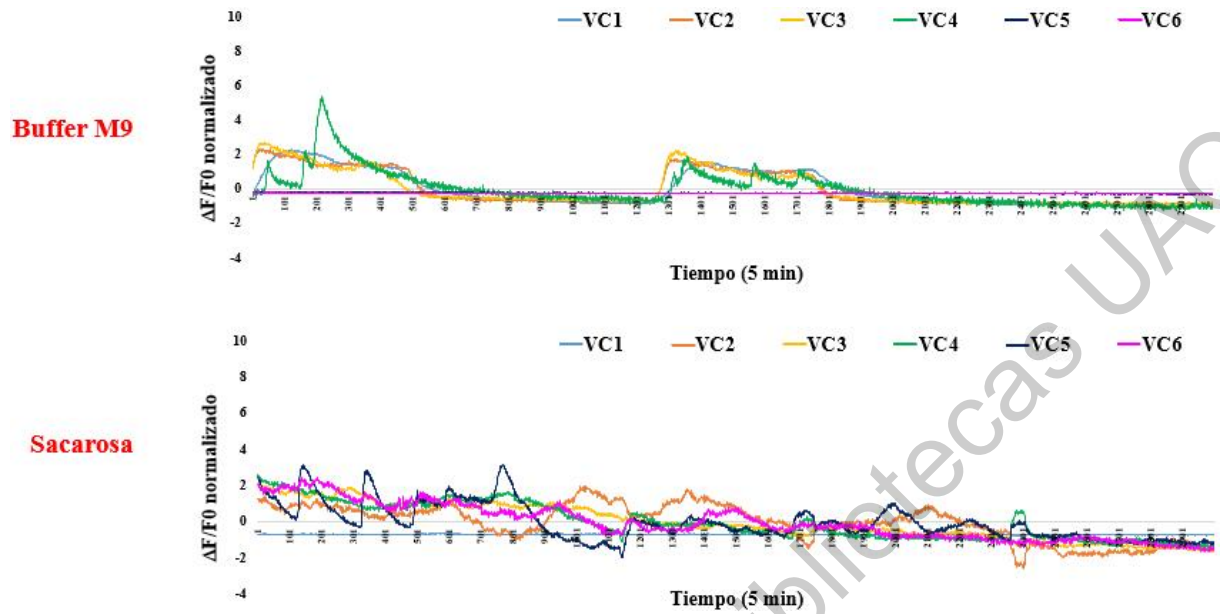


Figura 13. Captura de imagen de calcio. **A)** Imagen en campo claro del nematodo *C. elegans* fijado; **B)** Imagen capturada en canal verde (488 nm).

A)

CEPA LX1960



B)

CEPA *atm1*/LX1960

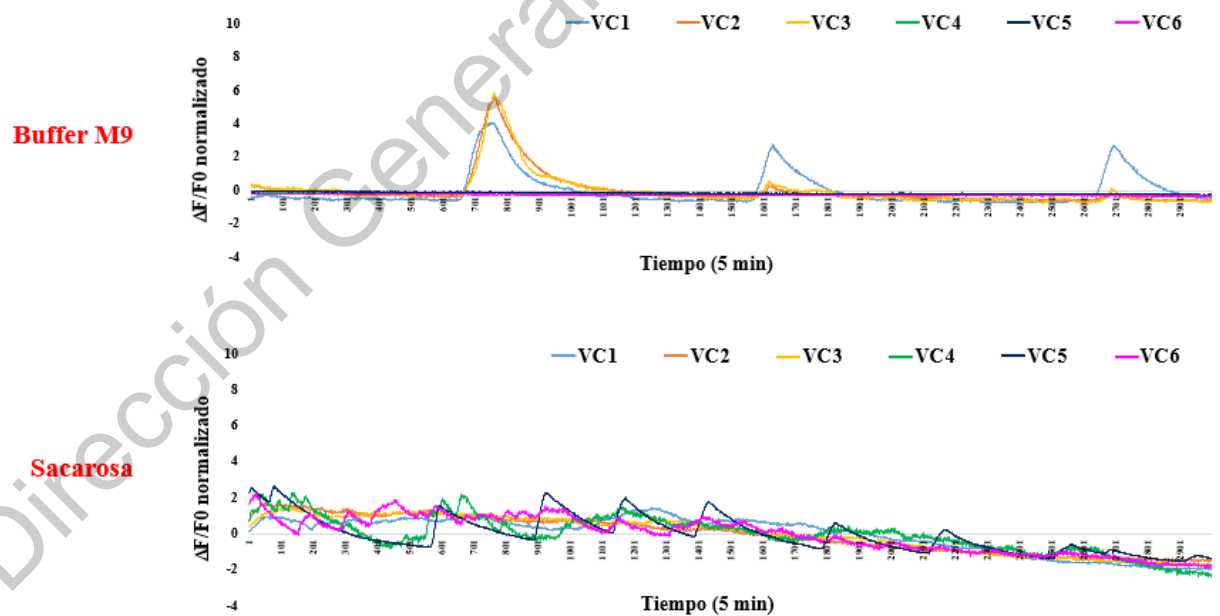
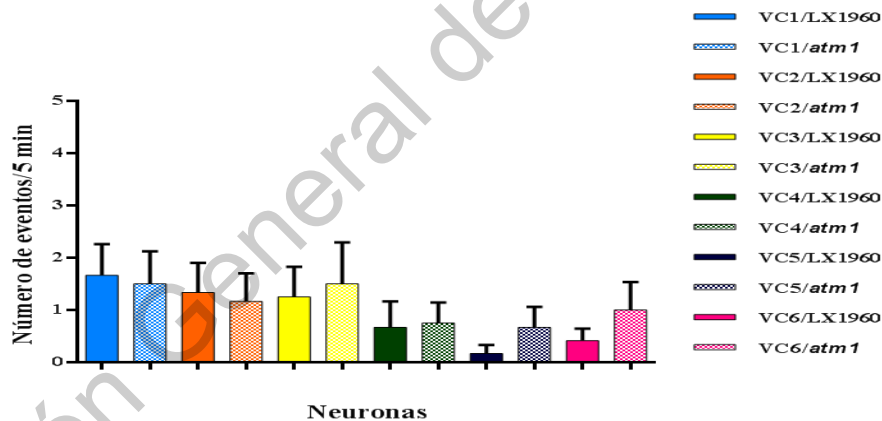


Figura 14. Normalización de la señal de calcio ($\Delta F/F_0$) de cepa control LX1960 (A) y de cepa *atm1*/LX1960 (B).

iii. Número e intervalo de eventos de Ca^{2+}

El resultado de los registros se resume en la Figura 15 en donde se muestra el promedio del número de transitorios observados en cada una de las seis neuronas VC en las distintas condiciones de osmolaridad (Buffer M9 y sacarosa) tanto de la cepa LX1960, como de *atm1*/LX1960. Aun cuando el número de eventos promedio de las neuronas VC4, VC5 y VC6 se observó gráficamente con cambios en la cepa silvestre respecto a la cepa *knock out*, el análisis estadístico no mostró diferencias en las seis neuronas entre ambos grupos ($p > 0.05$), bajo ninguna de las dos condiciones de registro; por lo que se infiere que la actividad neuronal no es modificada por la mutación de *mctp-1*. Aunque no se observaron cambios en el número de transitorios de Ca^{2+} existía la posibilidad de que hubiera modificaciones en el intervalo entre eventos, por lo que se analizó este parámetro en las neuronas VC1 y VC3 bajo la condición en buffer M9 y las neuronas VC1 y VC5 con sacarosa (Figura 16). El análisis sugiere que no hay cambios significativos en el intervalo entre eventos de LX1960 ± 2.5 veces la desviación estándar ($n=12$) cepa LX1960 y ($n=12$) cepa *atm1*/LX1960.

A) Buffer M9



B) Sacarosa

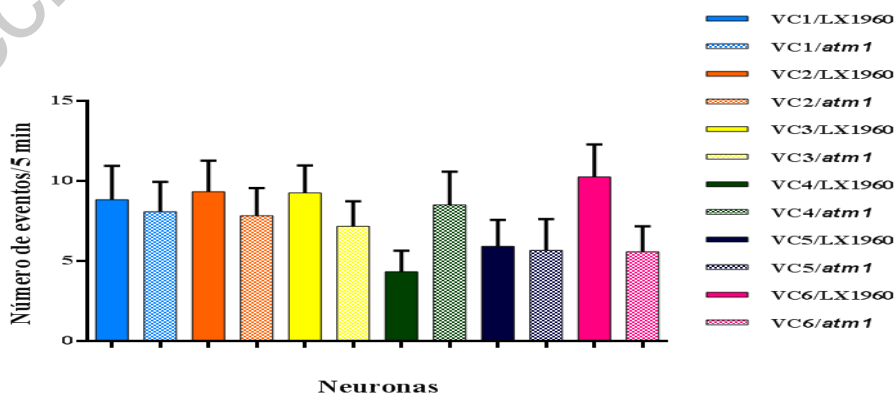
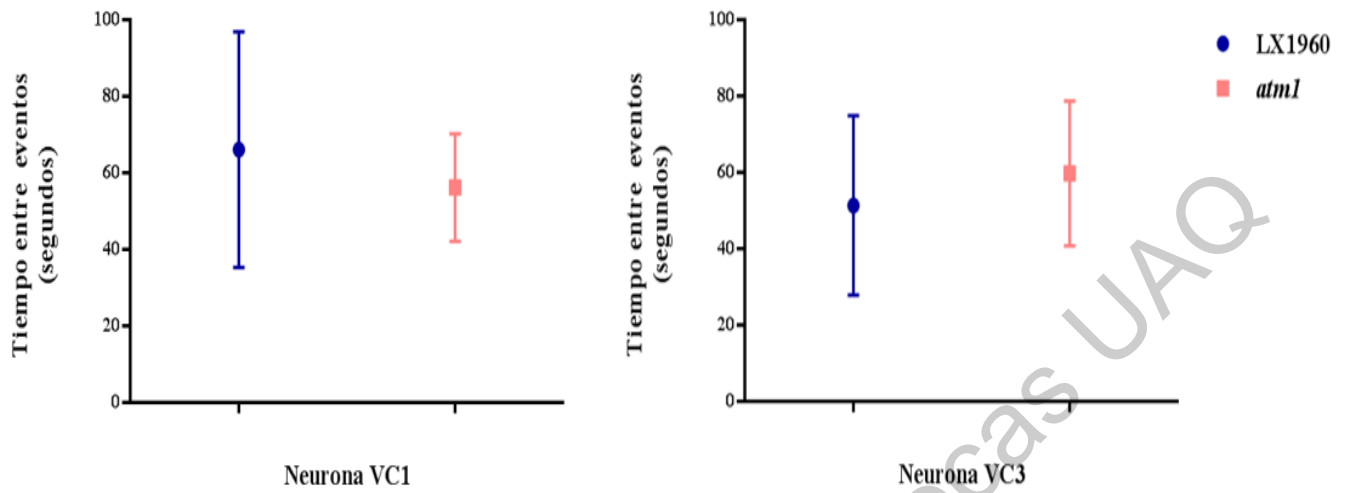


Figura 15. Número de eventos promedio de las VCn en dos condiciones de osmolaridad.

A) Buffer M9



B) Sacarosa

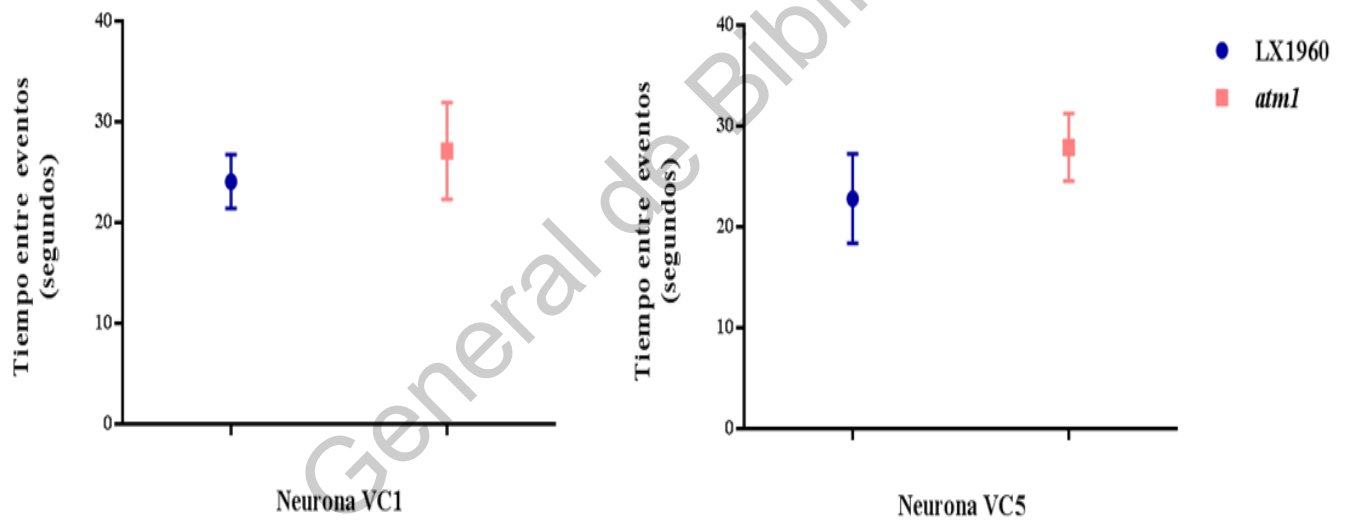


Figura 16. Tiempo promedio entre eventos de las neuronas VC1 y VC3 en buffer M9 (A) y VC1 y VC5 en sacarosa (B).

VII. DISCUSIÓN

En la primera parte del proyecto se obtuvo una cepa transgénica que porta la delección del gen *mctp-1* y expresa el reportero de Ca^{2+} GCaMP5 en un set de neuronas motoras (VCn). El transgénico fue viable y la fluorescencia derivada del GCaMP5 permitió determinar el número y el tiempo entre transitorios de Ca^{2+} en un período de 5 min. Es importante resaltar que en este trabajo se muestra la actividad de estas neuronas en ejemplares *in vivo*, aunque fijados a la superficie y no en libre movimiento. Existen trabajos que apoyan el método de fijación con pegamento como alternativa para el estudio de la actividad de Ca^{2+} en una variedad de grupos de neuronas o neurona (Zhang *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2013). No obstante, esto puede alterar la actividad sináptica que se observaría en libre movimiento. Las VCn, junto con las neuronas específicas de hermafroditas (HSN) y los músculos vulvares participan en el circuito neuronal que controla la puesta de huevos y se sabe que están rítmicamente activos durante la locomoción; además de que pueden verse alterados por estimulación mecánica o por cambios hipertónicos como es el uso del buffer M9 (Schafer, 2005). Collins y colaboradores (2016) describieron la actividad neuronal de las células HSN y VCn, mediante imagen de Ca^{2+} y microscopía confocal, observando que los transitorios de Ca^{2+} en libre movimiento eran más cortos en las VCn que las de las HSN, observando rara vez alguno en un estado inactivo. Los transitorios fueron descritos como ráfagas en cada puesta de huevos y con un intervalo entre eventos de 10 s aproximadamente en las VCn. Las VCn son en gran parte presinápticas solo recibiendo información entre ellas y las HSN. También mencionan, entre las limitantes en el estudio, la compleja morfología de las HSN y las VCn que a menudo condujo a que las células se encontraran como dos o más objetos dentro de cada captura de imagen, así como una deformación de las VCn en cada contracción muscular de la vulva. Por otro lado, en trabajos en donde el nematodo es fijado *in vivo* y a la vez estimulado en soluciones hipotónicas, se caracterizó funcionalmente el circuito neuronal de la puesta de huevos, midiendo por FRET el cambio relativo de dos reporteros de Ca^{2+} , la proteína amarilla fluorescente y la proteína cian fluorescente (YFP/CFP), reportando que tanto las HSN como las VCn los transitorios de calcio son individuales en cada puesta y que estos transitorios se veían aumentados significativamente en condiciones de baja osmolaridad mencionando que no es necesario la contracción muscular para activarlas, demostrando así que la osmolaridad puede afectar la actividad neuronal de las VCn y las HSN, en donde solo se observó un evento de Ca^{2+} cada 6 a 12 s durante 10 min (Zhang *et al.*, 2008). En el presente estudio las observaciones se hicieron en una cepa silvestre y una mutada, y el número de transitorios de Ca^{2+} fue similar a los trabajos mencionados.

Las proteínas que se ven implicadas en funciones sinápticas pueden ser modificadas mediante mutaciones dirigidas. *C. elegans* ofrece un modelo idóneo de estudiar las consecuencias de la inducción de mutaciones para su estudio *in vivo*. La función de las proteínas MCTPs es aún poco conocida y en este trabajo se abordó el estudio de un *knock out* de *C. elegans* que porta una mutación en el único gen *mctp-1* del nematodo para determinar si existen cambios en la actividad de neuronas implicadas en la actividad motora. El *knock out* muestra alteraciones en la actividad motora y, debido a que *mctp-1* se expresa en las neuronas del cordón ventral del nematodo, se infirió que la proteína puede jugar un papel en la transmisión sináptica (Téllez, 2019). Genç, *et al.* (2017) proponen que las proteínas MCTP son un nuevo sensor de Ca^{2+} localizado en el retículo endoplásmico (RE) y que son una fuente de retroalimentación dependiente de Ca^{2+} para la estabilización de la neurotransmisión, y que independientemente al tipo de mutaciones que generaron en los dominios de unión a Ca^{2+} de las MCTPs no observaron cambios relevantes en señales de Ca^{2+} inducidas por potenciales de acción en neuronas motoras en la mosca de la fruta. Resultados similares se pudieron observar en el presente trabajo, en donde la actividad de Ca^{2+} no se vio alterada en condiciones de alta y baja osmolaridad. La metodología utilizada para la observar la actividad neuronal de las VCn de *C. elegans*, mediante reporteros de Ca^{2+} genéticamente modificados, mostró ser adecuada para el estudio. Los reporteros de Ca^{2+} han mostrado ser suficientemente sensibles para medir las concentraciones celulares de este catión (Miyawaki *et al.*, 1997; Lin y Schnitzer, 2016). En el nematodo *C. elegans* y en otras especies como el pez cebra, estas herramientas han permitido monitorear la actividad neuronal de células sensoriales y motoras en distintos procesos como el desarrollo, puesta de huevos, entre otros (Higashijima *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2016). Además, mediante ingeniería genética en *C. elegans* se aplican este tipo de reporteros para caracterizar funcionalmente nuevos genes potencialmente involucrados en la neurotransmisión, como es el caso de las *mctp* (Shin *et al.*, 2005; Ardiel *et al.*, 2017; Ravi *et al.*, 2018).

No obstante, en este estudio existieron algunas limitaciones, ya que en la literatura se pueden encontrar trabajos en donde utilizan un mayor número de filtros de diversas longitudes de onda, las cuales filtran la señal independiente de dos reporteros de Ca^{2+} permitiendo así hacer un estudio radiométrico. Además, de que mediante el diseño de scripts en distintos softwares, se pueden hacer sustracciones más sofisticadas de la relación señal/ruido (Oh, *et al.* (2019). Joshi y colaboradores (2018) descubrieron que mutantes de *mctp* en el gusano *C. elegans* tienen una reducción en el número y tamaño de gotas de lípido en el retículo endoplásmico, sugiriendo que quizás la proteína MCTP del nematodo esté implicada en procesos metabólicos de la célula y no solo de la señalización neuronal

VIII. CONCLUSIONES

1. Se generó una cepa mutante de *C. elegans* que porta la delección del gen *mctp-1* y expresa el reportero de Ca^{2+} en neuronas.
2. No se encontraron modificaciones en los transitorios de Ca^{2+} de las neuronas VC del nematodo mutante de *mctp-1*, por lo que descartamos su papel en la neurotransmisión al menos en los parámetros medidos: número de eventos e intervalo de tiempo entre eventos.

PERSPECTIVAS

Pese a que los hallazgos no mostraron una relación entre la mutación de *mctp-1* y el número de transitorios de Ca^{2+} , esto no descarta que otros procesos estén afectados y no sean evidentes con las técnicas empleadas; por ejemplo, velocidad de reciclaje vesicular, biogénesis de vesículas sinápticas, renovación de componentes de la membrana plasmática u otros organelos. Por lo que otras alternativas experimentales pueden ser probadas para probar la función de este gen, por ejemplo, modificar las concentraciones de Ca^{2+} para exacerbar los eventos transitorios, bloqueo farmacológico de la pre y postsinapsis, etc.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Akerboom, J., T.-W. Chen, T. J. Wardill, L. Tian, J. S. Marvin, S. Mutlu, N. C. Calderon, F. Esposti, B. G. Borghuis, X. R. Sun, A. Gordus, M. B. Orger, R. Portugues, F. Engert, J. J. Macklin, A. Filosa, A. Aggarwal, R. A. Kerr, R. Takagi, S. Kracun, E. Shigetomi, B. S. Khakh, H. Baier, L. Lagnado, S. S.-H. Wang, C. I. Bargmann, B. E. Kimmel, V. Jayaraman, K. Svoboda, D. S. Kim, E. R. Schreiter, and L. L. Looger. 2012. Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging. *J. Neurosci.* 32:13819–13840. doi:10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012>
2. Arellano-Carbajal, F., L. Briseño-Roa, A. Couto, B. H. H. Cheung, M. Labouesse, and M. de Bono. 2011. Macoilin, a conserved nervous system-specific ER membrane protein that regulates neuronal excitability. *PLoS Genet.* 7. doi:10.1371/journal.pgen.1001341.
3. Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 77:71–94.
4. Calahorro, F., and M. Ruiz-Rubio. 2011. *Caenorhabditis elegans* as an experimental tool for the study of complex neurological diseases: Parkinson's disease, Alzheimer's disease and autism spectrum disorder. *Invertebr. Neurosci.* 11:73–83. doi:10.1007/s10158-011-0126-1.
5. Chen, T.-W., T. J. Wardill, Y. Sun, S. R. Pulver, S. L. Renninger, A. Baohan, E. R. Schreiter, R. A. Kerr, M. B. Orger, V. Jayaraman, L. L. Looger, K. Svoboda, and D. S. Kim. 2013. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature.* 499:295–300. doi:10.1038/nature12354. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23868258> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3777791>
6. Chung, S. H., L. Sun, and C. V. Gabel. 2013a. In vivo Neuronal Calcium Imaging in *C. elegans*. *J. Vis. Exp.* e50357. doi:10.3791/50357. Available from: <http://www.jove.com/video/50357>
7. Chung, S. H., L. Sun, and C. V. Gabel. 2013b. In vivo Neuronal Calcium Imaging in *C. elegans*. *J. Vis. Exp.* 1–9. doi:10.3791/50357.
8. Clapham, D. E. 2007. Calcium signaling. *Cell.* 1047–1058. doi:10.1201/9781420038231.
9. Collins, K. M., A. Bode, R. W. Fernandez, J. E. Tanis, J. C. Brewer, M. S. Creamer, and M. R. Koelle. 2016. Activity of the *C. elegans* egg-laying behavior circuit is

- controlled by competing activation and feedback inhibition. *Elife*. 5:1–24. doi:10.7554/elifesciences.21126.
10. Conradt, B. 2005. Programmed cell death. In: *WormBook*. p. 1–13.
 11. Consortium, T. C. elegans D. M. 2012. Large-Scale Screening for Targeted Knockouts in the *Caenorhabditis elegans* Genome. *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 2:1415–1425. doi:10.1534/g3.112.003830. Available from: <http://g3journal.org/lookup/doi/10.1534/g3.112.003830>
 12. Cook, S. J., T. A. Jarrell, C. A. Brittin, Y. Wang, A. E. Bloniarz, M. A. Yakovlev, K. C. Q. Nguyen, L. T. H. Tang, E. A. Bayer, J. S. Duerr, H. E. Bülow, O. Hobert, D. H. Hall, and S. W. Emmons. 2019. Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature*. 571:63–71. doi:10.1038/s41586-019-1352-7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1352-7>
 13. Corbalan-Garcia, S., and J. C. Gómez-Fernández. 2014. Signaling through C2 domains: More than one lipid target. *BBA - Biomembr.* 1838:1536–1547. doi:10.1016/j.bbamem.2014.01.008. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.008>
 14. Corsi, A. K., B. Wightman, and M. Chalfie. 2015. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 200:387–407. doi:10.1534/genetics.115.176099.
 15. Djurovic, S., S. Le Hellard, A. K. Kähler, E. G. Jönsson, I. Agartz, V. M. Steen, H. Hall, A. G. Wang, H. B. Rasmussen, I. Melle, T. Werge, and O. A. Andreassen. 2009. Association of MCTP2 gene variants with schizophrenia in three independent samples of Scandinavian origin (SCOPE). *Psychiatry Res.* 168:256–258. doi:10.1016/j.psychres.2008.08.007. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2008.08.007>
 16. Espino Saldaña, A. (2019). *Patrón de expresión y evaluación de la función de los genes mctp del pez cebra Danio rerio, que codifica para proteínas transmembranales con múltiples dominios C2*. Doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro
 17. Genç, Ö., D. K. Dickman, W. Ma, A. Tong, R. D. Fetter, and G. W. Davis. 2017. MCTP is an ER-resident calcium sensor that stabilizes synaptic transmission and homeostatic plasticity. *Elife*. 6:1–23. doi:10.7554/elifesciences.22904.
 18. Jorgensen, E. M., and S. E. Mango. 2002. The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Rev. Genet.* 3:356–369. doi:10.1038/nrg794.
 19. Katz, B., and R. Miledi. 1968. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J.*

- Physiol. 195:481–92. doi:10.1111/j.1365-3040.1992.tb01004.x. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1351674&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Kerr, R. A. 2006. Imaging the activity of neurons and muscles. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050440>
21. Kerr, R., V. Lev-Ram, G. Baird, P. Vincent, R. Y. Tsien, and W. R. Schafer. 2000. Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron*. 26:583–594. Available from: <http://www.wormbase.org/db/misc/paper?name=WBPaper00004194>
22. Maeda, I., Y. Kohara, M. Yamamoto, and A. Sugimoto. 2001. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr. Biol.* 11:171–176. Available from: <http://www.wormbase.org/db/misc/paper?name=WBPaper00004651>
23. Min, S.-W., W.-P. Chang, and T. C. Südhof. 2007. E-Syts, a family of membranous Ca²⁺-sensor proteins with multiple C2 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:3823–3828. doi:10.1073/pnas.0611725104.
24. Nekimken, A. L., H. Fehlauer, A. A. Kim, S. N. Manosalvas-kjono, P. Ladpli, F. Memon, D. Gopisetty, V. Sanchez, and B. Miriam. 2018. in a Microfluidic Trap. 17:1116–1127. doi:10.1039/c6lc01165a.Pneumatic.
25. Nguyen, J. P., F. B. Shipley, A. N. Linder, G. S. Plummer, J. W. Shaevitz, and A. M. Leifer. 2015. Whole-brain calcium imaging with cellular resolution in freely behaving *C. elegans*. *PNAS*. E1074-71081. doi:10.1073/pnas.1507110112. Available from: <http://arxiv.org/abs/1501.03463%0Ahttp://dx.doi.org/10.1073/pnas.1507110112>
26. Nigon, V. M., and M.-A. Felix. 2013. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. In: *WormBook*. p. 1–22.
27. Oh, J., C. Lee, and B.-K. Kaang. 2019. Imaging and analysis of genetically encoded calcium indicators linking neural circuits and behaviors. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 23:237. doi:10.4196/kjpp.2019.23.4.237.
28. Pollard, T. D., W. C. Earnshaw, J. Lippincott-Schwartz, and G. T. Johnson. 2017. *Cell biology*.
29. Qiu, L., H. Yu, and F. Liang. 2015. Multiple C2 domains transmembrane protein 1 is expressed in CNS neurons and possibly regulates cellular vesicle retrieval and oxidative stress. *J. Neurochem.* 135:492–507. doi:10.1111/jnc.13251.
30. Richmond, J. 2007. Synaptic function. In: *WormBook*. p. 1–15.

31. Schafer, W. R. 2005. Egg-laying. WormBook. 1–7. doi:10.1895/wormbook.1.38.1.
32. Shin, O.-H., W. Han, Y. Wang, and T. C. Südhof. 2005. Evolutionarily Conserved Multiple C2 Domain Proteins with Two Transmembrane Regions (MCTPs) and Unusual Ca²⁺ Binding Properties. J. Biol. Chem. 280:1641–1651. doi:10.1074/jbc.M407305200.
33. Sutton, R. B., B. A. Davletov, A. M. Berghuis, T. C. Südhof, and S. R. Sprang. 1995. Structure of the First C2 Domain of Synaptotagmin I: A Novel Ca²⁺/Phospholipid-Binding Fold. Cell. 80:929–938.
34. Téllez Arreola, J. (2019). *MCTP-1 regulates synapse function and behavior in Caenorhabditis elegans*. Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
35. White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson, and S. Brenner. 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*.
36. Zarain-herzberg, M. L. Á. 2010. El ion calcio como segundo mensajero en el desarrollo del sistema nervioso.
37. Zhang, M., S. H. Chung, C. Fang-Yen, C. Craig, R. A. Kerr, H. Suzuki, A. D. T. Samuel, E. Mazur, and W. R. Schafer. 2008. A Self-Regulating Feed-Forward Circuit Controlling *C. elegans* Egg-Laying Behavior. Curr. Biol. 18:1445–1455. doi:10.1016/j.cub.2008.08.047.

X. SUPLEMENTARIAS

	36		185
<i>atm1</i>	AGTGGTCACTGACAAATGTTTTGATTTATAATAAACATTTTATCCGTTAACAMTTTCGAACTCTTTTACAGGACTTGGATAAATGGCTCAAGCCTGCTTTTTGTACAACTTG		CAGGTTTTCTTTTTACTTTTTATAATA
<i>atm1/LX1960</i>	AGTGGACA-CTGACAA-TTGTTTTTGATTTATAATAAACATTTTATCCGTTAACAMTTTCGAACTCTTTTACAGGACTTGGATAAATGGCTCAAGCCTGCTTTTTGTACAACTTG		CAGGTTTTCTTTTTACTTTTTATAATA
	186		335
<i>atm1</i>	ATTCTGATGATACATTTTCTCAACTGTGGTTTCAGTAAGAACTTGGCTACTTTTAAATTAACCTCTTTAAAAATGATTTTATTTTTATTACAGGAAGTCCGACCCATATGTAAGTTTCGATACAGGACACATCGTTTATAAA		
<i>atm1/LX1960</i>	ATTCTGATGATACATTTTCTCAACTGTGGTTTCAGTAAGAACTTGGCTACTTTTAAATTAACCTCTTTAAAAATGATTTTATTTTTATTACAGGAAGTCCGACCCATATGTAAGTTTCGATACAGGACACATCGTTTATAAA		
	336		485
<i>atm1</i>	TCTGGACAAATTTTCAAAAACCTGAAATCCACTTGGGATGAAGAGTCCAAATGATGTCGATGACGTACATGTCCAATACGCTTGAAGTGTTCGATTTGATCGATTTGTACAGATGATTTAAGGAGACGCAAGTTGACATG		
<i>atm1/LX1960</i>	TCTGGACAAATTTTCAAAAACCTGAAATCCACTTGGGATGAAGAGTCCAAATGATGTCGATGACGTACATGTCCAATACGCTTGAAGTGTTCGATTTGATCGATTTGTACAGATGATTTAAGGAGACGCAAGTTGACATG		
	486		635
<i>atm1</i>	TCACAAGTGAAGTGGTGCACGTACGTTCCAAAATATCTCTCACTTACTGAAAATATAITTCAGACCACTGAATTTCAOGTCGAATTAAGTGAAGTTAATCAACCACTGGAAAGTTTCAGTGTGTGTACAATCACTCCTATG		
<i>atm1/LX1960</i>	TCACAAGTGAAGTGGTGCACGTACGTTCCAAAATATCTCTCACTTACTGAAAATATAITTCAGACCACTGAATTTCAOGTCGAATTAAGTGAAGTTAATCAACCACTGGAAAGTTTCAGTGTGTGTACAATCACTCCTATG		
	636		785
<i>atm1</i>	ACTCAATTAGAAGTTCAGCAGTTTCATCAAAAAGCTCAAAAAGGATTTGAGCACGTGAGAGAAGAAAGAGCAAAAGCAGTGAAGTATTGGCAATTTGTCAATTCCTAAACTAGACATTCATCTGGTGAGGGCGTTACGGGGCGCC		
<i>atm1/LX1960</i>	ACTCAATTAGAAGTTCAGCAGTTTCATCAAAAAGCTCAAAAAGGATTTGAGCACGTGAGAGAAGAAAGAGCAAAAGCAGTGAAGTATTGGCAATTTGTCAATTCCTAAACTAGACATTCATCTGGTGAGGGCGTTACGGGGCGCC		
	786	848	
<i>atm1</i>	TCCTTACAGCCCTTATCACGCCCTTCCAGTATGCTAATGAACCCAAACCGTTGGAGAA		
<i>atm1/LX1960</i>	TCCTTACAGCCCTTATCACGCCCTTCCAGTATGCTAATGAACCCAAACCGTTGGAGAA		

Figura Suplementaria 1. Secuencia de fragmento del gen *unc-119* (subrayado gris) de *atm1* con GCaMP5. En amarillo secuencia del gen *mctp-1*.