



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR BICISTRÓNICO  
PARA MEDIR CALCIO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**SARA RUTH ALBARRÁN GUTIÉRREZ**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Albarrán  
Gutiérrez  
Sara Ruth  
5523992524  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
407057526

### 2. Datos del tutor

Dr.  
Christopher David  
Wood

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Enrique  
Salas  
Vidal

### 4. Datos del sinodal 2

M. en C.  
Luis Bernardo  
Luna  
Ulloa

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Carlos Alberto  
Guerrero  
Hernández

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.  
Susana  
Castro  
Obregón

### 7. Datos del trabajo escrito

Construcción de un vector bicistrónico para medir calcio  
90 p  
2012

*A mi hermana Eli*

## **Agradecimientos**

A mi tutor, Chris Wood por su apoyo en todo momento, por que siempre se preocupó porque aprendiera, estuviera bien y nunca me faltara nada; pero sobre todo por su paciencia y consejos. Gracias por enseñarme que en la ciencia hay que ser perseverante.

A mis sinodales Susana Castro, Enrique Salas, Carlos Guerrero y Bernardo Luna por las correcciones a esta tesis, su paciencia y aportaciones. A mi tutora Marú por el apoyo durante la carrera y al Dr. Raúl Barrera por compartir conmigo su entusiasmo por la ciencia.

A mi amiga y hermana de laboratorio Aimée, por cuidar de mi y mis geles, por los buenos momentos, su compañía y por sus consejos. A Elida por brindarme tu amistad, a Dámaris por compartir su sabiduría sobre Westerns, a Saúl por su grata compañía y ayuda, a Maria, David, y Conchita, por sus consejos y por que me permitieron una agradable estancia en el laboratorio. A Daniel, Dany, Gaby e Iván gracias por soportar mi mal carácter, por su amistad incondicional, por ser mis confidentes y mis mejores amigos. A Fer, Many, Jackie, Tania, Stevens, por ser amigos increíbles y por las prácticas de campo, pachangas, parrandas, y demás que jamas olvidare.

A Valentín por tu cariño hacia mi, sé que has sufrido directamente mis largas estancias en el laboratorio y te quiero por que comprendes lo que amo y lo respetas.

A mis padres Josué y Martha agradezco su comprensión y amor. Mami eres un ejemplo de esfuerzo y perseverancia y Papá siempre has sido mi guía gracias por creer en mí.

A mi hermana Eli, por pasar algunas noches en vela para mejorar esta tesis, pero más que nada, por que siempre ha estado conmigo dandome su apoyo. Te quiero mucho.

Finalmente gracias a nuestra máxima casa de estudios UNAM, a la Facultad de Ciencias por abrirme sus puertas y a todos los profesores que con sus enseñanzas cambiarón mi forma de pensar y me hicieron una mejor persona.

## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>8</b>
1.1. Señalización por medio de $Ca^{+2}$ .....	9
1.1.1. Mecanismos de homeostasis del ión $Ca^{+2}$ en el interior de la célula	9
1.1.2. Tipos de señales de calcio	12
1.2. Medición de $Ca^{+2}$ intracelular .....	15
1.2.1. Indicadores químicos fluorescentes	16
1.2.2. Indicadores bioluminiscentes y fluorescentes	17
1.3. Proteínas fluorescentes .....	17
1.4. Sensores Genéticamente Codificados .....	19
1.4.1. Sensores que utilizan FRET para medir $Ca^{+2}$	21
1.4.2. Sensores que utilizan una proteína fluorescente para medir $Ca^{+2}$	23
1.4.3. Sensor Case12	25
1.5. Secuencias para expresar varias proteínas en un mismo vector.....	28
1.6. Secuencias auto-cortantes 2A.....	31
1.6.1. Descripción de las secuencias 2A	31
1.6.2. Modelo para explicar el procesamiento 2A	33
1.6.3. Ventajas y desventajas	35
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>37</b>
<b>3. JUSTIFICACION</b>	<b>39</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>42</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>42</b>
5.1. Objetivos particulares .....	42
<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>43</b>
6.1. Construcción del vector .....	43
6.1.1. Digestiones con enzimas de restricción	43
6.1.2. Rellenado de extremos cohesivos (Blunt Ending DNA fragments)	43
6.1.3. Desfosforilación del vector	44
6.1.4. Amplificación por PCR	44
6.1.5. Extracción de DNA de geles de agarosa	45

6.1.6.	Geles de Agarosa y Electroforesis	45
6.1.7.	Ligaciones	45
6.1.8.	Cuantificación del DNA	46
6.1.9.	Transformación de bacterias por choque de calor o por electroporación.	47
6.1.10.	Minipreps	48
6.1.11.	Maxipreps	49
6.2.	Cultivo celular	49
6.2.1.	Descongelamiento de las células	49
6.2.2.	Subcultivo Celular	50
6.3.	Transfecciones transitorias	50
6.3.1.	Trasfección transitoria por CaCl <sub>2</sub>	50
6.3.2.	Trasfección con lipofectamina	51
6.4.	Microscopia	52
6.5.	Obtención de extractos proteínicos para Western Blot	52
6.6.	Western Blot	53
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>56</b>
7.1.	Péptido T2A	56
7.2.	Case12	61
7.3.	mCherry	64
7.4.	PoliA	66
7.5.	PGKNeo	69
7.6.	CMV/CBA	72
7.7.	Secuenciación de la construcción	74
7.8.	Prueba <i>in vitro</i> (Transfección)	77
7.9.	Análisis de los productos proteínicos	78
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>80</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>82</b>
<b>10.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>83</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>84</b>
<b>12.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>89</b>

## ABREVIATURAS

Ca <sup>+2</sup>	Ión calcio
GFP	Proteína verde fluorescente
GES	Sensores genéticamente codificados
cpFP	Proteína fluorescente permutada circularmente
2A	Secuencia auto-cortante 2A
CaM	Calmodulina
M13	Fragmento de cinasa de la cadena ligera de la miosina que se une a CaM
FRET	Transferencia de energía por resonancia Förster
ATP	Trifosfato de adenosina
RE	Reticulo endoplásmatico
RS	Reticulo sarcoplásmatico
GFP	Proteína verde fluorescente
RYR	Receptor de rianodina
kDa	Kilodalton
pb	pares de bases
ES	Troncal embrionaria
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa



## RESUMEN

El calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) es una señal intracelular responsable de controlar numerosos procesos celulares, estas señales de calcio dependen del espacio y tiempo donde tienen lugar. Para medir el  $\text{Ca}^{+2}$  existen indicadores (reporteros), entre los cuales destacan los indicadores fluorescentes denominados sensores codificados genéticamente (GES).

Si bien, existen numerosos estudios donde se utilizan sensores de calcio GES, todos ellos solo asocian los cambios en la fluorescencia con cambios en el  $\text{Ca}^{+2}$ , sin tomar en cuenta otros factores que pueden modificar la fluorescencia.

Por lo tanto, el presente trabajo propone un diseño de vector que permite distinguir entre cambios en la fluorescencia dependientes de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  y cambios en la fluorescencia independientes de  $\text{Ca}^{+2}$ .

Básicamente esta construcción se realizó mediante el uso de una secuencia autocortante 2A, la cual fue unida en el mismo marco de lectura al sensor de calcio Case12 y a una proteína roja fluorescente (mCherry), todo bajo un mismo promotor CBA. La construcción se realizó haciendo cortes con enzimas de restricción, ligaciones y amplificaciones por PCR. Se esperaba obtener de este sistema dos proteínas funcionales, en proporción constante, que permitieran relativizar ambas fluorescencias para normalizar la expresión del sensor.

Los resultados obtenidos de digestiones con enzimas de restricción y secuenciaciones del vector, confirman que todos los elementos están presentes (promotor, Case12, péptido autocortante y mCherry). Sin embargo, al transfectar células HEK293 con la construcción, solo se obtuvo fluorescencia de mCherry; y al analizar el extracto proteínico de esta transfección mediante western blot se concluye que la proteína Case12 está presente pero no es fluorescente.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Señalización por medio de $\text{Ca}^{+2}$

El calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) es una señal intracelular responsable de controlar numerosos procesos celulares. Es importante incluso desde que inicia la vida, ya que está implicado en procesos como: fertilización, formación de los patrones de desarrollo, diferenciación celular, proliferación celular, activación de factores transcripcionales, e incluso tiene una función muy importante durante la muerte celular [1-3].

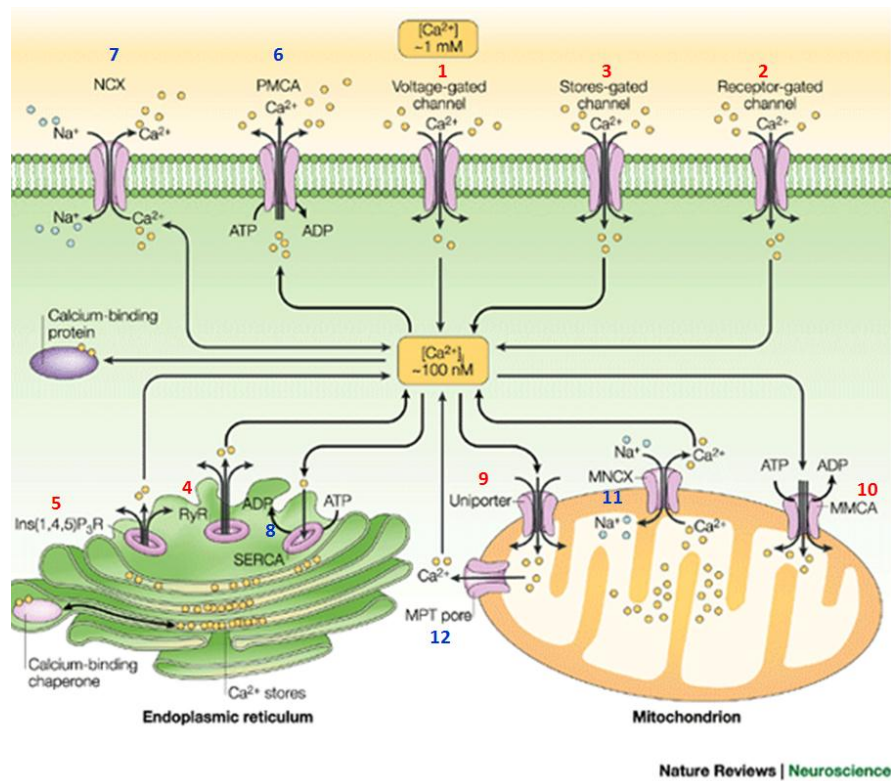
La señalización por  $\text{Ca}^{+2}$ , actúa mediante aumentos en la concentración del calcio citoplasmático (mecanismo de encendido). En reposo, la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  oscila en 100 nM, y al activarse esta señal, el aumento puede llegar hasta 1000 nM. Para alcanzar tal aumento, la célula utiliza  $\text{Ca}^{+2}$  ya sea del exterior o del interior de la célula [1, 4].

#### 1.1.1. Mecanismos de homeostasis del ión $\text{Ca}^{+2}$ en el interior de la célula

El calcio es almacenado dentro de la célula en las pozas de  $\text{Ca}^{+2}$ : RE (retículo endoplasmático) o su organelo equivalente en las células musculares RS (retículo sarcoplasmático). La liberación de calcio de estas pozas internas es controlada por varios canales, entre los más importantes y estudiados están:  $\text{InsP}_3\text{R}$  (receptor inositol-1,4,5-trifosfato) y la familia de los RYRs (receptores de rianodina) (Figura 1). El principal activador de estos canales es el calcio [1, 3], aunque otros componentes también pueden modularlos como por ejemplo:  $\text{InsP}_3$ , diacilglicerol, rianodina, la fosforilación, pH, entre otros [4].

Sin embargo, no solo el RE y RS se consideran las únicas pozas de calcio intracelular. En años recientes ha aumentado la evidencia que sugiere que los organelos ácidos (endosomas, lisosomas, vesículas secretoras) juegan un papel importante en la regulación del calcio, siendo el ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP) el causante de la movilización del  $\text{Ca}^{+2}$  en estas pozas [5]. Se piensa que el mecanismo para la

señalización por medio de estas pozas, se realiza cuando una pequeña cantidad de  $\text{Ca}^{+2}$  es liberada de las pozas ácidas en respuesta a NAADP y esta señal es subsecuentemente amplificada vía el RE o RS en una ola global de  $\text{Ca}^{+2}$ . La evidencia además sugiere que son los canales de dos poros (TCPs) que se encuentran en estas pozas (siendo que son receptores muy parecidos a los canales dependientes de voltaje) los que actúan en el proceso de liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  en los organelos ácidos [6].



**Figura 1. La concentración de calcio está altamente regulada por diferentes mecanismos.** La concentración de calcio intracelular aumenta, ya sea por la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  del medio extracelular por los canales: dependientes de voltaje (1), dependientes de ligando (2), activados mecánicamente o en respuesta a pozas intracelulares vacías (3); o bien, por la salida de  $\text{Ca}^{+2}$  de las pozas intracelulares por los canales  $\text{RyRs}$  (4) e  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  (5). Para contrarrestar este aumento, la bomba ATPasa de calcio (PMCA) (6), el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) (7) y la bomba la ATPasa del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) (8) trabajan rápidamente para restablecer los niveles normales de calcio. Adicionalmente, la mitocondria contiene canales uniportadores (9), intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  (11), el poro mitocondrial de transición (MPT pore) (12) y una ATPasa (MMCA) (10) que sirven para regular las concentraciones de calcio en el citoplasma (Tomado y modificado de [7]).

Por otro lado, el  $\text{Ca}^{+2}$  entra del exterior mediante diferentes tipos de canales localizados en la membrana celular, los cuales se clasifican dependiendo del factor que los active. Los canales más estudiados son: 1) los dependientes de voltaje (VOCs, voltaje-operated channels), los cuales se activan por la despolarización de la membrana; 2) los canales dependientes de receptor (ROCs, receptor operated channels), los cuales se abren en respuesta a un estímulo externo, como glutamato, ATP o acetilcolina; 3) los canales dependientes de las pozas internas (SOCs, store operated channels), los cuales se activan cuando estas pozas se vacían [1, 3]; 4) los canales activados mecánicamente, los cuales están presentes en muchos tipos celulares y responden a deformaciones celulares (Figura 1) [4].

El  $\text{Ca}^{+2}$  liberado de las pozas solo se encuentra disponible por un breve tiempo para actuar como señal, ya que inmediatamente es secuestrado y transportado fuera del espacio citoplasmático [8], lo que se denomina como mecanismo de apagado, y es importante por que detiene la señal dada por el calcio y además evita que los fosfatos sean precipitados por el ión [2]. El mecanismo de apagado básicamente funciona mediante la remoción rápida de  $\text{Ca}^{+2}$  del citosol por medio de varias bombas e intercambiadores. Para enviar  $\text{Ca}^{+2}$  al exterior, se utiliza la bomba ATPasa de calcio (PMCA, plasma membrane  $\text{Ca}^{+2}$  ATPasa) y el intercambiador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ , ambos situados en la membrana. Para recaptar el  $\text{Ca}^{+2}$  hacia las pozas se utiliza la ATPasa del retículo sarco-endoplasmático (SERCA, sarco-endoplasmatic reticulum ATPasa) (Figura 1) [1, 4].

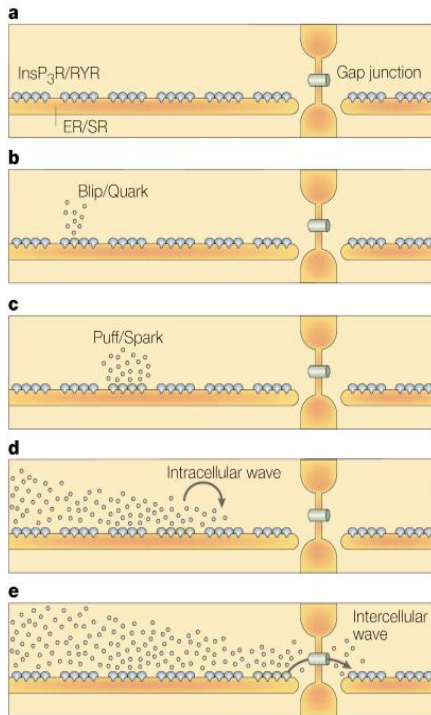
Un elemento importante para los mecanismos de encendido y apagado, es la mitocondria. Éste organelo tiene una enorme capacidad de acumular  $\text{Ca}^{+2}$  [2]. Al parecer, la mitocondria secuestra rápidamente el  $\text{Ca}^{+2}$  producido durante el desarrollo de una señal y luego, lo libera lentamente durante la fase de recuperación [4]. La mitocondria es capaz de secuestrar  $\text{Ca}^{+2}$  a través de uniportadores impulsados por el potencial de su membrana y ATPasas de membrana mitocondriales (MMCA, mitochondrial membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase); mientras que libera  $\text{Ca}^{+2}$  por medio de intercambiadores  $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ , y por el poro mitocondrial de transición (MPT) [3, 7] (Figura 1).

### 1.1.2. Tipos de señales de calcio

La señalización por calcio está dada generalmente por aumentos transitorios de  $\text{Ca}^{+2}$ , donde es importante la amplitud de estas oscilaciones, aunque en algunos casos también puede ser importante la duración o la localización del  $\text{Ca}^{+2}$ . Un ejemplo interesante se encuentra en las células del músculo liso, ya que en ellas, el  $\text{Ca}^{+2}$  es capaz de controlar dos mecanismos contrarios: la relajación y la contracción. Estas respuestas son debido a que los pulsos localizados de  $\text{Ca}^{+2}$  cerca de la membrana causan relajación; mientras que la contracción resulta del aumento global del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, lo cual ocurre cuando una gran proporción de canales libera el  $\text{Ca}^{+2}$  en sincronía [9, 10].

Concentraciones elevadas de este ión serían tóxicas para la célula, razón por la cual se presentan de una manera pulsativa y transitoria. Aunado al hecho de que estas señales, en contraste con un cambio global de  $\text{Ca}^{+2}$ , tienen una acción rápida a un costo energético relativamente bajo [4]. A lo largo de los años se han encontrado diferentes tipos de señales de acuerdo al espacio y tiempo que son (Figura 2):

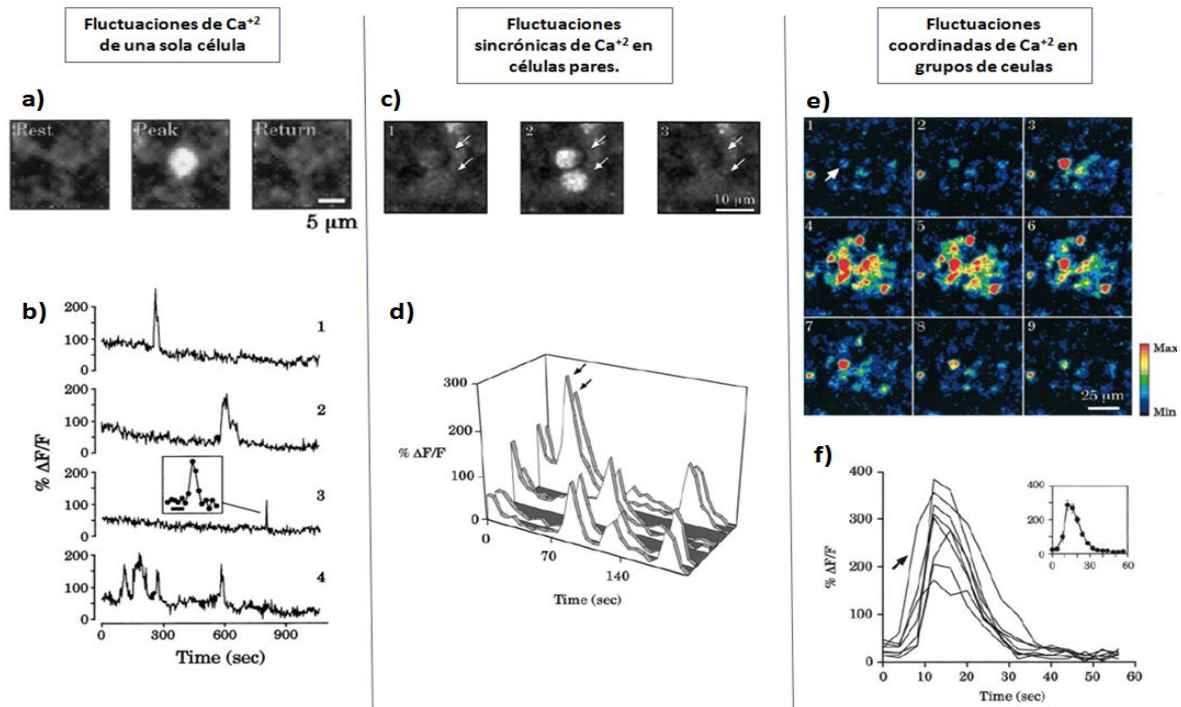
1) **blips o quarks** (Figura 2b), representan la actividad de un solo  $\text{InsP}_3\text{R}$  o  $\text{RyR}$ , respectivamente, y ocurre espontáneamente o después de una estimulación muy baja; 2) **puffs y sparks** (Figura 2c), los cuales son eventos un poco más largos que los anteriores, consecuencia de la activación coordinada de conjuntos de  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  o  $\text{RyRs}$ , respectivamente; 3) **olas de calcio intracelulares** (Figura 2d), donde los aumentos de calcio recorren las células completas, debido a que un grupo de canales de  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  o  $\text{RyRs}$  liberara calcio generando que el ión active receptores de calcio vecinos; 4) **olas de calcio intercelulares** (Figura 2e), estas se producen cuando las células están conectadas por uniones tipo gap; mediante ellas, las olas de calcio intracelular pueden viajar para esparcirse a células vecinas [1, 3].



**Figura 2. Diferentes tipos de señales de  $\text{Ca}^{+2}$  proveniente de las pozas intracelulares.** a) Distribución de los  $\text{InsP}_3\text{R}$  o  $\text{RYR}$ s en la superficie del RE/RS, b) blips y quarks, c) puffs y sparks, d) olas de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelulares, e) olas de  $\text{Ca}^{+2}$  intercelulares. (Tomado de [1]).

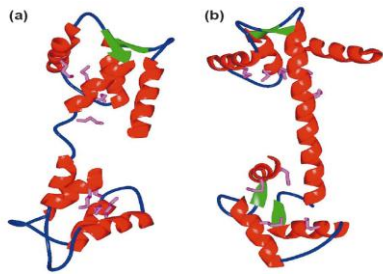
Las neuronas representan un ejemplo donde las señales espacio-temporales del  $\text{Ca}^{+2}$  son importantes, ya que aumentos locales del ión controlan la liberación de neurotransmisores en las terminales pre-sinápticas [10]; además, estas señales locales también están implicadas en el crecimiento de los conos axonales [11].

Otro ejemplo de este tipo de señales espacio-temporales se encuentra en la zona ventricular neocortical. En esta zona se describieron 3 tipos de patrones de  $\text{Ca}^{+2}$ . El primer patrón se encontró en células aisladas, donde fluctuaciones de  $\text{Ca}^{+2}$  ocurrían en una sola célula (Figura 3a y 3b) con un promedio de duración de 37.1 segundos, ocurriendo en el 82.5% de las células. El segundo patrón se encontró en células pares adyacentes (Figura 3c y 3d), entre las cuales se hallaron fluctuaciones sincrónicas de  $\text{Ca}^{+2}$ , con una duración aproximada de 36.7 segundos. Al parecer, este evento ocurre cuando las células están en la fase de mitosis compartiendo el citoplasma. Finalmente, el tercer patrón se encontró en grupos de células, en las cuales hay fluctuaciones coordinadas de  $\text{Ca}^{+2}$  (Figura 3e y 3f), este evento inicia con el aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  de una o dos células y se esparce a las células vecinas a  $\sim 8\mu\text{m/s}$ . Aunque es infrecuente este tercer patrón, al parecer el  $\text{Ca}^{+2}$  se difunde a través de las uniones gap [12].



**Figura 3. Fluctuaciones de  $\text{Ca}^{+2}$  de una sola célula (a y b):** a) una célula antes, durante y después de un aumento espontáneo de  $\text{Ca}^{+2}$ , b) gráfica de oscilaciones de calcio de 4 células por separado. **Fluctuaciones sincrónicas de  $\text{Ca}^{+2}$  en células pares adyacentes (c y d):** c) visualización de dos células adyacentes antes, durante y después del aumento sincrónico de  $\text{Ca}^{+2}$ , d) gráfica tridimensional de 3 pares de células adyacentes: antes, durante y después de la sincronización de calcio en dos células (las flechas indican tal evento de sincronización). **Fluctuaciones coordinadas de  $\text{Ca}^{+2}$  en grupos de células (e y f):** e) imagen donde se muestra una célula (marcada con una flecha), la cual inicia esta coordinación con las células que la rodean (las imágenes se tomaron cada 4 segundos), al final, regresan a su estado basal, f) gráfica del cambio en la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  de cada una de las células implicadas en este proceso de coordinación grupal (Tomado y modificado de [12]).

Es relevante mencionar como estas señales de  $\text{Ca}^{+2}$  se traducen en respuestas celulares. Básicamente, las oscilaciones de  $\text{Ca}^{+2}$  son descifradas por proteínas de unión a  $\text{Ca}^{+2}$ , que convierten las señales en una variedad de cambios bioquímicos y celulares [10]. Estas proteínas funcionan en general, de dos maneras: 1) ya sea como transportadoras o buffers de  $\text{Ca}^{+2}$ , donde traducen estas señales en cambios bioquímicos o 2) uniéndose al  $\text{Ca}^{+2}$ , lo que permite un cambio conformacional en ellas, que regula directamente algún proceso [8]. Entre algunos ejemplos están las proteínas: parvalbumina, troponina C, calmodulina (CaM), proteína cinasa C, calcineurina B,  $\alpha$ -Actinina, entre muchas otras [2].



**Figura 4. Cambios conformacionales de CaM:** a) Conformación de la estructura libre de  $\text{Ca}^{2+}$ ; b) conformación de la estructura unida a  $\text{Ca}^{2+}$ . La unión a calcio, produce cambios en las hélices de sus dominios, resultando en la exposición de sus residuos hidrofóbicos (Tomado de [8]).

CaM es uno de los ejemplos más estudiados. Esta proteína es expresada en todas las células eucariotas donde participa en eventos como crecimiento, proliferación y movimiento. La proteína CaM está conformada por cuatro manos E-F; las primeras dos manos E-F se combinan para formar un dominio globular N-terminal, que está separado por un pequeño linker flexible del dominio globular C-terminal, el cual consiste de las manos E-F 3 y 4 (Figura 4a); siendo más afín al  $\text{Ca}^{+2}$  el par C-terminal que el par N-terminal. En la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$ , el extremo N-terminal adopta una conformación “cerrada”, en la cual las hélices son comprimidas, mientras que el extremo C-terminal adopta una conformación “semi-abierta”, donde están expuestos al solvente sus grupos hidrofóbicos, lo que permite al extremo C-terminal interactuar a niveles basales de  $\text{Ca}^{+2}$  con proteínas blanco. En unión al  $\text{Ca}^{+2}$  estos dominios cambian dramáticamente a una conformación más “abierta” (Figura 4b), lo que resulta en la exposición de sus grupos hidrofóbicos, aumentando la afinidad con otras proteínas efectoras. Entre las proteínas con las que se une CaM sobresalen las adenilil ciclasas dependientes de CaM, fosfodiesterasas, proteínas cinasas, calcineurinas, entre otras. [8].

Para medir oscilaciones en el  $\text{Ca}^{+2}$ , existen indicadores (reporteros o sensores), que son moléculas que forman complejos selectivos y reversibles con este ión, y permiten dar una aproximación relativa de su concentración [13].

## 1.2. Medición de $\text{Ca}^{+2}$ intracelular

En la actualidad, existen básicamente tres tipos de indicadores para medir el calcio. Los indicadores químicos fluorescentes, los indicadores bioluminiscentes y los sensores



genéticamente codificados [14]. Estos indicadores pueden ser radiométricos o no. Cuando son radiométricos, el espectro de excitación (o emisión) cambia de acuerdo a la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  libre. En los compuestos no radiométricos, la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  es determinada por la intensidad de la fluorescencia [13].

### **1.2.1. Indicadores químicos fluorescentes**

Existe una gran variedad de indicadores químicos fluorescentes para medir  $\text{Ca}^{+2}$ , entre los que resaltan por sus cualidades: Indo 1, Fura 2, Bis-fura 2, Fluo 3, Oregon Green, Rhod 2 [14]. Dentro de las ventajas que tienen estos indicadores químicos fluorescentes sobre los indicadores bioluminiscentes o los sensores genéticamente codificados, es que estas moléculas son mucho más pequeñas, presentan un rango dinámico<sup>1</sup> amplio, mayor sensibilidad, una cinética de respuesta rápida y no requieren ser transferidos genéticamente (lo cual es una ventaja cuando se utilizan líneas celulares difíciles de transfectar) [14, 15].

Sin embargo, también presentan grandes desventajas: 1) tendencia a precipitar en las células, 2) tendencia a salir de las células, en parte por los transportadores aniónicos, aunque esto se puede suprimir un poco mediante sulfinpirazona o disminuyendo la temperatura, 3) los indicadores tienden a ser atrapados en los organelos intracelulares y por lo tanto no existe una distribución homogénea en el citosol, 4) estos compuestos químicos son en ocasiones difíciles de introducir a las células, 5) no pueden ser localizados en tipos celulares u organelos específicos, 6) suelen tener cierta citotoxicidad, 7) tienen niveles altos de fotoblanqueo<sup>2</sup>, ya que la iluminación excesiva causa una disminución en la señal, 8) tienden a unirse a otros iones y proteínas [14]. Debido a todo esto, el uso de estos sensores químicos se restringen a un pequeño número de eventos fisiológicos [14, 16]. En algunos casos, estos indicadores químicos serían inservibles, por ejemplo en

---

<sup>1</sup> Rango dinámico, se define como la diferencia entre la señal mínima y la señal máxima de fluorescencia.

<sup>2</sup> Fotoblanqueo, es un término genérico para referirse a todos los procesos que causan que la señal de fluorescencia se pierda permanentemente.

experimentos de transplantes *in vivo*, en los cuales se desea visualizar la respuesta de una célula específica en un hospedero de interés [17].

### 1.2.2. Indicadores bioluminiscentes y fluorescentes

Entre los indicadores de fotoproteínas (bioluminiscentes) más utilizados para medir  $\text{Ca}^{+2}$  están: aequorina, obelina, mitrocomina, y cilatina. Estas fotoproteínas emiten luz visible por medio de una reacción intramolecular en la presencia de calcio y un sustrato. Sin embargo, un problema con estas proteínas es que la bioluminiscencia es débil, ya que cada molécula de aequorina, al unirse al  $\text{Ca}^{+2}$  produce un solo fotón y por lo tanto requiere aparatos muy sensibles para su detección [14]. Otro problema con estos indicadores es que las fotoproteínas se consumen en la reacción de bioluminiscencia y al final la señal disminuye totalmente.

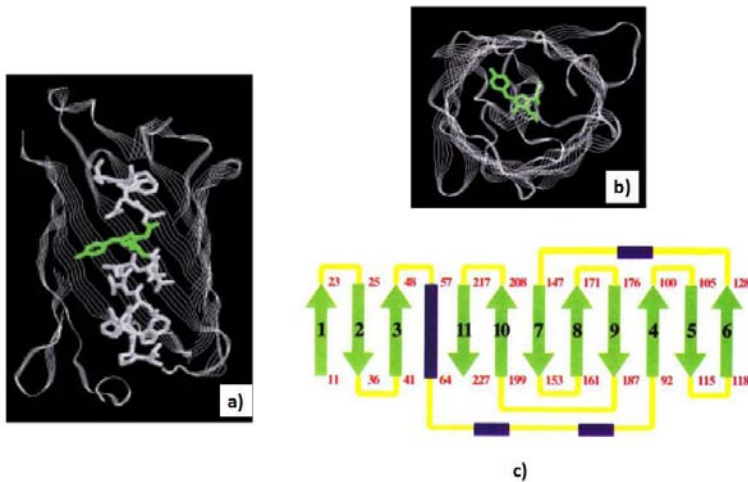
En función de lo anterior, se han desarrollado otros elementos para detectar estas dinámicas de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, denominados sensores genéticamente codificados, donde se utilizan proteínas fluorescentes.

### 1.3. Proteínas fluorescentes

La primera proteína fluorescente se descubrió en la medusa *Aequorea victoria* y se denominó GFP (proteína verde fluorescente). Esta proteína contiene un fluoróforo<sup>3</sup> colocado casi perfectamente en el centro de una estructura semirrígida en forma de  $\beta$ -barril (Figura 5a y 5b), la cual permite que las moléculas de solvente sean excluidas y protege al fluoróforo de ser apagado por el oxígeno molecular. De esta forma, la estructura  $\beta$ -barril es la responsable de la estabilidad térmica, química y mecánica de la proteína fluorescente [18, 19].

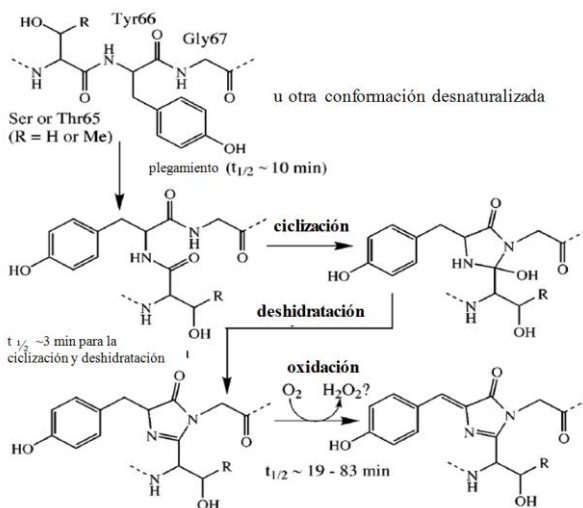
---

<sup>3</sup> Fluoróforo se refiere a la porción central de una molécula que es directamente responsable de absorber energía de una longitud de onda específica y emitirla en otra de mayor longitud.



**Figura 5. Estructura de la GFP.** Gráfico de la estructura beta-barril de la GFP vista de frente (a), y disectada para mostrar el fluoróforo (b). También se muestra un diagrama del patrón de plegamientos de la GFP (c), se muestran en verde las hojas  $\beta$ , en azul las  $\alpha$ -hélices y en amarillo los loops que las conectan, lo cual en conjunto forman el  $\beta$ -barril de la GFP (Tomado de [20] y [21]).

El  $\beta$ -barril está formado por 11 hojas  $\beta$ , las cuales rodean a una hélice  $\alpha$ -central que contiene al fluoróforo (Figura 5c) [22]. Éste está formado por los residuos Ser65-Tyr66-Gly67, que crean estructuras en forma de anillos (moléculas aromáticas), las cuales son capaces de absorber luz UV y azul y luego emitir en verde. La formación del fluoróforo es un mecanismo complejo de 4 pasos: plegamiento, ciclización, oxidación y deshidratación (Figura 6) [19].



**Figura 6. Mecanismo propuesto por Cubitt sobre la maduración del fluoróforo.** Primero, la GFP se pliega, luego la imidazolinona es formada por el ataque nucleofílico de la amida de Gly67 en el residuo carbonil 65, seguido de la deshidratación. Finalmente, el oxígeno molecular deshidrogena las uniones alfa-beta del residuo 66. La ciclización ocurre debido a que las secuencias Asn-Gly tienden a ciclizar (Tomado y modificado de [23]).

La fluorescencia en estas proteínas ocurre cuando un fotón excita al fluoróforo, elevando sus niveles de energía electrónica y vibracional. Luego, cuando el fluoróforo se relaja a su estado cero o basal libera energía en forma de un fotón, que en comparación con el absorbido es de menor energía. La liberación de ésta se denomina fluorescencia [24].

Con excepción de la GFP, todas las demás proteínas fluorescentes que se han encontrado en la naturaleza forman complejos diméricos o tetraméricos. Sin embargo, la GFP también tiene cierta tendencia a dimerizar, la cual puede ser suprimida mediante mutaciones (por ejemplo S65T) [23].

La ventaja de las proteínas fluorescentes es que pueden formar el fluoróforo sin la necesidad de cofactores, substratos o enzimas adicionales, excepto el oxígeno [19, 25], haciendo de éstas proteínas unas herramientas excelentes para la visualización *in vivo* de procesos celulares [26].

En la actualidad existe una gran variedad de proteínas fluorescentes que cubren casi todo el espectro visible. Un ejemplo es mCherry, que tuvo su ancestro en la proteína denominada inicialmente DsRed, descubierta en *Discosoma striata*. Esta proteína DsRed fluoresce en el espectro rojo, sin embargo, tenía muchos inconvenientes: baja fluorescencia, tetramerización obligada y por lo tanto incapacidad de ser fusionada con otras proteínas; por éstas razones se mejoró hasta obtener un derivado monomérico con propiedades superiores de maduración en el fluoróforo, la cual fue denominada RFP1 [27]. Posteriormente, por medio de rondas múltiples de evolución dirigida se obtuvo mCherry [28], una proteína que es considerada de las más fluorescentes y con mejor estabilidad en su fluoróforo.

#### 1.4. Sensores Genéticamente Codificados

Se denominan Sensores Genéticamente Codificados (en adelante GES, por las siglas genetically encoded sensores) a las proteínas fluorescentes que han sido modificadas de alguna forma, para detectar cambios específicos en algún parámetro dentro de las células.

Estas proteínas sensoras ofrecen un elegante método para la exploración y visualización en las células de elementos como:  $\text{Ca}^{+2}$ , pH,  $\text{Cl}^-$ , potenciales de membrana, proteínas específicas, entre otros. La ventaja de utilizar estos sensores genéticamente codificados es que proveen información espacio-temporal para estudiar la actividad de una proteína específica o una señal dentro de una célula viva [29].

La incorporación de los GES en las células se puede realizar mediante varias técnicas como son: lipofección, transducciones virales, electroporación, entre otros [15].

Los GES tienen grandes ventajas en comparación con los colorantes químicos fluorescentes, entre las cuales resaltan: 1) pueden ser fácilmente incorporados a las células, tejidos o incluso organismos, además una vez incorporados permiten su visualización durante varios días o semanas; 2) se pueden adicionar secuencias señales a los GES para situarlos en un organelo particular o un tipo celular específico; 3) es posible obtener organismos transgénicos que expresan GES; 4) la concentración del sensor puede ser regulada, si éste se pone bajo el control de un promotor inducible; 5) los sensores pueden ser mejorados mediante mutagénesis [15, 23, 29-31]. Gracias a esto han sido empleados exitosamente para medir  $\text{Ca}^{+2}$  en *C. elegans*, *Drosophila*, pez cebra y ratón [16, 31, 32].

Entre las desventajas de usar sensores basados en proteínas fluorescentes están: 1) la incógnita sobre la eficiencia en la formación del fluoróforo, 2) mayor tamaño en relación a los sensores químicos, 3) las cinéticas son ligeramente más lentas en comparación con los indicadores químicos, 4) los dominios que se adicionan a los GES podrían interferir en el mecanismo normal de la célula [23]. Sin embargo, se han desarrollado nuevas aproximaciones para que estos problemas se reduzcan o incluso se eliminen. Por ejemplo, para el caso específico del calcio, el péptido de unión a la calmodulina, así como la propia calmodulina, que están unidos a la mayoría de los sensores de calcio, podrían interactuar con proteínas reguladoras endógenas afectando el funcionamiento normal de la célula. Para evitar esto se han obtenido mutantes, cuyas proteínas endógenas no interactúan y de ésta manera no se ven afectadas las funciones normales de la célula [15].

Para generar GES se han utilizado diferentes plataformas, las cuales se dividen en tres clases: 1) sensores que utilizan dos proteínas fluorescentes donde se altera FRET<sup>4</sup>; 2) sensores donde se modulan las propiedades ópticas de una sola proteína, mediante la adición de uno o más dominios detectores que crean cambios conformacionales; 3) sensores que carecen de dominios proteínicos adicionales pero son sensibles a ciertos iones, debido a las propiedades intrínsecas de proteínas fluorescentes mutadas. Sin embargo, para  $\text{Ca}^{+2}$  sólo se han generado sensores basados en las dos primeras plataformas [30].

#### **1.4.1. Sensores que utilizan FRET para medir $\text{Ca}^{+2}$**

FRET (fenómeno de transferencia de energía por resonancia), es un evento que ocurre cuando se transfiere energía de un fluoróforo donador excitado hacia un fluoróforo aceptor. La transferencia de energía efectiva requiere que se sobreponga el espectro de emisión (del donador) y el espectro de excitación (del aceptor) (Figura 7), pero ambos espectros deben estar lo suficientemente separados para permitir la excitación independiente. Además, FRET también requiere un posicionamiento cercano con orientación favorable de ambos fluoróforos. Como resultado de la transferencia de energía, se da la disminución de la eficiencia cuántica<sup>5</sup> en la fluorescencia y el decremento en el tiempo de vida del donador, con el aumento en la fluorescencia de la proteína aceptor. Todos estos parámetros pueden ser medidos por métodos modernos de microscopia de fluorescencia [22, 29, 30, 33, 34].

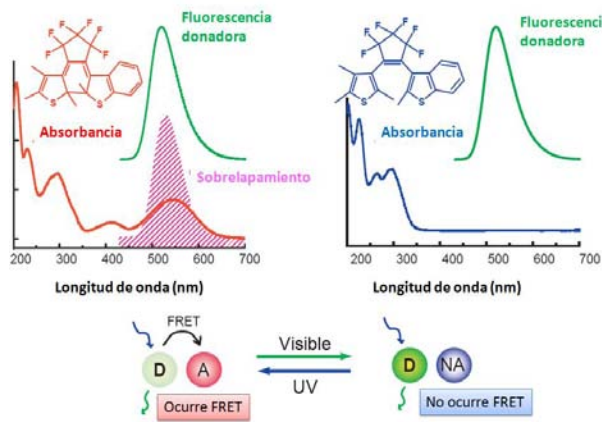
Los sensores GES que utilizan FRET se construyen generalmente mediante la fusión de dos proteínas fluorescentes con dominios sensibles a  $\text{Ca}^{+2}$ , donde al ser estimulados con el ión estos generan un cambio conformacional que modifica la distancia y orientación entre ambas proteínas, transformando la señal de FRET (Figura 8a). También existe una variante

---

<sup>4</sup> Transferencia de energía por resonancia de Förster

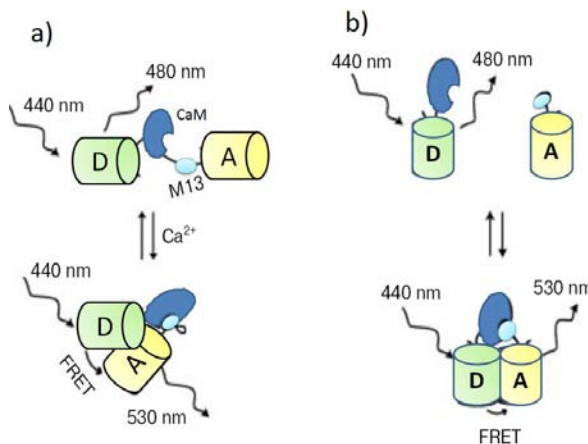
<sup>5</sup> Eficiencia cuántica, se refiere a la medición de la luz total de emisión sobre el rango fluorescente espectral, éste provee una medición de la intensidad máxima que puede ser obtenida con un fluoróforo.

en la cual las proteínas con los dominios sensibles a  $\text{Ca}^{+2}$  no se fusionan, y al unirse el ión a los dominios sensibles se acercan las proteínas generando FRET (Figura 8b) [35].



**Figura 7.** Esquema donde se muestra a la izquierda, los espectros de absorción de dos proteínas que sobreponen sus longitudes de onda y por lo tanto ocurre FRET. A la derecha, se muestra el espectro de dos proteínas que no sobreponen sus longitudes de ondas y por lo tanto no ocurre FRET (Tomado y modificado de [34]).

Sin embargo, una de las mayores limitaciones de los sensores que utilizan FRET consiste en su estrecho rango dinámico, el cual es limitado por la eficiencia de la transferencia de energía que depende del correcto posicionamiento de las proteínas, así como de la distancia entre ellas. Debido a esto, la mayoría de los GES basados en FRET tienen un aumento de fluorescencia promedio de 1.5-2 veces, siendo que no exceden un aumento en su fluorescencia de 5 veces en el caso de sensores para calcio [30].



**Figura 8. Esquema de los sensores que utilizan FRET.**

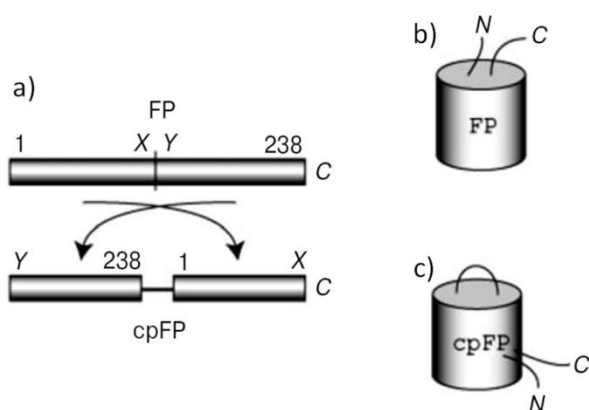
Se utilizan la letra D para representar la proteína donadora, la letra A para representar la proteína aceptora, CaM y M13 son los dominios sensibles a  $\text{Ca}^{+2}$ . A la izquierda (a) se muestra la estructura donde las proteínas fluorescentes son unidas covalentemente por los dominios detectores de  $\text{Ca}^{+2}$ . En ausencia del ión, la emisión del fluoróforo donador es observado a 480nm; la presencia del ion causa una transición conformacional de CaM que permite su unión al péptido M13. Esto resulta en una orientación más cercana de las proteínas permitiendo que ocurra FRET, lo cual se visualiza en la emisión del aceptor a 530nm. A la derecha (b) se muestra la estructura donde las proteínas fluorescentes tienen (cada una) un dominio detector de calcio (CaM o M13), al unirse estos dominios mediante el  $\text{Ca}^{+2}$  ocurre FRET

(Tomado y modificado de [30]).

Otros inconvenientes de los sensores que utilizan FRET son: que las interacciones débiles son difíciles de detectar por lo que se requieren controles de interacción 100% positivos y 0% negativos [23]; se necesitan métodos más sofisticados para visualizar y cuantificar FRET, por ejemplo, procesamientos matemáticos para imágenes o mediciones del fotoblanqueo [33]; los sensores basados en FRET son voluminosos (~50 Å) comparados con los sensores basados en una sola proteína [35].

#### 1.4.2. Sensores que utilizan una proteína fluorescente para medir $\text{Ca}^{+2}$

Para medir  $\text{Ca}^{+2}$  se han desarrollado GES que utilizan generalmente una sola proteína fluorescente permutada circularmente (cpFP). Una cpFP es una proteína en la cual el extremo N-terminal y el extremo C-terminal son fusionados a través de un linker flexible, formando nuevos extremos C-terminal y N-terminal en la proteína (Figura 9).

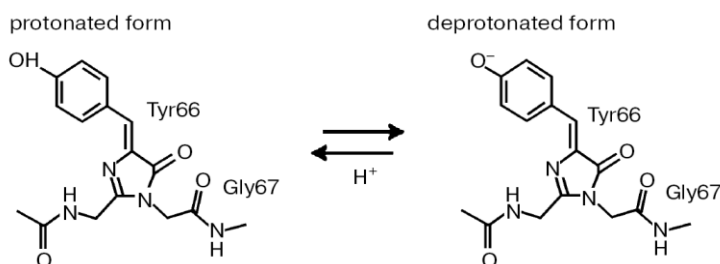


**Figura 9. Esquema donde se ilustra la permutación de una proteína fluorescente.** (a) Representación esquemática de la permutación, donde X y Y designan los puntos donde se corta la proteína para formar los nuevos extremos N-terminal y C-terminal, posteriormente estos dos fragmentos se unen mediante un péptido linker y se mantiene la estructura de barril de la proteína. (b) Esquema de una proteína fluorescente. (c) Esquema de una proteína cpFP donde los extremos N-terminal y C-terminal están cerca del fluoróforo (Tomado de [30]).

Para la construcción de GES se utilizan proteínas fluorescentes que han sobrevivido a la permutación y se les insertan dominios sensibles a  $\text{Ca}^{+2}$  en los nuevos extremos (Figura 9c) [29, 30]. La permutación permite que los dominios sensibles estén en proximidad al fluoróforo de la proteína, de tal manera que cuando el ión está presente, se generan cambios conformacionales en los dominios sensibles, causando modificaciones

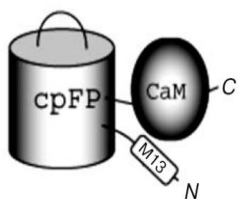


estructurales en el ambiente del fluoróforo, que resulta en la modificación de la señal de fluorescencia [36]. En las cpFPs, el fluoróforo está más expuesto al medio externo comparado con proteínas fluorescentes intactas (lo que explica su baja estabilidad al pH), por lo que el cambio en la fluorescencia es consecuencia de modificaciones en la proporción de formas protonadas y desprotonadas del fluoróforo [30] (Figura 10).



**Figura 10.** Transición de la GFP de una forma neutral (protonada) donde tiene un pico de absorción a 400nm, a una forma cargada (desprotonada) donde su pico de absorción es a 490nm (Tomado de [30]).

La ventaja de estos sensores basados en una sola proteína es su alto rango dinámico, ya que incluso se alcanza un aumento en la fluorescencia de 16.5 veces [30]. Cabe destacar que la mayoría de estos sensores para  $\text{Ca}^{+2}$  utilizan como dominios sensibles la calmodulina y el péptido M13 (fragmento de la quinasa de cadena ligera de la miosina), los cuales interactúan en presencia del  $\text{Ca}^{+2}$  (Figura 11) [37].



**Figura 11.** Esquema de los GES basados en una sola proteína. Se muestra el esquema de GCaMP que es un sensor GES basado en la permutación de una proteína fluorescente unida a dominios de unión a calcio (Tomado de [30]).

Hasta el momento se han construido varios sensores para  $\text{Ca}^{+2}$  que utilizan una proteína fluorescente (Tabla 1). Uno de los más importantes es GCaMP (Figura 11), en el cual se utiliza una permutación de EGFP, donde CaM está adherido al extremo terminal-C y en el

extremo terminal-N está el péptido blanco M13. GCaMP tiene baja fluorescencia, alta dependencia al pH y baja maduración a 37°C [38], sin embargo tiene una versión mejorada, denominada GCaMP1.6 [39], la cual tiene mayor fluorescencia y estabilidad al pH, pero al igual que GCaMP tiene baja maduración a 37°C [30].

Sensor	Variante de cpFP	Dominios sensibles	(F/F0) Max	pK <sub>a</sub>	K <sub>d</sub> (μM)	Estabilidad o maduración a 37 °C	Año
<b>Camgaroo-1</b>	YFP (no permutada)	CaM	7	ND	7	Baja	1995
<b>Flash-pericam</b>	EYFP	M13/CaM (E140Q)	8.0	7.9	0.7	Baja	2001
<b>GCaMP</b>	EGFP (cp 149-144)	M13/CaM	4.3	7.1	0.24	Baja	2001
<b>GCaMP1.6</b>	EGFP (cp149-144) mutada	M13/CaM (E140K)	4.9	8.2	0.16	Baja	2004
<b>GCaMP2</b>	EGFP (cp149-144) mutada	M13/CaM (E140K)	5.0	ND	0.16	Alta	2004
<b>Case12</b>	EGFP (cp145-144) mutada en H148E, 145T y Y203F	M13/CaM	12.0	7.2	1.0	Alta	2007
<b>Case16</b>	EGFP (cp145-144) mutada en H148E, 145S y Y203F	M13/CaM	16.5	7.2	1.0	Baja	2007

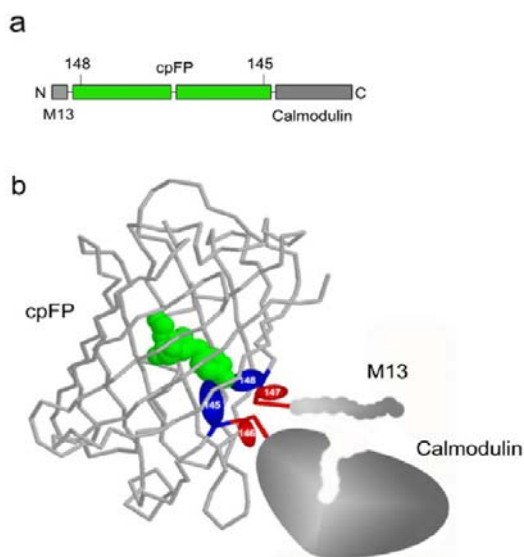
**Tabla 1. Comparación de las características de algunos sensores que utilizan una proteína fluorescente.** Se muestra la variante de cpFP utilizada (entre paréntesis se indica el lugar de la permutación) y también se indican los residuos mutados; se muestran los dominios sensibles y las sustituciones realizadas en ellos; (F/F0) Max indica el rango dinámico del sensor; PK<sub>a</sub> indica el valor de pH al cual la proteína pierde la mitad de su fluorescencia; K<sub>d</sub> (constante de disociación) se refiere a la afinidad del sensor por el Ca<sup>+2</sup> y finalmente se muestra el año de su construcción.

### 1.4.3. Sensor Case12

En el 2007 se creó el sensor Case12 que tiene mejores características como alto rango dinámico, estabilidad al pH y temperatura [40].

Como base para el sensor Case12 se utilizó el sensor GCaMP (linkers, dominios de M13 y calmodulina), ya que se determinó que la permutación en los residuos 145 y 148,

(compartida por los sensores Pericams y GCaMPs) era adecuada para obtener un alto rango dinámico (Figura 12).

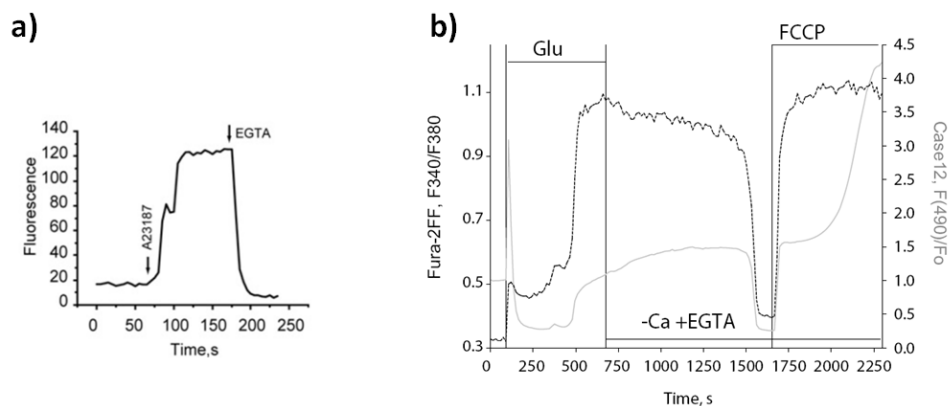


**Figura 12. Modelo propuesto de la organización espacial de los Pericams y GCaMPs.** a) Esquema de la construcción lineal de los sensores Pericams y GCaMPs, b) estructura propuesta de los sensores donde se señalan los aminoácidos importantes (145-148) y los dominios sensibles (calmodulina y M13) (Tomado de [40]).

Para mejorar el sensor se identificaron las mutaciones en las posiciones 145 y 148 en todos los sensores derivados de Pericam y GCaMP (Tabla 2a) y se crearon sensores mutantes (Tabla 2b). En la posición 145 se encontró siempre un residuo Gly o Thr, éste sitio fue sustituido por los aminoácidos Ser o Ala (ya que no causarían conflictos espaciales). La posición 148 fue sustituida por un residuo Asp, Glu o Asn; adicionalmente se sustituyó la posición 203 (la cual influye positivamente en la fluorescencia de proteínas permutadas) por un residuo de Phe (Tabla 2b). Los sensores mutantes obtenidos fueron caracterizados, y se determinó que la mutante cps2(S) tenía mayor rango dinámico (14.5) en respuesta a 1mM de  $Ca^{+2}$ . Esta mutante fue optimizada mediante mutagénesis aleatoria, para obtener mejor plegamiento a 37°C, resultando en una mutante que se denominó Case12 (Tabla 2c). Este sensor Case12 tiene como características principales: maduración rápida a 37°C y alto rango dinámico (12.0). Posteriormente se mutó (T145S), resultando en el Case16, sin embargo, éste tenía poca maduración en *E. coli* aunque tenía un rango dinámico de 16.5.

El sensor Case12 ha sido caracterizado en células HeLa, durante experimentos en los que se utilizó el ionóforo A23187 (que incrementa el calcio intracelular) y EGTA (agente quelante que se une al calcio extracelular y evita que el calcio intracelular aumente) (Figura 13a). También se ha comparado el Case12 con el indicador fura-2EF en neuronas corticales, donde se realizaron aumentos y disminuciones de calcio intracelular (Figura 13b). Los resultados demostraron que el sensor Case12 es comparable con indicadores químicos en cuanto a rango dinámico o señal de fluorescencia, y es un sensor eficiente para detectar cinéticas intracelulares [40].

Finalmente, para expresar los GES en las células deben ser insertados en un vector, bajo un promotor ya sea inducible o no. Sin embargo, en el caso de que se deseen expresar varios sensores a la vez, se requerirían varios promotores o IRES (ver siguiente sección) que no permitirían una expresión constante de los sensores. En la actualidad este problema suele ser resuelto gracias a las secuencias 2A, las cuales evitan este inconveniente y muchos más.



**Figura 13. Caracterización de Case12.** a) Caracterización en células HeLa que expresan el sensor Case12, donde se muestra que la adición del ionóforo A23187 (1mM) genera una respuesta fluorescente en el sensor, mientras que la adición del quelante EGTA inhibe rápidamente esta fluorescencia; b) comparación de la señal de fluorescencia del Case12 (línea gris) y el indicador químico fura-2FF (línea negra), en células neurales corticales durante una cinética generada por la adición de: Glu (ácido glutámico, que induce una entrada masiva de calcio al citosol), el quelante EGTA y FCCP (que induce la liberación del calcio de las pozas) (Tomado y modificado de [40]).

**a) Sensores previamente desarrollados**

Sensor	Posición 145	Posición 148	Posición 203	Características de fluorescencia
Pericam	H	G	Y	Aumenta 3X
Flash-Pericam	H	G	H	Aumenta 8X, baja estabilidad al pH
Ratiometric-Pericam	D	G	F	Aumenta 10X
Inverse-Pericam	T	G	A	Disminuye 5X
G18	E	G	T	Aumenta 4.3X
GCaMP1	E	T	T	Aumenta 4.3X en comparación con G18 debido a la mutación 145T
GCaMP1.6	E	T	T	Aumenta 4.9X
GCaMP2	E	T	T	Aumenta 5X

**b) Sensores desarrollados resultado de la mutación en las posiciones 145, 148 y 203**

Sensor	Posición 145	Posición 148	Posición 203	Características de fluorescencia
cps1	N	T	F	Bajo incremento
cps1(A)	N	A	F	Decremento 1.4X
cps1(S)	N	S	F	Aumento 1.5X
cps2	E	T	F	Aumento 14.5X
cps2(A)	E	A	F	No respuesta
cps2(S)	E	S	F	Aumento 1.4.5X
cps4	D	T	F	Bajo incremento
cps4 (S)	D	A	F	Cambios radiométricos 7.2X
cps4 (A)	D	S	F	Cambios radiométricos 8X

**c) Sensores desarrollados resultado de la mutación aleatoria de cps2**

Sensor	Posición 145	Posición 148	Posición 203	Características de fluorescencia
Case12	E	T	F	Incremento 12X, mayor velocidad de maduración
Case16	E	S	F	Incremento 16.5X

**Tabla 2. Análisis de sensores previamente desarrollados y mutantes que condujeron a la creación de Case12.** a) Sensores previamente desarrollados, donde se muestran los nombres de los sensores, los aminoácidos en la posición 148, 145 y 203, y las características de la fluorescencia máxima alcanzada por cada uno en respuesta al calcio; b) mutantes obtenidas de la sustitución en las posiciones 148, 145 y 203, y las características de la fluorescencia máxima alcanzada por cada uno en respuesta al calcio; c) se muestran los sensores Case12 y Case16 indicándose las substituciones realizadas para optimizar la variante cps2(S) y la fluorescencia máxima alcanzada por cada uno en respuesta al calcio (Tomado y modificado de [40]).

### 1.5. Secuencias para expresar varias proteínas en un mismo vector

Existen diversas formas para expresar dos o más proteínas en un mismo vector aunque presentan algunos inconvenientes. Por ejemplo (Tabla 3):

**Promotores.** En éste caso, cada una de las unidades transcripcionales contiene su propio ORF<sup>6</sup>. La ventaja de esta estrategia es que se pueden utilizar promotores inducibles o tejido-específicos. La mayor desventaja es la transcripción desacoplada de cada gen en referencia a los otros [41].

**Secuencias IRES<sup>7</sup>.** Estas secuencias son capaces de dirigir los ribosomas para iniciar la traducción en un sitio interno en el mRNA. Por ejemplo, en un mRNA bicistrónico, que contiene una secuencia IRES interna, el primer cistron es traducido directamente por el escaneo de los ribosomas que entran vía cap 5'; y el segundo cistron es traducido mediante la entrada de los ribosomas por la secuencia IRES. Debido a que cada cistron es resultado de un evento de traducción diferente, las proteínas no son obtenidas en proporciones constantes (hay un desbalance) ya que ambas traducciones están desacopladas, obteniéndose generalmente *in vivo* e *in vitro* entre 20 y 50% menos de la segunda proteína, lo que resulta en un exceso de la primer proteína. Estas secuencias son típicamente largas (~400 nucleótidos), similares al largo de los promotores, por lo que su uso se dificulta cuando se trata de transcribir varios genes, ya que secuencias directas repetidas tienden a ser inestables. Algunos estudios muestran que la eficiencia de los IRES tiende a variar considerablemente de un tipo celular a otro [41-43].

**Fusión de proteínas.** La fusión de múltiples proteínas en algunas ocasiones puede comprometer sus funciones, ejemplo de ello es que cuando se fusiona la proteína de cápside (CP) a la GFP, la fusión no permite la formación de partículas virales mientras que utilizando una secuencia 2A (ver sección 1.6) entre la GFP y la CP, se forman partículas virales decoradas de GFP [44]. Esta decoración en las partículas víricas es debido a que el producto de las proteínas cortadas CP-GFP inicia la formación de los viriones y la fusión CP-GFP que no se corta se incorpora en las partículas en desarrollo. Una segunda limitación de las proteínas fusionadas es que sólo pueden ser dirigidas hacia un solo compartimento subcelular [42].

---

<sup>6</sup> ORF (del ingles open reading frame), significa marco de lectura abierto

<sup>7</sup>IRES (del ingles internal ribosomes entry sequence), significa secuencias de entrada de los ribosomas

**Procesamiento proteolítico.** En éste, se fusionan dos proteínas con sitios de corte para proteinasas<sup>8</sup>, todo en el mismo ORF; después de la traducción, la poliproteína es cortada por una proteinasa para producir dos proteínas, las cuales permanecen con una secuencia que es parte del péptido blanco de la proteinasa. Así, el proceso es enteramente post-traducciona l y adicionalmente se requiere expresar la proteinasa. Los mayores problemas del procesamiento proteolítico son: 1) los productos proteínicos terminan en el mismo compartimento celular y además las proteinasas deben ser capaces de pasar a través del mismo compartimento para cortar las proteínas; 2) el corte puede ser incompleto, ya que su eficiencia depende en gran medida de la expresión de la proteinasa; 3) en algunos casos las proteinasas virales pueden llegar a ser tóxicas para la célula [41, 45].

Sin embargo, en algunos casos es necesario obtener de un vector una expresión constante de los genes, para lo cual se pueden utilizar los péptidos auto-cortantes 2A.

Estrategia de expresión	Promotores	mRNAs	ORFs	Proteínas	Mecanismos de Co-expresión		
Promotores internos	N	N	N	N	Transcripción		Múltiples transcritos
Splicing	1	N	N	N			
IRES	1	1	N	N	Traducción		Un solo transcrito
Péptidos auto-cortantes	1	1	1	N	Co-traducción	Traducción	
Procesamiento proteolítico	1	1	1	N	Post-traducciona l		
Fusiones	1	1	1	1	Traducción de proteínas quiméricas		

N=2,3,4, etc.

**Tabla 3. Clasificación de las estrategias de expresión** basadas en el mecanismo utilizado para co-expresar N número de proteínas (Tomado de [41]).

<sup>8</sup> Proteinasa o endoproteasas. Es una proteasa que corta en secuencias específicas de la cadena peptídica.

## 1.6. Secuencias auto-cortantes 2A

### 1.6.1. Descripción de las secuencias 2A

Las secuencias 2A (o péptidos auto-cortantes 2A) se descubrieron por primera vez en el virus de la fiebre aftosa (FMDV<sup>9</sup>) [46]. Sin embargo, desde su descubrimiento, muchas secuencias tipo 2A se han identificado en otros virus (Tabla 4) [47], aunque no todas son funcionales ([www.st-andrews.ac.uk/ryanlab/2A\\_2Alike.pdf](http://www.st-andrews.ac.uk/ryanlab/2A_2Alike.pdf)).

Virus	Familia de virus	Hospedero	Secuencias 2A o tipo-2A
FMDV (Foot-and-mouth disease)	<i>Picornaviridae</i>	Mamíferos	-PVKQLLNFDLLKLAGD <b>VESNPG P</b> -
ERAV (Equine rhinitis A virus)	<i>Picornaviridae</i>	Mamíferos	-----QCTNYALLKLAGD <b>VESNPG P</b> -
PTV1 (Porcine teschovirus-1)	<i>Picornaviridae</i>	Mamíferos	-----ATNFSLKQAGD <b>VESNPG P</b> -
TAV (Thosea asigna virus)	<i>Tetraviridae</i>	Insectos	-----EGRGSLT <b>CGDVESNPG P</b> -

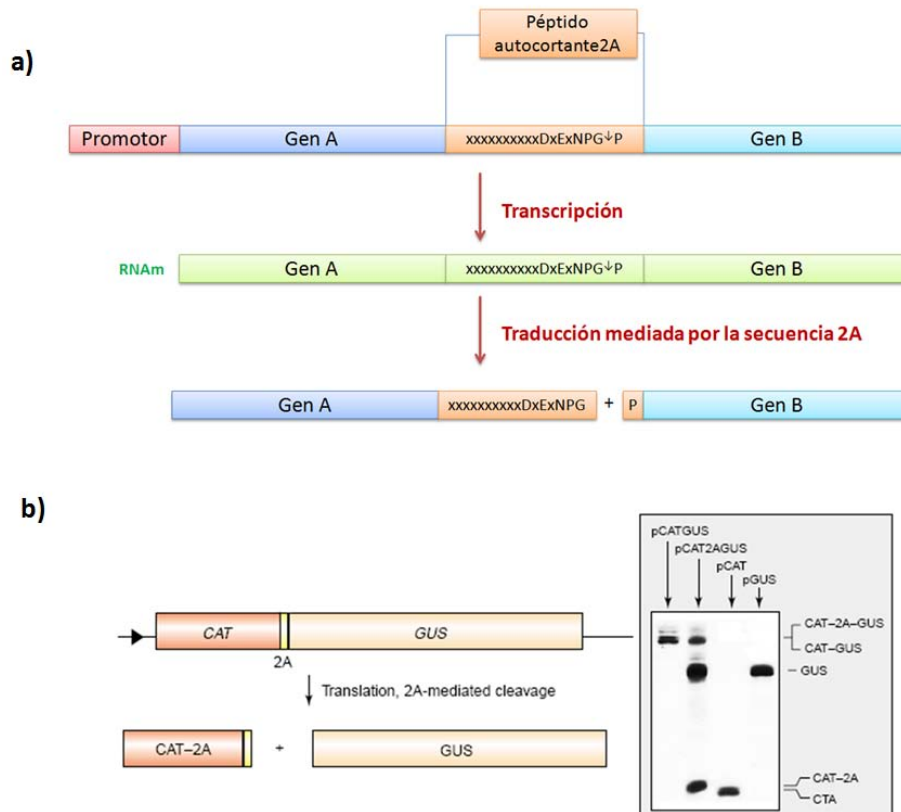
**Tabla 4. Secuencias 2A y tipo 2A utilizadas en biotecnología hasta la fecha.** El motivo conservado -DxExNPG P- se muestra en negritas (x representa cualquier aminoácido) (Tomado de [42]).

Una secuencia 2A es un péptido corto (~18 aminoácidos), que al ser situado entre dos genes (en el mismo marco de lectura), permite la expresión de ambos de manera independiente. Esto ocurre debido a que el péptido 2A es capaz de cortar su propio extremo C-terminal, ya que contiene un motivo conservado -DxExNPG<sup>↓</sup>P- (donde 'x' = cualquier aminoácido; la flecha indica el lugar donde se corta, siendo P el aminoácido N-terminal de la proteína siguiente) el cual evita que durante el proceso traduccional ocurra la unión entre la Gly y Pro terminales. Este corte, durante la traducción del extremo C-terminal permite la liberación de la proteína río arriba del 2A y posteriormente de manera independiente se libera la proteína río abajo del 2A (Figura 14a) [47-50].

<sup>9</sup>FMDV por sus siglas en inglés, Foot-and Mouth Disease Virus



De esta forma, múltiples proteínas pueden ser expresadas mediante un solo mRNA utilizando éste tipo de secuencias, resultando en una poliproteína capaz de auto-procesarse en múltiples productos [41, 42].



**Figura 14. Esquema y ejemplo del procesamiento mediante el péptido autocortante 2A.** a) Representación donde se muestra el mecanismo por el cual la secuencia auto-cortante 2A permite obtener dos proteínas individuales; la secuencia 2A se sitúa en el mismo marco de lectura entre el gen A y el gen B; durante la transcripción se genera un solo transcrito de RNA mensajero; durante la traducción se generan dos proteínas independientes, donde el gen río arriba (gen A) contiene en su extremo C-terminal la mayor parte de los aminoácidos del péptido autocortante, mientras que el gen río abajo del 2A (gen B) contiene en su extremo N-terminal solo el aminoácido prolina. b) Ejemplo de la expresión de las proteínas CAT (acetil-transferasa) y GUS (b-glucuronidasa) mediante la secuencia 2A. Se hizo un vector que contenía el gen CAT y GUS, donde la secuencia 2A era el mediador (CAT-2A-GUS). En el panel de la derecha se muestran los perfiles traduccionales obtenidos de lisados de reticulocitos de conejo (Tomado y modificado de [42]).

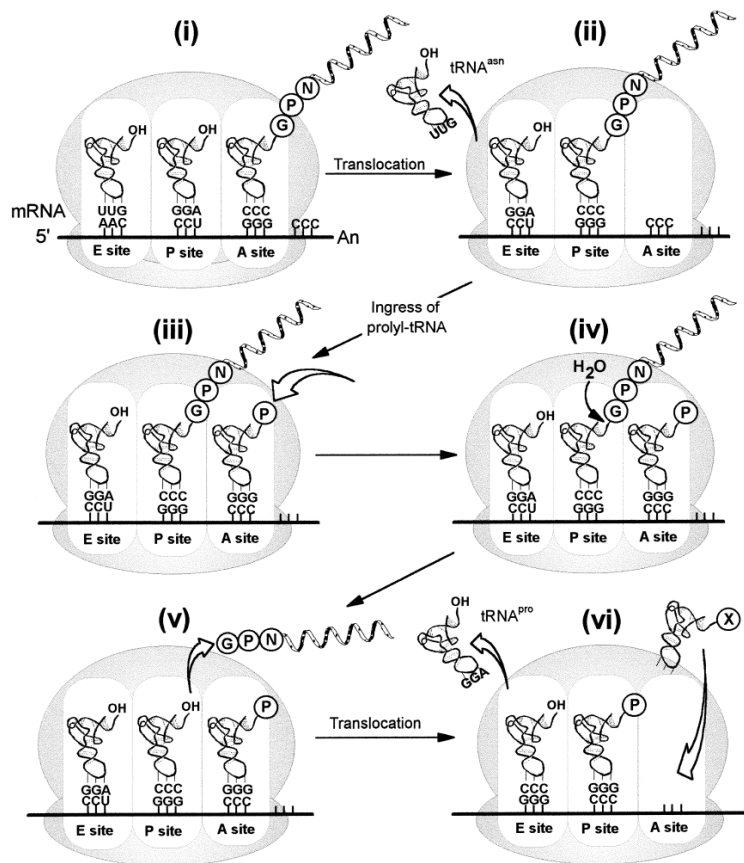
Cabe mencionar que en algunos casos, se obtiene más cantidad de proteína del gen río arriba del 2A, que del gen río abajo del 2A. Éste resultado no es por degradación del RNA o de la proteína río abajo, más bien tiene que ver con el modo de procesamiento del 2A. Adicionalmente *in vitro* se obtiene una pequeña cantidad de proteínas fusionadas (~15% de proteína no cortada). Sin embargo, estos problemas han sido resueltos introduciendo secuencias adicionales río arriba del 2A, por ejemplo, introduciendo una secuencia Gly-Ser-Gly entre la primer proteína y la secuencia 2A, alcanzando incluso 100% de corte y una co-expresión equimolar de los genes [51].

### 1.6.2. Modelo para explicar el procesamiento 2A

Hasta la fecha lo único que se ha confirmado sobre el funcionamiento de los péptidos auto-cortantes 2A, es que el ribosoma es capaz de continuar traduciendo el gen río abajo, después de la liberación de la proteína río arriba [45].

Se han propuesto varios modelos para explicar el funcionamiento de las secuencias 2A, siendo el modelo más aceptado el denominado “ribosome skipping” (Figura 15) [50]. Este modelo propone que, cuando un ribosoma encuentra una secuencia 2A en el mismo ORF del gen que está siendo traducido, “salta” la síntesis de la unión peptídica entre el aminoácido glicina y el aminoácido prolina (del motivo conservado -DxExNPG<sup>↓</sup>P- en el extremo C-terminal de la secuencia 2A) [52].

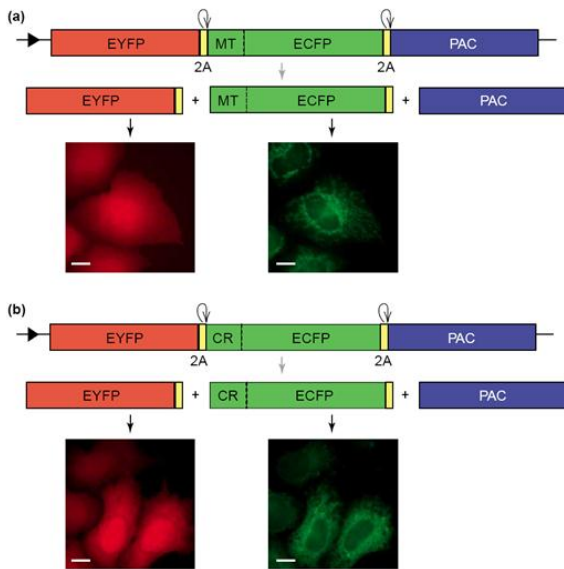
Se ha propuesto que el motivo conservado en el extremo C-terminal forma una hélice-alfa, y esta hélice interactúa con el túnel de salida del ribosoma, de tal manera que la unión éster entre el peptidil(2A)-tRNA naciente y el tRNA<sup>Pro</sup> no ocurre porque se evita el ataque nucleofílico (un obstáculo estérico nucleofílico), induciendo una pausa en la traducción [49]. Luego, el péptido naciente 2A es liberado por medio de los factores de liberación eucarióticos 1 y 3 (eRF1, eRF3) [53]. No obstante el protil-tRNA<sup>Pro</sup> queda unido al sitio P, el cual mimetiza una unión éster que permite que la traducción del ORF restante pueda seguir, re-iniciando desde el protil-tRNA<sup>Pro</sup> [42].



**Figura 15. Esquema del modelo propuesto para la actividad del 2A.** (i) Estado después de la adición del último residuo (Gly) del péptido 2A; (ii) el peptidil(2A)-tRNA es translocado del sitio A, al sitio P; permitiendo el ingreso del proilil-tRNA<sup>Pro</sup> al sitio A (iii). El proilil-tRNA<sup>Pro</sup> es incapaz de actuar como nucleófilo para formar el enlace peptídico, lo cual detiene la traducción y se libera el péptido naciente por hidrólisis (iv y v). El tRNA desacetilado ahora está en el sitio P (mimetizando la formación de la unión peptídica) y esto permite la translocación del proilil-tRNA<sup>Pro</sup> de lo sitio A al P (vi). La síntesis del péptido C-terminal del 2A procede ahora de forma normal, iniciando con una prolina (Tomado de [50]).

Este modelo se apoya en que el corte ocurre en todas las células eucarióticas hasta el momento probadas como: mamíferos incluyendo humanos [46], insectos, levaduras, hongos [54], peces [55], plantas [56]; no obstante este corte no ocurre en bacterias [57].

Debido a este mecanismo co-traduccionnal de las secuencias 2A, se pueden adicionar secuencias señales post-traduccionales a las proteínas, para enviar cada una a diferentes compartimentos celulares; por ejemplo, a cloroplastos, mitocondrias o membranas (Figura 16) [42].



**Figura 16. Adición de señales subcelulares a los productos procesados mediante el 2A.** Las imágenes se tomaron 36-48 horas post-trasfección en células HeLa. Las barras blancas representan 10 μm. a) La señal MT dirige la proteína ECFP a la mitocondria, mientras que la EYFP-2A se queda en el citosol (y difunde hacia el núcleo); b) la EYFP-2A (sin señal) esta localizada en el citosol, mientras que la señal CR dirige a la ECFP al retículo endoplasmático (Tomado de [42]).

### 1.6.3. Ventajas y desventajas

Un problema potencial es que el péptido 2A permanece como una extensión en el extremo C-terminal de la proteína río arriba del 2A, y éste pudiera afectar la función de la proteína. Sin embargo, esta extensión también podría afectar positivamente, ya que se han creado anticuerpos para esta secuencia para detectar la expresión o localización de la proteína río arriba [58]. Por otro lado, una prolina N-terminal queda adherida a la proteína río abajo del 2A, a pesar de esto, debido a la regla del término N dichas proteínas son muy estables [42]. Esta regla menciona que los residuos N-terminales en una proteína pueden funcionar como señal para enviar a degradación. Sin embargo, la única excepción a esta regla es la prolina, razón por la cual éstas proteínas río abajo del 2A tienden a ser muy estables [59].

En resumen, esta secuencia 2A presenta en particular, grandes ventajas entre las cuales se pueden mencionar: 1) expresión en cantidades esencialmente equimolares de dos o mas proteínas; 2) tamaño pequeño de la secuencia 2A (~18 aminoácidos) comparado con IRES o promotores, característica benéfica cuando se intentan hacer vectores con varias proteínas; 3) se les pueden adicionar secuencias señales post-traduccionales a las proteínas obtenidas mediante este sistema para enviar a cada una, a diferentes

compartimentos celulares; 4) para su funcionamiento, esta secuencia no requiere la presencia de otros factores celulares, excepto los ribosomas eucarióticos y dos factores de elongación presentes en todas las células eucarióticas [42, 60]. Así mismo, al compararse las secuencias 2A con otros sistemas como los mencionados anteriormente (IRES, fusiones, promotores, etc.), se ha concluido que las secuencias 2A ofrecen más ventajas, como por ejemplo, mayor expresión de cada una de las proteínas [61].

## 2. ANTECEDENTES

Existen varios antecedentes donde se utilizan sensores de calcio codificados genéticamente. Sin embargo, solo pocos han intentado expresar estos GES en células troncales (ES).

El antecedente más exitoso en este aspecto es el de Meyer y colaboradores [17]. En ésta investigación se construyeron 3 plásmidos denominados pCam1, pCam2 y pCAG-Cam2-PAC (Figura 17a), en los cuales se comparó la fluorescencia de los sensores de  $Ca^{+2}$ ; Camgaroo-1 y Camgaroo-2, bajo el promotor CMV/CBA o también llamado CAG (híbrido que se compone de la secuencia inmediata-tempran del *enhancer* del citomegalovirus unida a la secuencia promotor de la beta-actina de pollo) en células HEK293.

Después de resolver que el mejor sensor era el Camgaroo-2 (debido a su detectabilidad a 37°C) fue puesto bajo el promotor CMV/CBA (promotor ampliamente utilizado en células troncales), denominándolo plásmido *pCAG-Cam2-PAC* que mostró tener, antes y después de una diferenciación neural, una fluorescencia más visible en células ES en comparación con el promotor CMV (Figura 17b).

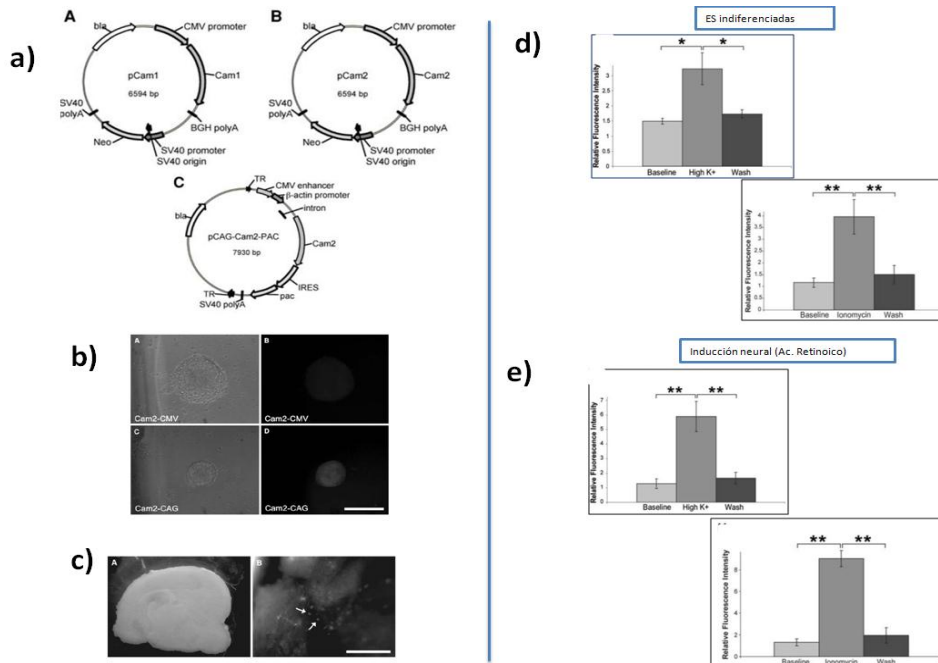
Para determinar la expresión del vector en células de tejido *in vivo*, se insertaron en rebanadas de cerebro células expresando el vector. El resultado fué la fluorescencia de células en tejido *in vivo* (Figura 17c).

Finalmente, para determinar si esta construcción podría ser utilizada para medir la actividad celular del  $Ca^{+2}$ , realizaron varios experimentos en células ES indiferenciadas y células con inducción neural, que involucraban aumentos y disminuciones de los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular. Midieron la intensidad de la fluorescencia y su capacidad de respuesta. Sus resultados demostraron que la fluorescencia se incrementaba significativamente (en comparación con la basal) en ambos casos (Figura 17d y 17e).

Este reporte establece la primera construcción realizada con sensores GES para ser utilizada en células ES. No obstante esta construcción *pCAG-Cam2-PAC* presenta un

inconveniente, ya que si se deseara cuantificar la concentración de calcio durante varios días, primeramente se debería cuantificar la expresión del sensor.

Adicionalmente los autores mencionan, que uno de los mayores inconvenientes de su construcción es el uso del Camgaroo-2, ya que tiene un rango dinámico muy bajo [17].



**Figura 17.** a) Plásmidos conteniendo el sensor Camgaroo: (A) pCam1, (B) pCam2 (ambos bajo el promotor CMV) y pCAG-Cam2-PAC (bajo el promotor CMV/CBA aunado a un gen de resistencia a puromicina). b) Colonias de células ES transfectadas con pCam2 bajo dos diferentes promotores (CMV o CAG) vistas con microscopia de fase (A y C) y de fluorescencia (C y D). c) Células ES expresando Camgaroo-2 en rebanadas de cerebro de ratón, donde las flechas indican las mismas. d) Resultados de las pruebas en células ES indiferenciadas donde se gráfica (arriba) la intensidad de fluorescencia basal, con aumento de calcio (derivado del aumento con potasio) y luego un lavado. Así mismo se realiza la misma gráfica, pero en este caso con aumento de calcio inducido con ionomicina (abajo). e) Los resultados de las pruebas en células ES con inducción neural por ácido retinoico, donde se grafica la intensidad de fluorescencia basal, con aumento de calcio (derivado del aumento con potasio) y luego un lavado (arriba). Así mismo se realiza la misma gráfica, pero en este caso con aumento de calcio inducido por ionomicina (abajo) (Tomado y modificado de [17]).

### 3. JUSTIFICACION

Ahora que se han identificado diversos tipos de señales por medio de calcio (olas de calcio, sparks, blips, etc.) es necesario determinar como esta señalización funciona en procesos celulares específicos, por ejemplo: mitosis, diferenciación celular, muerte celular, entre otros. Para lo cual, se requiere tener una correlación cuantitativa entre las oscilaciones en frecuencia y amplitud del  $\text{Ca}^{+2}$  y las respuestas celulares obtenidas de las mismas.

Si bien, existen numerosos estudios donde se utilizan sensores de calcio GES, todos ellos solo asocian los cambios en la fluorescencia con cambios en el  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, sin tomar en cuenta otros factores que pueden modificar la fluorescencia.

Uno de estos factores que puede modificar la fluorescencia y no está relacionado directamente con un cambio en el  $\text{Ca}^{+2}$ , son los cambios estocásticos dentro de las células, que pueden provocar una modificación en la tasa de transcripción o traducción; lo que se refleja en un cambio en la concentración de las proteínas. Se sabe que la expresión de cada gen es controlado por la concentración, estados y localizaciones de otras moléculas, y la cantidad o actividad de estas moléculas causan fluctuaciones correspondientes en la expresión del gen [62].

Por lo tanto si se está utilizando un sensor GES y ocurre este cambio estocástico en la tasa de transcripción o traducción, la concentración del sensor sería modificada y por lo tanto también la fluorescencia se vería afectada por este ruido intrínseco en las células.

Otro factor que pudiera influenciar en el nivel de fluorescencia, sería el cambio de morfología de las células. Normalmente, la manera más sencilla para medir la fluorescencia en las células, es utilizar un software donde se selecciona el área de la célula que se desea medir, posteriormente el programa cuenta cada uno de los pixeles presentes en esta área y obtiene la intensidad de fluorescencia para cada pixel, luego obtiene un promedio de esos valores y se obtiene el valor de la fluorescencia para cada célula.



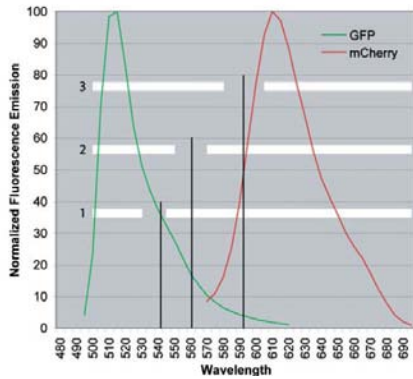
Sin embargo, se debe recordar que las células no son planas, es decir, contienen un plano "X", un plano "Y" y también presentan un plano "Z" que sería la profundidad o grosor de la célula. El plano "Z" hace más compleja la medición de la fluorescencia, debido a que en teoría las proteínas son fáciles de difundir en el agua, por lo tanto, podrían atravesar el diámetro entero de la célula en cuestión de segundos [63]. Lo que indica que si hay un cambio en la morfología de las células, habrá un movimiento de las proteínas a lo largo de la célula y esto podría modificar la concentración de dichas moléculas por pixel alterando los valores de la fluorescencia sin ser debidos a un cambio del ión.

Debido a que es difícil analizar el eje "Z" sólo se toman en cuenta normalmente los planos "X" y "Y", pero queda un error que debe ser analizado. Por ejemplo, en el caso de utilizar un GES, podría ocurrir que un cambio de morfología de las células, provocara que las moléculas en el eje "Z" se movieran al eje "X" o "Y" y con esto, la intensidad de fluorescencia por área sería modificada y esto resultando en un grado de error.

Por lo tanto, el presente trabajo propone un diseño de vector que permite distinguir entre cambios en la fluorescencia debido a cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  y cambios en la fluorescencia no por  $\text{Ca}^{+2}$ .

Para esto, se pensó utilizar una secuencia 2A, un sensor de calcio Case12 (principalmente por su alto rango dinámico, expresión a 37°C y estabilidad al pH) y la proteína fluorescente mCherry. Esta combinación de proteínas permitiría la detección de la señal fluorescente del sensor y del mCherry en dos distintos canales de emisión (Figura 18).

Por otro lado, la secuencia 2A, implica obtener proporciones constantes del sensor de calcio Case12 y la proteína mCherry. De esta manera, utilizando la secuencia 2A, se podría tener casi la misma proporción de las dos proteínas, de tal manera que mCherry sería un control interno que serviría como referencia para comparar y validar los cambios vistos por el sensor Case12.



**Figura 18. Emisiones normalizadas de GFP (línea verde) y mCherry (línea roja).** Las líneas negras indican 543, 561 y 694 nm, las cuales indican las longitudes de onda utilizadas para excitar a mCherry (Tomado de [64]).

Es decir, esta estrategia de vector daría a conocer de una manera indirecta el nivel de actividad de la transcripción, traducción, estabilidad y procesamiento del RNA, así como de la estabilidad de las proteínas.

Adicionalmente este vector se ideó para poder ser utilizado en células troncales, razón por la que se utilizó el promotor CMV/CBA que es funcional en este tipo de células [65] y por el que ya se han expresado sensores GES en las células ES [17].

En teoría, la construcción bicistrónica Case2ACherry permitiría detectar y monitorear al sensor en una manera espacial, temporal y discriminativamente.

#### 4. HIPÓTESIS

Mediante el uso de la secuencia autocortante 2A se pueden unir en un vector el sensor Case12 y la proteína mCherry, generándose de esta construcción dos proteínas funcionales, en proporciones constantes. Esto permitirá cuantificar la expresión del sensor mediante la expresión de la proteína mCherry.

#### 5. OBJETIVO GENERAL

Construir un vector que contenga el sensor de calcio Case12 unido a la proteína fluorescente mCherry, mediante la secuencia autocortante 2A, todo bajo un mismo promotor CMV/CBA.

##### 5.1. Objetivos particulares

- Contruir el vector bicistrónico: **CMVCBA CT2CpA PgkNeo** el cual nos permitirá distinguir entre cambios en la fluorescencia dependientes de la concentración de Ca<sup>2+</sup> y cambios en la fluorescencia independientes de Ca<sup>2+</sup>.
- Evaluar la funcionalidad del vector bicistrónico **CMVCBA CT2CpA PgkNeo** cuando se transfecten diferentes líneas celulares.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Construcción del vector

#### 6.1.1. Digestiones con enzimas de restricción

Los diferentes elementos (secuencias) que se esperaba constituyeran al vector final, se encontraban dispersos en diferentes plásmidos, por lo que en la mayoría de los casos, se cortó el fragmento deseado de estos plásmidos y se insertó en la construcción linearizada con enzimas de restricción. Así mismo, las digestiones sirvieron para realizar los *screenings* de colonias obtenidas después de la ligación. El protocolo utilizado fue:

- Reacción:

1-2 µg de DNA (diluido en 17µl de agua)	17 µl
Buffer 10X (específico para la enzima)	2 µl
Enzima	1 µl
Volumen total de la reacción	20 µl

- Vortexear y centrifugar unos segundos
- Incubar el tubo de 1-3hrs a 37°C

#### 6.1.2. Rellenado de extremos cohesivos (Blunt Ending DNA fragments)

En algunos casos, se tuvieron que rellenar los extremos cohesivos ya sea del inserto o del vector para lograr la ligación deseada. Se utilizó la enzima DNA blunting (marca Fermentas), la cual remueve los extremos cohesivos 3' y rellena los extremos cohesivos 5'. Siguiendo el protocolo:

- Una vez obtenido el fragmento deseado por medio de las enzimas de restricción correspondientes, esta digestión se inactiva 20 minutos a 65°C
- Luego se agrega a la reacción 1µL de enzima DNA blunting y 10µL de buffer para DNA blunting 10X
- Incubar la reacción a 70°C por 5 minutos y enfriar en hielo

- Añadir 1  $\mu\text{L}$  de DNA ligasa T4
- Incubar la reacción de ligación a temperatura ambiente por 30 minutos

### 6.1.3. Desfosforilación del vector

Para disminuir el ruido de fondo obtenido por vectores re-circularizados se optó en algunos casos, por desfosforilar el vector. Siguiendo los pasos:

- Una vez cortado el plásmido blanco con la apropiada enzima de restricción, sin purificar se le agrega a la digestión 0.5 $\mu\text{L}$  de enzima SAP
- Luego se incuba por 30 minutos a 37°C
- Se calienta a 65°C por 20 minutos

### 6.1.4. Amplificación por PCR

La secuencia de DNA requerida para la construcción a veces fue obtenida mediante amplificada por PCR. En éste caso protocolo fue:

- Reacción de PCR:

Agua ésteril	16 $\mu\text{l}$
10X Buffer Pfu* con MgSO <sub>4</sub>	2.5 $\mu\text{l}$
25mM dNTPs	0.5 $\mu\text{l}$
Primer 1 (100ng/ $\mu\text{l}$ )	2.5 $\mu\text{l}$
Primer 2 (100ng/ $\mu\text{l}$ )	2.5 $\mu\text{l}$
Templado DNA (100ng/ $\mu\text{l}$ )	0.5 $\mu\text{l}$
DNA polimerasa Pfu*	0.5 $\mu\text{l}$
Volumen Total de la Reacción	25 $\mu\text{l}$

\*Marca Fermentas

- Parámetros de los ciclos

Segmento	Numero de ciclos	Temperatura	Duración
1°	1	94-98°C	45 segundos
2°	25-30	94-98°C T <sub>m</sub> Primer – 5°C 72°C	45 segundos 45 segundos 1-2 minutos/kb del amplificado de PCR
3°	1	72°C	10 minutos

### 6.1.5. Extracción de DNA de geles de agarosa

Una vez obtenido el fragmento deseado, ya sea por amplificación por PCR o por digestión con enzimas de restricción, este fragmento era corrido en un gel de agarosa, cortado y posteriormente purificado por el Fermentas GeneJET Gel Extraction Kit siguiendo los pasos indicados en el instructivo.

### 6.1.6. Geles de Agarosa y Electroforesis

Principalmente se utilizaron 3 concentraciones de agarosa: 0.7% (para visualizar bandas de 4000 a 10000 pb), 1% (para bandas de 400 a 4000 pb) y 3% (para bandas menores de 400pb). Se utilizaron dos distintos buffers: SB 1X (anexo I) (para geles de 1 y 3%) y TAE 1X (anexo II) (para geles de 0.7%). El corrimiento de los geles fue de 5 minutos a 25mV y posteriormente el tiempo necesario a 100mV. Para la tinción se utilizó bromuro de etidio.

### 6.1.7. Ligaciones

Una vez obtenido el fragmento purificado, se procedía a insertarlo en la construcción mediante el siguiente protocolo de ligación:

- Se mezcla el inserto y vector en una relación molar 3:1 inserto:vector, en un volumen de 20µL
- Se calienta 50-60°C por 2 minutos

- Se transfiere el tubo a hielo
- Se agrega 2 $\mu$ L de buffer 10X T4 y 1 $\mu$ L de enzima T4 Ligasa
- Se mezcla y se deja a 4°C durante la noche o 1 hora a 12°C
- Para inactivar la enzima se calienta a 65°C durante 20 minutos
- Esta reacción se limpiaba directamente por columna con el Fermentas GeneJET Gel Extraction Kit.

### 6.1.8. Cuantificación del DNA

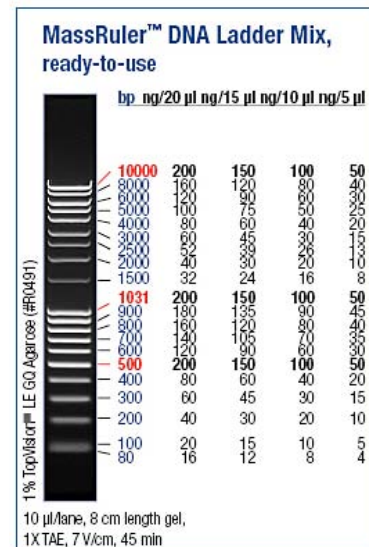
Para todos los puntos mencionados anteriormente se requirió una cuantificación del DNA, en algunos casos se utilizó el Nanodrop o el espectrofotómetro; sin embargo en el caso específico de la cuantificación del inserto y vector para las ligaciones, se utilizó una comparación del marcador de peso molecular con los fragmentos de DNA de la siguiente manera:

- Se corría en un gel de agarosa 5 $\mu$ l de inserto, 5 $\mu$ l de vector y 5 $\mu$ l de marcador Mass Ruler (Fermentas)
- Luego se comparaban el grosor de las bandas del inserto y vector, con las bandas del marcador de la izquierda para obtener una relación del número del ng/ $\mu$ l, simplemente siguiendo tres pasos:

+ Escoger la banda de Mass Ruler que mas se asemeje en grosor a la del nuestro fragmento de DNA

+ Determinar con la última columna de la derecha a cuantos ng/5 $\mu$ l equivale esa línea

+ Dividir el equivalente entre 5 (es decir los 5 $\mu$ l cargados), para obtener el número de ng/ $\mu$ l de nuestros fragmentos



### 6.1.9. Transformación de bacterias por choque de calor o por electroporación.

Una vez realizada la ligación, se procedía a clonarla en bacterias, generalmente células *Escherichia coli* de la cepa DH5 $\alpha$ . Ésta transformación se realizaba ya sea por electroporación o por choque de calor, siguiendo los siguientes protocolos:

#### Transformación por choque de calor

- Agregar a 10 $\mu$ L de la reacción de ligación a 200  $\mu$ l de bacterias DH5 $\alpha$  competentes
- Dejar en el hielo durante 15 minutos
- Poner a 42 $^{\circ}$ C durante 1 minuto
- Transferir a hielo y dejar durante 5 minutos.
- Agregar 800  $\mu$ l de LB
- Dejar en la incubadora durante 1 hora a 37 $^{\circ}$ C con agitación vigorosa
- Centrifugar a 12 000 rpm durante 1 minuto.
- Quitar el sobrenadante por decantación
- Vortexear hasta que la pastilla de bacterias quede resuspendida
- Plaquear las bacterias en cajas de LB con el antibiótico.
- Dejar en la incubadora a 37 $^{\circ}$ C durante toda la noche.

#### Transformación por electroporación

- En una cubeta para electroporación (0.1 cm) previamente enfriada agregar: 50  $\mu$ l de células electrocompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$  y 1  $\mu$ l de la reacción de ligación (evitando las burbujas)
- Dar un pulso a:

C ( $\mu$ F)	25
PC	200
Volt	1800



- Agregar 800 µl de LB y mezclar
- Incubar 1 hora a 37 °C con agitación vigorosa
- Centrifugar a 12 000 rpm durante 1 minuto
- Quitar el sobrenadante por decantación
- Vortexear hasta que la pastilla de bacterias quede resuspendida
- Plaquear las bacterias en cajas de LB con el antibiótico ampicilina.
- Dejar en la incubadora a 37 °C durante toda la noche

#### **6.1.10. Minipreps**

Una vez obtenidas las colonias derivadas de la transformación, se realizaban minipreps a éstas colonias, mediante el siguiente protocolo:

- Se inoculan cada una de las colonias en 3 ml de LB, con una concentración de 100µg/ml de antibiótico (ampicilina)
- Dejar toda la noche en la incubadora a 37°C en agitación vigorosa.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto los 3 mL de LB inoculado y remover el sobrenadante.
- Resuspender la pastilla de las bacterias en 110 µl del buffer P1 (anexo III) y vortexear hasta que la pastilla se disuelva.
- Agregar 100 µl de buffer de lisis (anexo IV) recién preparado y mezclar suavemente.
- Añadir 120 µl del buffer P3 (anexo V) y mezclar. Incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Agregar 200 µl de isopropanol (2-propanol) para precipitar el DNA del sobrenadante. Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto. Quitar el isopropanol
- Añadir 500 µl de etanol al 70% y mezclar. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 min.

- Quitar el etanol. Adicionalmente centrifugar durante 1 minuto y quitar el etanol restante
- Dejar el tubo destapado durante 10 minutos aproximadamente para secar el DNA.
- Disolver en 20  $\mu$ l de agua miliQ.

\* Para enviar a secuenciar, los minipreps se realizarón con el Kit de QUIAGEN.

#### **6.1.11. Maxipreps**

En la mayoría de los casos, se realizarón maxipreps de las colonias positivas, ya que se requiere suficiente cantidad de DNA para una ligación eficiente. Los maxipreps se realizarón mediante los kits de las compañías Zymo Research o QIAGEN, siguiendo los instructivos respectivos.

### **6.2. Cultivo celular**

Una vez obtenida la construcción se procedió a evaluar su funcionamiento en células HEK293, por lo cual se realizó el cultivo celular.

#### **6.2.1. Descongelamiento de las células**

Como primer paso, se descongeló la línea celular HEK293, para lo cual se siguió el siguiente protocolo:

- Colocar el vial en baño de agua a 37 °C y esperar a que se descongele.
- Trasferir a un tubo falcon de 15 ml y agregar 5 ml del medio D-MEM (anexo VI) suplementado con suero fetal bovino (10%) y GPS 1X (glutamina, penicilina y estreptomycin) y piruvato de sodio (1%).
- Centrifugar a 1000 RPM durante 5 min y aspirar el medio.
- Resuspender las células en 10 ml de medio suplementado.
- Sembrar en cajas incubando a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **6.2.2. Subcultivo Celular**

Posteriormente esta línea celular se mantuvo mediante subcultivos frecuentes cada 2 o 3 días dependiendo de su confluencia. Este subcultivo se realizó mediante el siguiente protocolo:

- Aspirar el medio y lavar con PBS 1X (anexo VII) dos veces.
- Agregar 1 ml de tripsina 0.25% (anexo VIII) e incubar 3 minutos a 37 °C.
- Añadir 8 ml de medio D-MEM suplementado, previamente calentado a 37 °C.
- Trasferir el disgregado a un tubo y centrifugar a 1 000 RPM durante 5 min.
- Quitar el medio y resuspender las células en 5ml de medio D-MEM suplementado.
- Contar el número de células en la cámara de Neubauer.
- Sembrar en cajas la siguiente proporción de células: para cajas de 10 cm sembrar 3 millones de células con 7 ml de medio y para cajas de 35 mm sembrar 200 000 células con 2 ml de medio.

### **6.3. Transfecciones transitorias**

Una vez obtenido el vector se transfectó a células mediante dos métodos: mediante  $\text{CaCl}_2$  o por medio de lipofectamina, utilizando los siguientes protocolos:

#### **6.3.1. Trasfección transitoria por $\text{CaCl}_2$**

- Un día antes sembrar el número correspondiente de células, para obtener 50% de confluencia el día a transfectar.
- Reducir el volumen del medio en las cajas a un tercio.
- En tubos eppendorf de 1.5 ml, preparar los tubos usando las siguientes proporciones con sus respectivas instrucciones:

Para cajas de 35 mm		
	1 Plásmido	Co-transfección
Agua grado cultivo	38.75 $\mu$ l	X
DNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	5 $\mu$ g	3 $\mu$ g (por plásmido)
Mezclar		
CaCl <sub>2</sub> 2M	6.25 $\mu$ l	6.25 $\mu$ l
Resuspender dos veces e incubar 10 minutos a temperatura ambiente		
HBS 2X	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Volumen Final	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Resuspender una vez e incubar inmediatamente 2 minutos a 37°C		

- Agregar la mezcla por goteo al cultivo (tocando delicadamente la superficie), luego agitar suavemente para dispersar la mezcla.
- Incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 12 a 17 horas. Posteriormente cambiar el medio

### 6.3.2. Trasfección con lipofectamina

- Un día antes de la trasfección, sembrar las células en cajas de 35 mm (para que estén de 80-90% de confluencia para el día de la trasfección).
- Para cada caja se necesitan preparar dos tubos:

Tubo 1: Diluir de 2-3  $\mu$ g de plásmido (de una solución de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l) en 200  $\mu$ l de DMEM sin suero y sin antibióticos con 1% de Glutamax y piruvato.

Tubo 2: Diluir de 6-3  $\mu$ l de lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 200  $\mu$ l de DMEM sin suero y sin antibióticos

- Combinar los dos tubos y mezclar suavemente (sin vortexear)
- Dejar incubar a temperatura ambiente durante 15-25 minutos.
- Cambiar el medio de las células con 2 ml de DMEM sin suero y sin antibióticos.
- A cada tubo que contiene el plásmido con la lipofectamina agregar 600  $\mu$ l de DMEM sin antibióticos (el volumen final para cada tubo es 1ml)

- Agregar el contenido del tubo a las células.
- Incubar durante 4-6 hrs en la incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.
- Después de transcurrido el tiempo de incubación agregar 1 ml de DMEM suplementado (10% de FBS, GPS y piruvato) a cada caja. Si se observa toxicidad quitar el medio de transfección y agregar 3 ml de medio DMEM suplementado.
- Reemplazar con medio completo a las 18-24 horas después de la transfección.
- La fluorescencia es visible después de 24 horas realizada la transfección.

#### 6.4. **Microscopia**

La captura de imágenes se realizó mediante el microscopio Axio Observer Z1 (Zeiss, Alemania), utilizando los filtros Alexa Fluor 489 (excitación de 450-490 y emisión de 515-565) y Cherry (excitación a 575 y emisión a 610). El programa para unir las imágenes fue Image J (ROI manager).

#### 6.5. **Obtención de extractos proteínicos para Western Blot**

Para la realización del Western blot se utilizó el siguiente protocolo para extraer las proteínas, de las células previamente transfectadas:

- Hacer la lisis celular a las 48 horas posteriores a la transfección, para permitir una mayor producción de la proteína a detectar, para lo cual se despegan las células con un raspador (sin retirar el medio de cultivo, ya que en él puede haber células flotando que contengan la proteína de interés), transfiriéndolas a un tubo eppendorf de 1.5 ml. En adelante se realiza todo en frío, para evitar la degradación de las proteínas.
- Se centrifugan por 5 minutos a 358 g a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 1 ml de PBS (anexo VII) frío.
- Centrifugar por 5 minutos a 358 g a 4°C, para eliminar restos de medio de cultivo.

- Eliminar el sobrenadante y nuevamente resuspender las células en 1 ml de PBS frío. Centrifugar por 5 minutos a 358 g a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 50µl de buffer de lisis (anexo XI) e incubar 20 minutos en hielo. Trascorridos los 20 minutos, sonicar con 3 pulsos de 20 segundos a amplitud 1 para fragmentar las estructuras celulares no lisadas por el buffer, sobre todo el DNA.
- Centrifugar 10 minutos a 17,530 g a 4°C, recuperar el sobrenadante y cuantificar la cantidad de proteína (µg/µl).

## 6.6. Western Blot

### a) Electroforesis en gel desnaturizante de acrilamida (SDS-PAGE).

El porcentaje del gel separador está dado por el tamaño de la proteína, en este caso se utilizó un gel 10% para el western blot, siguiendo el siguiente protocolo:

- Mezclar las soluciones para el gel separador (anexo XII) de acuerdo a las proporciones indicadas y verter la mezcla al cassette para geles de poliacrilamida.
- Agregar 500 µl de alcohol isobutílico sobre el gel, para alinearlos, y dejar polimerizar
- Una vez polimerizado el gel, drenar el alcohol isobutílico, y preparar ahora el gel concentrador de acuerdo a las proporciones indicadas (anexo XII).
- Verter el gel concentrador poco a poco sobre el gel separador y colocar el peine. Una vez polimerizado quitar el peine y eliminar los residuos de los pozos con papel filtro.
- Preparar las muestras y el marcador de peso molecular de proteínas, mezclándolas con buffer de carga (anexo XIII). Es recomendable cargar 30 µg por muestra de proteína, para una mejor detección.
- Ya preparadas las muestras, se incuban por 3 minutos a 95°C.
- Llenar la cámara de electroforesis con buffer de corrida (anexo XIV).

- Cargar las muestras y el marcador de proteínas (Page Ruler Fermentas) en el gel. Los carriles libres de muestra deben ser cargados con buffer de carga, y todos los carriles deben tener el mismo volumen.
- Correr el gel a 150 V, hasta que el frente de corrida, indicado por el azul de bromofenol del buffer de carga llegue al final del gel. Toma aproximadamente 2 horas.

#### **b) Transferencia de proteínas de gel de poliacrilamida a membrana de PVDF**

- Cortar la membrana del tamaño exacto del gel y pre-humedecerla en metanol al 100% para activarla (desde este momento debe cuidarse que la membrana siempre se mantenga húmeda).
- Prehumerar esponjas y papeles Whatman en buffer de transferencia (anexo XV) frío, a saturación. De la misma manera, equilibrar el gel y la membrana activada en buffer de transferencia frío.
- Armar un sándwich dentro de buffer de transferencia de la siguiente manera: esponja, 2 papeles Whatman, gel de poliacrilamida, membrana de PVDF, 2 papeles Whatman, esponja.
- Presionar el sándwich de manera que se eliminen las burbujas formadas y colocar en la cámara de transferencia. El gel debe quedar orientado hacia el ánodo y la membrana de PVDF hacia el cátodo.
- Llenar la cámara de transferencia con buffer de transferencia y correr durante 90 minutos a 100 V a temperatura ambiente.

\*Para corroborar la correcta transferencia de proteínas, puede teñirse la membrana con rojo de Ponceau al 0.1% durante 5 minutos o bloquearse directamente con leche sin grasa al 5%.

\*Desde el momento en que termina la transferencia, la membrana tiene una polaridad, ya que las proteínas transferidas son absorbidas por la membrana del lado que estuvo en contacto con el gel; por ello, se corta el extremo superior

derecho de la membrana, así quedará expuesto el lado que estuvo en contacto con el gel.

### **c) Detección de proteínas por medio de Western Blot (Revelado en Odyssey)**

- Al terminar la transferencia de proteínas a la membrana de PVDF, remojar la membrana en PBS durante varios minutos.
- Bloquear la membrana con leche sin grasa al 5%, disuelta en TBST (anexo XVI) por una hora a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C.
- Enjuagar 4 veces, por 10 minutos en TBST, en agitación suave.
- Diluir el anticuerpo primario en TBST, e incubar la membrana con el anticuerpo primario a temperatura ambiente y en agitación suave
  - \*En este caso se utilizó un anticuerpo policlonal de cabra antiGFP diluido 1:500 y se incubó durante una hora
- Lavar la membrana con TBST, 4 veces por 5 minutos, en agitación suave.
- Diluir el anticuerpo secundario correspondiente en TBST
  - \*En éste caso se utilizó el anti-Cabra diluido 1:15000
- Incubar la membrana, protegiéndola de la luz, 45 minutos, en agitación suave. Dejar la membrana incubándose por periodos de más de una hora no se recomienda, ya que incrementa el ruido de fondo y la inespecificidad.
- Lavar la membrana 4 veces por 5 minutos con TBST, en agitación suave y protegiendo a la membrana de la luz.
- Enjuagar la membrana con PBS para eliminar el TBST residual, y escanear en el Odyssey en el canal correspondiente, de acuerdo al fluoróforo acoplado al anticuerpo secundario utilizado
  - \*Se utilizó el canal 700 nm para visualizar el anticuerpo secundario



## 7. RESULTADOS

### 7.1. Péptido T2A

En este proyecto se utilizó la secuencia 2A para poder expresar dos genes (el sensor de calcio Case12 y la proteína reportera mCherry) de manera constante, lo cual permite conocer la expresión del sensor gracias a la proteína mCherry.

Una de las características más importantes para que funcionen adecuadamente las secuencias 2A, es que los dos genes que flanquean al 2A deben estar en el mismo marco de lectura para permitir su expresión [42]. Por lo tanto, la estrategia para construir el vector fue unir en el mismo marco de lectura el sensor de calcio (Case12), la secuencia 2A y el gen que codifica para el reportero (mCherry).

Se utilizó el plásmido *pSCP in puc19 eco sbf* (Figura 19a) que contiene las secuencias tipo 2A: F2A, T2A y P2A (derivada del virus de la fiebre aftosa, del virus de *Thosea asigna* y del virus porcino teschovirus-1, respectivamente).

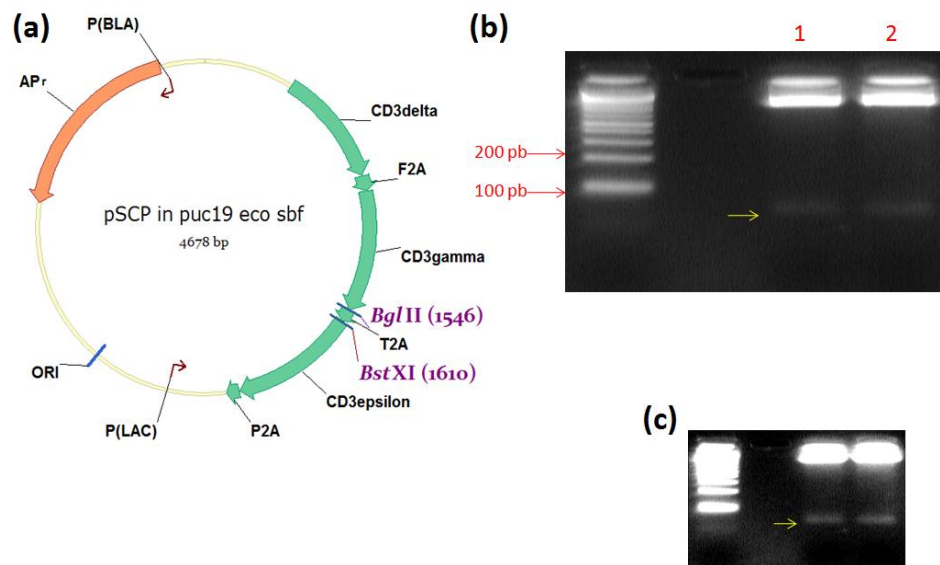
Lo primero que se realizó fue crear más sitios de restricción alrededor de una secuencia 2A, debido a que la mayoría de los sitios cortaban dentro de la secuencia 2A o se encontraban muy lejos (30-50 pb); además eran sitios de restricción que requerían enzimas con las cuales no se contaban en el laboratorio. Ésto permitiría tener más opciones de estrategias que facilitarían el posicionamiento en el mismo ORF de la secuencia 2A con los demás genes.

Se escogió la secuencia T2A debido a que para escindirlo se contaba con las enzimas *BglII*<sup>10</sup> y *BstXI*<sup>11</sup>; también se determinó utilizar estas dos, debido a la eficiencia que tienen para cortar en el mismo buffer. Por lo tanto, el plásmido *pSCP in puc19 eco sbf* se cortó con éstas enzimas, lo cual escindió el T2A con un peso de 64 pb, tal como lo muestra el gel de la Figura 19b y 19c.

---

<sup>10</sup> *BglII* corta dejando extremos cohesivos

<sup>11</sup> *BstXI* corta dejando extremos cohesivos

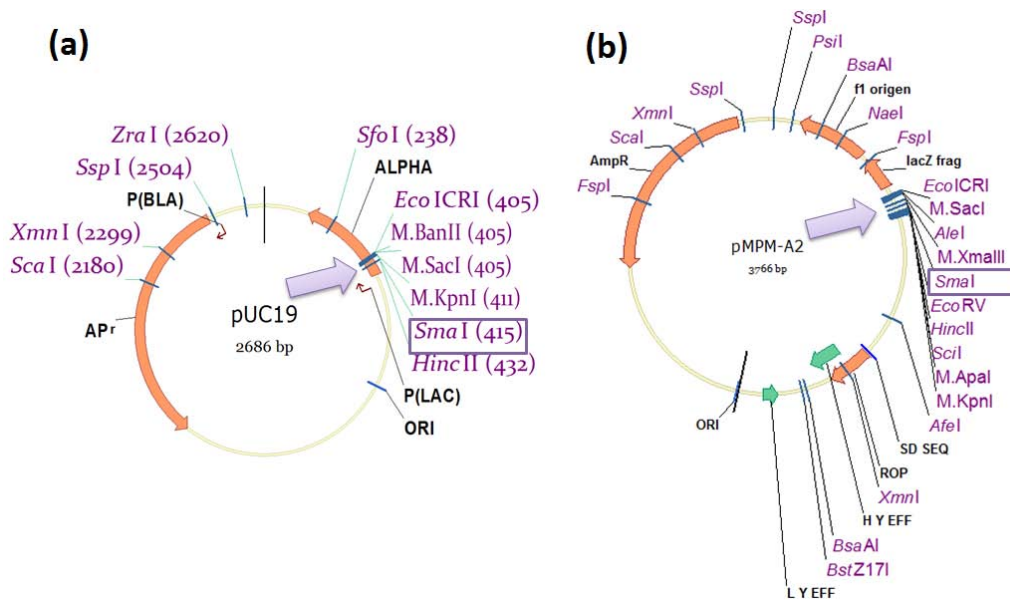


**Figura 19.** a) Mapa del plásmido *pSCP in puc19 eco sbf*, el cual contiene las secuencias F2A, T2A y P2A. Así mismo, se señalan los sitios de restricción de las enzimas *BglIII* y *BstXI*. b) Gel de agarosa al 3% donde se muestra la digestión del plásmido *pSCP in puc19 eco sbf* (carriles 1 y 2), con las enzimas *BglIII* y *BstXI*, del cual se esperaba un fragmento de 64 pb, y que se encuentra indicado por la flecha amarilla. c) Fotografía procesada de la misma figura b, por medio del programa ImageJ, para una mejor visualización de las bandas (flecha amarilla), por medio de una aumento de brillo y mayor contraste.

Posteriormente se insertó el T2A en los plásmidos *pMPM-A2* y *pUC19* (Figura 20) para situar más sitios de restricción alrededor del T2A, los cuales fueron preferencialmente sitios únicos en el plásmido. Esta estrategia permitió tener más opciones para insertar los genes (río arriba o río debajo) en el mismo marco de lectura.

Para insertar el T2A en esa sección, se rellenaron los extremos cohesivos del fragmento T2A aislado previamente (Figura 19b) y se cortaron los plásmidos *pMPM-A2* y *pUC19* con la enzima *SmaI*<sup>12</sup> (Figura 20a y 20b). Por último, se ligó el T2A, ahora con extremos romos, a cada uno de los plásmidos en el sitio.

<sup>12</sup> *SmaI* corta dejando extremos romos

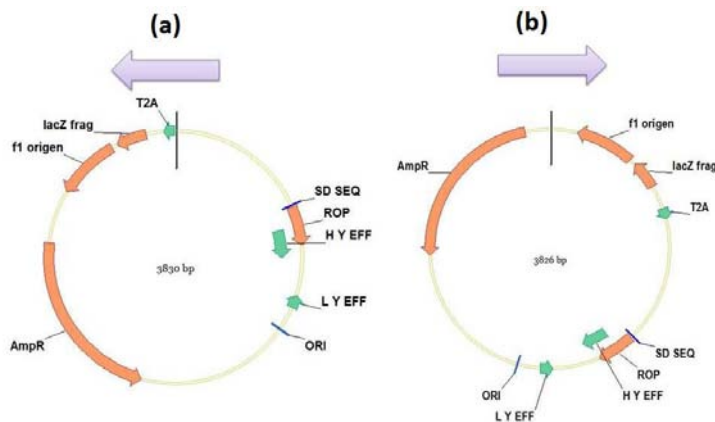


**Figura 20.** Mapa de los plásmidos: a) *pMPPM-A2* y b) *pUC19*. En ellos se muestran los sitios de restricción donde las enzimas cortan, dejando extremos romos y son sitios únicos en el plásmido. Con una flecha morada se marca la región donde se encuentra la mayor acumulación de estos sitios. En cuadro se denota el sitio *SmaI* que se utilizó para linearizar los plásmidos.

Cabe mencionar, que debido a la ligación con extremos romos, se podía esperar que el T2A se insertara 5' → 3' o viceversa. Por ejemplo, para el caso de *pMPPM-A2* existían dos posibilidades de inserción (Figura 21).

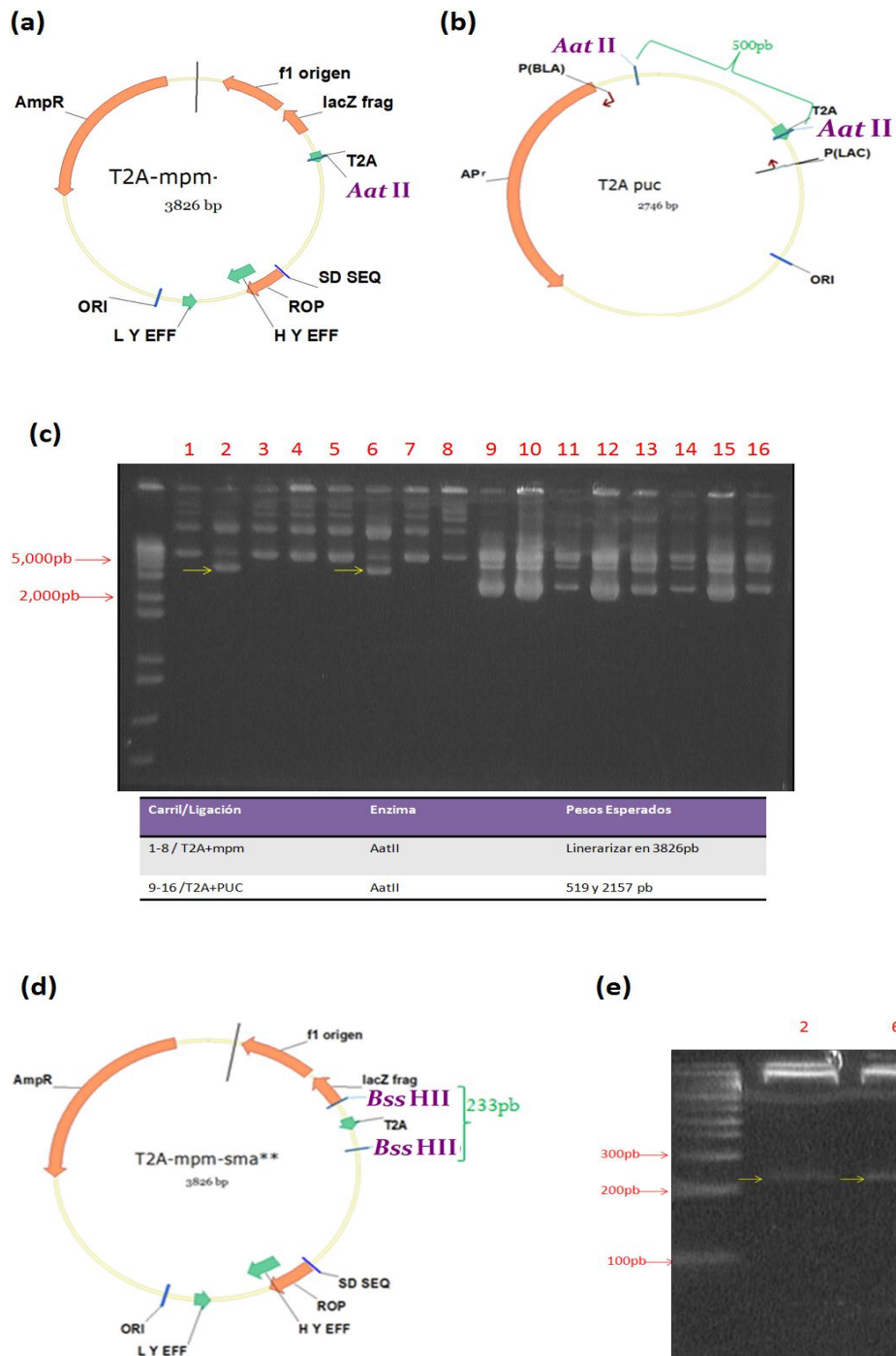
Para verificar la inserción del T2A se realizó un *screening* de las colonias transformadas con la enzima *AatII*, la cual se utilizó porque corta únicamente dentro de la secuencia T2A, por lo tanto el plásmido sería cortado únicamente si está presente la secuencia T2A (Figura 22 a y b). En total se analizaron 16 colonias para *pMPPM-A2* y 16 más para *pUC19* (datos no mostrados). Tal como muestran las clonaciones *in silico* de la Figura 22a y 22b, el resultado de una ligación positiva debería ser una linearización de 3826 pb para *pMPPM-A2*, mientras que para *pUC19* debería escindir dos fragmentos, uno de 519 pb y otro de 2157 pb. De todas colonias analizadas, solamente las colonias 2 y 6 (*pMPPM-A2*) contenían una banda de aproximadamente 3500 pb, siendo éstas por lo tanto positivas (Figura 22c, flechas amarillas). Sin embargo, ambas muestras contenían un barrido (probablemente

debido a DNA súper-enrollado no digerido), por lo tanto, se realizó otro *screening* en las colonias 2 y 6 utilizando la enzima *Paul* (*BssHII*). Con este análisis se esperaba una banda de 233 pb (Figura 22d), la cual se vió en ambas colonias (Figura 22e, flechas amarillas).



**Figura 21.** Clonación *in silico* de las posibles opciones de inserción del T2A en el plásmido *pMPPM-A2*, ya sea 5'→3' (a) o visceversa (b).

Estos resultados demostraron que el T2A había sido integrado en las colonias 2 y 6 del plásmido *pMPPM-A2* específicamente. Posteriormente para determinar la dirección del inserto T2A, se envió a secuenciar el fragmento del plásmido que contenía el T2A. Los resultados mostraron que la colonia 6 contenía mutaciones en ésta secuencia por lo que se descartó y la colonia 2 resulto contener el T2A con la dirección ilustrada en la Figura 21a, a este plásmido se le denominó *mpm con T2A*.



**Figura 22.** a) Clonación *in silico* del plásmido **pMPM2** con el T2A inserto. b) Clonación *in silico* del plásmido **PUC19** con el T2A inserto. En ambos casos se muestra el sitio *AatII* utilizado para la búsqueda del T2A. c) Gel de agarosa 1%, en el cual se muestra el *screening* con la enzima *AatII*; así mismo se muestran los pesos esperados. d) Clonación *in silico* de la inserción del T2A en el plásmido **pMPM2**, donde señala el sitio *Paul*. E) Gel de agarosa al 3%, en el cual se muestra la digestión de las muestras 2 y 6 con la enzima *Paul*, la cual debiera visualizar una banda de 233 pb (si eran positivas), las cuales se denotan por las flechas amarillas.

## 7.2. Case12

Para medir y visualizar *in vivo* las fluctuaciones del calcio intracelular, se requería un sensor GES que tuviera alta afinidad por el calcio (ya que se necesitaba que pudiese identificar una concentración mínima de 100 nM por ejemplo, si la construcción fuese dirigida para expresarse en el RE, se requeriría un indicador de baja afinidad), con alto rango dinámico, rápida cinética de respuesta y eficiente a 37° C. Por lo tanto se determinó utilizar el sensor Case12 [40].

Dentro de la construcción, el sensor se colocó río arriba del 2A, ya que se sabe, el gen río arriba del 2A suele tener ligeramente más expresión que el gen río abajo [42], permitiendo una mejor visualización de la fluorescencia. Además, se tomó en cuenta que debía estar en el mismo marco de lectura con la secuencia 2A.

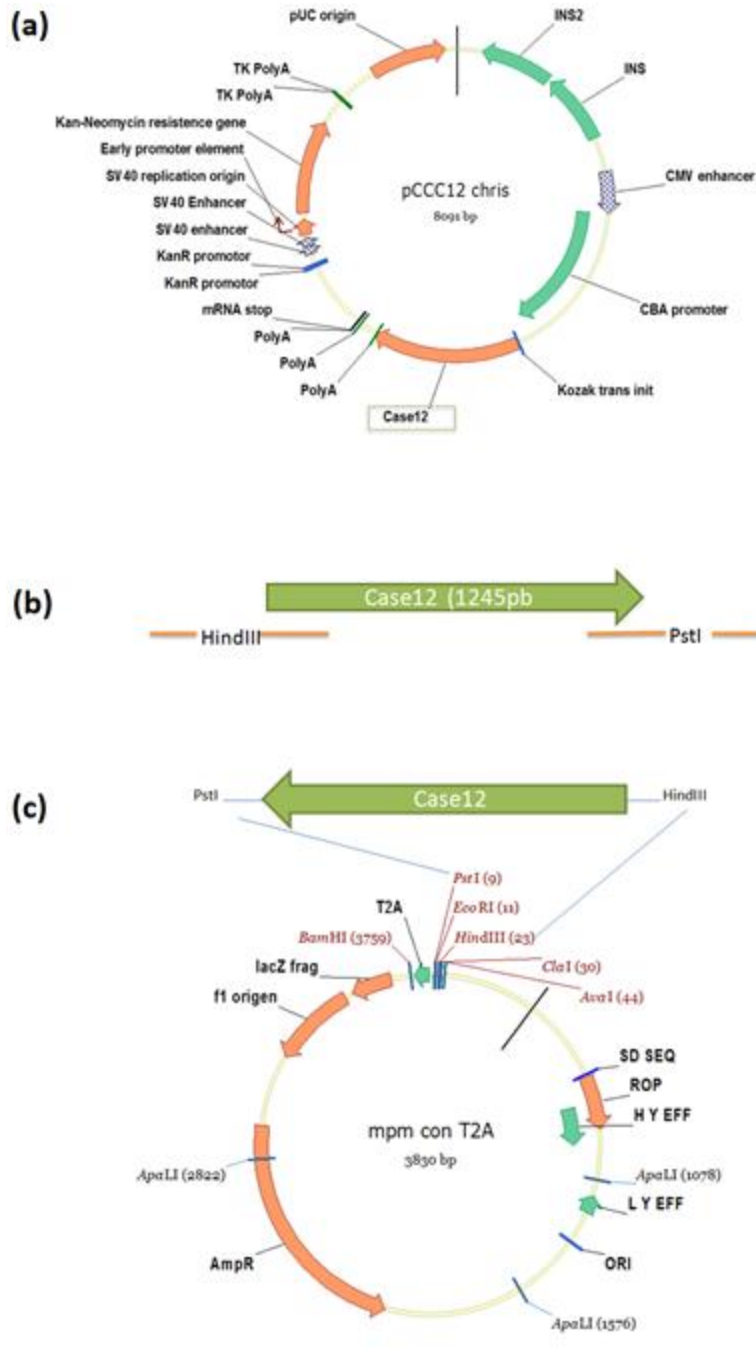
Para lograr dicha construcción se utilizó la secuencia del Case12 contenida en el plásmido **pCCC12 chris** (Figura 23a), sin embargo dicha secuencia no contenía sitios de restricción a su alrededor para permitir insertarla en el plásmido **mpm con T2A** y que se obtuviera el Case12 y el T2A en el mismo marco de lectura. Por otro lado, escindir el T2A de su plásmido e insertarlo en el **pCC12 chris** tampoco permitía un único marco de lectura ni cortando y luego rasurando los extremos se obtenía éste marco único.

Por lo tanto, para que el T2A y el sensor de Case12 estuviesen en el mismo marco de lectura, se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos para amplificar el Case12; esperando un producto de 1245 pb por PCR. A éstos oligonucleótidos se les adicionaron los sitios de restricción *HindIII*<sup>13</sup> y *PstI*<sup>14</sup> (Figura 23b), tomando en cuenta los pares de bases necesarios para que al ser insertado el Case12 en los sitios *HindIII* y *PstI* del plásmido **mpm con T2A** se obtuviera un único marco de lectura para el T2A y el Case12 (Figura 23c). Se eligieron los sitios *HindIII* y *PstI* debido a que eran sitios únicos dentro del plásmido, se encontraban río arriba de la secuencia T2A y además cortan en el mismo buffer.

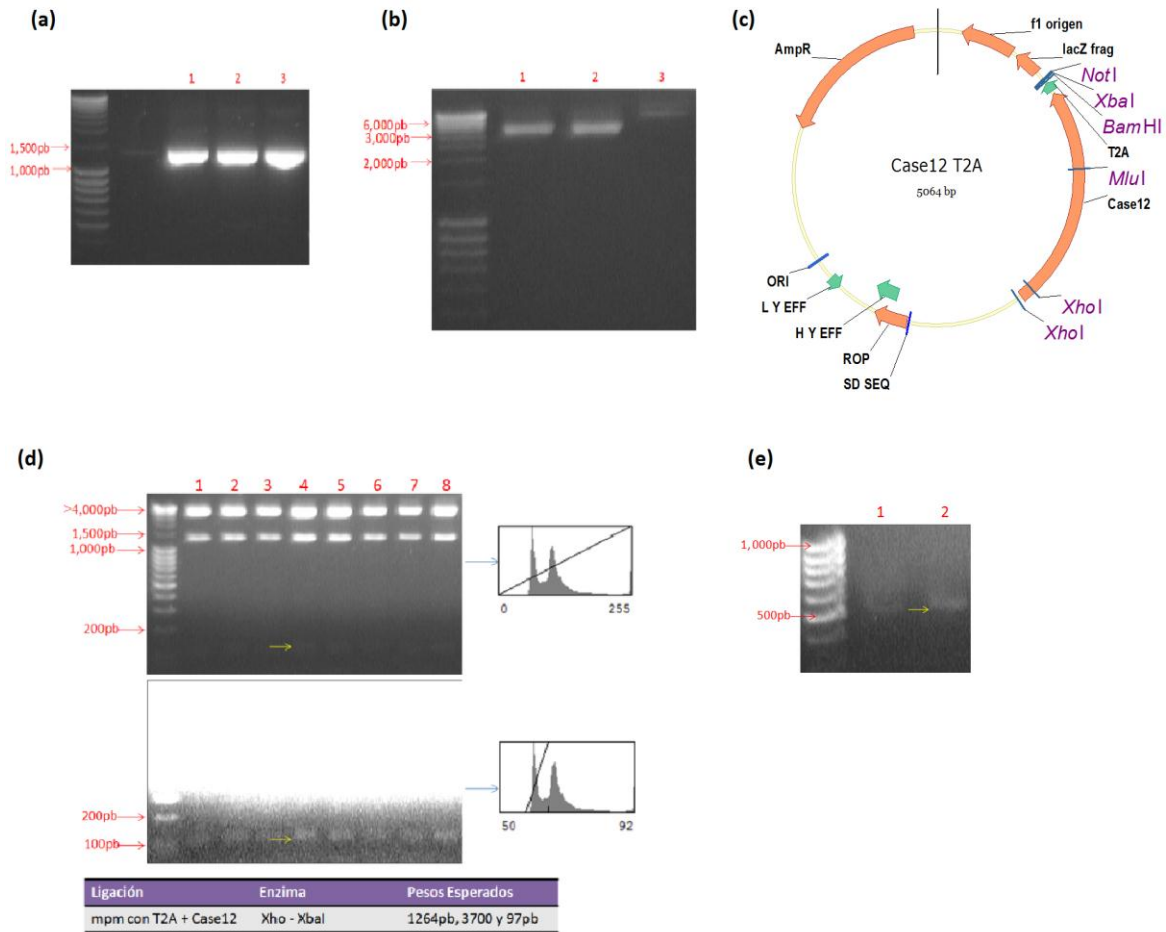
---

<sup>13</sup> *HindIII* corta dejando extremos cohesivos

<sup>14</sup> *PstI* corta dejando extremos cohesivos



**Figura 23. Estrategia para poner en el mismo marco de lectura al sensor Case12 y al T2A.** a) Mapa del plásmido *pCCC12 chris* que contiene el sensor Case12. b) Esquema de la estrategia de amplificación por PCR del Case12, donde se denota con una línea color naranja los oligonucleótidos flanqueando al Case12, el oligonucleótido *forward* adicionando sitio *HindIII* y el oligonucleótido *revers* adicionando un sitio *PstI*, a la secuencia Case12. c) Estrategia general de inserción del producto de PCR (que contiene el Case12) en el plásmido *mpm con T2A*.



**Figura 24.** a) Producto de la amplificación por PCR del sensor Case12 con un peso de 1248 pb, se realizó en cada carril la amplificación con una Tm de 50, 55 y 60 °C. b) Plásmido *mpm con T2A*, cortado con las enzimas de restricción *HindIII* y *PstI* (carriles 1 y 2) y sin ninguna digestión (carril 3). c) Mapa de la clonación *in silico* de la unión del Case12 en el plásmido *mpm con T2A*, donde se muestran los sitios *XbaI*, *BamHI*, *MluI* y *XhoI*. d) Se muestra un gel de agarosa al 1% con el *screening* de 8 de las 16 colonias obtenidas en la ligación Case12 con el plásmido *mpm con T2A*. Además, se muestran las enzimas y los pesos esperados. Ambas fotografías representan el mismo gel sin embargo, la fotografía de abajo fue procesada por medio del programa ImageJ, para mejorar la visualización de la banda más pequeña. Como lo indican los diagramas de la derecha, la intensidad de luz y el contraste fueron modificados. A modo de ejemplo, la flecha amarilla señala una banda exactamente en el mismo lugar de ambas fotos. e) Gel de agarosa al 2% donde se muestra el análisis de las colonias 1 y 2 de la ligación Case12 con el plásmido *mpm con T2A* en el cual, se observa un fragmento de aproximadamente el peso esperado (520 pb) en ambas colonias, aunque ligeramente más visible en la colonia 2 (flecha amarilla).

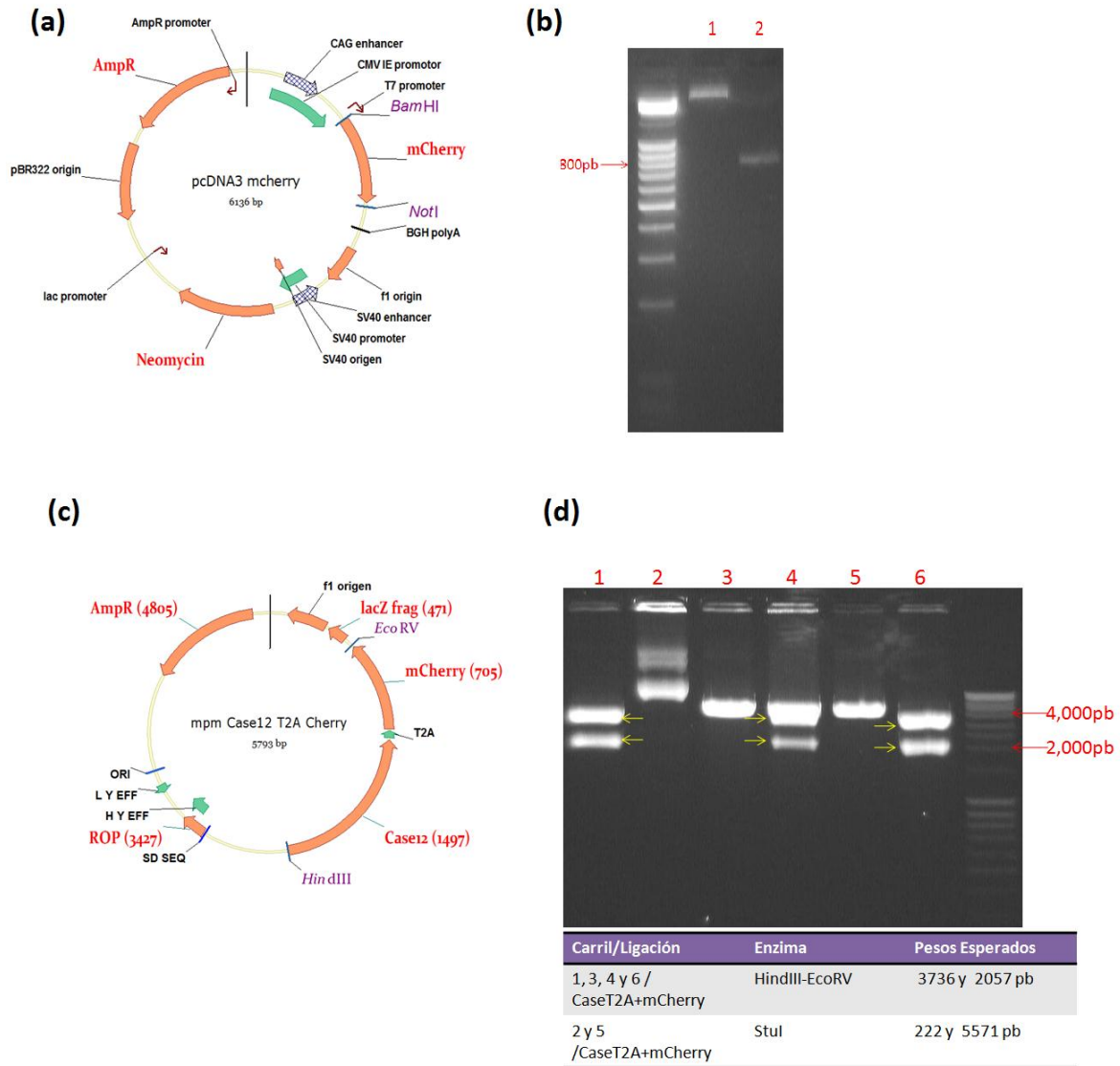


Por medio de los oligonucleótidos *forward* y *reverse* (Figura 24a) se amplificó el Case12 y luego se digirió con éstas enzimas *HindIII* y *PstI* para dejar los extremos cohesivos; además se digirió el plásmido ***mpm con T2A*** con las enzimas antes mencionadas (Figura 24b). Una vez unidos el Case12 y el ***mpm con T2A***, se realizó un *screening* a 16 colonias candidatas con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. En éstas colonias se insertó el Case12 ya que se obtuvieron 3 fragmentos (Figura 24c): uno de 1264 pb, otro de 3700 pb y un pequeño fragmento de 97 pb. Como se muestra en la figura 24d, las 16 colonias analizadas contenían el inserto Case 12. Para corroborar este dato, se realizó una digestión de dos colonias (colonia 1 y 2), con las enzimas *MluI* y *BamHI* donde se observó un fragmento de 520 pb (Figura 24e), el cual confirmaba la inserción del Case12. Por lo tanto, este plásmido contenido en la colonia 2, se le denominó ***Case12 T2A*** (Figura 25a)

### 7.3. mCherry

Como reportero del Case12 se utilizó la proteína mCherry porque: 1) esta proteína es fluorescente, y por lo tanto permite visualizar *in vivo* su acumulación, 2) tiene buena fotoestabilidad, 3) es una proteína monomérica, 4) tiene su espectro visible en rojo y es una gran ventaja, ya que longitudes de onda largas generan menos fototoxicidad [22], aunado con el hecho de que la detección de la señal fluorescente del sensor y del mCherry, sería en dos distintos canales de emisión (Figura 18) [25].

Aunque existen otras proteínas con características parecidas, por ejemplo mPlum que tiene una limitada fluorescencia pero excelente fotoestabilidad [22], se determinó utilizar mCherry debido a que es una proteína equilibrada en cuanto a su fluorescencia y fotoestabilidad.



**Figura 25.** a) Mapa del plásmido *pcDNA3 mCherry*, el cual contiene la secuencia que codifica para la proteína mCherry. Además se indican los sitios *BamHI* y *NotI* los cuales se utilizarán para escindir el fragmento mCherry. b) Gel de agarosa al 0.7%, donde se muestran los fragmentos de la digestión con *BamHI* y *NotI*: carril 1, purificado del plásmido *Case12 T2A* cortado con ambas enzimas; carril 2, secuencia mCherry (748pb) escindida del plásmido *pcDNA3 mCherry* por las mismas enzimas. c) Gel de Agarosa al 1%, en el cual se muestra el *screening* de 6 colonias obtenidas en la ligación que une el mCherry al plásmido *Case12 T2A*. Se indican en la figura las enzimas utilizadas y pesos esperados. d) Mapa de la construcción *in silico* del plásmido denominado *mpm Case12 T2A Cherry*. Se indican los sitios *EcoRV*, *HindIII*, *StuI*.

Hasta este punto de la construcción, se tenían dos elementos juntos: el T2A y río arriba el sensor Case12, en el plásmido **Case12 T2A** (Figura 24c). Por lo tanto, se pretendía que mCherry estuviese río abajo del T2A en el mismo ORF.

Para obtener esto, se utilizaron dos sitios compartidos por el plásmido **Case12 T2A** (Figura 24c) y por el plásmido **pcDNA3 mcherry** (Figura 25a), que permitía la inserción del mCherry en la dirección correcta río abajo del T2A, y lo colocaba en el mismo marco de lectura que el Case12 y el T2A. Estos sitios eran *BamHI* y *NotI*.

Por lo tanto, se digirieron los plásmidos **Case12 T2A** y **pcDNA3 mcherry** con las enzimas *BamHI* y *NotI*, lo que resultó en el linearizado del plásmido **Case12 T2A** (5052 pb) y la liberación de un fragmento de 748 pb que contenían a mCherry (Figura 25b).

Una vez realizada la ligación del inserto mCherry al vector **Case12 T2A**, se procedió a realizar un *screening* de las colonias transformadas con la misma. Se tomaron 6 colonias y cada una se digirió con *HindIII* y *EcoRV*, o simplemente con la enzima *StuI*. Los resultados mostraron que las colonias 1, 4 y 6 (Figura 25c) eran positivas, ya que contenían el bandeo esperado debido al mCherry inserto. A este plásmido que contenía las secuencias del Case12, el T2A y el mCherry, se le denominó **mpm Case12 T2A Cherry** (Figura 25d).

#### 7.4. PoliA

La secuencia AAUAAA es una señal de reconocimiento para que al mRNA se le añadan residuos de ácido poliadenílico (poliA), este elemento ayuda a evitar que el transcrito de mRNA sea degradado, aumentando su vida media en el citosol, de modo que se puede sintetizar mayor cantidad de proteína [66]. Es ampliamente utilizado para evitar que los transcritos de vectores transfectados sean degradados. Por lo tanto, es un elemento que sería indispensable para una buena expresión del sensor Case12, así como de la proteína mCherry.

Cabe mencionar que para el caso específico de la construcción sólo se requería una secuencia poliA al final de gen mCherry, ya que los péptidos 2A actúan de manera co-

traduccional [42], lo que significa que en nuestro caso, se tendría un solo transcrito con la secuencia Case12-T2A-mCherry; el cual sería protegido mediante la secuencia poliA.

Para insertar el poliA en el plásmido, primero se intentó linearizar el plásmido *mpm Case12 T2A Cherry* (Figura 25d) con una enzima que corta dejando extremos romos (en éste caso *EcoRV*), luego se amplificó el poliA por PCR y se insertó este producto en el plásmido. Sin embargo no se obtuvieron colonias positivas de tal estrategia. Probablemente, debido a que el inserto no está fosforilado porque es un producto de PCR, la mayoría de los plásmidos linearizados con extremos romos se recircularizan.

Por lo tanto, se utilizó el plásmido denominado *pCloneJet*<sup>15</sup>, el cual es un sistema de clonación altamente eficiente de productos de PCR. Este vector contiene un gen que codifica una enzima letal para la célula huésped. Al insertar una secuencia en medio del gen tóxico de *pClonejet*, pierde su letalidad. Como resultado, solo las células bacterianas con plásmidos recombinados son capaces de formar colonias y los vectores recircularizados que carecen del inserto expresan la enzima letal. Esta selección positiva acelera el proceso de *screening* [67]. Por lo tanto, nos evita tener clonas falsas positivas, que se obtiene cuando se clonan fragmentos de PCR, ya que éste plásmido permite que los extremos del fragmento amplificado por PCR sean fosforilados, resultado de la digestión con enzimas de restricción.

Se sintetizaron oligonucleótidos con los cuales se amplificó el poliA por PCR, adicionando un sitio *EcoRV*<sup>16</sup> y un sitio *NheI*<sup>17</sup> flanqueando al poliA (Figura 26b). Este fragmento amplificado fue insertado en el plásmido *pCloneJet*. Las colonias derivadas de la transformación con ésta ligación (pocas colonias, ya que las bacterias con el plásmido recircularizado mueren) se analizaron tomando en cuenta, que el fragmento amplificado de PCR podría insertarse 5'→3' o viceversa (tal como en el ejemplo de la figura 21). Se utilizaron las enzimas *BglII* y *EcoRV* para realizar el *screening*, donde se esperarían 3 patrones diferentes. En el caso de que no se halla insertado el poliA se esperaría una

---

<sup>15</sup> CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas)

<sup>16</sup> *EcoRV* corta dejando extremos romos

<sup>17</sup> *NheI* corta dejando extremos cohesivos

linearización de 3144 pb. En el caso de que el inserto se encuentre de 5'→3' se esperaría un fragmento de 3369 pb. Finalmente si el inserto se encuentra de 3'→5', se esperaría una banda de 253 pb y otra banda de 3116 pb. Debido a que sería difícil discernir entre el primero y el segundo caso, donde las bandas estarían muy juntas, se buscaron colonias con la última opción.

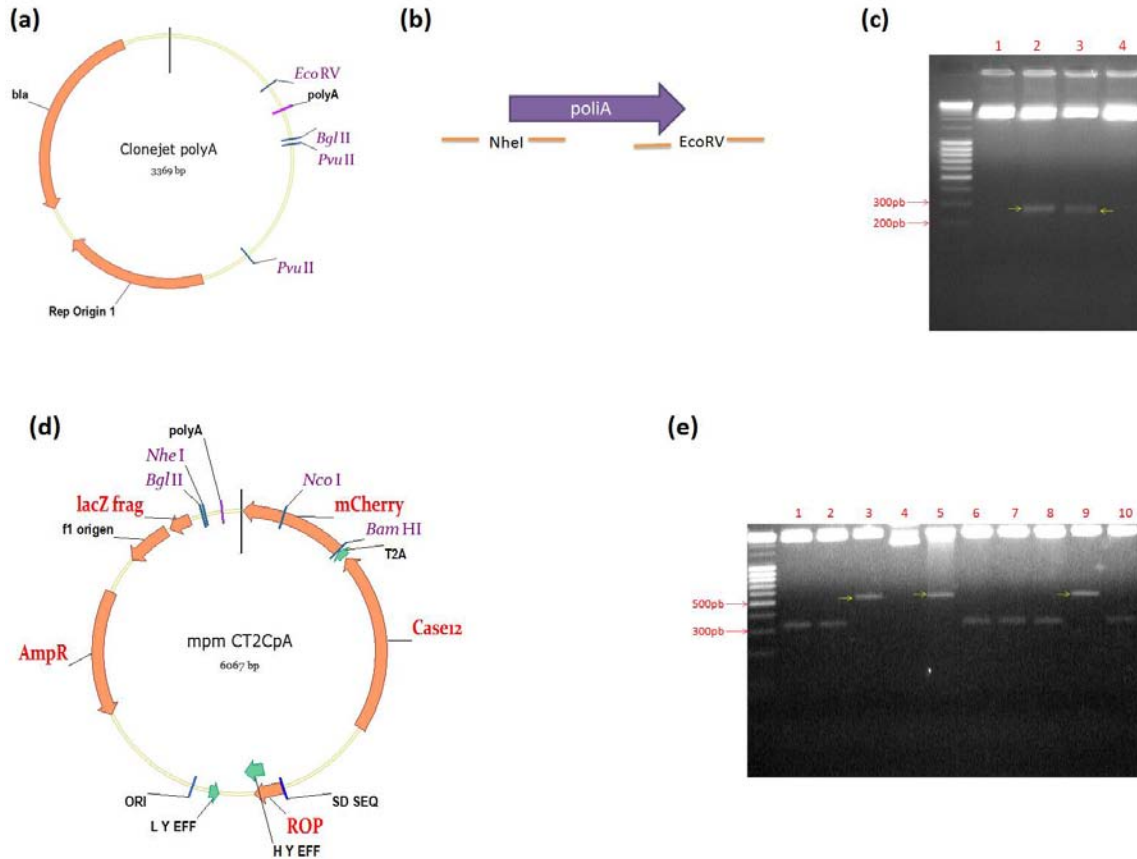
Tal como lo muestra el gel de la figura 26c, se visualizó un fragmento de aproximadamente 250 pb (marcado con flecha amarilla) en las colonias 2 y 3, es decir, estas colonias eran positivas para el último caso. El plásmido obtenido se nombró **CloneJet poliA** (Figura 26a).

La secuencia poliA de este nuevo plásmido se cortó con las enzimas *EcoRV* y *PvuII*<sup>18</sup>, y se insertó en el plásmido **mpm Case12 T2A Cherry**, cortado con la enzima *EcoRV* y desfosforilado (para evitar recircularización). El sitio *EcoRV* (adicionado mediante los *primers*) permitió cortar el poliA del **pCloneJet** dejando extremos romos libres para insertarlo en el plásmido **mpm Case12 T2A Cherry**.

Se realizó un *screening* de las colonias transformadas con las enzimas *NheI* y *NcoI* para encontrar la colonia positiva que contuviera el poliA con la orientación correcta, ya que nuevamente existían 3 posibilidades. Primeramente que no se insertara el T2A, lo que resultaría en la linearización del plásmido **mpm Case12 T2A Cherry** con un peso de 5793 pb. Otra posibilidad es que se insertara el poliA con la dirección correcta (Figura 26d) y por lo tanto la liberación de dos fragmentos, uno de 525 pb y otro de 5509 pb. Finalmente, existía la posibilidad de que se insertara al revés el T2A, con la liberación de un fragmento de 300 pb y otro de 5493 pb. Se analizaron 10 colonias, de las cuales la 3, 5 y 9 contenían la orientación correcta, tal como se demuestra con la figura 26e. A este plásmido contenido en las colonias positivas, se le denominó **mpmCT2CpA** (Figura 26d).

---

<sup>18</sup> *PvuII* corta dejando extremos romos



**Figura 26.** a) Mapa de una de las posibilidades de clonación *in silico* con inserción del poliA en el **pCloneJet**. Se indican los sitios *EcoRV*, *BglIII* y *PvuII*. b) Esquema de la estrategia de amplificación por PCR del poliA, donde se denota con una línea color naranja los *primers* flanqueando al *Case12*; el *primer forward* adicionado con el sitio *NheI* y el *primer reverso* adicionado con el sitio *EcoRV*. c) Gel de agarosa al 3% del screening con *EcoRV* y *BglIII* de las colonias 1-4 obtenidas de la ligación poliA + **pCloneJet**. Las flechas amarillas indican la banda esperada de 253 pb, es decir colonias positivas para la inserción del poliA con la orientación deseada. d) Mapa de la clonación *in silico* denominada **mpmCT2CpA**, donde se muestran los sitios *NheI* y *NcoI*. e) Gel de agarosa al 1% del screening con *NheI* y *NcoI* de 10 colonias, obtenidas de la ligación poliA + **mpm Case12 T2A Cherry**. Las flechas amarillas indican la banda que refiere al fragmento esperado de 525 pb, es decir, colonias que insertaron el poliA y se encuentran en la orientación deseada.

### 7.5. PGKNeo

Uno de los métodos por los cuales se pueden seleccionar las células que han insertado vectores con proteínas fluorescentes, es mediante la selección de las células por fluorescencia. Sin embargo, este método requiere tiempo, materiales para separar las células, entre otros.

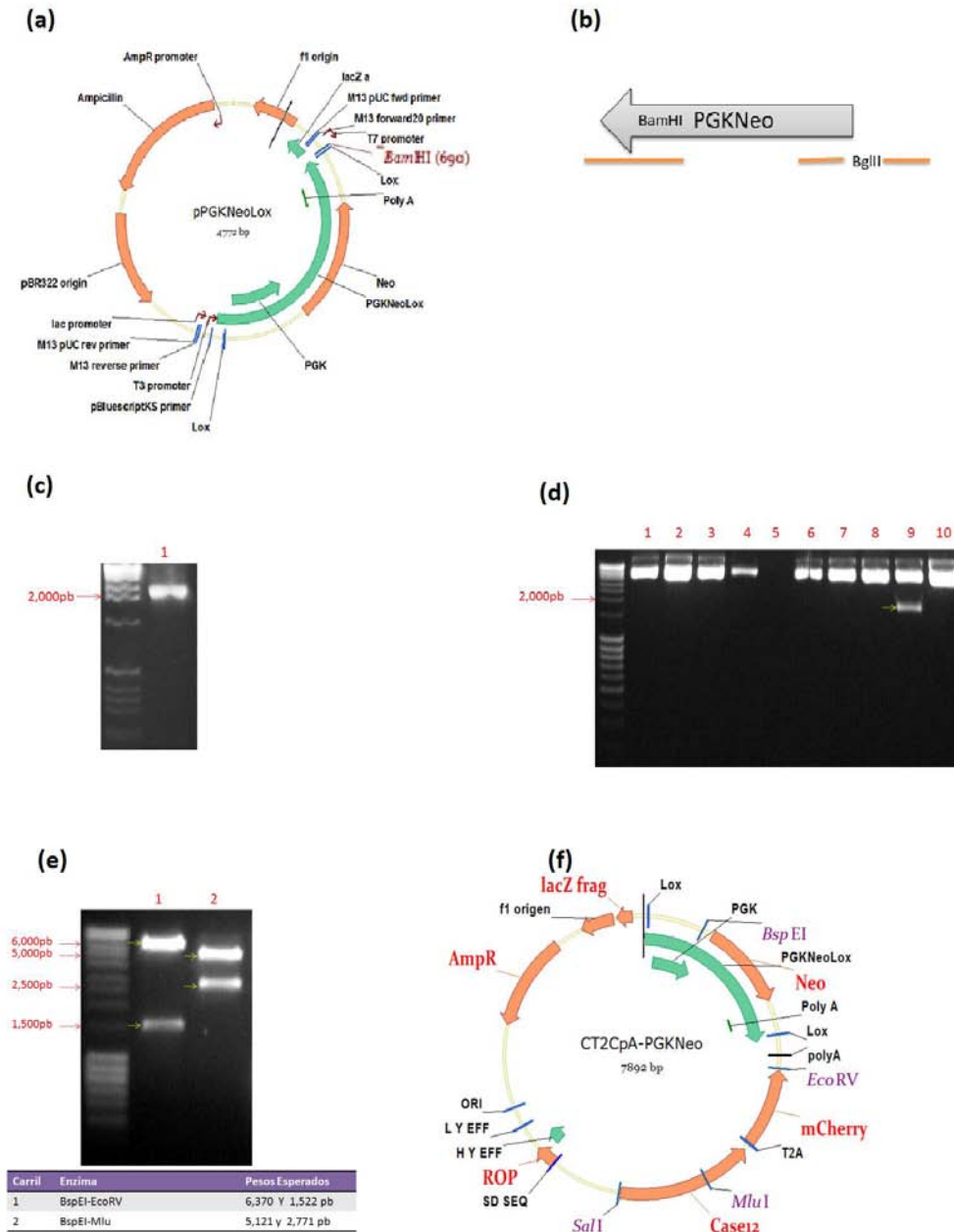
Para evitar seleccionar de esta manera, se agregó a la construcción un *cassette* de resistencia PGK-Neo con los sitios Lox-P en los extremos. Éstos sitios permiten remover el *cassette* por medio de la CRE-recombinasa fácilmente [68].

Hasta el momento se tenían los elementos Case12-T2A-mCherry-poliA en el mismo marco de lectura (Figura 26d).

La estrategia para unir la secuencia PGK-Neo en el plásmido ***mpmCT2CpA***, fue hacer esta inserción en el sitio de restricción *BglIII*. Sin embargo, un impedimento para realizar esto era la secuencia PGK-Neo que no contenía ningún sitio *BglIII* para poder ligarlo al plásmido. En cambio, contenía un sitio *BamHI* (Figura 27a), el cual es compatible con el sitio *BglIII*, ya que ambos dejan los mismos extremos cohesivos. Debido a que sólo faltaba un sitio compatible con *BglIII*, en el otro extremo del PGK-Neo, se amplificó por medio de PCR ésta secuencia mediante *primers* que permitieron adicionar el sitio *BglIII* (Figura 27b). Como resultado de la amplificación por PCR los sitios *BglIII* y *BamHI* flanqueaban el PGK-Neo, siendo éstos compatibles con el sitio *BglIII* del plásmido ***mpmCT2CpA***.

Una vez amplificado el fragmento PGK-Neo e insertado en plásmido ***mpmCT2CpA***, se analizaron con la enzima *NheI* las colonias obtenidas de la transformación con esta ligación. Si el fragmento era insertado se vería una banda de 128 pb o una banda de 1737 pb. En contraste, si el fragmento no se hubiese insertado, se linearizaría el plásmido en 6000 pb. Por lo tanto, se realizaron *screenings* de 18 colonias obtenidas de esta ligación, de las cuales sólo una fue positiva (Figura 27d).

Para confirmar este resultado, se realizaron dos digestiones más de la colonia positiva 9 con las enzimas *BspEI*, *EcoRV* y *Mlu* (Figura 27e), lo cual reafirmó la inserción del PGKNeo. De esta manera se obtuvo el plásmido denominado ***CT2CpA-PGKNeo*** (Figura 27f).



**Figura 27.** a) Mapa del plásmido *pPGKNeoLox* donde se indica el sitio *BamHI*. b) Esquema de la estrategia de amplificación por PCR del PGK-Neo, donde se denotan con una línea color naranja los primers flanqueando al PGKNeo, adicionando el sitio *BglII* mediante el primer. c) PGKNeo amplificado por PCR, cuyo peso es de 1808 pb. d) Gel de agarosa al 1%, del screening de 10 colonias con *NheI* obtenidas de la ligación PGKNeo + *mpmCT2CpA*. La flecha amarilla indica la banda que refiere al fragmento esperado de 1737 pb, la cual es una colonia positiva. e) Gel de agarosa al 1%, donde se muestran dos digestiones para confirmar que el PGK-Neo ha sido insertado en el plásmido *mpmCT2CpA*. Se muestra en la figura las enzimas utilizadas y los pesos esperados. Las flechas amarillas indican las bandas que reafirman que esta colonia fue positiva. f) Mapa del plásmido *CT2CpA-PGKNeo* que indica los sitios *NheI*, *BspEI*, *MluI*, *SalI* y *EcoRV*.



## 7.6. CMV/CBA

Finalmente, para la construcción se requería un promotor que permitiera la expresión de la secuencia Case12-T2A-mCherry-poliA, por lo que se utilizó el CMV/CBA, debido a que el propósito del vector era ser utilizado en células troncales.

Para insertar el promotor CMV/CBA río arriba de la secuencia Case12-T2A-mCherry-poliA, se amplificó este promotor del plásmido **pCDA-CMVCBA** (Figura 28a) mediante PCR, con la adición de sitios específicos que permitirían colocarlo río arriba del Case12. Sin embargo, no se obtuvieron colonias positivas. No se sabe por que no se obtuvieron colonias positivas, una posibilidad es que los oligonucleótidos diseñados, podrían haber estado formando estructuras secundarias. En este caso algún dímero podría estar impidiendo amplificar la secuencia CMV/CBA.

Debido a este resultado, la estrategia se modificó. Se digirió el plásmido **CT2CpA-PGKNeo** (Figura 27f) con la enzima *Sall*<sup>19</sup>. Luego se escindió el CMV/CBA con los sitios de restricción *Sall* y *XhoI*<sup>20</sup>, y de esta manera se insertó el promotor a la construcción.

Sin embargo, al digerir con *Sall* y *XhoI*, el plásmido **pCDA-CMVCBA** (Figura 28a), liberaba fragmentos muy parecidos (1985, 2185 y 2319 pb) y difíciles de separar en un gel de agarosa, que serían complicados de cortar para aislar la banda que contendría al CMV/CBA, incluso utilizando un gel largo con una concentración muy baja (0.5-0.7%).

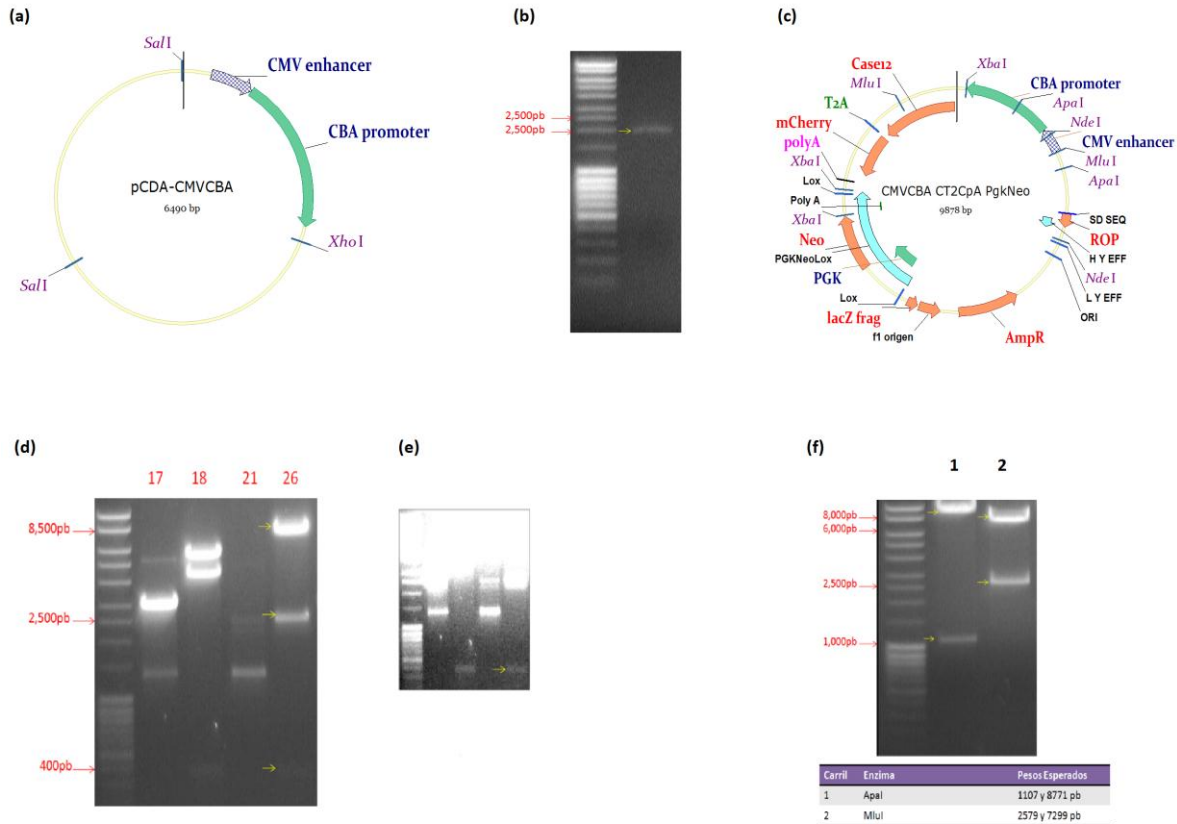
En función de lo anterior, primero se determinó digerir el CMV/CBA con la enzima *Sall*, lo que resultaría en dos bandas, una de 4305 pb y otra de 2185 pb. Tal como lo muestra el mapa del plásmido **pCDA-CMVCBA** (Figura 28a), la banda más pesada sería la que contendría el CMV/CBA. Esta banda de 4305 pb se aisló y se purificó, luego este fragmento se digirió con la enzima *XhoI*. Resultando así en dos fragmentos, uno de 1986 pb (que contenía al CMV/CBA) y otro de 2319 pb. Aunque ambos tenían un peso relativamente parecido, se logró aislar el fragmento deseado en un gel al 0.7% obteniendo una banda

---

<sup>19</sup> *Sall* corta dejando extremos cohesivos

<sup>20</sup> El sitio *XhoI* es compatible con el sitio *Sall*

muy bien definida de 1986 pb (Figura 28b), la que se insertó en el plásmido **CT2CpA-PGKNeo** (Figura 27f) en el sitio *Sall*.



**Figura 28.** a) Mapa del plásmido **pCDA-CMV CBA** donde se indican los sitios *SalI* y *XhoI*. b) Producto de la digestión secuencial del plásmido **pCDA-CMV CBA** con las enzimas *Sall* y *XhoI*, donde se marca el fragmento de 1986 pb que contiene el CMV/CBA. c) Mapa de la construcción final plásmido **CMV CBA CT2CpA PgkNeo** que contiene el promotor CMV/CBA, el sensor Case12 unido mediante el péptido autocortante T2A a la secuencia mCherry, así como el *cassette* PGK-Neo inserto. Se muestran los sitios *XbaI*, *ApaI*, *NdeI*, *MluI*. d) Gel de Agarosa al 0.7%, del *screening* (colonias 17, 18, 21 y 26 obtenidas de la ligación PGKNeo+ **CT2CpA-PGKNeo**) con la enzima *XbaI*. Si la orientación era correcta se esperaban tres fragmentos de 361, 2453 y 7064 pb, que se marcan en el gel con las flechas amarillas. e) Fotografía procesada de la misma figura 28d, por medio del programa ImageJ, para mejora la visualización de las bandas (flecha amarilla), por medio de un aumento de brillo y mayor contraste. f) Gel de agarosa al 1%, donde se muestran dos digestiones para confirmar que la colonia número 26 era positiva para la ligación CMV/CBA + **CT2CpAPGKNeo**. Se muestra en la figura, las enzimas utilizadas y los pesos esperados. Las flechas amarillas indican las bandas que reafirman que esta colonia era positiva.

Las colonias obtenidas de esta ligación se analizaron con la enzima *NheI*. De nuevo existían 3 posibles plásmidos en las colonias obtenidas de esta ligación, debido a que *Sall* y *XhoI* dejan los mismos extremos compatibles. Una posibilidad era la no inserción del CMV/CBA, o la inserción de ésta con orientación invertida. La otra posibilidad es que hubiese sido correcta la inserción, tal como lo muestra la clonación *in silico* de la figura 28c.

En función de lo anterior se realizó un *screening* de 31 colonias para buscar primero las que contenían el CMV/CBA inserto. De estas, se obtuvieron 4 colonias probablemente positivas. Luego, se hizo un *screening* con la enzima *XbaI*, para determinar cuál de ellas tenía la orientación correcta. Tal como lo muestra el mapa *in silico* de la construcción (Figura 28c), se esperaban tres fragmentos: 361, 2453 y 7064 pb, si la orientación era correcta. Por el contrario, si el CMV/CBA había sido insertado al revés, se obtendría un bandeo de 5338, 4179, y 361 pb.

Como lo demuestra el gel de la Figura 28d, la colonia 26 resultó contener el CMV/CBA en la orientación correcta. Sin embargo, para corroborar este dato se realizaron dos digestiones más (Figura 28e). Debido a que el promotor se había insertado correctamente a la construcción objetivo, el plásmido denominado **CMVCBA CT2CpA PgkNeo** estaba listo.

#### 7.7. Secuenciación de la construcción

Para la construcción **CMVCBA CT2CpA PgkNeo** (Figura 28c) era necesario reafirmar los elementos más importantes como son: que estuvieran presentes la secuencia del promotor y del Case12 y que el conjunto Case12-T2A-mCherry se encontrara en el mismo marco de lectura. Por lo tanto, se realizaron diversas secuenciaciones.

La presencia del promotor, se analizó mediante la secuenciación **9380** con el oligonucleótido *M13 Rev* (5'-TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC-3), el cual se une río arriba del promotor. La parte secuenciada se marca en la figura 29a. Esta secuencia mostró que el promotor estaba presente, sin embargo como lo muestran los resultados de la figura 29b, se encontró una delección de una citosina en el sitio 1375. Sin embargo, había la

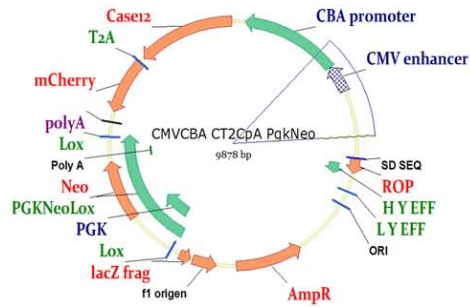
posibilidad de que esta deleción, en realidad no existiera, ya que el cromatograma presentaba algunas irregularidades. Por lo tanto, con ésta se confirmó la presencia del promotor y su 99% de identidad del sitio 1266 al sitio 2061.

La presencia del sensor se realizó con la secuenciación **9926** utilizando el oligonucleótido *P5F* (5'- CTG CGA GGG GAA CAA AGG-3'). Tal como lo muestra la figura 29c, este oligonucleótido pega dentro del promotor y permite secuenciar una parte del sensor Case12. Sin embargo, esta secuencia tuvo demasiadas incongruencias con el mapa *in silico* (Figura 29d), así como irregularidades en el cromatograma (picos muy bajos), por lo que se descartó, a reserva de los datos rescatados donde se puede concluir que: 1) dentro del promotor de la posición 133 a la posición 569, hay un 98.4% de secuencia consenso entre el mapa *in silico* y la secuenciación; 2) dentro del Case12, de la posición 9858 a la posición 9598 existe un 99.2% de secuencia consenso entre el mapa *in silico* y la secuenciación.

Por último, se realizó una secuenciación (**9928**) para determinar si estaba en el mismo marco de lectura el fragmento Case12-T2A-mCherry. Para lo cual se utilizó el oligonucleótido denominado *P8F* (5'- ACA AGC TGG AGT ACA ACA-3') que abarca el fragmento objetivo (Figura 29e). Con esta secuenciación se obtuvo una identidad absoluta del 100% de la posición 8085 a la posición 9020. Lo cual confirmó que el Case12, el T2A y mCherry tienen el mismo marco de lectura (Figura 29f). Además, también se observan que no contienen mutaciones los fragmentos alcanzados a secuenciar desde donde pega este oligonucleótido (Figura 29f). Esta secuenciación, a diferencia de las anteriores, no presentó irregularidades.

Se concluyó lo siguiente: que los elementos insertados (promotor, Case12, T2A y mCherry) estaban presentes en la construcción y que la secuencia Case12-T2A-mCherry se encontraba en el mismo marco de lectura. Corroborando una vez más que la construcción **CMVCBA CT2CpA P<sub>gk</sub>Neo** tenía los elementos necesarios.

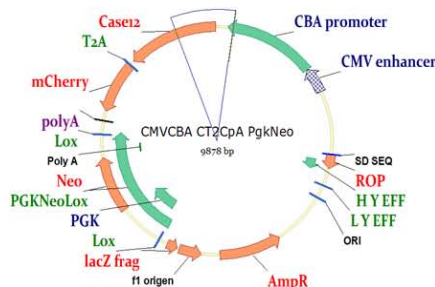
(a)



(b)

Posición en el plásmido <i>in silico</i>	Tipo de mutación
1266-1374	Ninguna
1375	Delección
1376-2061	Ninguna

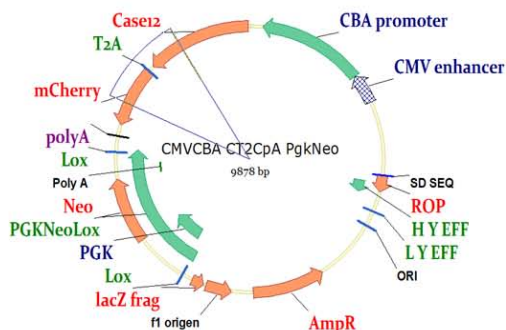
(c)



(d)

Fragmento	Posición	Cae dentro del	Tipo de mutación
8-569	203	Promotor	C X T
8-569	208	Promotor	Inserción
8-569	226	Promotor	G X T
8-569	308	Promotor	Inserción
8-569	356	Promotor	Inserción
8-569	457	Promotor	Inserción
8-569	569	Promotor	T X C
9598-9878	9660	Case12	Inserción
9598-9878	9617	Case12	Inserción

(e)



(f)

Fragmento secuenciado	Cae dentro de
8085-8532	mCherry
8533-8544	Fragmento de union
8545-8598	T2A
8599-8613	Fragmento de union
8614-9020	Case12

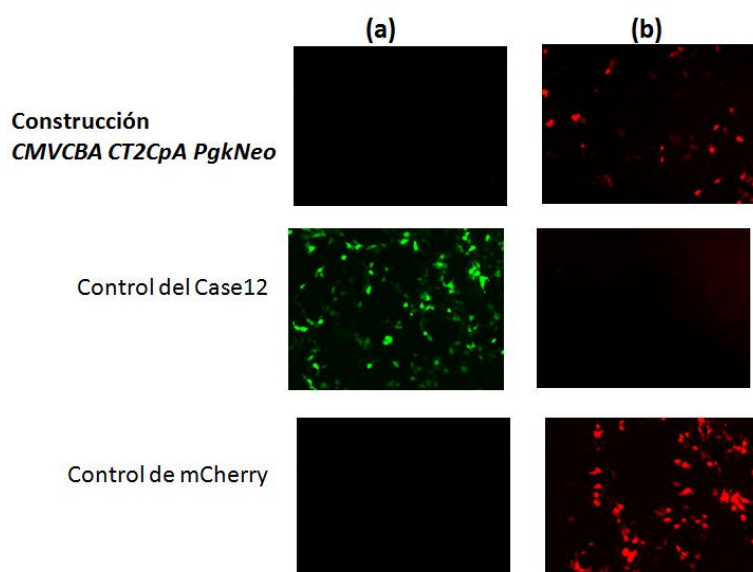
**Figura 29.** a) Mapa *in silico* del **CMVCBA CT2CpA PgkNeo** donde se marca el fragmento secuenciado con el *primer M13 Rev* (secuencia 9380). b) Tabla de resultados de la secuenciación 9380 donde se muestra que solo se encontró una delección en la posición 1373. c) Mapa *in silico* del **CMVCBA CT2CpA PgkNeo** donde se marca el fragmento secuenciado con el *primer P5F* (Secuencia 9926). d) Tabla de resultados de la secuenciación 9926 donde se muestran las mutaciones encontradas en comparación con el plásmido *in silico*. e) Mapa *in silico* del **CMVCBA CT2CpA PgkNeo** donde se marca el fragmento secuenciado con el *primer P8F* (Secuencia 9928). f) Tabla de resultados de la secuenciación 9928 donde se muestran el desglose de los fragmentos obtenidos con 100% de identidad.

### 7.8. Prueba *in vitro* (Transfección)

Una vez corroborado por medio de enzimas de restricción y secuenciación, que todos los elementos estaban presentes y posicionados en forma correcta, se transfectó el plásmido para su caracterización.

Al realizar la transfección con el plásmido **CMVCBA CT2CpA PgkNeo** en células HEK 293, mediante lipofección, se obtuvo solamente fluorescencia en el canal rojo (Figura 30). Este experimento se repitió más de 5 veces cambiando todas las variables que pudieran estar afectando el resultado: cantidad de plásmido, línea celular (se cambió a HEK 293T), método de transfección (se cambió a transfecciones mediante cloruro de calcio). Sin embargo, el resultado no cambió.

Se sabe que la maduración del fluoróforo en las proteínas fluorescentes involucra un paso de oxidación, el cual típicamente toma de segundos a minutos, pero en algunos casos días [18]. Por lo tanto se mantuvieron las células transfectadas por varios días sin ningún resultado positivo. El control Case12 (plásmido **pCCC12 chris**, Figura 30) que contenía el mismo promotor, siempre resultaba positivo.

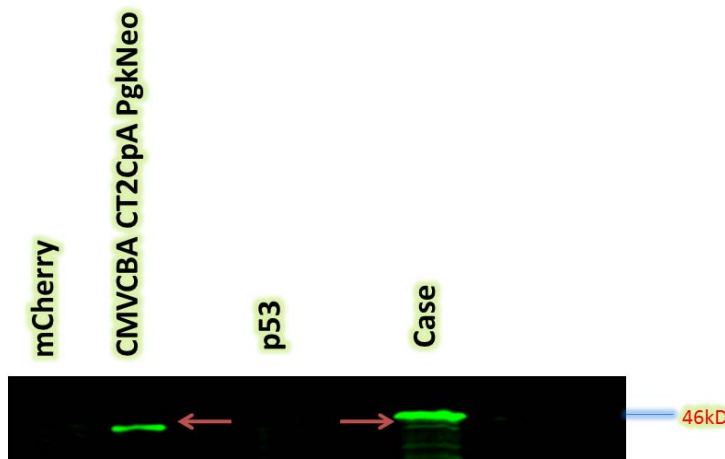


**Figura 30.** Resultados de las transfecciones en la línea celular HEK293 con la construcción **CMVCBA CT2CpA PgkNeo** y sus respectivos controles transfectados: Case12 (**pCCC12 chris**) y mCherry (**pcDNA3 mcherry**). Panel (a) se muestra el filtro Alexa Fluor 489 (excitación de 450-490 y emisión de 515-565) y el panel (b) muestra el filtro Cherry (excitación a 575 y emisión a 610). Demostrando que solo se obtuvo fluorescencia de mCherry en las transfecciones con la construcción.

### 7.9. Análisis de los productos proteínicos

Debido a su fluorescencia se sabía que mCherry estaba funcionando (Figura 30) y por ende no cabía duda alguna de que el promotor también. Gracias a la secuenciación **9928** se sabía que mCherry, T2A y Case12 estaban en el mismo marco de lectura. Por lo tanto, se podía esperar que el T2A funcionara correctamente ya que no contenía mutación alguna. Entonces la proteína Case12 podía estar presente o no. Cabía la posibilidad de que la proteína estuviese siendo degradada (por ejemplo, por alguna mutación que impidiera su plegamiento y esto la enviara a degradación).

Por lo tanto, se realizó un Western Blot (Figura 31) donde se marcan las bandas de 46 kDa (flechas rojas), que corresponden al peso del sensor Case12 (del plásmido control **pCCC12** y de la construcción **CMVCBA CT2CpA PgkNeo**). El anticuerpo utilizadó presento un grado de inespecificidad, sin embargo se marcan muy bien las bandas que representan al sensor.

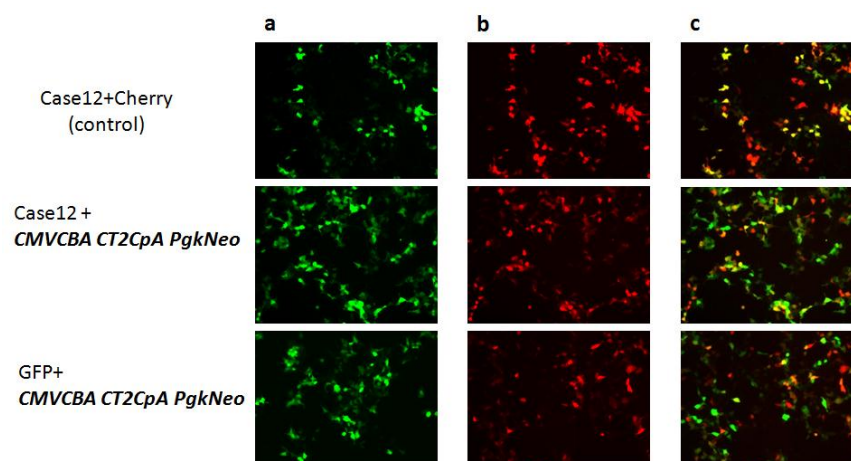


**Figura 31.** Western Blot utilizando anti-GFP para encontrar la banda referente al sensor Case12. Las flechas rojas indican la banda correspondiente a 46 kDa que es el peso del sensor Case12. Se utilizó como controles mCherry, Case12 y p53.

El resultado confirmó por una parte, que el péptido autocortante T2A estaba funcionando, ya que de no ser así, se hubiese obtenido una fusión de la proteína mCherry y el Case12. Por otra parte, se demostró que la proteína Case12 estaba presente (no estaba siendo degradada).

Una posibilidad de la fluorescencia nula del sensor en la construcción era que tal vez, podría tener una mutación que estuviera haciendo que la proteína se dimerizara, ya que se sabe del aumento de la GFP a agregarse o dimerizarse cuando se fusiona con otras proteínas insolubles o cuando se utilizan permutaciones circulares. En tal caso, se podría perder la fluorescencia por que se vería disminuida la maduración del fluoróforo o la eficiencia cuántica [18].

Por lo tanto, se analizó esta posibilidad mediante co-transfecciones. Se esperaba que si tal vez la proteína Case12 estuviese dimerizando debido a una mutación, al agregar otra proteína Case12 no mutada o una proteína GFP, la cual, tiene más tendencia a oligomerizar [25], la fluorescencia de ambas proteínas se apagaría parcialmente o en su totalidad. Sin embargo la fluorescencia no disminuyó (Figura 32).



**Figura 32.** Resultados de las co-transfecciones, que demuestran fluorescencia en todos los casos, concluyendo que no esta siendo dimerizando el sensor de la construcción. Panel (a) se muestra el filtro Alexa Fluor 489 (excitación de 450-490 y emisión de 515-565), el panel (b) muestra el filtro Cherry (excitación a 575 y emisión a 610) y el panel (c) se muestra la unión de (a) y (b).



## 8. DISCUSIÓN

Las fluctuaciones de calcio son relevantes en muchos procesos celulares como la fertilización, formación de los patrones de desarrollo, diferenciación celular, proliferación celular, activación de factores transcripcionales, entre otras [1]. Para medir tales oscilaciones en la concentración de calcio, se han construido los sensores codificados genéticamente, cuya novedad es que son insertados en las células y su fluorescencia cambia en función de la concentración de calcio en el medio.

Sin embargo, es difícil conocer la expresión de la proteína *in vivo* de forma continua, durante un periodo largo de tiempo.

Para resolver este inconveniente, el presente proyecto tuvo por objetivo construir un vector que pudiera ser utilizado en células troncales para visualizar cambios en la concentración de calcio citoplasmático en tiempo real. Para crear este vector, se utilizó el promotor CMV/CBA, un sensor GES Case12, una secuencia auto-cortante 2A, una proteína fluorescente mCherry y finalmente un *cassette* PGK-Neo.

Este novedoso sistema, donde el sensor es unido a una proteína fluorescente mediante la secuencia 2A, permitiría expresar el Case 12 de manera relativamente equimolar al gen mCherry y de ésta forma, este gen podría normalizar la expresión del Case12.

Como lo muestra la figura 28c, se logró el objetivo principal del proyecto, es decir la construcción del **CMVCBA CT2CpA PgkNeo**. Sin embargo, el resultado fue diferente al esperado, ya que el sensor no tuvo fluorescencia.

Debido a que mCherry sí producía fluorescencia (Figura 30), el promotor estaba funcionando. Por secuenciación se comprobó que mCherry, T2A y Case12 estaban en el mismo marco de lectura; adicionalmente se sabe que el T2A funcionó correctamente por que en el western blot no se obtuvieron proteínas fusionadas.

Se determinó que la secuencia del sensor Case12, estaba presente en la construcción por medio de las digestiones, así como por las secuenciaciones parciales del Case12 (9928 y

9926); adicionalmente mediante el western blot se determinó que la proteína no estaba siendo degradada, ya que era capaz de acumularse en el citoplasma.

Tomando en cuenta todos estos datos solo quedaron dos posibles hipótesis sobre porque el sensor Case12 no es funcional. La primera, es que la cola peptídica que queda unida al Case12 de la secuencia T2A, de alguna manera interfiere con la función del fluoróforo, ya sea en su maduración o en las transiciones electrónicas para que ocurra la fluorescencia. La segunda, es que el Case12 de la construcción esta mutado en un sitio o más, que impiden la fluorescencia del Case12.

Varios reportes mencionan que la presencia del 2A en el extremo C-terminal ha resultado ser negativa para la expresión de diferentes proteínas, por ejemplo se ha descrito, 1) una reducción de la actividad de una proteína de cápside [69]; 2) hubo disfuncionalidad de un pentapéptido, lo que causó replications incompetentes de viriones [54]; 3) se obtuvo reducción en secreción y función de la TGF- $\beta$  [70]; 4) hubo inestabilidad de la proteína hrGFP-2A, en comparación con la hrGFP sola [71]; 5) eliminación total de fluorescencia en la proteína DsRed-2A [72]

Así mismo están los reportes de los sensores pericam y G-CaMP que indican que el extremo C-terminal de CaM es un lugar muy sensible para la adición de elementos (los cuales tienen un alto parecido con el sensor Case12). En el caso de Pericam [73] se menciona que intentaron conectar el extremo C-terminal de CaM y el extremo N-terminal de M13, con los extremos N y C terminales de cpEYFP respectivamente. Sin embargo, la proteína quimera, no mostraba ninguna respuesta al calcio, por lo que intercambiaron a CaM y al M13, resultando esto favorable. Exactamente lo mismo ocurrió en el caso de G-CaMP [38], en éste sensor intentaron poner a CaM al termino N de la cpEGFP (queriendo esto decir que el término C de CaM estaría pegado a cpEGFP), obteniendo como resultado muy poca respuesta al calcio.

Por lo tanto el extremo C-terminal de CaM es un dominio muy importante, el cual interactúa con el M13 y por lo tanto es esencial que se encuentre libre. Debido a la adición

de la cola T2A en este trabajo el dominio podría no encontrarse libre para interactuar con el M13.

Sin embargo, no se puede descartar una mutación dentro de la secuencia Case12. Del fragmento de 8614 a 9020pb que forma parte del sensor (aproximadamente un tercio del sensor) no contiene mutación alguna. No se puede descartar la idea de una mutación en otro lugar que pudiese deformar la estructura del beta-barril, lo que podría resultar en un cambio en el microambiente del fluoróforo y esto podría influir en la maduración de éste o su estado de protonación [74], lo que resultaría en una fluorescencia nula. Tal vez esta mutación podría ser resultado de la amplificación por PCR.

Finalmente los resultados sugieren que, si bien la construcción en el presente no es viable, la combinación correcta del péptido autocortante 2A, una proteína reportera y un sensor de calcio, pudiera ser una buena solución para determinar la expresión del sensor de calcio.

## 9. CONCLUSIÓN

Se construyó el vector **CMVCBA CT2CpA PgkNeo**, que contiene un sensor Case12 unido a una proteína mCherry mediante una secuencia 2A, todo esto bajo un promotor CMV/CBA.

El resultado final es que el sensor no tuvo fluorescencia, aunque todos los demás elementos (promotor, mCherry, T2A) funcionaron correctamente.

La fluorescencia nula puede deberse a que el Case12 está mutado en un sitio que impide su fluorescencia o debido a que la cola adicional T2A impide la fluorescencia del sensor Case12.

## 10. PERSPECTIVAS

La visualización de células *in vivo* permite conocer las interacciones moleculares individuales bajo condiciones fisiológicas normales y provee información que a veces es imposible obtener por técnicas convencionales.

Hasta el momento existen muchos sensores con los cuales se pueden medir estas oscilaciones de calcio. Sin embargo, el reto en la actualidad no solamente es mejorar estos sensores, sino también desarrollar nuevos instrumentos que puedan tomar ventaja de los mismos y potenciarlos de tal manera que se pueda tener una investigación más certera de los resultados.

Esta construcción no sirvió para detectar cambios en la concentración de calcio citoplasmático. Sin embargo, debido a su naturaleza modular (sitios de restricción adicionados y sitios de restricción ya presentes) permite intercambiar fácilmente los elementos de la construcción.

Por lo tanto, sería relevante seguir analizando varios elementos y sus arreglos para crear una construcción eficiente, por ejemplo:

Se podría cambiar la posición de las proteínas fluorescentes en la construcción. En este caso simplemente se intercambiaría el sensor Case12 por la proteína fluorescente mCherry en la construcción y viceversa. Así, la cola T2A sería adicionada a la proteína mCherry y el extremo C-terminal del sensor Case12 se encontraría libre para interactuar con su péptido de unión.

Otra posibilidad sería cambiar de sensor, donde el motivo sensible al calcio no esté en el extremo C-terminal. Tal vez, se podría utilizar un sensor basado en FRET, donde el dominio sensible al calcio se encuentre entre dos proteínas fluorescentes.

## 11. ANEXOS

### I. Buffer SB 20X (para 1litro):

- 8g de NaOH
- 45g de ácido bórico
- Aforar con agua destilada a 1 litro

### II. Buffer TAE 50X (para 1litro):

- Disolver 242 gr de Tris base (PM=121.14) en 750mL de agua destilada
- Agregar 57.1 ml de ácido glacial
- Agregar 100 ml de EDTA 0.5M (pH 8.0)
- Ajustar a un volumen de 1L

### III. Buffer P1 (para 110 µl):

- 100 µl de la solución P1( 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA)
- 10 µl de RNAsa.

### IV. Buffer P2 (para 100 µl):

- 50 µl de NaOH 400 mM
- 50 µl de SDS al 2%.

### V. Buffer P3:

- 5M de acetato de potasio pH 5.5

### VI. Dulbecco's Modified Medium (D-MEM)

- Sobre con el medio DMEM (GIBCO)
- NaHCO<sub>3</sub> (3.7g)
- H<sub>2</sub>O

Para preparar 1 litro:

- Disolver el sobre con el medio D-MEM en 800 ml de H<sub>2</sub>O grado cultivo.
- Añadir el NaHCO<sub>3</sub> y agitar hasta disolver.
- Ajustar el pH a 6.9
- En campana, aforar en matraz de 1L
- Esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm.
- Almacenar a 4 °C y utilizar en un periodo máximo de 2 meses.

VII. Buffer Salino de Fosfatos (PBS 1X).

- 136 mM de NaCl
- 2 mM de KCl
- 10mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

VIII. Tripsina 0.25%

- Tripsina 2.5% (GIBCO)
- Verseno (GIBCO)

Para 10 ml:

- En campana mezclar 1 ml de tripsina al 2.5% con 9 ml de verseno.
- Almacenar a 4 °C hasta por 1 mes.

IX. HBS 2X

- 273 Mm de NaCl
- 9.9 mM de KCl
- 2.8 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 11 mM de Dextrosa
- 41 mM de HEPES

Para 100 ml:

- Disolver en 95 ml de agua grado cultivo.
- Prepara tres de esta soluciones HBS.
- Ajustar cada una a un pH distinto que vaya de los 6.9 a 7.1
- Filtrar las soluciones en campana a través de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .
- Se debe determinar el buffer con mejor eficiencia (mínimo 70%) transfectando un vector de expresión de GFP, con los diferentes HBS 2X. El HBS que de lugar a la mejor eficiencia de transfección alicuotarlo cada 500 ml y almacenarlo a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

X. CaCl<sub>2</sub>

- 1.472 g de CaCl<sub>2</sub> en 5 ml de agua grado cultivo (almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$ ).

XI. Buffer de lisis

- Tris 50 mM, pH8
- NaCl 150 mM
- 1% NP-40 o Igepal
- 0.5% Deoxicolato de sodio
- 0.1% SDS

\*Antes de usar, adicionar la cantidad correspondiente de solución stock 10X de inhibidores de proteasas (Mini-complete, Roche).

XII. Proporciones para geles desnaturalizantes

**Gel separador**

Soluciones	8% (9 ml)	10% (9 ml)	12% (9 ml)
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	2.385 ml	2.385 ml	2.385 ml
Agua	4.185 ml	3.58 ml	2.987 ml
SDS 10%	90 $\mu\text{l}$	90 $\mu\text{l}$	90 $\mu\text{l}$
A/B 30%	2.393 ml	3 ml	4.488 ml
APS 10%	72 $\mu\text{l}$	72 $\mu\text{l}$	72 $\mu\text{l}$
TEMED	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$

### Gel concentrador 5% (3 ml)

Soluciones	
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	750 $\mu$ l
Agua	1.697 ml
SDS 10%	30 $\mu$ l
A/B 30%	498 $\mu$ l
APS 10%	22.5 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l

#### XIII. Buffer de carga 3X (9.5 ml)

- 3.55 ml de agua bidestilada
- 1.25 ml de Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8
- 2.5 ml de glicerol
- 2 ml de SDS 10%
- 200  $\mu$ g de azul de bromofenol 0.5%
- Alicuotar cada 500  $\mu$ l por tubo.
- Se usa 1X final.

\*Almacenar a 4°C.

\*Antes de usar, añadir 25  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada 475  $\mu$ l de buffer.

#### XIV. Buffer de corrida 10X pH 8.3 (1 L)

- Tris base 25 mM (30.3 g)
- Glicina 192 mM (144 g)
- SDS 0.1% (10 g)
- Aforar a 1 L con agua bidestilada.
- Se usa 1X.

\*Almacenar a 4°C.



XV. Buffer de transferencia (1 L)

- Glicina 39 mM (2.9 g)
- Tris base 48 mM (5.8 g)
- SDS 0.037% (0.37 g)
- Metanol 20% (200 ml)

\*Se prepara al momento, para evitar evaporación y se pre-enfria a 4°C.

XVI. TBST (1 L)

- 100 ml TBS 10X
- Tween 20 0.01% (1 ml)

\*Aforar a 1 L con agua bidestilada.

## 12. REFERENCIAS

- [1] Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(1):11-21.
- [2] Clapham DE. *Cell* 1995;80(2):259-268.
- [3] Lipskaia L, Lompre AM. *Biol Cell* 2004;96(1):55-68.
- [4] Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12(1):3-10.
- [5] Zhu MX, Evans AM, Ma J, Parrington J, Galione A. *Commun Integr Biol* 2010;3(1):12-17.
- [6] Zhu MX, Ma J, Parrington J, Calcraft PJ, Galione A, Evans AM. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;298(3):C430-441.
- [7] Syntichaki P, Tavernarakis N. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(8):672-684.
- [8] Chin D, Means AR. *Trends Cell Biol* 2000;10(8):322-328.
- [9] Berridge MJ. *J Physiol* 1997;499 ( Pt 2):291-306.
- [10] Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 12):2213-2222.
- [11] Schmitz Y, Luccarelli J, Kim M, Wang M, Sulzer D. *J Neurosci* 2009;29(38):11973-11981.
- [12] Owens DF, Kriegstein AR. *J Neurosci* 1998;18(14):5374-5388.
- [13] Rudolf R, Mongillo M, Rizzuto R, Pozzan T. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(7):579-586.
- [14] Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B. *Physiol Rev* 1999;79(4):1089-1125.
- [15] McCombs JE, Palmer AE. *Methods* 2008;46(3):152-159.
- [16] Griesbeck O. *Curr Opin Neurobiol* 2004;14(5):636-641.
- [17] Meyer JS, Tullis G, Pierret C, Spears KM, Morrison JA, Kirk MD. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29(8):1191-1203.
- [18] Hsu ST, Blaser G, Jackson SE. *Chem Soc Rev* 2009;38(10):2951-2965.
- [19] Craggs TD. *Chem Soc Rev* 2009;38(10):2865-2875.
- [20] Matz MV, Lukyanov KA, Lukyanov SA. *Bioessays* 2002;24(10):953-959.
- [21] Yang F, Moss LG, Phillips GN, Jr. *Nat Biotechnol* 1996;14(10):1246-1251.
- [22] Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 24):4247-4260.
- [23] Tsien RY. *Annu Rev Biochem* 1998;67:509-544.
- [24] Lichtman JW, Conchello JA. *Nat Methods* 2005;2(12):910-919.
- [25] Verkhusha VV, Lukyanov KA. *Nat Biotechnol* 2004;22(3):289-296.
- [26] Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA. *Trends Biotechnol* 2005;23(12):605-613.
- [27] Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(12):7877-7882.
- [28] Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. *Nat Biotechnol* 2004;22(12):1567-1572.
- [29] VanEngelenburg SB, Palmer AE. *Curr Opin Chem Biol* 2008;12(1):60-65.
- [30] Souslova EA, Chudakov DM. *Biochemistry (Mosc)* 2007;72(7):683-697.
- [31] Kotlikoff MI. *J Physiol* 2007;578(Pt 1):55-67.
- [32] Miyawaki A. *Dev Cell* 2003;4(3):295-305.
- [33] Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(12):906-918.
- [34] Jares-Erijman EA, Jovin TM. *Nat Biotechnol* 2003;21(11):1387-1395.
- [35] Li IT, Pham E, Truong K. *Biotechnol Lett* 2006;28(24):1971-1982.
- [36] Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(20):11241-11246.
- [37] Ikura M, Clore GM, Gronenborn AM, Zhu G, Klee CB, Bax A. *Science* 1992;256(5057):632-638.
- [38] Nakai J, Ohkura M, Imoto K. *Nat Biotechnol* 2001;19(2):137-141.
- [39] Wang L, Jackson WC, Steinbach PA, Tsien RY. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(48):16745-16749.

- [40] Souslova EA, Belousov VV, Lock JG, Stromblad S, Kasparov S, Bolshakov AP, Pinelis VG, Labas YA, Lukyanov S, Mayr LM, Chudakov DM. *BMC Biotechnol* 2007;7:37.
- [41] de Felipe P. *Curr Gene Ther* 2002;2(3):355-378.
- [42] de Felipe P, Luke GA, Hughes LE, Gani D, Halpin C, Ryan MD. *Trends Biotechnol* 2006;24(2):68-75.
- [43] Borman AM, Le Mercier P, Girard M, Kean KM. *Nucleic Acids Res* 1997;25(5):925-932.
- [44] Cruz SS, Chapman S, Roberts AG, Roberts IM, Prior DA, Oparka KJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(13):6286-6290.
- [45] de Felipe P. *Genet Vaccines Ther* 2004;2(1):13.
- [46] Ryan MD, Drew J. *Embo J* 1994;13(4):928-933.
- [47] Luke GA, de Felipe P, Lukashev A, Kallioinen SE, Bruno EA, Ryan MD. *J Gen Virol* 2008;89(Pt 4):1036-1042.
- [48] Ryan MD, King AM, Thomas GP. *J Gen Virol* 1991;72 ( Pt 11):2727-2732.
- [49] Ryan MD, Donnelly MLL, Lewis A, Mehrotra AP, Wilkie J, Gani D. *Bioorg Chem* 1999;27:55-79.
- [50] Donnelly ML, Luke G, Mehrotra A, Li X, Hughes LE, Gani D, Ryan MD. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 5):1013-1025.
- [51] Holst J, Vignali KM, Burton AR, Vignali DA. *Nat Methods* 2006;3(3):191-197.
- [52] de Felipe P, Luke GA, Brown JD, Ryan MD. *Biotechnol J* 2010;5(2):213-223.
- [53] Doronina VA, Wu C, de Felipe P, Sachs MS, Ryan MD, Brown JD. *Mol Cell Biol* 2008;28(13):4227-4239.
- [54] Suzuki N, Geletka LM, Nuss DL. *J Virol* 2000;74(16):7568-7577.
- [55] Provost E, Rhee J, Leach SD. *Genesis* 2007;45(10):625-629.
- [56] Halpin C, Cooke SE, Barakate A, El Amrani A, Ryan MD. *Plant J* 1999;17(4):453-459.
- [57] Donnelly ML, Gani D, Flint M, Monaghan S, Ryan MD. *J Gen Virol* 1997;78 ( Pt 1):13-21.
- [58] Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, Vignali DA. *Nat Biotechnol* 2004;22(5):589-594.
- [59] Varshavsky A. *Cell* 1992;69(5):725-735.
- [60] Halpin C, Barakate A, Askari BM, Abbott JC, Ryan MD. *Plant Mol Biol* 2001;47(1-2):295-310.
- [61] Chinnasamy D, Milsom MD, Shaffer J, Neuenfeldt J, Shaaban AF, Margison GP, Fairbairn LJ, Chinnasamy N. *Virol J* 2006;3:14.
- [62] Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. *Science* 2002;297(5584):1183-1186.
- [63] Spiller DG, Wood CD, Rand DA, White MR. *Nature* 2010;465(7299):736-745.
- [64] Muller-Taubenberger A, Anderson KI. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;77(1):1-12.
- [65] Chung S, Andersson T, Sonntag KC, Bjorklund L, Isacson O, Kim KS. *Stem Cells* 2002;20(2):139-145.
- [66] Peña A. In. D.F.: Limusa, 2004. p. 169.
- [67] Michelsen BK. *Anal Biochem* 1995;225(1):172-174.
- [68] Bio Online. Introduction to Vector Design for the Generation of Transgenic Mice. 2002.
- [69] Funston GM, Kallioinen SE, de Felipe P, Ryan MD, Iggo RD. *J Gen Virol* 2008;89(Pt 2):389-396.
- [70] Rothwell DG, Crossley R, Bridgeman JS, Sheard V, Zhang Y, Sharp TV, Hawkins RE, Gilham DE, McKay TR. *Hum Gene Ther* 2010;21(11):1631-1637.
- [71] Lengler J, Holzmuller H, Salmons B, Gunzburg WH, Renner M. *Anal Biochem* 2005;343(1):116-124.
- [72] Hasegawa K, Cowan AB, Nakatsuji N, Suemori H. *Stem Cells* 2007;25(7):1707-1712.
- [73] Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(6):3197-3202.
- [74] Stepanenko OV, Verkhusha VV, Kuznetsova IM, Uversky VN, Turoverov KK. *Curr Protein Pept Sci* 2008;9(4):338-369.