



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Clonación y expresión del gen que
codifica para la proteína
dependiente de calcio/calmodulina
II γ (CaMKII γ)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN BIOQUÍMICA
DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A:

MARIA ELENA RICO FLORES

ASESORES:

M. EN C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ

M. EN C. HÉCTOR IVÁN SALDÍVAR CERÓN

COASESOR:

DR. LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO
2018**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

DEPARTAMENTO DE

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Clonación y expresión del gen que codifica para la proteína dependiente de calcio/calmodulina Ily (CaMKIly).

Que presenta la pasante: **María Elena Rico Flores**

Con número de cuenta: **413084488** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Agosto de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
VOCAL	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Asesores

M en C. Ana Laura Vázquez Martínez

Profesor de asignatura de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM

M. en C Héctor Iván Saldivar Cerón

Profesor de asignatura de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM

Dr. Luis Enrique Arias Romero

Profesor titular "A" de tiempo completo de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida y acompañarme en todo el camino.

A mi madre María de Lourdes, por su incondicional amor, por sus noches de desvelo, por apoyarme en todo. Por el amor que siempre llena sus abrazos, sus palabras y sus acciones. Por su paciencia en su fe en mí en todo este camino. Te amo.

A mi padre Gonzalo, por creer en mí, por preocuparse, apoyarme siempre y procurar que nunca me falte nada. Por su amor y onfianza.

A mi hermana Alejandra, por ser mi compañera de vida, mi amiga y mi apoyo en toda etapa de mi vida. Por tus tonterías y consejos. Por cuidarme y a veces ser la mayor.

A la comunidad Nuevo Espíritu, por su apoyo y hermandad, porque sin ustedes mi vida no sería igual.

A Mario, por ser mi mejor amigo, mi compañero y mi confidente. Por esos días a tu lado, por tus palabras de amor y por tu paciencia.

A Karla Cintya, por ser mi mejor amiga, por tus risas y locuras. Por tus palabras de aliento y por enseñarme el lado más colorido de la vida.

A Jaime, Carlos y Oscar, por ser unos grandes amigos y compañeros de locuras.

A mis amigos Maria, Citlali, Suellen, Lucia, Jair y Jesús por esas tardes de risas, por las salidas, por las tardes de estudios y de quejas. Por ser mi apoyo en este camino.

A mis amigos de laboratorio Xochitl y Luis, por esas tardes de pláticas, por su ayuda en este año y su amistad.

A la profesora Ana Laura, por creer en mí y darme esta oportunidad.

Al M. en C Héctor Iván, por ayudarme todo el tiempo, por su paciencia y su amistad.

Al Dr. Luis Arias, por la oportunidad de estar en su laboratorio y su apoyo.

A la UNAM por ser mi segundo hogar.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Luis Enrique Arias Romero, profesor titular "A" de tiempo completo e investigador de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

TABLA DE CONTENIDO

I.	Índice de figuras	
II.	Índice de tablas	
III.	Abreviaturas	
IV.	Resumen	
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Proteína cinasa dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina II (CaMKII).....	1
1.2	Estructura y activación de CaMKII.....	2
1.3	Modificaciones post-traduccionales de CaMKII.....	6
1.4	Efectos biológicos de CaMKII.....	10
1.5	Papel de CaMKII en el desarrollo del cáncer.....	16
1.6	Fundamentos de métodos a usar.....	18
1.6.1	Transformación en bacterias competentes.....	18
1.6.2	Extracción por lisis alcalina del plásmido.....	19
1.6.3	Amplificación por PCR.....	19
1.6.4	Ensayo de restricción.....	20
1.6.5	Transfección del vector- proteína por lipofección.....	21
1.6.6	Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos y SDS-PAGE para proteínas.....	21
1.6.7	Inmuno-electrotransferencia y revelado de la proteína (Western Blot). ..	22
2.	JUSTIFICACIÓN.....	23
3.	OBJETIVO GENERAL.....	24
4.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1	Cultivo celular.....	25
a)	HEK293T.....	25
5.2	Transformación en bacterias competentes.....	25
5.3	Extracción por lisis alcalina del plásmido pEGFP-C1 (MINIPREP).....	25
5.4	Determinación de la concentración del plásmido pEGFP-C1.....	26
5.5	Amplificación por PCR del ORF de CaMKII.....	26
5.6	Ensayo de restricción plásmido pEGFP-C1.....	27

5.7 Clonación de CaMKII γ en el vector pEGFP-C1 por medio de In-Fusion HD Cloning Kit.....	28
5.8 Secuenciación del vector pEGFP-CaMKII γ	30
5.9 Transfección de pEGFP-CaMKII γ	30
5.10 Electroforesis SDS-PAGE	30
5.11 Transferencia e inmunodetección (Western Blot)	31
5.12 Microscopia	32
6. RESULTADOS	33
6.1 Obtención del ORF de CaMKII γ	33
6.2 Restricción del plásmido pEGFP-C1	34
6.3 Clonación de CaMKII γ en el vector pEGFP-C1.....	35
6.4 Secuenciación de la construcción de pEGFP-CaMKII γ	38
6.5 Transfección y expresión de la proteína fusión GFP-CaMKII γ	39
6.6 Expresión e inmunodetección de GFP-CaMKII γ	41
7. DISCUSIÓN.....	44
8. CONCLUSIONES	47
9. REFERENCIAS	48
Anexo A. Tabla de anticuerpos	54
Anexo B. Tabla de oligonucleótidos diseñados para In-Fusion	54

Índice de figuras

Figura 1. Kinoma humano y familias que lo conforman.....	1
Figura 2. Estructura de las subunidades de CaMKII.....	2
Figura 3. Estructura de la holoenzima de CaMKII.....	3
Figura 4. Activación de CaMKII por fosforilación y oxidación.....	4
Figura 5. Columna con membrana de silica utilizada para lisis alcalina.....	19
Figura 6. Pasos de una reacción de PCR.....	20
Figura 7. Enzimas de restricción BamHI y HindIII.....	20
Figura 8. Mecanismo de transfección por lipofección.....	21
Figura 9. Método de detección de Western Blot por quimioluminiscencia.....	22
Figura 10. Estructura del plásmido EGFP-C1.....	28
Figura 11. Protocolo In-Fusion HD.....	29
Figura 12. Amplificación del marco de lectura abierto de CaMKII γ	33
Figura 13. Restricción de pEGFP-C1 con BamHI.....	34
Figura 14. Electroforesis de pEGFP-C1 y el ORF de CaMKII γ , relación 3:1.....	35
Figura 15. Electroforesis de la construcción GFP-CaMKII γ	36
Figura 16. Digestión del vector GFP-CaMKII γ con enzimas de restricción HindIII y BamHI.....	37
Figura 17. Secuenciación del plásmido GFP-CaMKII γ	38
Figura 18. Visualización al microscopio de fluorescencia de células HEK293T transfectadas.....	39
Figura 19. Visualización en microscopio confocal de células HEK293T transfectadas.....	40
Figura 20. Células HEK293 transfectadas con CaMKII α	40
Figura 21. Tinción de gel de poliacrilamida con azul de Comassie.....	41
Figura 22. Tinción con rojo de Ponceau de las proteínas transferidas a la membrana de PVDF.....	42
Figura 23. Detección de la construcción de la proteína GFP-CaMKII γ por medio de Western Blot.....	43

I. Índice de tablas

Tabla 1. Modificaciones post-traduccionales de CaMKII, las isoformas que la sufren y la función biológica de CaMKII.....	9
Tabla 2. Condiciones de PCR.....	27

II. Abreviaturas

aa	Aminoácidos
ADP	Adenosín difosfato
AMPA	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ATF	Factor de transcripción activador
ATP	Adenosín trifosfato
BAFF	Factor activador de linfocitos B
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
Ca ²⁺	Calcio
CaM	Calmodulina
CaMKII	Proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina II
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECC	Acoplamiento excitación-contracción
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)
ETC	Acoplamiento excitación-transcripción
GFP	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent protein)
HDCA	Desacetilasa de histonas
HEK293T	Células embrionarias de riñón humano 293
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana
IFN	Interferón
IL-6	Interleucina 6
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
LMC	Leucemia mieloide crónica
LPS	Lipopolisacárido
LTP	Potenciación a largo plazo
mA	Miliamperes
ng	Nanogramos
NMDAR	Receptores de e N-metil-D-aspartato

ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
pEGFP-C1	Vector de clonación de GFP
PP1	Proteína fosfatasa 1
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PP2C	Proteína fosfatasa 2C
PVDF	Polifluoruri de viilideno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
STAT1	Transductor de señal y activador de la transcripción 1
TAK	Factor de crecimiento activado por cinasa 1
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
VSM	Musculo liso vascularizado
μ g	Microgramos
μ L	Microlitros

III. Resumen.

En el cuerpo humano el calcio actúa como segundo mensajero en varias vías de señalización en distintas células. Este ión es responsable de un gran número de acontecimientos celulares, entre los cuales destacan el crecimiento celular y la organización del citoesqueleto. El calcio además regula a las proteínas cinasas dependientes de calcio calmodulina, a las cuales pertenece CaMKII.

La proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} / Calmodulina II es una cinasa de serinas y treoninas multifuncional, caracterizada por ser codificada por cuatro genes diferentes (α , β , δ y γ), generando así 28 isoformas de la proteína, las cuales están expresadas de manera diferencial y distribuidas en distintos tejidos del cuerpo humano.

De estas isoformas, las más estudiadas son las que se expresan en el cerebro (α y β), seguida por la isoforma δ que se expresa en el corazón. Sin embargo la isoforma γ ha sido poco estudiada.

Recientemente se ha encontrado evidencia de que CaMKII se expresa en altos niveles en varios tipos de cáncer como pulmón, mama, próstata y cáncer de colon, entre otros. Esto implica a todas las isoformas de CaMKII, sin embargo también se ha demostrado que específicamente CaMKII γ tiene un papel fundamental en este padecimiento. Por lo que es importante profundizar en el estudio específico de esta isoforma (γ) y la relación que tiene esta proteína con distintas vías de señalización que la ubican como un elemento importante en la biología del cáncer.

Para ello es importante contar con las herramientas necesarias para su estudio. Este trabajo se enfocó en la construcción de proteína CaMKII γ fusionada a una construcción de un vector de expresión eucarionte, que contiene el gen que codifica para una bandera de GFP en el extremo amino terminal por medio de técnicas de biología molecular. Esta herramienta ayudará a visualizar la distribución de CaMKII γ en líneas celulares transformadas, así como su localización en la celular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Proteína cinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina II (CaMKII)

La familia de las CaM-cinasas está compuesta por cinasas que fosforilan residuos de serina o treonina en sus sustratos. Esta familia se divide en CaM-cinasas específicas de sustrato y CaM-cinasas multifuncionales, a las cuales pertenece CaMKII (Figura 1) (Swulius M.T, 2008).

La proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina II (CaMKII) es un complejo multimerico formado por 12 a 14 subunidades. (Erickson, J.R, 2014)

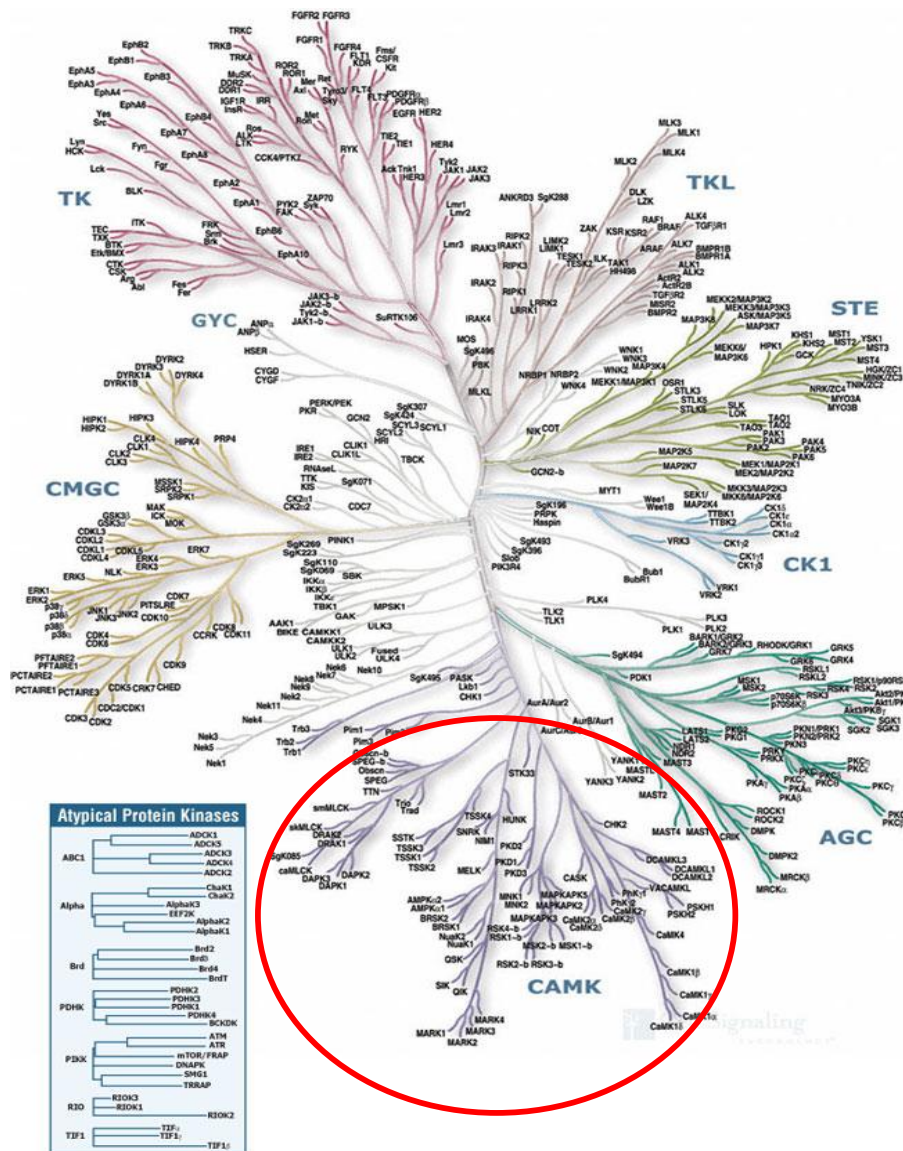


Figura 1. Kinoma humano y familias que lo conforman. Se han identificado más de 90 tirosina cinasas en el kinoma humano, de las cuales 38 son citoplasmáticas y se encuentran divididas en 10 subfamilias, 58 son tirosina cinasas receptoras, que están divididas en 20 subfamilias. (Tomado de Lacal J. 2006)

1.2 Estructura y activación de CaMKII

Cada una de las subunidades tiene un dominio catalítico en el extremo amino-terminal, seguido de un dominio de regulación que se sobrelapa con un dominio de unión a calcio/calmodulina y finalmente un dominio de asociación en el extremo carboxilo-terminal que es responsable de la multimerización (Figura 2) (Erickson, J.R, 2014). Es en este último dominio donde se ensamblarán las demás unidades para formar la holoenzima o asociará la holoenzima con otras proteínas posteriormente. Así la holoenzima estará formada por 8 a 12 unidades, organizada como una rueda alrededor del eje central que serán los dominios de asociación (Figura 3) (Taleisnik, 2006).

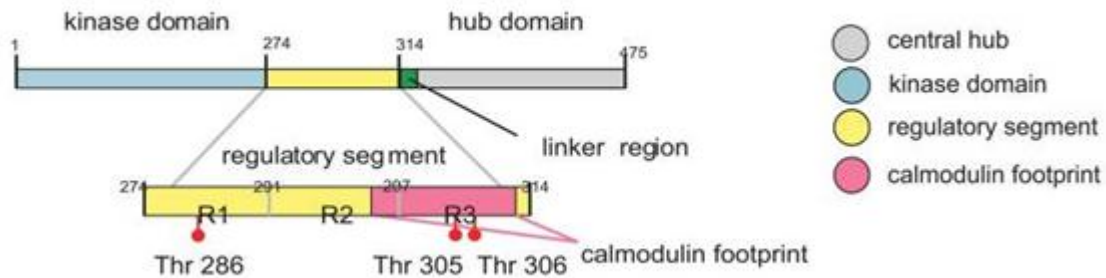


Figura 2. Estructura de las subunidades de CaMKII. Donde se muestra el dominio catalítico, seguido del dominio regulatorio donde ocurren las fosforilaciones de la Thr²⁸⁶ y Thr^{305/306}. Se muestra también el dominio de unión a calcio/calmodulina y por último el dominio de asociación (Tomado de Johannes W. H, 2014).

Como otras cinasas, el dominio catalítico de CaMKII tiene un sitio de unión a ATP que crea un microambiente que disminuye la energía requerida para hidrolizar el ATP mejorando así la tasa de transferencia del fosfato y del ATP hacia su sustrato, un residuo de serina/treonina y expulsando ADP (Erickson, J.R, 2014).

El dominio regulatorio de CaMKII tiene una región de unión a Ca²⁺/CaM y una región de autoinhibición. La región autoinhibitoria contiene la mayoría de los elementos que son críticos para la regulación de la actividad de CaMKII, incluyendo un segmento donde ocurren modificaciones postraduccionales como fosforilaciones,

N-acetil glucosilaciones, nitrosilaciones y oxidaciones que regulan la actividad biológica de esta enzima (Pellicena, P, 2014).

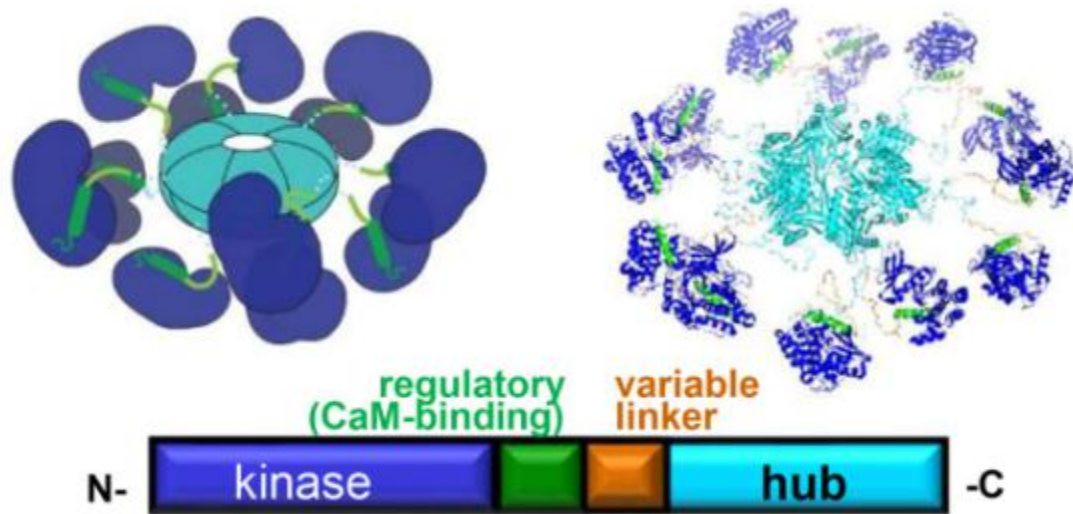


Figura 3. Estructura de la holoenzima de CaMKII. Se muestra la estructura de la holoenzima formada por 12 subunidades. Además de la secuencia de cada subunidad, donde se observa el dominio cinasa N-terminal de color azul, seguido por el dominio regulador de unión a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ de color verde. Posteriormente de color naranja se ve la región variable y el dominio de asociación C-terminal en color azul claro, el cual media la formación de la holoenzima (Tomado de Cook S, 2018).

Existen 4 diferentes genes de CaMKII y cada gen codifica una cinasa distinta (α , β , γ y δ). Estas isoformas pueden distinguirse por una secuencia de aminoácidos que se encuentra en la región variable, entre el dominio de regulación y el dominio de asociación (Shioda, 2015). Y de igual manera, cada uno de estos genes se somete a un splicing alternativo extensivo que produce un gran número de variantes de cada gen (Saddouk F, 2016).

Todas las isoformas de CaMKII aparentemente comparten mecanismos regulatorios y sustratos similares pero difieren en la distribución tisular (Wang Y.Y, 2015). Todas las isoformas pueden formar holoenzimas entre si sin preferencia específica de forma. Además todas las isoformas comparten una amplia homología (Cook S, 2018). Las cuatro isoformas se expresan en diferentes tejidos del cuerpo, δ y γ se expresan de manera ubicua en el cuerpo, mientras que la expresión de α y β se

restringe a sistema nervioso central, aunque la isoforma β también es expresada en páncreas y musculo esquelético (Cook S, 2018).

En condiciones basales, el dominio catalítico de la cinasa se encuentra unido al segmento autoinhibidor del dominio de regulación, provocando que CaMKII se encuentre inactiva (Johannes W. H, 2014). Así que cuando los niveles de calcio intracelular se elevan periódicamente, este se une a la calmodulina formando un complejo que se unirá al dominio de regulación activando un monómero de CaMKII (Wang Y.Y, 2015). De la misma forma esta unión provocará que el dominio de regulación libere al dominio catalítico. Y cuando $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se une a dos subunidades vecinas, puede producirse la autofosforilación en la Thr^{286} en el caso de $\text{CaMKII}\alpha$ y en la Thr^{287} en $\text{CaMKII}\beta$ y δ (Johannes W. H, 2014). Este proceso se ilustra en la Figura 4.

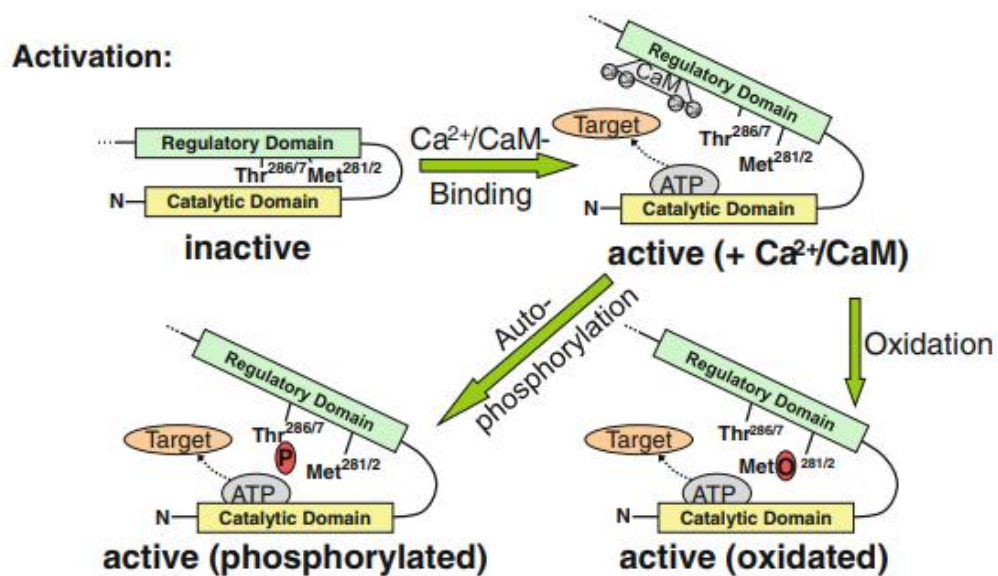


Figura 4. Activación de CaMKII por fosforilación y oxidación. La activación de la proteína comienza con la unión de calcio/ calmodulina al dominio regulatorio. Lo que deja expuestos los residuos $\text{Thr}^{286/287}$ que pueden ser fosforilados, al igual que los residuos $\text{Met}^{281/282}$ que pueden ser oxidados, activando así la cinasa (Tomado de Maier L, 2012).

La activación conduce a la fosforilación de las subunidades de CaMKII adyacentes en la Thr²⁸⁶ (para la isoforma α) o en la Thr²⁸⁷ (para la β , γ , y δ). La fosforilación de Thr²⁸⁷ tiene al menos dos efectos sobre CaMKII, que son que la afinidad de unión de la calmodulina por el dominio regulador de la CaMKII y aumente a más de 1000 veces y además, el grupo fosfato cargado negativamente en el sitio Thr²⁸⁷ impide la re-asociación de los dominios catalíticos y de regulación, evitando la autoinhibición incluso si los niveles de Ca²⁺ disminuyen y la calmodulina se disocia de CaMKII (Erickson J.R, 2014). Lo que conlleva a la persistencia de la actividad de cinasa de la proteína incluso cuando los niveles de Ca²⁺/ CaM disminuyan. A esto también se le llama actividad autónoma de calcio en CaMKII, que es significativamente menor a la actividad máxima (Johannes W. H, 2014). Por lo tanto la autofosforilación en la Thr^{286/287} puede usarse como indicador la de activación de CaMKII. Después de la disociación de Ca²⁺/ CaM, la proteína CaMKII permanece activa y se producen autofosforilaciones adicionales en Thr³⁰⁵, Thr³⁰⁶ y Ser³¹⁴ (Huang, B. 2014).

La fosforilación de la Thr³⁰⁶ en CaMKII α inhibe la unión de Ca²⁺/CaM por una interacción con la guanilato ciclasa, esto mismo ocurre con las demás isoformas en la Thr³⁰⁷. De igual manera la unión de Ca²⁺/CaM con Thr³⁰⁶ no fosforilada previene la fosforilación de este residuo que se encuentra dentro del dominio de unión a Ca²⁺/CaM (Rellos P, 2010).

Finalmente se ha observado que el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) regulan al alza la actividad de la CaMKII y a través de medios directos e indirectos (Erickson J.R, 2008).

1.3 Modificaciones post-traduccionales de CaMKII

Se denomina modificación post-traducciona a los cambios químicos de proteínas recién sintetizadas que se producen en péptidos y proteínas determinados (Koolman, J y Rohm K, 2005).

Las modificaciones post-traduccionales cambian las propiedades de una proteína, ya sea mediante escisión proteolítica o por adición de un grupo modificador en uno o más aminoácidos. Estas pueden determinar el estado de actividad, localización y renovación de las proteínas, además de interacciones con otras proteínas (Mann, M y Jensen, 2003).

CaMKII sufre diversas modificaciones, incluyendo la fosforilación que se produce sobre todo en los residuos de serina y treonina, (Koolman, J y Rohm K, 2005) la oxidación, la O-Glc-NAC, la nitrosilación y la S-nitrosilación (Rajtik, T, 2017) descritas en la Tabla 1.

La activación de la cinasa por medio de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ provoca la fosforilación de la Thr²⁸⁶ para la isoforma α y la fosforilación en la Thr²⁸⁷ para las demás isoformas. También se ha reportado que la fosforilación en la Thr^{305/306} tiene un impacto en CaMKII inhibiendo la unión de ésta con $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, sin embargo esta fosforilación debe estar precedida por la fosforilación en la Thr²⁸⁶ (Toussaint F, 2016).

Aunque se han identificado varios sitios de autofosforilación en los residuos de Ser²⁶, Thr²⁵⁴, Thr²⁶², Ser²⁸⁰, Ser³¹⁹ y la Ser³⁵⁰, hasta la fecha se desconoce su función (Yilmaz M, 2013). Sin embargo, la autofosforilación en la Thr²⁵³ se ha identificado en estudios *in vivo* y se cree es la responsable de la orientación de CaMKII hacia las densidades postsinápticas en las neuronas (Toussaint F, 2016).

Además de la fosforilación, CaMKII puede ser activada por la oxidación de residuos de metionina Met²⁸¹ y Met²⁸² independiente de calcio. (Maier L, 2012).

CaMKII es abundante en el sistema nervioso y tiene diversos papeles en donde las modificaciones post-traduccionales también tienen un papel clave. Por ejemplo, la autofosforilación de CaMKII en Thr²⁸⁶/ Thr²⁸⁷ estabilizan la localización de CaMKII en el sitio de densidad postsináptica (Shioda, 2015).

Sin embargo tanto las autofosforilaciones, como la oxidación de residuos de metionina y los mecanismos dependientes de ROS necesitan estar precedidas por la activación de una subunidad por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Toussaint F, 2016).

Además de las fosforilaciones, CaMKII puede sufrir desfosforilaciones como las provocadas por las proteínas fosfatasa PP1, PP2A y PP2C que en el caso de la Thr²⁸⁶/ Thr²⁸⁷ inactivan a la enzima. Por otro lado la desfosforilación por la proteína fosfatasa 1 (PP1) en la Ser³³² promueve en la isoforma CaMKII β 3 la translocación de la proteína al núcleo, en sistema nervioso. Entonces esta proteína fosforila distintos factores de transcripción como MeCP2 y CCAAT/potenciador, aumentando la expresión de BDNF, provocando la entrada de calcio por la despolarización a través de receptores de NMDA y promoviendo la autofosforilación de CaMKII δ 3 en Thr²⁸⁷ y de nuevo en la Ser³³² en el citosol (Maier L, 2012; Shioda, 2015).

En cambio, en CaMKII γ la desfosforilación en la Ser³³⁴ por calcineurina, que es una proteína fosfatasa, es la responsable de translocar la proteína a núcleo (Shioda, 2015).

Otra de estas modificaciones post-traduccionales es la O-GluNAcilación que es una reacción de glicación que ocurre en la Ser²⁷⁹ y activa a CaMKII en el dominio regulador. Esta modificación post-traducciona es reversible y lábil, y además compite con los eventos de fosforilación (Marcinkiewicz y Schaffer, 2015). Esta implicada en el aumento de la fuga de Ca^{2+} y un aumento en insuficiencia cardiaca (Bell J, 2015).

De igual manera CaMKII puede activarse a través de la S-nitrosilación de la Cys²⁷³ y Cys²⁹⁰ (Wang Y, 2015). Esta modificación consiste en la adición covalente de un grupo nitroxilo al grupo tiol de la cadena lateral de residuos de cisteína. Se sabe que esta modificación se encuentra implicada en procesos críticos del ciclo celular que incluye la transcripción y apoptosis (Guzmán L, 2015), procesos en los cuales se ha visto está implicada CaMKII.

Se ha sugerido que la S-nitrosilación es un mecanismo de regulación de señalización celular mediada por óxido nítrico.

Así también, se ha demostrado que el dominio regulador de CaMKII γ contiene un par de aminoácidos sensibles a oxido-reducción que son Cys²⁸⁰ y Met²⁸¹, en la isoforma α Met²⁸¹y Met²⁸², y en el β , γ , y delta, los cuales pueden ser oxidados cuando se exponen a niveles elevados de estrés oxidativo ROS. De la misma forma que la autofosforilación de la Thr²⁸⁷, la oxidación de Met²⁸¹ y Met²⁸² impide la reasociación de los dominios catalíticos y de regulación, incluso en ausencia de la unión de Ca²⁺/CaM. También la oxidación puede aumentar la sensibilidad de activación de la CaMKII γ por Ca²⁺/CaM y la abundancia de CaMKII γ con la Thr²⁸⁷ autofosforilada por inactivación de fosfatasas (Hanson, P.I, 1989).

Tabla 1. Modificaciones post-traduccionales de CaMKII.

Residuo	Modificación	Isoforma	Función	
Thr ²⁸⁶	Fosforilación	α	Activación Afinidad por CaM Impedir reasociación con dominio catalítico	
Thr ²⁸⁷		β, δ, γ		
Thr ³⁰⁵		α	Inhibir la unión de Ca ²⁺ /CaM	
Thr ³⁰⁶				
Thr ³⁰⁷		β, δ, γ		
Ser ²⁶	Autofosforilación	α, β, δ, γ	Desactivación de CaMKII	
Thr ²⁵⁴		β	Orientación de CaMKII a las densidades postsinápticas neuronales.	
Thr ²⁶²				
Ser ²⁸⁰				
Ser ³¹⁹				
Ser ³⁵⁰				
Ser ³³²		Desfosforilación	δ	Se requiere desfosforilación para translocarse a núcleo.
Ser ³³⁴			γ	
Met ²⁸¹	Oxidación	α, β, δ, γ	Evita reasociación con dominios catalíticos. Aumento de sensibilidad hacia Ca/CaM	
Met ²⁸²		β, δ, γ		
Cys ²⁸⁰		A		
Ser ²⁷⁹	O-Glc-NAC	α, β, δ, γ	Activación de CaMKII autónoma. Compite con la fosforilación	
Cys ²⁷³	Nitrosilación		Activación	
Cys ²⁹⁰				
Cys ²⁹⁸	S- nitrosilación	α	Actividad autónoma	

Se muestran las isoformas de CaMKII, y en que residuos ocurren las modificaciones post-traduccionales, además de la función que tienen en la proteína.

1.4 Efectos biológicos de CaMKII

CaMKII tiene una serie de propiedades bioquímicas que lo convierten en un transductor único de señales de calcio.

CaMKII es muy abundante en el sistema nervioso, incluyendo las neuronas sensoriales periféricas (Hongwei Y, 2015), ya que media formas de plasticidad sináptica bidireccional que ayudan en el proceso de aprendizaje, memoria y cognición (Cook S, 2018). Además, controla la liberación presináptica de neurotransmisores y la excitabilidad neuronal (Toussaint F, 2016).

En las neuronas, el Ca^{2+} juega un papel fundamental ya que controla las funciones neuronales básicas, donde se incluye la excitabilidad de la membrana y la transmisión sináptica. Por lo que CaMKII tiene una participación importante en estos procesos; por ejemplo, en neuronas sensoriales, la depresión dependiente del uso de la excitabilidad intrínseca de la membrana está mediada por la elevación de calcio (Hongwei Y, 2015).

De las cuatro isoformas de CaMKII que se han reportado, son la α y la β las que se expresan principalmente en el cerebro y sus niveles de expresión son diferentes en cada región cerebral, pero la isoforma α se expresa ampliamente en poblaciones post-sinápticas (Soderling T, 2000). Así que CaMKII se encuentra prácticamente en todos los compartimentos neuronales, especialmente en la densidad postsináptica (PSD) (Soderling T, 2000).

CaMKII tiene un papel clave en la señalización sináptica ya que ésta proteína fosforila y con esto regula el tráfico y la actividad de los receptores de neurotransmisores y los canales iónicos que median la excitabilidad neuronal. Procesos que tienen importancia en la memoria y el aprendizaje. Todo esto mediado por CaMKII (Hoelz, A., A.C. Nairn, y J. Kuriyan, 2003).

Por otro lado CaMKII también es esencial para la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP), provocando un aumento de larga duración en la eficiencia de la transmisión sináptica entre las neuronas (Rellos P, 2010), ya que tras la

estimulación sináptica, CaMKII se encarga de convertir las señales transitoria de Ca^{2+} en una respuesta sostenida de LTP (Toussaint F, 2016).

La regulación de LTP por CaMKII tiene dos objetivos principales, que son NMDAR y los receptores AMPA (Toussaint F, 2016). Se ha visto que ya activada, CaMKII fosforila el receptor AMPA nativo en células hipocámpicas cultivadas, lo que da como resultado la potenciación de la corriente mediada por el receptor AMPA en células completas (Soderling T, 2000). Esto puede dar como resultado un mecanismo general para la plasticidad sináptica en múltiples regiones del cerebro, aunque en algunos casos se requieren otras vías de señalización.

CaMKII también regula el tráfico y el ensamblaje de distintas proteínas involucradas en estos procesos, tales como las subunidades GluA2 dentro de AMPAR, y con esto se modula la permeación de Ca^{2+} en los canales. Los niveles de calcio intracelular están relacionados con la excitabilidad neuronal y por ello también se sugiere que CaMKII modula la afluencia del Ca^{2+} neuronal y por ende también la excitabilidad (Toussaint F, 2016), además de modular los canales AMPAR y NMDAR, CaMKII se encarga también de modular otros canales iónicos neuronales, como los canales de potasio. ya que estos canales son activados con Ca^{2+} , el cual se ve aumentado por CaMKII (Toussaint F, 2016).

Por su parte CaMKII β predomina en el desarrollo temprano del cerebro y se demostró que esta isoforma promueve la formación de filipodios y ramas neuríticas en el desarrollo de cultivos de neuronas en el hipocampo (Colbran R, Brown M, 2004).

En las neuronas del cerebro anterior la α -actinina, que es una proteína de unión a actina F, apoya la asociación de CaMKII con F-actina, esta asociación es necesaria para la actividad de CaMKII β en las neuronas (Johannes W. H, 2014). Además de esto, la unión con α -actinina al igual que Ca^{2+}/CaM , estimula la actividad de CaMKII pero en menor medida que Ca^{2+}/CaM y solo para ciertos sustratos (Johannes W. H, 2014).

En cambio, CaMKII α se expresa durante el desarrollo neuronal y estabiliza la estructura del árbol dendrítico. De la misma forma CaMKII parece regular la formación de sinapsis y espinas dendríticas (Colbran R, Brown M, 2004).

A pesar de que en cerebro se expresan ambas isoformas (α y β), ambas parecen tener funciones distintas, si recordamos lo explicado anteriormente, cada isoforma de CaMKII contiene un dominio catalítico en el extremo N-terminal, seguido por un dominio de regulación con un sitio de unión a Ca²⁺/CaM, además de una región variable un dominio de asociación en el extremo C-terminal. En cada isoforma la región variable está sujeta a un corte y empalme alternativo diferente en las cuatro isoformas de CaMKII, esta región puede afectar la regulación y orientación subcelular. Es en esta región donde CaMKII α y CaMKII β son diferentes. Por ejemplo: es en esta región donde CaMKII β media la unión con F-actinina. Algo que no ocurre con CaMKII α (Cook S, 2018).

En el corazón, CaMKII se activa por el aumento de Ca²⁺. Donde CaM intracelular se unirá a cuatro iones de calcio y este complejo Ca²⁺/CaM será el que se una al dominio regulador de CaMKII, desplazando al dominio inhibitorio y activando la enzima. Allí CaMKII fosforila numerosas proteínas diana que se encuentran implicadas en la afluencia de Ca²⁺ y otros procesos del cardiomiocito (Grandi E, 2014).

De igual manera se ha identificado a CaMKII como un regulador de expresión génica de las HDAC'S, de la misma forma se ha demostrado que regula la dinámica intracelular de Ca²⁺, aunque también se le ha implicado en la arritmia cardíaca y la hipertrofia (Toussaint F, 2016).

En este contexto CaMKII está involucrada en el acoplamiento de excitación-contracción (ECC) y en el acoplamiento excitación-transcripción (ETC). El primero comienza por un aumento de Ca²⁺ intracelular durante el potencial de acción, que activara los miofilos que conducen a la contracción (Maier L, 2012).

De las cuatro isoforma que existen, CaMKII δ es la que principalmente se expresa en el corazón, aunque no es la única. En el sistema circulatorio, CaMKII δ es

necesario para la homeostasis de calcio en el corazón, además de regular la acción de los cardiomiocitos. En este contexto, CaMKII regula esto mediante la modulación de los canales $Ca_v 1.2$ y la corriente de calcio asociada. Y además de la afluencia de calcio, CaMKII modula la liberación de calcio desde las reservas intracelulares (Maier L, 2012; Meng, 2014; Toussaint F, 2016).

Así que en el corazón, CaMKII se encarga de fosforilar directamente los canales de Ca^{2+} o sus proteínas accesorias, regulando con esto tanto la homeostasis de Ca^{2+} como la dinámica de los eventos transitorios de señalización de Ca^{2+} (Toussaint F, 2016).

Aunque también se ha demostrado que la actividad de CaMKII autónoma de CaM por la autofosforilación conduce a la apoptosis, acoplamiento de excitación-contracción defectuoso e insuficiencia cardíaca, CaMKII juega un papel fundamental en la regulación de los canales iónicos del miocardio, promoviendo la muerte celular, la hipertrofia cardíaca y la disfunción miocárdica. Esto en gran parte, por la activación de las vías de señalización hipertróficas del factor 2 potenciador de miocitos en el miocardio. Además la expresión y actividad de CaMKII aumenta en corazones humanos que fallan, ya que ésta relacionada con la remodelación patológica del miocardio y la regulación de proteínas clave implicadas en el acoplamiento y excitación-contracción cardíaca. Por lo que se ha observado una mayor actividad de CaMKII en pacientes con cardiopatía estructural y arritmias. En estos casos la duración prolongada del potencial de acción conduce a la hiperactivación de CaMKII y la insuficiencia cardíaca (Swaminathan P, 2011; Rellos P, 2010).

La actividad de CaMKII dependiente de la oxidación juega un papel crítico en numerosos procesos patológicos del corazón. Por ejemplo, cuando CaMKII es oxidado, la vía de señalización renina-angiotensina-aldosterona promueve mayor estrés oxidativo en el corazón (Erickson, J.R, 2014). Los niveles elevados de aldosterona circulante aumentan la oxidación de CaMKII, lo que ocasiona apoptosis, deterioro de la función cardíaca y posible ruptura cardíaca. Sin embargo la activación de CaMKII por Redox, mejora la remodelación eléctrica en el corazón y

la apoptosis de células nodales y todas ellas contribuyen a arritmias potencialmente mortales (Erickson, J.R, 2014).

En el corazón, CaMKII también tiene un papel en el control de la expresión génica, que se produce a través de la fosforilación de la histona deacetilasa (HDAC) en cardiomiocitos y otro tipo de células, lo que estimula la exportación de HDAC del núcleo, lo que permite la expresión génica. Sin embargo este proceso también está involucrado en la hipertrofia cardíaca inducida por CaMKII (Toussaint F, 2016).

En el músculo liso vascularizado (VSM) se ha identificado la presencia de holoenzimas de CaMKII, específicamente CaMKII δ y CaMKII γ . En estudios *in vitro* se ha observado que CaMKII δ regula positivamente la proliferación y migración de células VSM, en cambio, estudios *in vivo* muestran que CaMKII δ es importante para promover la remodelación de la pared vascular inducida por lesión. En resumen, CaMKII desempeña un papel crítico en la regulación de la presión arterial a través de estos mecanismos (Saddouk F, 2016; Maione A, 2017).

Sin embargo, estudios han demostrado que CaMKII puede tener un papel importante en la aterosclerosis, ya que se expresa en células del músculo liso vascular (VSMC), regulando la proliferación de éstas, además en macrófagos CaMKII regula la diapédesis, infiltración y liberación de enzimas de la matriz extracelular, llevando a el desarrollo de la enfermedad (Maione A, 2017).

Como se dijo anteriormente CaMKII se expresa en diversos órganos y compartimentos del cuerpo humano. Otro ejemplo es CaMKII en su isoforma γ , que se presenta en el hígado, donde se sabe que CaMKII afecta los niveles de glucosa en plasma, la conversión de piruvato en glucosa y la expresión del metabolismo de la glucosa hepática (Ozcan L, 2012).

Por otro lado, se ha demostrado que CaMKII también se ve implicado en la regulación del ciclo celular, en especial la desfosforilación de la Thr²⁵³, que es esencial para la progresión de metafase a anafase en la mitosis. De igual manera, la proliferación celular está controlada por todas las isoformas de CaMKII (Hoffman, A, 2014).

Se ha demostrado que CaMKII es un componente del aparato mitótico y es esencial para la duplicación del centrosoma inicial. CaMKII tiene diferentes papeles durante todo el proceso mitótico, durante la interfase, se localiza difusamente en el citoplasma y núcleo. Durante la metafase, CaMKII se encuentra asociado en el eje de los polos, y en la transición de metafase-anafase, se encuentra en los centrosomas y entre los polos del huso. Posteriormente después de a anafase, CaMKII se transloca al área de separación de los cromosomas (Skelding K, 2011).

Se ha analizado el papel de CaMKII en todas las fases del ciclo celular y se ha encontrado que en la fase S el papel de la cinasa es más bien débil. Sin embargo, la función de CaMKII es esencial para la progresión de G₂ a M, ya que se ha demostrado que existe una sobreexpresión de CaMKII, también se observa un incremento en la división celular. De la misma manera se encontró que CaMKII es necesaria para la transición de metafase a anafase (Skelding K, 2011).

El factor promotor de mitosis (MPF) es clave en la transición de G₂/M. Durante la interfase es un complejo formado por Cdk1 y ciclina B1, este complejo es inhibido por la fosforilación de Cdk1 en dos sitios de fosforilación. Estas son revertidas por Cdc25c provocando la activación de MPF y la mitosis. Por su parte Cdc25c es inhibido por CaMKII, por lo que la cinasa actúa como un inhibidor de la mitosis. Pero al mismo tiempo Cdc25c puede ser activado por una fosforilación, y es CaMKII la que es responsable también de este fenómeno, así que CaMKII actúa como un regulador de la mitosis (Skelding K, 2011).

Se ha demostrado que existen muchas proteínas que son sustratos de CaMKII, entre ellas se encuentran factores de transcripción como CREB, ATF y CEBP β , las actividades de transcripción de estos están reguladas a través de la fosforilación de residuos específicos de serina. Por ejemplo, CaMKII también fosforila a STAT1 en la Ser⁷²⁷, ya fosforilada STAT1 transloca a núcleo, se une a secuencias de DNA específicas y activan la transcripción de genes relacionados. (Nair J, 2002).

En el sistema inmune, son importantes los receptores tipo Toll y su activación es esencial para provocar la respuesta inmune innata y mejorar la inmunidad adaptativa contra patógenos invasores. Estos receptores están implicados con

CaMKII. Primero los ligandos de los receptores TLR 4, 9 y 3 inducen flujos de calcio intracelulares, este flujo activara a CaMKII α en macrófagos promoviendo la citosina dependiente de MyD88 y CaMKII fosforilará TAK1 y IFN (Lin X, 2008).

De la misma forma CaMKII mejora la producción de TNF- α inducida por el factor activador de plaquetas y por LPS (Lin X, 2008).

También se ha demostrado que la inhibición de CaMKII suprime la producción de IL-6, TNF- α y IFN- α/β en macrófagos que es desencadenado por TLR 4, 9 y 3. Del mismo modo se demostró que la sobreexpresión de CaMKII α activa y aumenta los niveles de IL-6, TNF- α y IFN- α/β (Lin X, 2008).

Por otro lado CaMKII γ es necesario en el sistema inmune para la memoria de las células T y la activación de las células T CD8+ (Meng, 2014).

De igual manera CaMKII se ve implicado en la regulación de otros procesos biológicos, como la fertilización, la diferenciación osteogénica, el mantenimiento del tono vascular (Skelding K, 2011).

1.5 Papel de CaMKII en el desarrollo del cáncer

En los últimos años se ha investigado el rol de CaMKII en el cáncer. Por ejemplo, se han identificado en células de neuroblastoma humano diferentes isoformas de CaMKII. Además se sugiere que en algún momento de la tumorigénesis neuronal CaMKII α se “apaga” y aparecen nuevas variantes de CaMKII. Por lo que todas las isoformas de CaMKII pueden verse implicadas en el desarrollo del cáncer. Otro ejemplo es el cáncer de próstata, donde se ha identificado que CaMKII β , δ y γ se ven implicados, promoviendo la resistencia a la apoptosis de las células cancerígenas (Rokhlin O, 2007).

Sin embargo algunos estudios han implicado específicamente a CaMKII γ como un elemento importante en la proliferación de células cancerosas. En uno de ellos la inhibición farmacológica de CaMKII γ en las células de osteosarcoma humano 143B con inhibidores químicos de CaMKII γ como el MG-63 y KN-93, resultó en una disminución del 80 y el 70% en la proliferación, respectivamente (Wang, Y.Y, 2015).

También se ha demostrado que la administración *in vivo* de KN-93, que es un inhibidor de CaMKII, a ratones xenoinjertados con células de osteosarcoma humano redujeron significativamente el crecimiento del tumor intratibial y subcutáneo. Finalmente, el efecto de la inhibición de CaMKII se asoció con un aumento de la expresión de genes y niveles de proteína de p21cip/KIP, y la disminución de la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (Rb), y el transactivador E2F (Wang, Y.Y, 2015).

Por otro lado en las células normales y neoplásicas linfoides B, la supresión de CaMKII impidió la producción excesiva del factor activador de célula B perteneciente a la familia del TNF (BAFF). Al parecer BAFF humano soluble media la proliferación celular y la supervivencia es dependiente de Ca²⁺ y CaMKII (Liang, D, 2014). En la leucemia mieloide crónica (LMC), la proliferación celular depende específicamente de la activación de las isoformas CaMKII. (Wang, Y.Y, 2015)

Las células de LMC que se someten a diferenciación terminal o inhibición del crecimiento muestran una marcada reducción de la autofosforilación de CaMKII. La inhibición de la CaMKII resultó en la supresión de la proliferación de células de leucemia mieloide (Wang, Y.Y, 2015). La inhibición farmacológica de CaMKII afecta negativamente múltiples vías de señalización, incluyendo la vía de las MAPK, Stat3/Stat5, y GSK3/ β -catenina. CaMKII suprime la expresión de CaMKIV para promover la proliferación de células de leucemia (Si, J. and S.J. Collins, 2018).

Al mismo tiempo CaMKII se ha involucrado en diferentes vías de señalización, como la activación de NF- κ B, la fosforilación de IKK β , regulación de Erk1/2, Akt1, Stat3 y β -catenina. Sin embargo, los efectos biológicos de CaMKII dependen de los sitios fosforilados, Hoffman *et al* demostraron que la fosforilación en la Thr²⁸⁶ promueve la proliferación de células de neuroblastoma, mientras que la sobreexpresión de un mutante fosfomimético en el residuo de Thr²⁵³ redujo significativamente las tasas de proliferación en estas células (Hoffman A, 2014).

De la misma forma recientemente se ha asociado que la fosforilación de CaMKII en la Thr²⁸⁶ puede controlar procesos implicados en la tumogénesis y progresión del cáncer de mama. Esto debido a que el aumento de la expresión de CaMKII y la

fosforilación de la Thr²⁸⁶ indican menor supervivencia libre de metástasis en pacientes con cáncer de mama. De igual modo la inhibición farmacológica de esta fosforilación demostró *in vitro* prevenir la migración e invasión de células de cáncer de mama. Esto sugiere que dicha fosforilación controla la migración e invasión de células de cáncer de mama (Chi M, 2016).

Además de esto, en las células cancerosas, la remodelación de la señalización de Ca²⁺ ayuda a mantener las características del cáncer. Por lo que CaMKII tiene una participación crítica en la progresión del cáncer (Chen X, 2018).

El papel de CaMKII ha sido ampliamente estudiado en cerebro y corazón, sobre todo en CaMKII α y CaMKII β . Sin embargo existen pocos trabajos que describan a CaMKII γ . En los últimos años se ha descrito que esta cinasa tiene importancia en el ciclo celular y la proliferación celular además de que puede tener implicaciones en el cáncer, pero el cómo lo hace es aún desconocido. Por lo que el estudio específico de CaMKII γ es necesario.

1.6 Fundamentos de métodos a usar

1.6.1 Transformación en bacterias competentes

Este método se basa en provocar que DNA exógeno pase a ser parte del material genético de la bacteria, logrando que pueda ser heredado por las nuevas células cada vez que la bacteria se multiplique.

Se utilizan bacterias que son llamadas competentes, ya que presentan condiciones fisiológicas especiales, logrando que la bacteria sea adecuada para recibir DNA exógeno.

La cepa de *E. coli* DH5 α se destaca por contener la mutación recA1 que proporciona alta estabilidad de inserción del DNA exógeno, además de presentar alto rendimiento y calidad de DNA gracias a la mutación endA.

La cepa XL10 gold se recomienda para clonajes difíciles ya que aumenta la transformación de DNA de gran tamaño. Sin embargo, es una cepa deficiente en endonucleasas y sistemas de restricción.

1.6.2 Extracción por lisis alcalina del plásmido

Este método se basa en la lisis de las bacterias por medio de soluciones alcalinas, destruyendo el DNA cromosomal y dejando solo los plásmidos por ser pequeños. Este lisado es neutralizado posteriormente para crear las condiciones apropiadas para unir el DNA plásmidico a una membrana de sílica en una columna (Figura 4). Los restos celulares y el SDS precipitarán por centrifugación formando un pellet y el sobrenadante con el DNA plásmidico pasará por la columna, posteriormente se lava el DNA adsorbido y éste es eluido (Birnboim H, 1979).

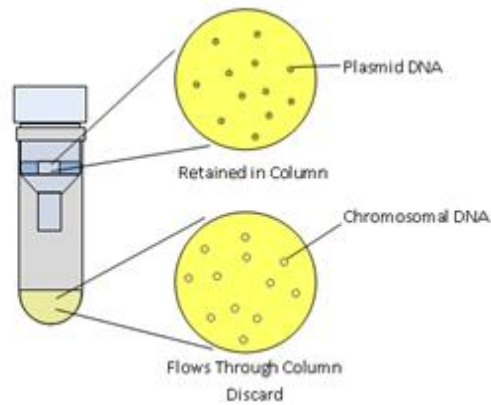


Figura 5. Columna con membrana de sílica utilizada para lisis alcalina. Se muestra un ejemplo de columna y la región donde es atrapado el DNA plásmidico en la columna (University of Queensland, 2018).

1.6.3 Amplificación por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa amplifica una secuencia específica de DNA a partir de una mezcla compleja. Esta reacción depende de la capacidad de desnaturalizar alternativamente moléculas de DNA de doble cadena por calor (90-94° C) y posteriormente bajar la temperatura para que los extremos 3' de las hebras se apareen con los oligonucleótidos específicos del segmento de DNA que se desea amplificar.

Para el siguiente paso se utiliza una polimerasa resistente a la desnaturalización por calor. La polimerasa Taq extiende los extremos 3' de los oligonucleótidos utilizando las hebras del ADN bicatenario como plantilla.

Una última desnaturalización pone fin a un ciclo y da comienzo al siguiente. Un ciclo se repite típicamente de 20-50 veces (Lodish, 2005). Esto se ilustra en la figura 5.

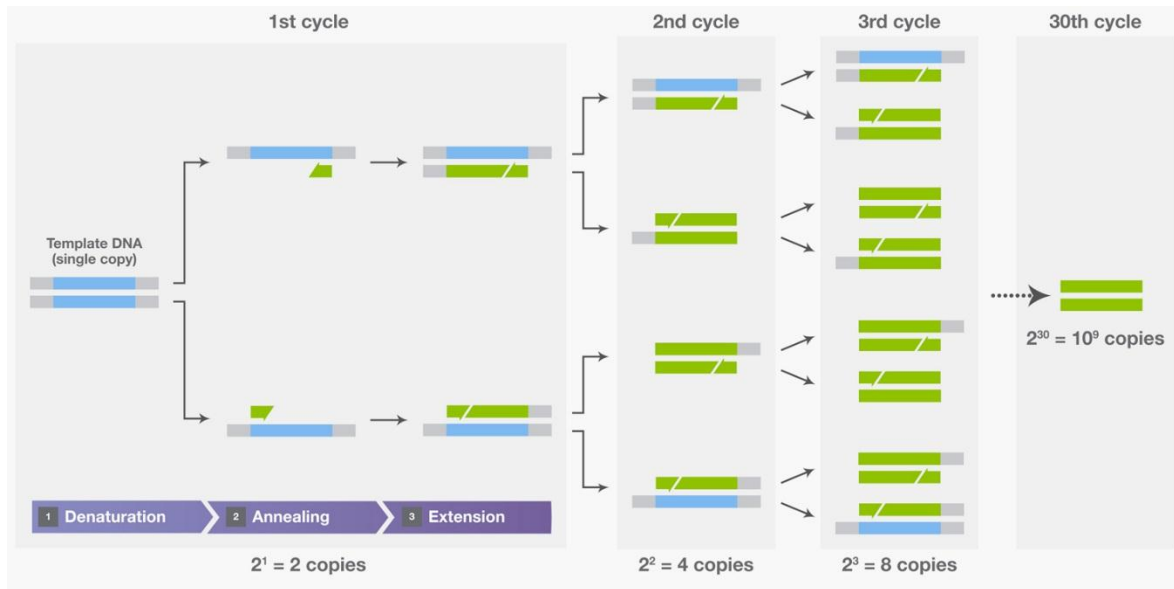


Figura 6. Pasos de una reacción de PCR. En el primer ciclo se muestra la desnaturalización, el alineamiento y la extensión, la amplificación exponencial del DNA se muestra al avanzar los ciclos. (Thermo Fisher Scientific, 2018)

1.6.4 Ensayo de restricción

Este ensayo se basa en el uso de enzimas de restricción, las cuales reconocen secuencias específicas en el DNA, éstas también son conocidas como endonucleasas y cortan los enlaces fosfodiéster a partir de una secuencia que reconocen, esta secuencia es palindrómica.

Las enzimas de restricción pueden producir dos tipos de corte, que son los extremos cohesivos que cortan de manera escalonada en dos puntos diferentes y los extremos romos, que cortan en un solo punto de la secuencia. (Valenzuela, 2017)

Fuente	Enzima de restricción	Sitio de reconocimiento y corte
<i>Bacillus myloliquefaciens</i>	BamHI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'GGATCC 3' \\ 3'CCTAGG 5' \\ \uparrow \end{array}$
<i>Haeophilis influenzae</i>	HindIII	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'AAGCTT 3' \\ 3'TTCGAA 5' \\ \uparrow \end{array}$

Figura 7. Enzimas de restricción BamHI y HindIII. Se muestra la fuente de cada enzima y los sitios de corte donde actúa.

1.6.5 Transfección del vector- proteína por lipofección.

Esta técnica se basa en la formación de varios complejos entre lípidos catiónicos y DNA. Este complejo que por carga tiene afinidad a la membrana permitirá que el DNA exógeno entre al citosol. Se le considera una transfección transitoria o temporal (Alberts, 2002).

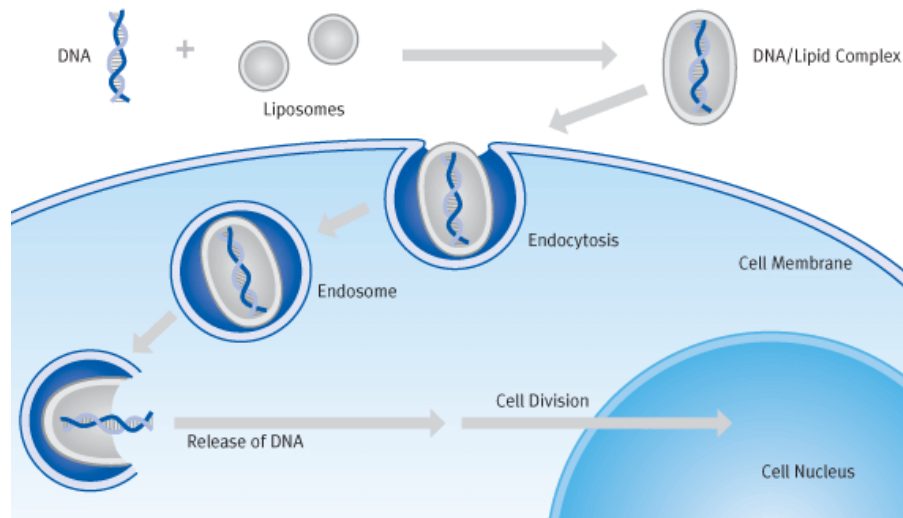


Figura 8. Mecanismo de transfección por lipofección. Se muestran los pasos de la lipofección desde que el DNA exógeno entra a la célula (Biotex Laboratories, 2016).

1.6.6 Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos y SDS-PAGE para proteínas.

La electroforesis en geles de agarosa se considera el método estándar para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA, donde la agarosa funcionará como un filtro en el que los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente que aquellos de mayor tamaño.

Esta técnica se basa en la combinación de fuerzas eléctricas y de fricción, las cuales permitirán el desplazamiento y separación en función del tamaño de las moléculas de DNA, por lo que al ser sometido a un campo eléctrico, la carga neta negativa del DNA hará que éstos se muevan en dirección al ánodo (Fierro, 2015).

En cambio, para separar proteínas se utiliza la electroforesis SDS-PAGE, donde se utilizan geles de poliacrilamida junto con la presencia del detergente aniónico como el dodecilsulfato sódico. Este gel se prepara vertical y sigue el mismo fundamento

de cargas, pero en este las proteínas tendrán su separación de acuerdo con la masa molecular, es decir, con la longitud de la cadena polipeptídica de la proteína.

1.6.7 Inmunoelctrotransferencia y revelado de la proteína (Western Blot).

Esta técnica se basa en transferir las proteínas separadas por electroforesis SDS-PAGE del gel de poliacrilamida a una membrana, en éste caso PVDF, siendo éstas una copia exacta del gel. (Kurien, 2006)

Esta membrana posteriormente es incubada con dos anticuerpos; el anticuerpo primario que se une específicamente a las proteínas de la membrana, y el anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario, éste anticuerpo secundario esta conjugado con una enzima como la fosfatasa alcalina (AP) o la peroxidasa de rábano picante (HRP). Una vez terminado el tiempo de incubación, se añade un fluoróforo, el cual emitirá una luz que nosotros vemos en forma de bandas las cuales corresponden a las proteínas, éste método se ilustra en la figura 8 (Kurien, 2006). Esta luz ocurre por quimioluminiscencia, la cual sucede cuando un sustrato químico es catalizado por una enzima y se produce luz como un subproducto, ésta señal luminosa se puede capturar en una película de rayos X o por un dispositivo de imágenes de carga acoplada.

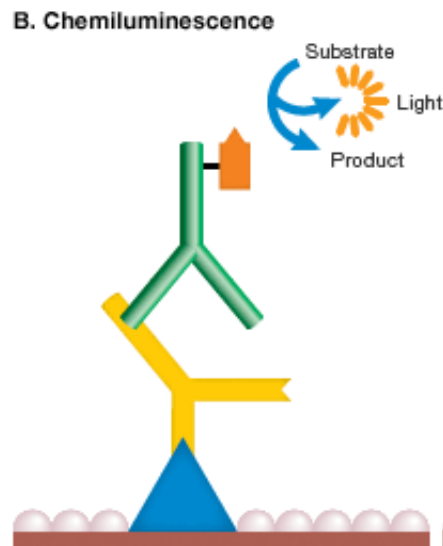


Figura 9. Método de detección de Western Blot por quimioluminiscencia. Se genera una señal detectable después de la unión de un anticuerpo específico para la proteína de interés (Bio-Rad Laboratories, 2018)

2. JUSTIFICACIÓN

La proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina II tiene un papel crítico en varias funciones celulares, sin embargo los mecanismos moleculares asociados a éstas aún no han sido dilucidados Estudios recientes sugieren que los niveles altos de CaMKII son expresados en diversas enfermedades malignas, así que se genera la necesidad de estudiar a fondo las funciones biológicas asociadas al cáncer reguladas por CaMKII, para contestar estas preguntas se plantea generar algunas herramientas moleculares para generar respuestas específicas. Una de estas es una construcción plasmidica con la información genética que codifica para la proteína CaMKII con bandera de GFP en el extremo amino terminal que permita rastrear la proteína en un contexto celular.

3. OBJETIVO GENERAL

Mediante técnicas de biología molecular clonar el gen que codifica para CaMKII γ con una bandera de GFP en una versión silvestre como herramienta para el estudio de esta cinasa.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar extracción y purificación de plásmido EGFP-C1
- Realizar caracterización y corte de plásmido EGFP-C1
- Amplificar por PCR el ORF de CaMKII γ
- Realizar una construcción del plásmido EGFP-CaMKII γ por sistema de clonación In-Fusion.
- Comprobar la expresión de la proteína en la línea celular HEK293T mediante microscopia de fluorescencia y Western Blot.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo celular

a) HEK293T

La línea celular HEK293T de riñón embrionario humano contiene el antígeno T SV40. Fueron cultivadas en medio DMEM (GIBCO) adicionado de suero fetal bovino (GIBCO) al 10%, 2mM de L-glutamina (GIBCO) y 1X de penicilina-estreptomicina (10,000U/mL, BIOWEST). En una atmosfera de 5% CO₂, 95% aire y una temperatura de 37°C.

5.2 Transformación en bacterias competentes

La replicación del plásmido pEGFP-C1 se realizó en bacterias competentes *E.coli* DH5 α , agregando aproximadamente 100ng del plásmido a las bacterias e incubando en hielo por 30 minutos, posteriormente se sometieron a un choque térmico (42°C por dos minutos y 3 minutos en hielo).

Se agregó 1mL de medio LB y se incubo a 37°C en agitación por 1 hora antes de sembrar en una placa con agar LB + Kanamicina 30 μ g/ μ L. Y se dejaron crecer a 37°C toda la noche.

5.3 Extracción por lisis alcalina del plásmido pEGFP-C1 (MINIPREP)

De las colonias positivas, se seleccionaron y aislaron 2, las cuales se crecieron en 5 mL de medio LB liquido con Kanamicina 30 μ g/ μ L por 16 horas a 37°C en agitación constante para extraer el DNA plásmidico.

Para esto fue utilizado el kit GenJet Plasmid Miniprep (Thermo), de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor las bacterias fueron empastilladas en tubos eppendorf de 1.5 mL por centrifugación a 13,500 rpm durante dos minutos, descartando el sobrenadante.

El pellet fue re-suspendido en 250 μ L de buffer de re-suspensión, el cual contiene RNasa. Se agitó en vortex y posteriormente se lisaron las bacterias con 250 μ L de buffer de lisis, que contiene NaOH y SDS, este último permite la solubilización de los fosfolípidos de la pared celular bacteriana, permitiendo la lisis y liberación del DNA cromosomal bacteriano y la liberación íntegra del plásmido en el sobrenadante.

Posteriormente se añadieron 350 μ L de buffer de neutralización, se mezcló el tubo y se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

El plásmido contenido en el sobrenadante se agregó directamente en la columna para su purificación y se centrifugó a 13,500rpm por 1 minuto para remover el líquido remanente. Después se agrega 500 μ L de solución de lavado a la columna para eliminar el exceso de detergente de la muestra y se centrifugó con las condiciones anteriores.

La columna se centrifugó por un minuto adicional. Finalmente se añadieron 50 μ L de buffer de elusión, incubando a temperatura ambiente por 2 minutos. La integridad del plásmido fue evaluada por electroforesis cargando 100 ng de éste en un gel de agarosa al 0.8%.

5.4 Determinación de la concentración del plásmido pEGFP-C1

La concentración del DNA plásmidico fue determinada mediante espectrofotometría por equipo EPOCH BIOTEK. Usando 1 μ L de buffer de elusión como blanco y 1 μ L de la muestra de plásmido.

5.5 Amplificación por PCR del ORF de CaMKII γ

Se diseñaron los oligonucleótidos específicos para amplificar el gen que codifica a la proteína CaMKII γ , obteniendo “forward” CaMKII γ HindIII 5´GGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGATGGCCACCACCGCCACCTG3´ y “reverse” CaMKII γ BamHI 5´CAGTTATCTAGATCCGGTGGATCCTCACTGCAGCGGTGCGGCAG3´ (Anexo B) Para amplificar este fragmento se emplearon los siguientes reactivos:

Oligonucleótidos	0.35 μ M
KAPA HiFi Hotstart (KAPABIOYSTEMS)	1U
KAPA HiFi Buffer	1X
KAPA dNTPs mix	10mM
pDONOR CaMKII γ	10ng
Volumen final	25 μ L

La reacción de PCR fue llevada a un volumen final de 25 μ L y sometida a las siguientes condiciones:

Tabla 2. Condiciones de PCR

1 ciclo	Desnaturalización	95°C	3 minutos
35 ciclos	Desnaturalización	98°C	20 segundos
	Alineamiento	65°C	15 segundos
	Extensión	72°C	90 segundos
	Extensión final	72°C	1.7 min
	Reacción mantenida	4°C	∞

Para corroborar la amplificación del fragmento, el producto de PCR se resolvió en un gel de agarosa a 0.8% por 30 minutos a 100mV en buffer TAE a 0.5X teñido con bromuro de etidio, y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

5.6 Ensayo de restricción plásmido pEGFP-C1

Se realizó una digestión en dos pasos del plásmido pEGFP-C, primero con la enzima de restricción BamHI en una reacción donde se colocaron 2 μ g del plásmido con 10 U de BamHI y Buffer BamHI 10X, ajustando a un volumen final de 50 μ L por dos horas a 37°C. La restricción del fragmento se corroboró por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, se purificó y posteriormente se realizó una segunda digestión con HindIII colocando 43 μ L del plásmido con 10U de HindIII y Buffer R 10X ajustando el volumen final a 50 μ L, se incubó por una hora a 37°C.

El producto obtenido se purificó agregando "Binding Buffer" del kit "GeneJet Genomic DNA Purification Kit", posteriormente se pasó por la columna de purificación "GeneJet", se agregó buffer de lavado que posteriormente se retiró y se centrifugó en seco a 13,500 rpm por 2 minutos y finalmente se agregó buffer de elusión para recuperar el producto y se cuantificó.

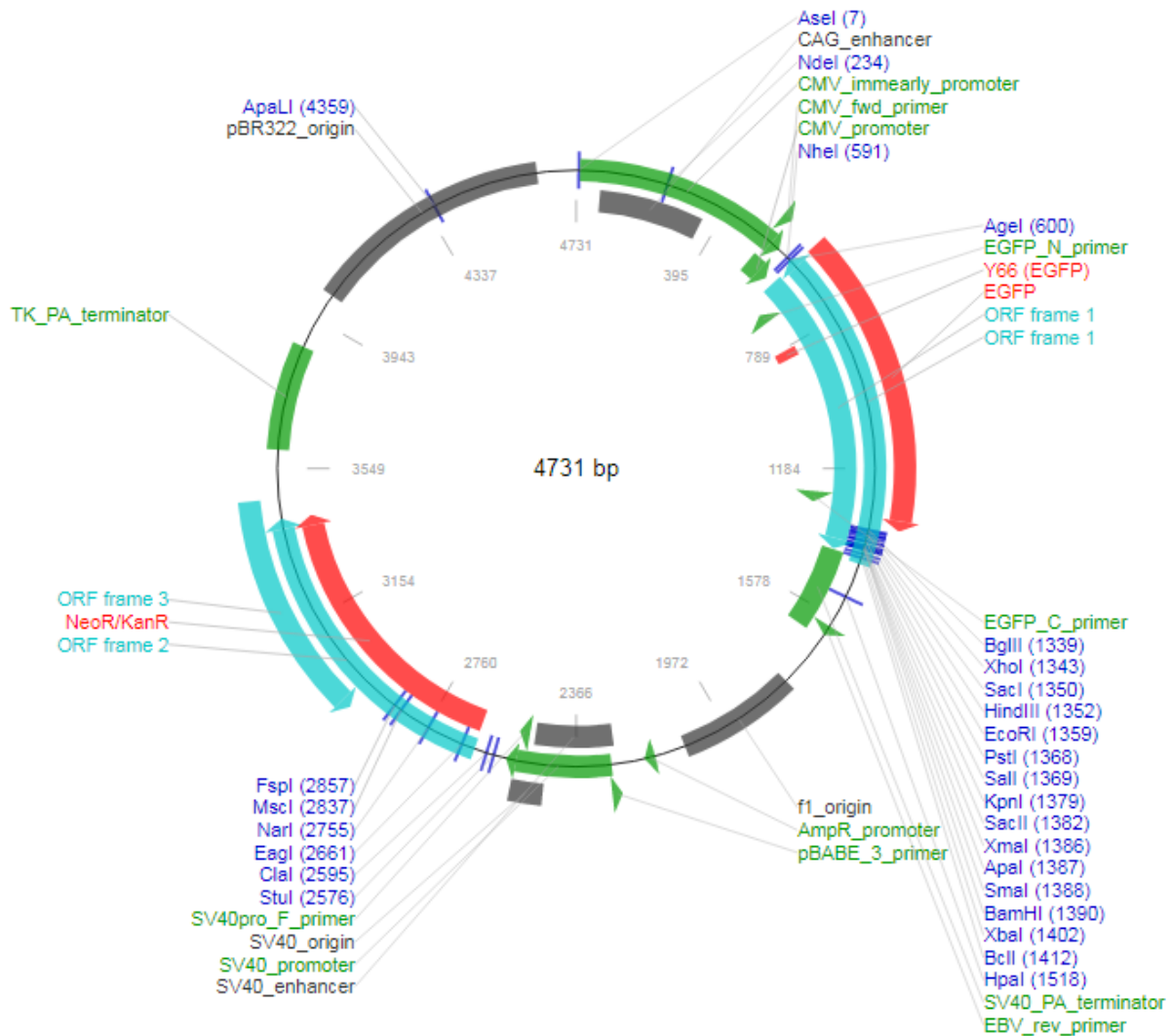


Figura 10. Estructura del plásmido EGFP-C1. Se señalan los sitios de corte que reconocen BamHI y HindIII (Addgene, 2018).

5.7 Clonación de CaMKII γ en el vector pEGFP-C1 por medio de In-Fusion HD Cloning Kit.

Para comprobar la cantidad de pEGFP-C1 de CaMKII γ se realizó una electroforesis en relación 1:3 respectivamente en un gel de agarosa al 0.8%.

Para clonar CaMKII γ se utilizó el kit “In-Fusion HD Cloning kit”, para el cual es necesario que el producto de PCR de CaMKII γ tenga 15 pb homologas de pEGFP-

C1 en los extremos, por lo que oligonucleótidos utilizados fueron diseñados de esta manera.

Se realizó la reacción de clonación colocando 63 ng de fragmento de PCR de CaMKII γ con 85 ng del vector linealizado de pEGFP-C1 y “In-Fusion HD Enzyme premix 5X” ajustando a un volumen final de 10 μ L con agua destilada. La reacción se incubó a 50°C por 15 minutos.

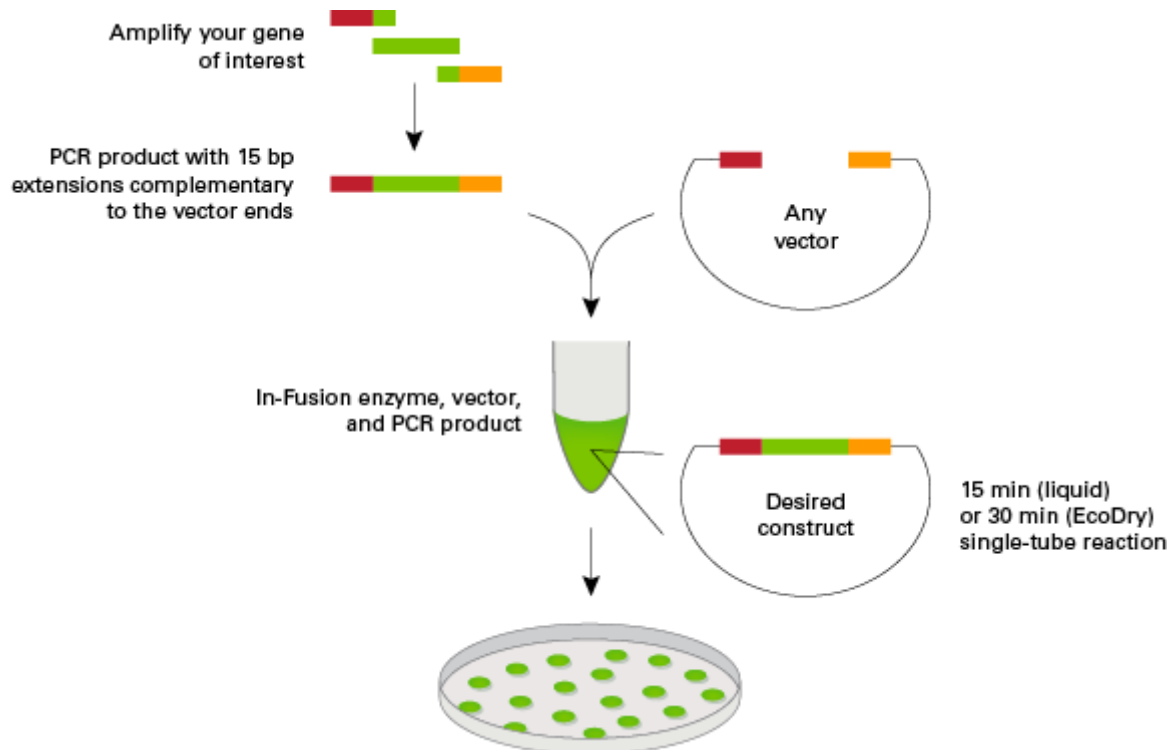


Figura 11. Protocolo de In-Fusion HD. Resumen general del protocolo utilizado para los kits de clonación In-Fusion HD (Takara Bio USA. 2016).

Se transformó en 50 μ L de células competentes DH5 α y “XL10 gold” usando en cada una 2.5 μ L del producto de la reacción. Se tomó parte de las colonias y se realizó MINIPREP de cada una de ellas y se cuantificó.

Posteriormente el plásmido se separó en un gel de agarosa al 0.8% para evaluar su integridad y se digirió en dos pasos con BamHI y HindIII comprobando la liberación del inserto y la construcción del plásmido por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

5.8 Secuenciación del vector pEGFP-CaMKII γ

El plásmido purificado fue secuenciado. Las muestras fueron enviadas a UBIPRO en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, donde se realizó una secuenciación por el método enzimático de Sanger.

5.9 Transfección de pEGFP-CaMKII γ

El DNA purificado se transfectó en células HEK293T usando el método de lipofección, bajo el siguiente protocolo: se colocaron 150,000 células (90% confluencia) por pozo en una placa de 12 pozos y se transfectó con 4 μ L de Lipofectamina LTX reagent (Invitrogen) que fue diluida en 60 μ L de Opti-MEM (GIBCO) y combinado con 1.5 μ g de plásmido (pEGFP-CaMKII γ) diluido con 350 μ L de Opti-MEM, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. El complejo DNA-lípido se añadió a las células con 500 μ L de Opti-MEM, las células se colocaron en la incubadora (37°C) por 4 horas, posteriormente se cambió el medio y se incubó por 48h para confirmar la transfección.

Al cumplirse las 48 horas se observaron las células al microscopio de epifluorescencia, las células que expresaron la proteína se lavaron con 1 mL de PBS frío y después de retirarlo se añadieron 100 μ L de Buffer Laemlli 2X (Tris-HCl 375mM pH=6.8, SDS 9%, glicerol 50%, beta-mercaptoetanol 9% y azul de bromofenol 0.03%) y 100 μ L de PBS 1X, se incubaron por 10 minutos, se lisaron las células con un “scraper” o gendarme y posteriormente se hirvieron a 98°C por 10 minutos.

5.10 Electroforesis SDS-PAGE

Para determinar si las células transfectadas expresan a la proteína CaMKII γ -GFP, se tomaron 40 μ L de las muestras de lisados y se migraron en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. La electroforesis se realizó en buffer de corrida (Tris 25mM, glicina 192mM y SDS 0.1%) a un voltaje constante de 120V. Cuando la migración finalizó, el gel fue removido de la cámara de electroforesis y se tiñó con azul de Comassie por 5 minutos y se destiñó con solución desteñidora (Etanol, Ácido acético y agua destilada) toda la noche.

Se realizó un segundo gel con las mismas condiciones anteriores, sin teñir, para realizar la transferencia a una membrana PVDF.

5.11 Transferencia e inmunodetección (Western Blot)

Las proteínas separadas electroforéticamente en el gel SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana PVDF. Para realizar esta transferencia se preparó un sándwich de transferencia de la siguiente manera: Primero una esponja previamente sumergida en buffer de transferencia (Tris, glicina, metanol) seguida de dos papel Whatman también sumergidos en este mismo buffer, después el gel, encima de el se colocó la membrana seguida por dos fragmentos de papel Whatman y una esponja. Una vez ensamblado en sándwich, se aseguró que no existieran burbujas que interfieran con la transferencia de las proteínas a la membrana. Esta transferencia ocurrió del polo negativo (gel) al positivo (membrana PVDF). Este sándwich se introdujo en la cámara de transferencia, llenándola con buffer de transferencia hasta la marca de límite. Para prevenir que este buffer se sobrecalentara durante la transferencia e interfiera con el amperaje, la cámara de transferencia se montó en un baño de hielo por 60 minutos a 400mA.

Al terminar la transferencia, para comprobar que se hubieran transferido las proteínas en la membrana PVDF, está se tiñó con una solución de rojo de Ponceau 0.5% en ácido acético 2% por 5 minutos a temperatura ambiente y se lavó posteriormente en ddH₂O. Una vez corroborada la transferencia de proteínas, la membrana fue bloqueada con leche baja en grasa 5% en TBS-Tween 0.1% (50mM Tris pH=7.5, 150mM NaCl) por 1 hora a temperatura ambiente y al terminar se incubó con anticuerpo primario (anti-GFP 1:10,000) en solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados a la membrana, uno cada 15 minutos con TBS-Tween 0.1%. Después del último lavado la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (anti-ratón 1:20,000) en solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente (Anexo A). Finalmente se realizaron 3 lavados de 15 minutos con TBS-Tween 0.1%, después las membranas se cubrieron con 500 µL de solución "Clarity Western ECL Substrate" (BIO-RAD) y las membranas fueron expuestas a placas autoradiograficas "HyBlot ES".

5.12 Microscopia

Se colocó un cubreobjetos estéril en una caja Petri donde posteriormente se sembraron células HEK293T, al llegar a una buena confluencia éstas se transfectaron por lipofección con la construcción CaMKII γ -GFP, después de 48 hrs se retiró el medio y las células se fijaron con paraformaldehído al 3.7% por 10 minutos, después se tomó el cubreobjetos con pinzas y se montó en un portaobjetos limpio y se procedió a visualizar las células en microscopio de fluorescencia y confocal.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención del ORF de CaMKII γ

El primer paso para la obtención de la proteína recombinante, fue obtener el ORF de CaMKII γ , los oligonucleótidos utilizados se muestran en el anexo B.

El cDNA a obtener por PCR pesa alrededor de 1699pb, en la figura 12 se demuestra por medio de una electroforesis el producto obtenido y su peso, confirmando que su peso es aproximado a 1700pb.

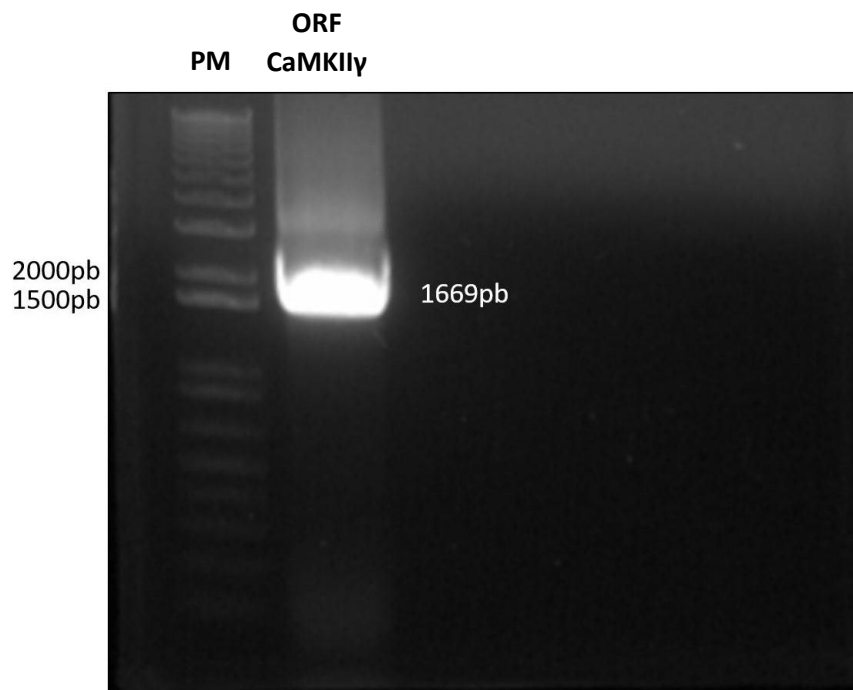


Figura 12. Amplificación del marco de lectura abierto de CaMKII γ . Gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio. Se muestra en el primer carril el marcador de peso y en el segundo carril el producto de PCR correspondiente al ORF de CaMKII γ

6.2 Restricción del plásmido pEGFP-C1

Para la utilización del plásmido éste se sometió a una restricción con BamHI y HindIII. Con la primera el plásmido logra linealizarse para su posterior utilización, esto se comprobó por una electroforesis de gel de agarosa al 0.8%. El vector pEGFP-C1 linealizado tiene un peso de 4731pb, lo que se comprueba al observar la figura 6, donde se muestra a pEGFP-C1 digerido por BamHI.

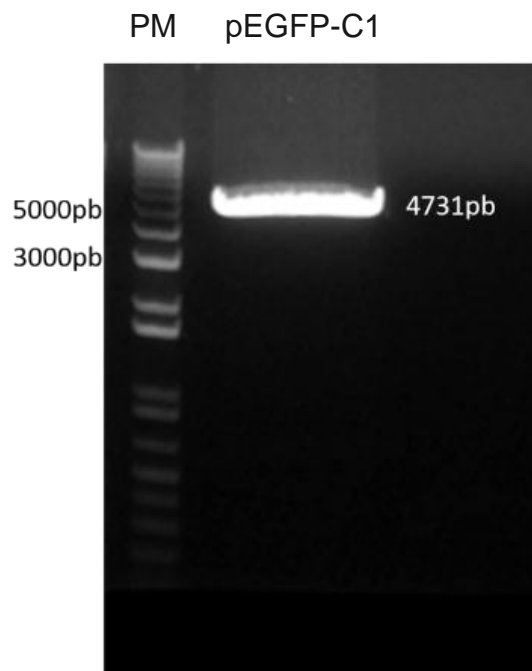


Figura 13. Restricción de pEGFP-C1 con BamHI. Gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio. Se observa en el segundo carril una banda correspondiente a pEGFP-C1, la cual pesa 4731pb.

6.3 Clonación de CaMKII γ en el vector pEGFP-C1

Antes de iniciar la reacción de clonación, se debió asegurar que tanto el vector pEGFP-C1 como el cDNA de CaMKII γ se encontraran a una concentración óptima después de purificarse, esto se comprobó por medio de una electroforesis a una relación 3:1 en gel de agarosa al 0.8%. La cual también demuestra la integridad del producto de PCR y del plásmido, comprobando que son idóneos para realizar la técnica. Observándose en la figura 14.

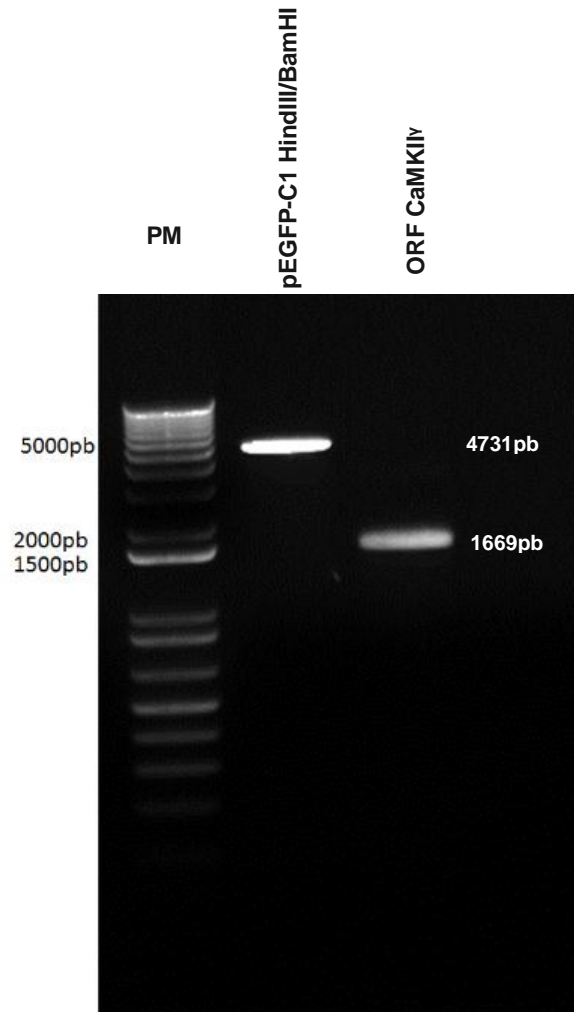


Figura 14. Electroforesis de pEGFP-C1 y el ORF de CaMKII γ , relación 3:1. Por la intensidad de las bandas se puede comprobar que se cargó mayor cantidad de pEGFP-C1 y de ambos casos se muestran bandas correspondientes al peso del producto de PCR y el plásmido.

Como se explicó anteriormente, los oligonucleótidos diseñados para amplificar el ORF de CaMKII γ contienen además de un sitio de restricción para BamHI y un sitio de restricción para HindIII, 18 pares de bases homólogas del vector pEGFP-C1 río arriba y río abajo. Ya que la clonación se realizó con la recombinasa In-Fusion, la cual es una enzima que recombina fragmentos de ADN, en este caso cDNA generado por PCR y un vector linealizado, reconociendo 18pb homólogas y superponiéndolas en los extremos, generando una nueva construcción.

Esta construcción se transformó en dos cepas de bacterias competentes, *E. coli* DH5 α y XL10gold. De las cuales se obtuvieron múltiples colonias y se seleccionaron seis colonias, después se obtuvo el plásmido por lisis alcalina y se verificó la integridad en gel de agarosa. El vector construido linealizado tiene un peso de 6400pb (~4700pb del vector vacío y ~1500pb de CaMKII γ).

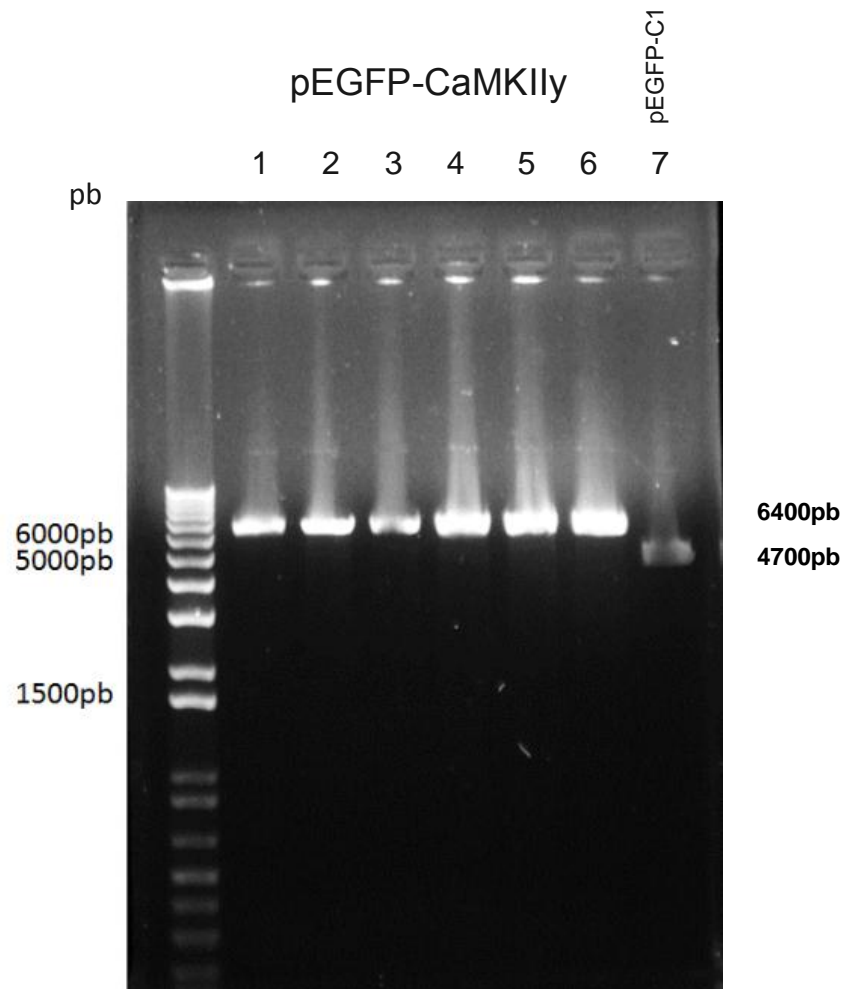


Figura 15. Electroforesis de la construcción CaMKII γ -GFP. Los carriles 1, 2 y 3 pertenecen a colonias de DH5 α , mientras de que los carriles del 4 al 6 corresponden a colonias de XL10gold. El carril 7 muestra el control negativo, donde se cargó el vector pEGFP-C1 vacío.

Para comprobar que el fragmento que se clonó dentro del plásmido estuviera presente, se realizó una restricción con las enzimas BamHI y HindIII, esperando entonces que se liberara un fragmento de 1600pb correspondiente a CaMKII γ y un fragmento de 4731pb correspondiente al vector pEGFP-C1. Ésto se muestra en la figura 16.

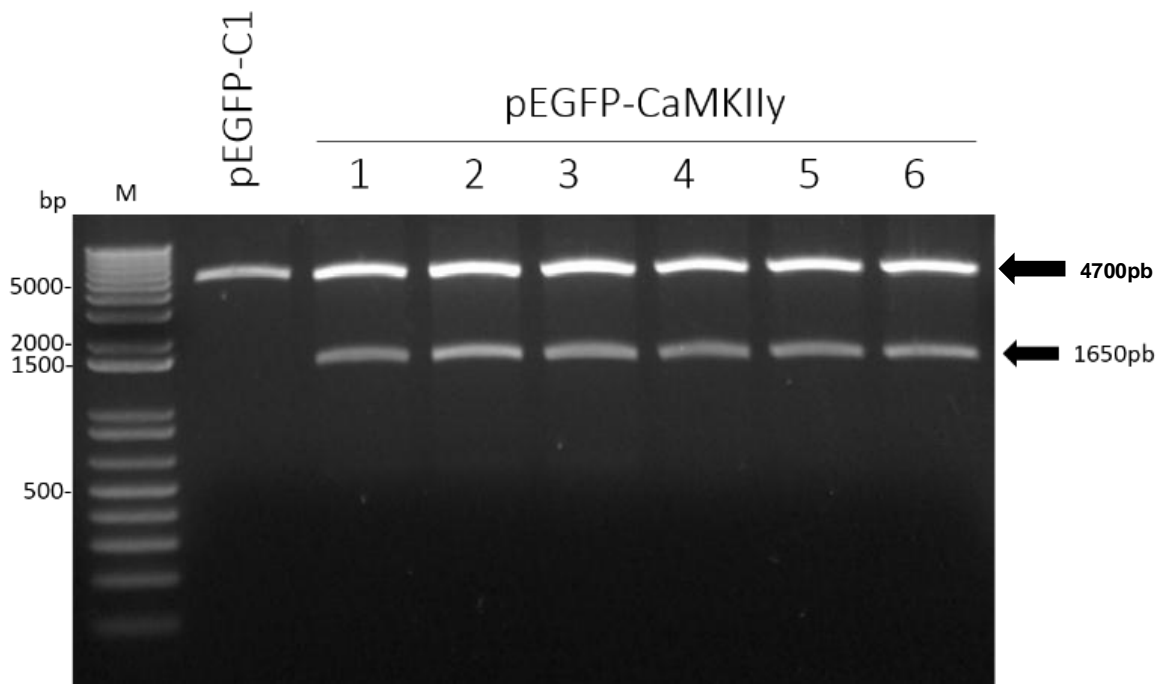


Figura 16. Digestión del vector CaMKII γ -GFP con enzimas de restricción HindIII y BamHI. Se muestra el control negativo de pEGFP-C1 con un peso aproximado de 5000pb, en cambio en los carriles 1-6 se muestra una banda de 5000pb correspondiente a el vector y además una banda de aproximadamente 1650pb correspondiente a CaMKII γ .

6.4 Secuenciación de la construcción de pEGFP-CaMKII γ

La construcción después se llevó a secuenciar para verificar la integridad de la secuencia de CaMKII γ , comprobando que el inserto no sufrió cambios en su secuencia ni se generaron codones de paro prematuros que provoque la síntesis de una proteína incompleta. Esta secuenciación se muestra en la figura 17.

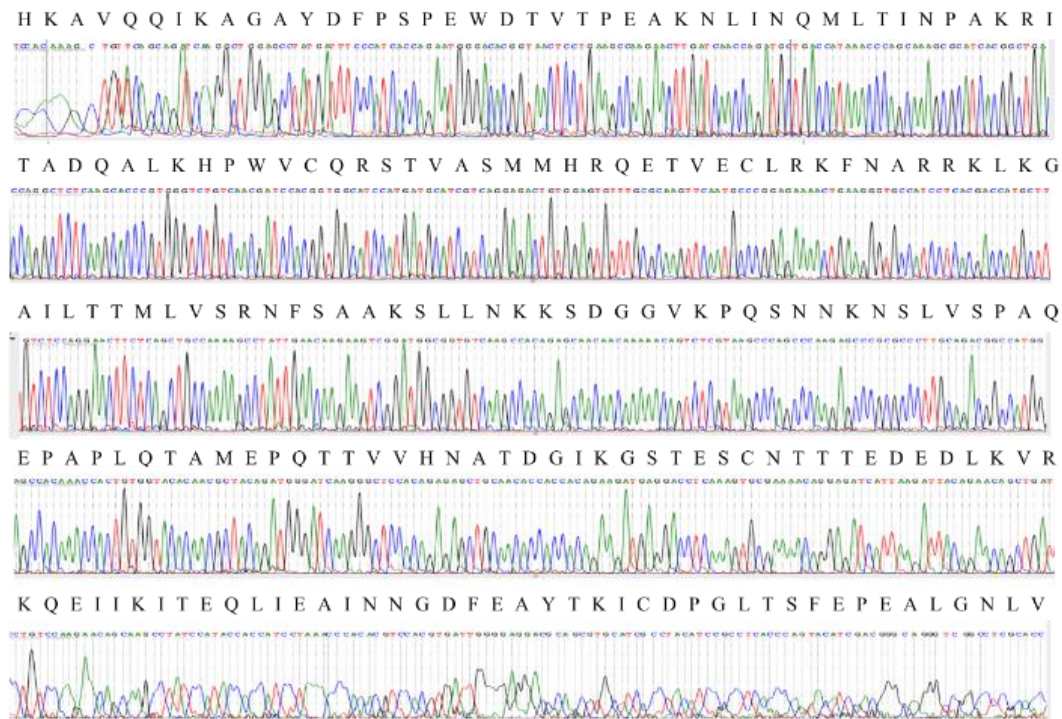


Figura 17. Secuenciación del plásmido EGFP-CaMKII γ . Se observa la secuencia correspondiente al plásmido construido. Se observa que en los extremos se pierde especificidad para identificar a las bases.

6.5 Transfección y expresión de la proteína fusión GFP-CaMKII γ

Las células se transfectaron con la construcción para inducir la expresión de la proteína fusión GFP-CaMKII γ , usando como control un vector vacío de pEGFP-C1. Observándose como en la figura 18.

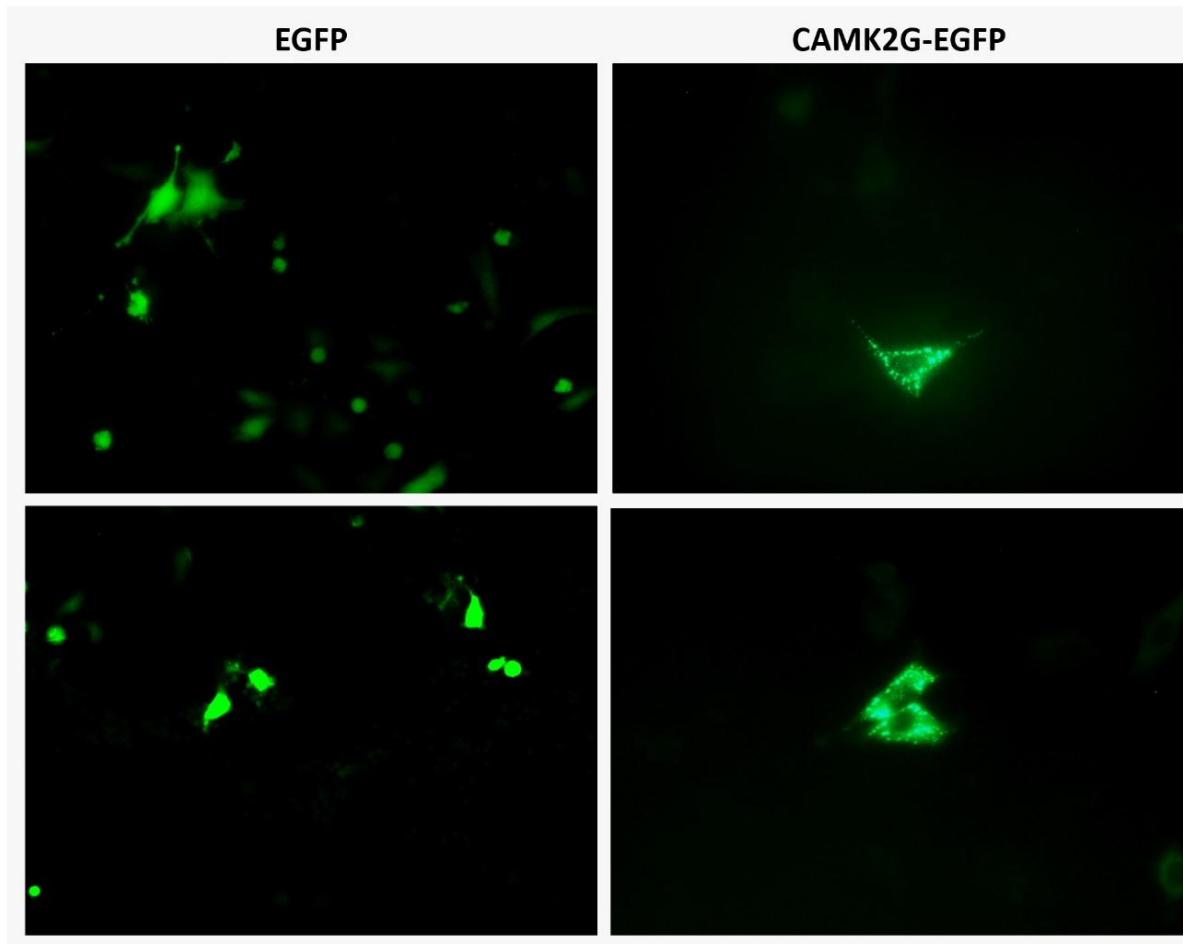


Figura 18. Visualización al microscopio de fluorescencia de células HEK293T transfectadas. Del lado izquierdo se muestran las células transfectadas con el vector vacío pEGFP-C1. En la columna derecha se muestran células transfectadas con la construcción de CaMKII γ -GFP. En ambos casos se muestran las células transfectadas de color verde al microscopio de fluorescencia.

Una transfección exitosa se comprueba mediante la visualización de luminiscencia color verde en las células. Ya que entonces, éstas expresan la proteína verde fluorescente. En las células transfectadas con el vector vacío se observa una luminiscencia verde uniforme, sin embargo en las células transfectadas con GFP-CaMKII γ se muestra la expresión de la proteína en forma de punteado en la célula.

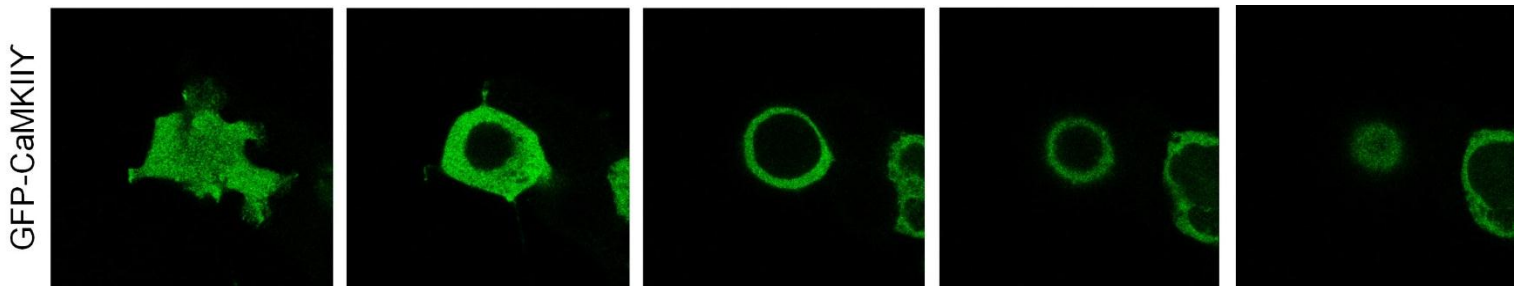


Figura 19. Visualización en microscopio confocal de células HEK293T transfectadas. Se observa una sola célula transfectada, donde GFP se encuentra expresada en citoplasma y en filipodios.

En la figura 19 se muestran cinco planos de la misma célula, demostrando la expresión de GFP-CaMKII γ en el interior de la misma. Esto también nos ayuda a comprobar la expresión de GFP-CaMKII γ . Al comparar la distribución celular observada de GFP-CaMKII γ con la literatura sobre construcciones de otras proteínas como CaMKII α , se comprueba que la construcción realizada no afecta la distribución endógena en las células.

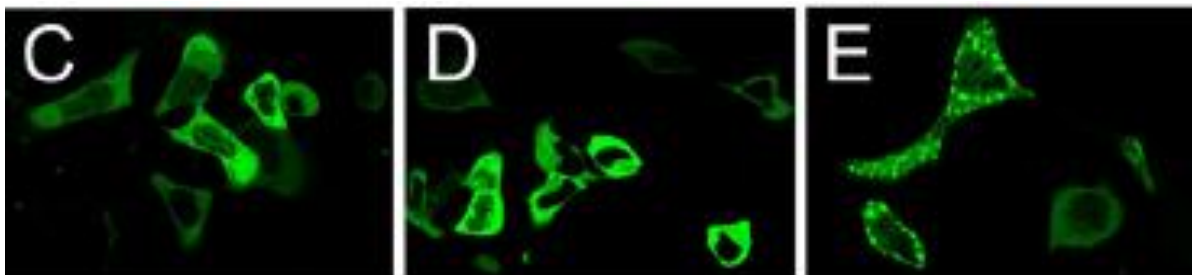


Figura 20. Células HEK293 transfectadas con CaMKII α -GFP. Se observa una distribución celular muy similar a la mostrada con la construcción CaMKII γ -GFP (Raka F, 2015)

6.6 Expresión e inmunodetección de GFP-CaMKII γ .

Para verificar la identidad de la proteína GFP-CaMKII γ , las células transfectadas se lisaron extrayendo las proteínas de ella, las cuales se cargaron en un gel de poliacrilamida, realizando una electroforesis SDS-PAGE. El gel obtenido con las proteínas separadas se tiñó con azul de Comassie como se muestra en la figura 21.

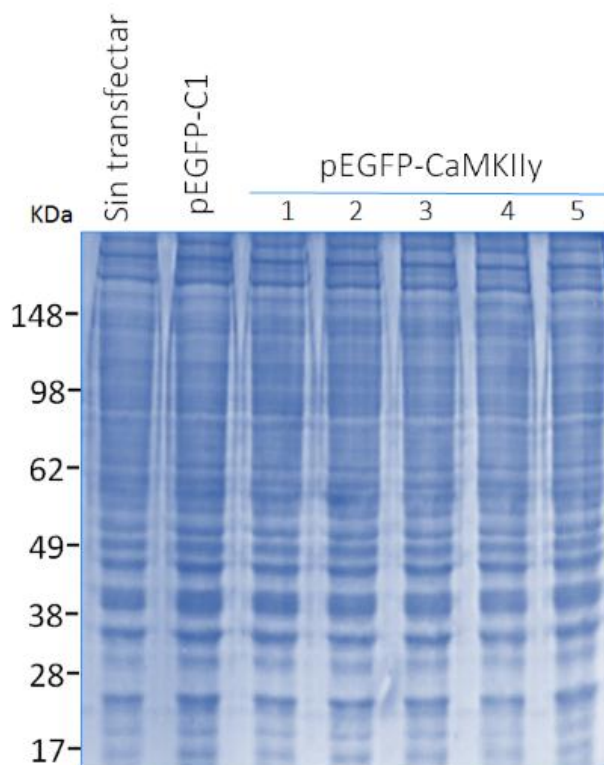


Figura 21. Tinción de gel de poliacrilamida con azul de Comassie. Se observa la separación de proteínas de acuerdo a su peso por medio de una electroforesis SDS-PAGE. Se puede observar que visualmente la cantidad de proteína en todos los carriles es la misma.

Esta tinción nos permite comprobar la separación de las proteínas en todos los carriles, además de corroborar que la cantidad de proteína cargada en cada carril fuera la misma, funcionando así también como control de carga.

Por otro lado, se realizó una transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana PVDF. Iniciando así el Western Blot.

La figura 22, nos muestra a las proteínas transferidas a la membrana.

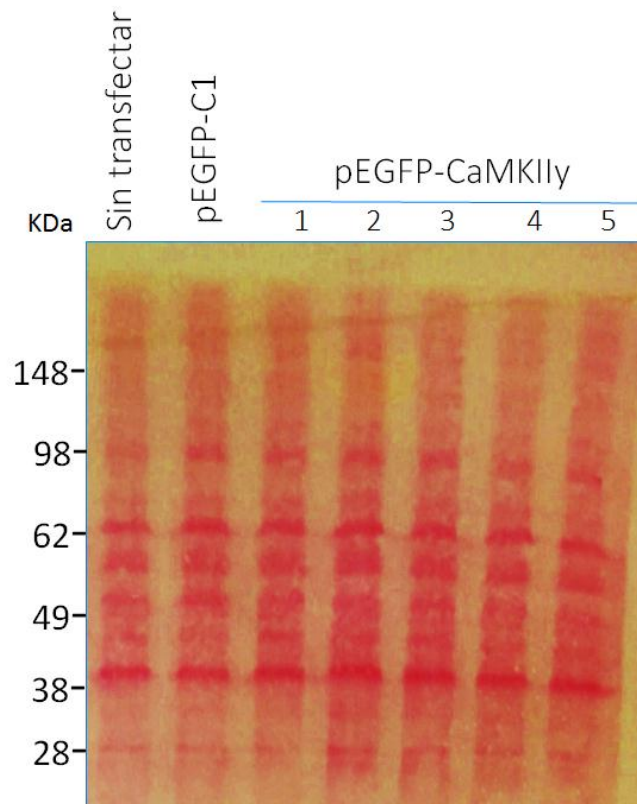


Figura 22. Tinción con rojo de Ponceau de las proteínas transferidas a la membrana de PVDF. Se pueden observar teñidas en rojo todas las proteínas que se transfirieron en la membrana. La intensidad de la coloración puede relacionarse con la cantidad de proteína contenida en la membrana.

Al observar la membrana teñida con rojo de Ponceau se puede corroborar que la transferencia fue eficiente al haber una buena cantidad de proteínas en ésta. Posteriormente se lavó el rojo de Ponceau para comenzar con la incubación con los anticuerpos.

Así que para corroborar la identidad de la proteína y su expresión de ésta en la línea celular transfectada, se realizó un western blot usando un anticuerpo dirigido contra GFP, lo que permitió identificar la proteína recombinante GFP-CaMKII γ cuyo resultado de muestra en la figura 23.

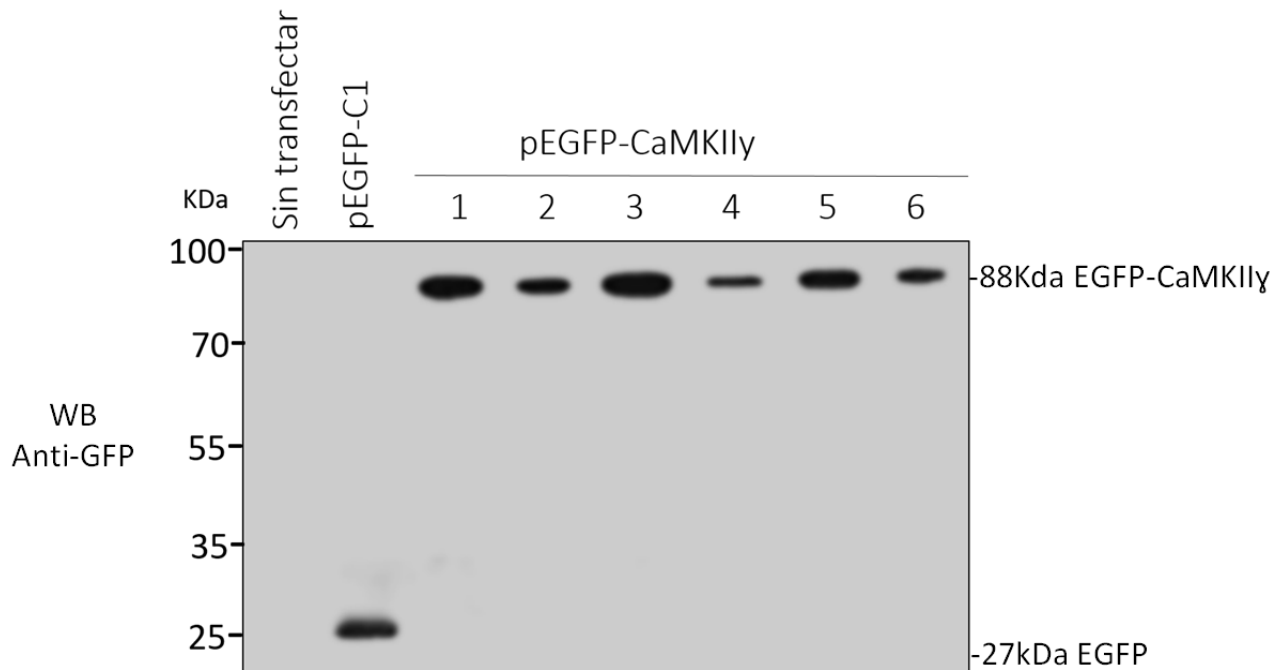


Figura 23. Detección de la construcción de la proteína CaMKII γ -GFP por medio de Western Blot. Western Blot usando anticuerpo anti-GFP, usando como control el vector vacío de pEGFP-C1. En los siguientes carriles se observa una banda correspondiente a la construcción de pEGFP-CaMKII γ .

La figura 23 nos muestra la inmunodetección de GFP en las muestras, como control negativo se muestra el primer carril, donde se colocó muestra de células sin transfectar que no expresan GFP, por lo que no se muestra ninguna banda. En el segundo carril se muestra una banda de aproximadamente 27 kDa correspondiente al vector vacío pEGFP-C1, usado como control positivo de GFP.

En cambio en los demás carriles se muestra una banda de aproximadamente 88 kDa correspondiente al peso de la construcción total de pEGFP-CaMKII γ , donde se muestra que se está expresando la bandera de GFP unida a CaMKII γ en todas las clonas obtenidas, aunque en diferente cantidad.

7. DISCUSIÓN

CaMKII juega un papel importante en el cerebro y las arritmias cardiacas, además de otros procesos fisiológicos del cuerpo incluyendo ser activador de varias vías de señalización implicadas en la proliferación celular y la progresión del ciclo celular. Recientemente se ha encontrado la asociación de esta proteína con la progresión del cáncer, incluyendo el cáncer de mama que es una de las primeras causas de muerte en mujeres mayores de 25 años en México.

Por ello es necesario estudiar más ampliamente esta proteína, sus isoformas y sus asociaciones en estos procesos con lo que posteriormente se podrían generar terapias eficientes contra distintos padecimientos en los que CaMKII esté implicada.

Para ello es muy útil contar con herramientas que faciliten la investigación de esta proteína. En este trabajo se generó una construcción de CaMKII γ , que es una de las isoformas menos estudiadas, fusionada con una bandera de EGFP.

La proteína verde fluorescente (GFP) es ampliamente usada en la biología molecular como marcador por producir bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible sin la necesidad de agregar aditivos (Pérez M, 2018).

Una vez obtenido el ORF de CaMKII γ por medio de una PCR y el plásmido pEGFP-C1 linealizado se procedió a realizar una clonación convencional por restricción y ligación, usando las enzimas de restricción BamHI y HindIII y T4Ligasa con una relación 3:1 entre inserto y vector. Los productos de ligación se transformaron en bacterias competentes *E.coli* DH5 α de donde se seleccionaron colonias con resistencia a Kanamicina de las cuales se extrajo por lisis alcalina el plásmido. Sin embargo al comprobar por restricción y electroforesis la construcción plásmidica se observaron bandas solo correspondientes a EGFP-C1 de aproximadamente 5000pb, demostrando que la construcción no estaba presente. Al repetir el procedimiento con distintas variantes en cantidad, reactivo y cepas de bacterias y no obtener resultados favorables se exploraron otros métodos de clonación, escogiéndose la enzima In-Fusion, la cual produce una clonación recombinante que está basada en la homología de la secuencia a clonar, es decir, los 18pb que se le

agregaron al cDNA de CaMKII γ y que son compartidas por el vector pEGFP, éstas secuencias de nucleótidos son reconocidas por la enzima de clonación que producirá la recombinación.

La construcción obtenida se transformó esta vez en dos cepas distintas de bacterias *E. coli* competentes DH5 α y XL10gold, que presentan condiciones fisiológicas especiales, que permiten que la bacteria sea apta para recibir DNA exógeno a través de la membrana celular. Esto para disminuir errores experimentales y asegurar que la cepa utilizada fuera óptima para albergar el plásmido. Después de seleccionar seis colonias resistentes a Kanamicina, se aseguró la presencia de la construcción por restricción y electroforesis, obteniendo esta vez la construcción en las 6 colonias. Visualizando entonces una banda de aproximadamente 5000pb correspondiente a GFP y una banda de aproximadamente 1650pb correspondiente a CaMKII γ comprobando que la construcción obtenida tiene el peso esperado. Sin embargo este resultado no comprueba que la secuencia de GFP o de CaMKII γ no haya sufrido algún cambio durante la recombinación, para lo cual la construcción de GFP-CaMKII γ fue secuenciada.

El resultado de la secuenciación fue comparado con la variante 1 de CaMKII γ , demostrando que la proteína no sufrió cambios importantes durante la recombinación con GFP.

Otra forma de comprobar la expresión de la proteína GFP-CaMKII γ fue la visualización de células transfectadas al microscopio de fluorescencia. Donde se observaría una fluorescencia verde propia de la bandera de GFP. Al comparar los resultados de la fluorescencia del control con GFP, donde se observa una fluorescencia verde uniforme en toda la célula, en cambio, con las células que expresan GFP-CaMKII γ , se puede observar que la expresión no se visualiza en toda la célula, si no que parece encontrarse en puntos específicos con una distribución punteada. Esto debido a la localización de CaMKII γ en la célula.

Estudios recientes en células HUVEC señalan que existe una interacción entre CaMKII en sus isoformas α y β y moléculas de actina del citoesqueleto (Khan S, 2016). Esto sugiere que lo que se observa en las transfecciones sea el mismo

fenómeno de interacción con el citoesqueleto de actina de las células. Del mismo modo se ha encontrado que el patrón de agregados en puntos se observa con CaMKII α en células HeLa (Shibata A, 2015).

Estos agregados pueden formarse a partir de interacciones entre holoenzimas de CaMKII, como las que se observan en células de hipocampo en condiciones de isquemia (Vest R, 2009).

La visualización de células transfectadas en microscopio confocal reveló que la proteína está presente en citoplasma pero no en núcleo. Se sabe que CaMKII γ presenta una estructura similar a las otras isoformas de CaMKII, pero además, contiene una secuencia de localización nuclear en el dominio variable que se encuentra regulado por la fosforilación de la Ser³³⁴ (Ma H, 2015). Sin embargo es importante señalar que CaMKII γ tiene 8 variantes distintas, de las cuales solo 2 presentan esta secuencia de localización nuclear. La construcción EGFP-CaMKII γ que aquí se presenta se realizó con el ORF de la variante 1 de CaMKII γ , la cual no presenta esta secuencia de localización nuclear.

Para finalizar, el Western Blot permitió confirmar la identidad de la construcción, por medio de una banda de 88 kDa, correspondiente a la construcción completa de GFP-CaMKII γ .

Como se mencionó anteriormente, las modificaciones post-traduccionales de CaMKII son variadas y el que estas ocurran o no, pueden modificar distintos procesos fisiológicos.

En la región de autoinhibición de CaMKII contiene elementos que son críticos para la regulación de la actividad de CaMKII, incluyendo las modificaciones post-traduccionales, como el segmento donde ocurren fosforilaciones, modificaciones por N-acetilglucosaminación y por oxidación (Wang Y, 2015). Un cambio en una base de la secuencia de CaMKII puede provocar que se desencadenen diversos fenómenos asociados al ciclo celular y recientemente asociados al cáncer. Al tener identificadas estas posibles modificaciones, se puede iniciar una mutagénesis sitio dirigida de la construcción GFP-CaMKII γ , transfectarla a las células de interés y

observar con mayor eficiencia el papel de CaMKII γ en distintas etapas del ciclo celular, permitiendo no solo estudiar una modificación, si no que abriendo la posibilidad de estudiar distintas en diversas líneas celulares, y más específicamente podría ayudar a observar el papel de la proteína en las distintas etapas del cáncer, así como las asociaciones entre CaMKII γ y otras proteínas implicadas también en estos procesos malignos.

8. CONCLUSIONES

- Se realizó eficientemente la clonación del gen que codifica para CaMKII γ fusionado a una bandera de GFP.
- La construcción GFP-CaMKII γ fue transfectada en la línea celular HEK293T comprobando su eficiencia para expresar la proteína por medio de inmunodetección y microscopia de fluorescencia y confocal.
- Se demostró que la secuencia de CaMKII γ no sufrió cambios en la clonación.
- Con las pruebas realizadas se comprueba que GFP-CaMKII γ es una buena herramienta para investigar las implicaciones de la cinasa en diversos padecimientos.

9. REFERENCIAS

1. Addgene (2018) Plasmid: pEGFP-C1. Recuperado de:
<https://www.addgene.org/vector-database/2487/>
2. Alberts B, Jonhson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of The Cell. 2005. Garland Publishing Inc.
3. Bell J, Raaijmakers A, Jansseens J, Delbridge Lea. *CaMKII δ and cardiomyocyte Ca²⁺ signaling new perspctives on splice variant targeting.* Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2015. **42** (12) p: 1440-1681.
4. Bio-Rad Laboratories. (2018) Detection methods. Recuperado de:
<http://www.bio-rad.com/es-mx/applications-technologies/detection-methods?ID=LUSQ6KKG4>
5. Biotex Laboratories. (2016) Tansfection methods. EU. Recuperado de:
<https://www.biontex.com/eu/transfection/>
6. Birnboim H.C., and Doly, J. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979. 7, 1513 -1522.
7. Chen X, Wu Q, Sun P, Zhao Y, Zhu M, Miao C. *Propofol Disrupts Aerobic Glycolysis in Colorectal Cancer Cells via Inactivation of the NMDAR—CAMKII-ERK Pathway.* Cellular Physiology and Biochemistry 2018. **46** (2) p: 492-504.
8. Chi M, Evans H, Gilcrist JJ, Mayhew J, Hoffman A, Pearsall E, Jankowski H, Brzozowski J, Skelding K. *Phosphorylation of calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II at T286 enhances invasion and migration of human breast cancer cells.* Scientific Reports 2016. **6**.
9. Colbran R, Brown M. *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity.* Current Opinion in Neurobiology 2004. **14** (3) p: 318-327
10. Cook S, Bourke A, O'Leary H, Zaegel V, Mize-Berge J, Tucker C, Coultrap S, Herson P, Bayer K. *Analysis of the CaMKII α and β splice-variant distribution among brain regions reveals isoform-specific differences in holoenzyme formation.* Sci Rep 2018. **8**

11. Erickson, J.R., *et al.*, *A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation*. *Cell*, 2008. **133**(3): p. 462-474.
12. Erickson, J.R., *et al.*, *Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation*. *Nature*, 2013. **502**(7471): p. 372-376.
13. Erickson, J.R., *Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart*. *Front Pharmacol*, 2014. **5**: p. 59.
14. Fierro, F (2015) *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*. Recuperado de: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/electroforesis.pdf>
15. Grandi E, Bers D. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*. (6 Ed) Elsevier 2014.
16. Guzmán L, Guevara A, Marín C. *S-nitrosilación de proteínas: Implicancias en la biología molecular del cáncer*. *Pharmaciencia* 2015. **1**(2) p: 84-92.
17. Hanson, P.I., *et al.*, *Expression of a multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase and mutational analysis of its autoregulation*. *Neuron*, 1989. **3**(1): p. 59-70.
18. Hoelz, A., A.C. Nairn, and J. Kuriyan, *Crystal structure of a tetradecameric assembly of the association domain of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II*. *Mol Cell*, 2003. **11**(5): p. 1241-51.
19. Hoffman A, *et al*, *Dephosphorylation of CaMKII at T253 controls the metaphase–anaphase transition*. *Cellular Signalling*, 2014. **26**: p784-756.
20. Hongwei Y, Bin P, Xandy W, Hsiang-En W, Jingwei Meng, Fischer G, Vilceanu D, *et al.* *CaMKII controls whether touch is Painful*. *The Journal of Neuroscience* 2015. **35**(42) p: 14086- 14102.
21. Hook, S.S. and A.R. Means, *Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. **41**: p. 471-505.
22. Huang, B, Yang, C, Wojton J, Huang N, Chen, C, Soderblom E, Zhang L, Kornbluth S. *Metabolic control of Ca²⁺/ Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)- mediated Caspase-2 suppression by the B55β/Protein Phosphatase 2A (PPA2)*. *Journal of Biological Chemistry* 2014. **289** p: 35882-35890.

23. Johannes W. Hell. *CaMKII: Claiming Center Stage in Postsynaptic Function and Organization*. Neuron. 2014. **81**(2) p: 249–265.
24. Khan S, Conte I, Bayer U, Molloy J. *Multiple CaMKII Binding Modes to the Actin Cytoskeleton Revealed by Single-Molecule Imaging*. Biophysical Journal 2016. **111** p: 395-408.
25. Koolman, J y Rohm K .*Bioquímica: Texto y atlas*. Médica Panamericana. Madrid. 2015 p 488.
26. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. Methods 2006 **38**(4):283-293.
27. Lacal J. *Changing the course of oncogenesis: The development of tyrosine kinase inhibitions*. ESC Supplements 2006. **4** (7) p:14-20
28. Liang, D., et al., *BAFF activates Erk1/2 promoting cell proliferation and survival by Ca²⁺-CaMKII-dependent inhibition of PP2A in normal and neoplastic B-lymphoid cells*. Biochem Pharmacol, 2014. **87**(2): p. 332-43.
29. Lin X, Yao M, Li N, Wang C, Zheng Y, Cao X. *CaMKII promotes TLR-triggered proinflammatory cytokine and type I interferon production by directly binding and activating TAK1 and IRF3 in macrophages*. Blood 2008. **112**. P: 4961-4970.
30. Lodish H. *Biología celular y molecular*. Panamericana. 2005. España.
31. Ma H, Li B, Tsien R. *Distinct roles of multiple isoforms of CaMKII in signaling to the nucleus*. Biochim Biophys Acta 2015. **1853** (9) p: 1953-1957.
32. Maier L. *Ca²⁺ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) in the Heart*. Calcium Signaling, Advances in Experimental. Medicine and Biology 2012. Recuperado de: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-94-007-2888-2_30.pdf.
33. Maione S, Cipolletta E., Sorriento D, Borriello F, Soprano M, Rusicano M, Esposito V, Markabaouj A, Palma G, Martino G, Maresca L, Nobile G, Formisano P, Ciccarelli M, Marone G, Timarco B. *Cellular subtype expression and activation of CaMKII regulate the fate of atherosclerotic plaque*. Arteriosclerosis 2017. **256**. p:53-61.

34. Mann, M y Jensen *Proteomic analysis of post-translational modifications*. Nature Biotechnology. 2003. **21**. p:255-261.
35. Marcinkiewicz, J. and Schaffer, S. (2015). *Taurine 9*. Springer.
36. Meng Z, Li T, et al. *Berberamine inhibits the growth of liver cancer cells and cancer initiating cells by targeting Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II*. Mol Cancer Ther 2014. **12** (10)
37. Nair J, DaFonseca C, Tjernberg A, Sun W, Darnell J, Chait B, Zhang J. *Requirement of Ca²⁺ and CaMKII Stat1 Ser-727 phosphorylation in response to IFN-γ*. Proceedings of the National Academy of Sciences 2002. **99**(9) p:5971-5976
38. Ozcan L, Wong C, Li G, Xu T, Pajvani U, et al. *Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in fasting and obesity*. Cell Metab 2012. **15** (5) p: 739-751.
39. Pellicena, P. and H. Schulman, *CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 21.
40. Pérez M, Becú D. *La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia*. Medicina (Buenos Aires) 2018. **69** (3) p: 370-374
41. Rajtik, T., Goncalvesova, E., Varga, Z. V., Leszek, P., Kusmierczyk, M., Hulman, M. Adameova, A. *Posttranslational modifications of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIδ and its downstream signaling in human failing hearts*. American Journal of Translational Research 2017. **9**(8): p3573–3585.
42. Raka F, Sebastiano A, Kulhawy S, Ribeiro F, Godin C, Caetano F, Angers S, Ferguson S. *Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein Kinase II interacts with group I Metabotropic Glutamate and facilitates Receptor Endocytosis and ERK1/2 signaling: role of β-Amyloid*. Molecular Brain. 2015. **8**(21)
43. Rellos P, Pike A, Niesen F, Salah E, Lee W, Von Delt F, Knapp S. *Structure of the CaMKIIδ/Calmodulin Complex Reveals the Molecular Mechanism of CaMKII Kinase Activation*. Journal PLOS Biology 2010. **8** (7) e1000426. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000426>

44. Rokhlin O, Taghiyev A, Bayer K, Bumcrot D, Kotelianski V, Glover R , Cohen M. *Calcium/calmodulin-dependent kinase II plays an important role in prostate cancer cell survival*. *Cancer Biology & Therapy* 2007. **6**(5) DOI: 10.4161/cbt.6.5.3975
45. Saddouk F, Sun L, Feng Y, Jiang M, Singer D, Backs J, Riper D, Ginnan R, Schwarz J, Singer H. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-γ (CaMKIIγ) negatively regulates vascular smooth muscle cell proliferation and vascular remodeling*. *The FASEB Journal* 2016. **30** (3) p: 1051-1064
46. Shibata A, Maebashi H, Nakahata Y, Nabekura J, Murakoshi H. *Development of a Molecularly Evolved, Highly Sensitive CaMKII FRET Sensor with Improved Expression Pattern*. *PLOS ONE* 2015. **10**:3.
47. Shioda N, Sawai M, Ishizuka Y, Shirao T, Fukunaga K. *Nuclear Translocation of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase IIδ3 Promoted by Protein Phosphatase-1 Enhances Brain-derived Neurotrophic Factor Expression in Dopaminergic Neurons*. *Journal Biological Chemistry* 2015. **290** (35) p: 21663-21675
48. Si, J. and S.J. Collins, *Activated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IIγ is a critical regulator of myeloid leukemia cell proliferation*. *Cancer Res*, 2008. **68**(10): p. 3733-42.
49. Skelding K, Rostas J, Verrills N. *Controlling the cell cycle: The role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II*. *Cell Cycle* 2011. **10** (4) p: 631-639.
50. Soderling T, Derkach A. *Postsynaptic protein phosphorylation and LTP*. *Trends in neurosciences* 2000. **23** (2) p: 75-80
51. Swaminathan, P.D. and M.E. Anderson, *CaMKII inhibition: breaking the cycle of electrical storm?* *Circulation*, 2011. **123**(20): p. 2183-6.
52. Swulius M.T, Waxham M.N. *Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinases*. *Cell Mol Life* 2008. **65** (17) p: 2637-2657
53. Takara Bio (2016) In-Fusion HD Cloning Kit User Manual. USA
54. Taleisnik S. *Receptores celulares y la transducción de señales. Temas de biología celular*. Editorial Brujas. 2006 Córdoba. p.p 269

55. The University of Queensland. (2018) Background on alkaline lysis-plasmid preparation. Australia: Diamantina Institute. Recuperado de:
<https://di.uq.edu.au/community-and-alumni/sparq-ed/cell-and-molecular-biology-experiences/alkaline-lysis-mini-plasmid-preparation/background-alkaline-lysis-mini-plasmid-preparation>
56. Thermo Fisher Scientific. (2018) PCR Basics. Recuperado de:
<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>
57. Toussaint F, Charbel C, Allen B, Ledoux J. *Vascular CaMKII: heart and brain in your arteries*. American Journal of Physiology Cell Physiology 2016. **311** (3) C464-C478
58. Valenzuela A. (09 de Octubre 2017) *Las enzimas de restricción y la ADN ligasa*. Publicado por: Khan Academy. Recuperado de:
<https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/restriction-enzymes-dna-ligase>
59. Vest R, O Leary H, Bayer U. *Differential regulation by ATP versus ADP further links CaMKII aggregation to ischemic conditions*. FEBS Letters 2009. **583** (22) p: 3577-3581
60. Wang, Y.Y., R. Zhao, and H. Zhe, *The emerging role of CaMKII in cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(14): p. 11725-34.
61. Yilmaz M, Gangopadhyay S, Leavis P, Grabarek Z, Morgan K. *Phosphorylation at Ser²⁶ in the ATP-binding site of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II as a mechanism for switching off the kinase activity*. Bioscience reports 2013. **33**(2)

Anexo A. Tabla de anticuerpos

Anticuerpo	Dilución anticuerpo primario	Dilución anticuerpo secundario
Anti-GFP	1: 10,000 Hecho en ratón	Anti mouse 1:20,000 Hecho en ratón Marcado con: HRP (Peroxidasa de rábano)

Anexo B. Tabla de oligonucleótidos diseñados para In-Fusion

Nombre	Forward HindIII	Reverse BamHI
CaMKII γ	5' GGACTCAGATCTCGAGCTCAAG CTTCGATGGCCACCACCGCCACC TG 3'	5' CAGTTATCTAGATCCGGT GGATCCTCACTGCAGCGGT GCGGCAG 3'

Donde:

Verde: 18 bases para sistema INFUSION que forman parte del vector pEGFP-C1

Rojo: Secuencias de corte para las enzimas de restricción

Azul: Bases para amplificar el cDNA de CaMKII γ