



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CONSTRUCCIÓN DE VECTORES QUE EXPRESEN
SENSORES GENÉTICOS FLUORESCENTES DE
CALCIO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

PAULA VICTORIA RUBIO ALVARADO



DIRECTOR DE TESIS:

DR. CHRISTOPHER WOOD

2010



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO.

1. Datos del alumno

Rubio
Alvarado
Paula Victoria
56320329
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302081769

2. Datos del Tutor

Dr.
Christopher David
Wood

3. Datos del sinodal 1

Dr.
José Luis
Puente
García

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Takuya
Nishigaki
Shimizu

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Bertha
Molina
Alvarez

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Renato
León
Rodríguez

7. Datos de trabajo escrito.

Construcción de vectores que expresen sensores genéticos fluorescentes de calcio y peróxido de hidrógeno.
93 p.
2010

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutor Chris Wood por todo lo que hizo por mí la haberme transmitido sus conocimientos, experiencias, por brindarme las herramientas necesarias para poder realizar el proyecto y por su interés en enseñarme, de verdad Chris fue un placer ser tu alumna y trabajar juntos. A mis sinodales José Luis Puente, Takuya, Renato y Bertha por sus comentarios y revisiones. También quiero agradecer al Dr. Luis Covarrubias por permitirme tener un espacio y trabajar en su laboratorio, a mis compañeros del IBT Gaby, Raúl, Alex, Itzcoatl, Chio, Conchita, Gilda que siempre me ayudaron en mis dudas e hicieron que mi estancia en el laboratorio y en Cuernavaca fuera muy agradable.

En especial quiero agradecerles mucho a mis padres Victoria y José Luis, y a mí querida hermana Ady porque sin ellos no hubiera llegado a lograr mis metas, gracias por todo su cariño, amor, comprensión, confianza, apoyo incondicional, estoy muy agradecida por tenerlos a mi lado, los amo y los adoro con todo mi corazón. A mis tías que siempre me han querido y ayudado, Male, Lidia, Luchita, Tita, y mis primas y primos Cinthya, Mariana, Ixchel, Mónica, Sonia y Juan.

También gracias a todos los amigos de la facultad Adam, Marco, Ursula, Erandi, Licha, Gaby Luque, Luis, Sergio, Brenda, María, Adrián y otros más que no mencioné, del voly Tony, Raquel, amigos de la primaria, secundaria, prepa, de mis cursos, porque todos ustedes han sido parte muy especial de mi vida, hemos vivido cosas muy importantes y he sido muy feliz compartiendo muchas experiencias.

Por último gracias a la UNAM y a todos los profesores que han sido parte de mi formación personal y académica.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Fluctuaciones del Ca ²⁺ intracelular.....	8
1.2. Medición del Ca ²⁺ intracelular.....	11
1.3. Proteínas Fluorescentes.....	12
1.4. Sensores fluorescentes codificados genéticamente.....	14
1.4.1. Sensores de FRET.....	16
1.4.2. Sensores genéticos que utilizan un fluoróforo.....	20
1.5. Sensor de Ca ²⁺ Case12.....	22
1.6. Peróxido de Hidrógeno.....	23
1.7. Sensor de H ₂ O ₂ intracelular.....	25
1.8. <i>Insulators</i>	27
1.9. Utilización de sensores fluorescentes genéticos en células ES.....	28
2. ANTECEDENTES.....	29
2.1. Sensor de Ca ²⁺ Case12.....	29
2.2. Sensor de H ₂ O ₂ HyPer.....	32
3. JUSTIFICACIÓN.....	34
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVO GENERAL.....	34
5.1. Objetivos Particulares.....	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1. Mantenimiento de las líneas celulares.....	35
6.2. Biología Molecular.....	40
6.3. Microscopía.....	47
7. RESULTADOS.....	49
7.1. Obtención de vectores con el sensor para Ca ²⁺ Case12.....	49
7.2. Obtención de vectores con sensor de H ₂ O ₂ HyPer.....	57
7.3. Expresión de Case12 en células HEK293T.....	62
7.4. Expresión de HyPer en células HEK293T.....	64
7.5. Caracterización funcional del sensor Case12 en células HEK293T.....	64
7.6. Pruebas para optimizar la incubadora acoplada al microscopio.....	67
7.7. Experimentos de larga duración con el sensor Case12.....	69

7.8. Respuesta de Case 12 ante el ATP en células AD293.....	70
7.9. Caracterización de los sensores de Ca ²⁺ intracelular que usan FRET.....	72
7.10. Caracterización funcional del sensor HyPer en las células HEK293T.....	75
7.11. Efecto del EUK-134 ante cambios en el H ₂ O ₂ intracelular.....	76
7.12. Caracterización funcional de HyPer en células AD293.....	78
7.13. Funcionamiento de HyPer en células tratadas con Tamoxifen.....	79
7.14. Expresión de los vectores HyPer en células troncales de ratón.....	80
8. DISCUSIONES.....	83
9. CONCLUSIONES.....	87
10. PERSPECTIVAS.....	88
11. REFERENCIAS.....	89

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i -Concentración de calcio intracelular

ADPRc - Adenosin difosfato cíclico de ribosa

AMPc - Adenosin monofosfato cíclico

ATP - Adenosín trifosfato

BFP - Proteína azul fluorescente

Ca²⁺ - Calcio

CaCl₂ - Cloruro de calcio

CaM - Calmodulina

ER - Retículo Endoplásmico

ES- Células troncales embrionarias

FRET-Transferencia de energía de resonancia

GFP – Proteína verde fluorescente

H₂O₂ – Peróxido de Hidrógeno

IP3 - 1,4,5 inositol trifosfato

MLCK - Cadena ligera de la cinasa de la miosina

O² - Radical superóxido

Pb - Pares de bases

ROS - Especies reactivas de oxígeno

RYR - Receptor de rianodina

SR- Retículo Sarcoplásmico

YFP - Proteína amarilla fluorescente

RESUMEN

Los sensores fluorescentes codificados genéticamente, se han convertido en herramientas muy útiles para hacer estudios de visualización y medición de ciertos parámetros intracelulares. El calcio y el peróxido de hidrógeno son moléculas que participan como mensajeros intracelulares para regular diferentes funciones celulares.

En el presente trabajo se construyeron vectores que contienen la secuencia que codifica para sensores fluorescentes que miden calcio y peróxido de hidrógeno intracelular. La construcción de los plásmidos se llevó a cabo con el propósito de ser utilizados en un futuro en las células troncales embrionarias de ratón (ES), por tal motivo fue necesario incorporar en los plásmidos la secuencia para el “*enhancer*”-promotor CMV/CBA y las secuencias aisladoras llamadas “*insulators*”. Una vez terminadas las construcciones, se evaluó el funcionamiento de los sensores contenidos en los vectores en dos líneas celulares: HEK293T y AD293. Los resultados mostraron que el sensor Case12 y HyPer respondieron a las variaciones en la concentración de Ca^{2+} o H_2O_2 intracelular respectivamente modificando su fluorescencia. Adicionalmente, se logró crecer de manera óptima células en la incubadora adaptada en el microscopio, con esto se pudieron llevar a cabo experimentos de larga duración (horas), y se observó que las células transfectadas con los vectores siguen expresando los sensores durante varios días siendo observadas bajo el microscopio de fluorescencia.

Los vectores construidos que contienen los sensores representan una herramienta práctica y útil para llevar a cabo estudios sobre los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} y de H_2O_2 en células vivas en tiempo real.

1. INTRODUCCIÓN

El calcio es un segundo mensajero intracelular, que es esencial para llevar a cabo numerosas funciones biológicas tales como: morfogénesis, contracción muscular, apoptosis, expresión génica, fertilización, etc. (Morales Tlalpan *et al.* 2007). Para realizar esas funciones, las células deben modificar la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en el citoplasma, que en niveles basales se encuentra entre los 100-200 nM (Berridge *et al.* 2000). Los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocurren a través del uso de receptores, canales, amortiguadores, proteínas citosólicas que unen Ca^{2+} , intercambiadores y bombas (Figura 1). En un momento dado el nivel de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está determinado por un balance entre las reacciones que se les ha llamado de “encendido” y de “apagado” (Berridge *et al.* 2003). Durante los mecanismos de encendido se incrementa el Ca^{2+} en las células, el cual puede provenir del medio extracelular o de los depósitos internos de Ca^{2+} que son: el retículo endoplásmico (ER), la mitocondria y en las células musculares el retículo sarcoplásmico (SR). En las reacciones denominadas de apagado el Ca^{2+} intracelular del citoplasma es removido, ya sea expulsándolo al exterior por medio de intercambiadores ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) y bombas como la ATPasa dependiente de calcio (PMCA), o es recapturado por los depósitos internos a través de la bomba SERCA, la cual está en el retículo endoplásmico y sarcoplásmico (Nowycky y Thomas 2002).

1.1. Fluctuaciones del Ca^{2+} intracelular.

La señalización a través del calcio depende en gran medida de un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (Berridge *et al.* 1998). Este cambio se produce por la entrada de Ca^{2+} del exterior o por la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. El Ca^{2+} extracelular puede entrar a través de distintos mecanismos. En la membrana celular hay proteínas que son canales y permiten el paso del Ca^{2+} hacia el interior. Los canales pueden ser dependientes de voltaje (VOC), dependientes de receptores (ROC), o canales dependientes de las pozas internas (SOC) los cuales se abren cuando los depósitos intracelulares de Ca^{2+} se han vaciado (Doadrio 2009).

Los VOC pertenecen a una familia de la cual se han descrito seis tipos funcionales de canales de calcio (T, L, N, P, Q y R). Estos canales se abren cuando ocurren despolarizaciones en la membrana (Doadrio 2009).

Los canales ROC, se activan cuando su ligando se une al receptor específico de membrana, y los SOC son canales que se abren cuando los depósitos intracelulares de Ca^{2+} se han vaciado (Berridge *et al.* 1998). También existen los receptores TRP (receptores de potencial transitorio), los cuales son canales que permiten la entrada de Ca^{2+} en respuesta a distintos estímulos como el estrés mecánico y la temperatura (O'Neil y Brown 2003).

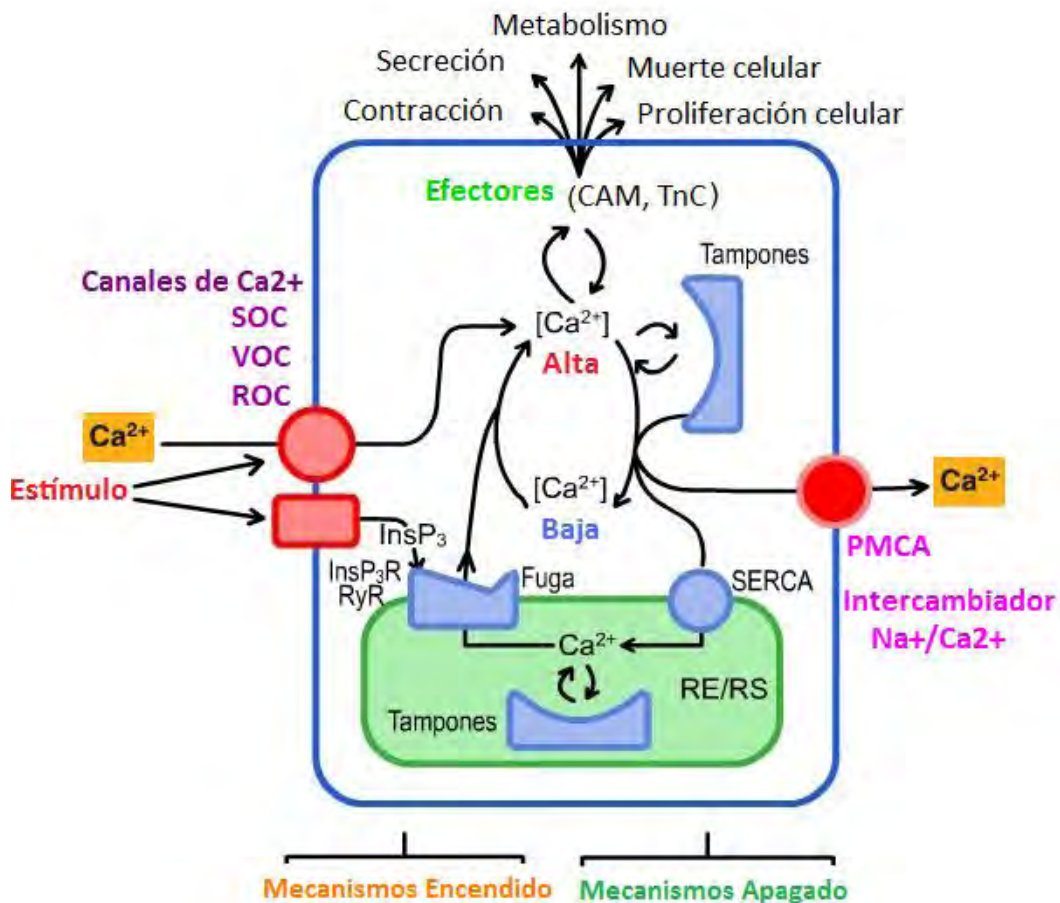


Figura 1. Dinámica del Ca^{2+} intracelular. Durante los mecanismos de encendido la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta mediante la entrada de Ca^{2+} extracelular o la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. En los mecanismos de apagado la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuye porque el Ca^{2+} es removido del citoplasma a través de intercambiadores o bombas. Modificado de: Díaz 2003.

El aumento en el Ca^{2+} intracelular también se genera por liberación de Ca^{2+} de las pozas internas. Esta liberación es controlada por canales del receptor del 1,4,5, inositol trifosfato (IP3R) y el

receptor de rianodina (RyR), los cuales se encuentran en el retículo endoplásmico y sarcoplásmico (Berridge *et al.* 2000).

Una de las rutas intracelulares mejor caracterizada en la liberación de calcio del ER y SR es a través del IP₃ (Figura 2). El IP₃ se genera a partir de los fosfolípidos de inositol (Alberts *et al.* 2008). En esta vía participa un receptor acoplado a una proteína G específicamente una G_q. Cuando el ligando se une al receptor se activa la proteína G_q que a través de su subunidad α estimula la activación de la fosfolipasa C- β . (Alberts *et al.* 2008). La fosfolipasa C hidroliza al fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) y se generan dos productos: el diacilglicerol y el IP₃. El IP₃ es una molécula pequeña, hidrosoluble que deja la membrana plásmica y difunde hacia el interior de la célula (Alberts *et al.* 2008). Cuando el IP₃ llega al retículo endoplásmico, se une a su receptor IP₃R que funciona como canal de Ca²⁺ y por lo tanto ocurre la liberación de calcio del interior del ER (Clapham 2007). El diacilglicerol es hidrofóbico y se queda en la membrana, activando a la proteína cinasa C en una de sus múltiples funciones (Alberts *et al.* 2008).

Otro mecanismo por el cual se libera Ca²⁺ de las pozas internas, es a través de los (RyR) receptores de rianodina (Nowycky y Thomas 2002). Estos receptores se encuentran en el retículo endoplásmico y el sarcoplásmico. Existen tres isoformas de estos receptores: RyR1, RyR2 y RyR3 (Fill y Copello 2002). El receptor de rianodina funciona como un canal para liberar Ca²⁺, el cual puede ser modulado por distintos agentes fisiológicos como el Ca²⁺, Mg²⁺, ATP, adenosin difosfato cíclico de ribosa (ADPRc), por procesos celulares: fosforilación, oxidación y por agentes farmacológicos como: la cafeína, rianodina, rutenio, etc. (Fill y Copello 2002). Se sabe que en células del músculo esquelético el RyR1 tiene una participación importante en el acoplamiento de la excitación-contracción del músculo. Para que ocurra el acoplamiento de excitación-contracción se produce la despolarización de la membrana que es detectada por los receptores de dihidropiridinas (DHPR) localizados en la membrana de los túbulos T, que transmiten la señal al RyR1 para que se libere Ca²⁺ del SR (Yamazawa *et al.* 1997).

Aunque los RyR pueden ser controlados por diversos factores, el Ca²⁺ tiene un papel muy importante en su regulación. Al ocurrir la entrada de Ca²⁺ extracelular, los canales RyR pueden ser activados por ese mismo Ca²⁺ para liberar más Ca²⁺ (Fill y Copello 2002).

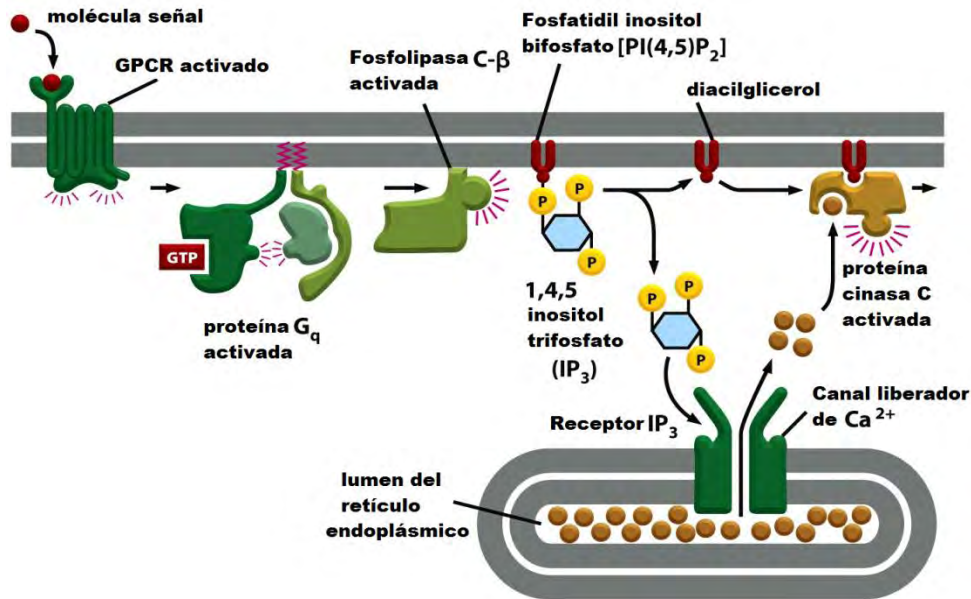


Figura 1.1. Ruta del IP3. El receptor acoplado a una proteína G se une a su ligando, lo que induce a que la proteína G se active, posteriormente esta proteína G es capaz de darle actividad a la fosfolipasa C-β, la cual hidroliza al fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂), generando el 1,4,5-inositol trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol. El IP₃ se une a su receptor en el retículo endoplásmico, para abrir canales de Ca²⁺. Tomado y modificado de: Alberts *et al.* 2008.

1.2. Medición del Ca²⁺ intracelular.

Por la importancia que tienen los cambios de la [Ca²⁺]_i para realizar distintas funciones biológicas, se han desarrollado diversas técnicas y herramientas que permiten la medición y visualización del calcio intracelular (Takahashi *et al.* 1999). En el año de 1980 Tsien y sus colaboradores lograron crear una variedad de indicadores químicos fluorescentes para medir calcio intracelular (Takahashi *et al.* 1999).

La fluorescencia es la emisión de luz por parte de una molécula con propiedades fluorescentes que al ser excitada emitirá luz de una longitud de onda más larga que la de absorción (Lichtman y Conchello 2005). El fenómeno de fluorescencia ocurre cuando los electrones de la molécula son excitados para pasar de un estado basal a uno con mayor energía, los electrones tienden a regresar al estado basal, al pasar al estado de menor energía emitirán luz (Lichtman y Conchello 2005).

El principio por el cual funcionan los indicadores fluorescentes, es que al estar unidos al calcio o la molécula de interés, cambian sus propiedades de absorción y de emisión (Takahashi *et al.* 1999). Los indicadores fluorescentes pueden clasificarse en indicadores de cociente o indicadores de una sola longitud de onda. Los indicadores de cociente miden la concentración de Ca^{2+} a partir de los valores de la intensidad de la fluorescencia de dos longitudes de onda. Con el otro tipo de indicadores la concentración de Ca^{2+} es determinada por el incremento relativo en la intensidad de la fluorescencia de una sola longitud de onda (Rudolf *et al.* 2003). En la Tabla 1.2 se muestran algunos de los indicadores fluorescentes más comúnmente empleados para medir el Ca^{2+} intracelular, los de color azul representan a los indicadores de cociente y los morados son los que miden una sola longitud de onda.

Tabla 1.2. Indicadores Fluorescentes de Calcio (Takahashi *et al.* 1999).

INDICADOR	Longitud de onda de Absorción (nm).		Longitud de onda de Emisión (nm).	
	Libre de Ca^{2+}	Unido a Ca^{2+}	Libre de Ca^{2+}	Unido a Ca^{2+}
Fura 2	363	335	512	505
Indo 1	346	330	475	401
Quin 2	353	333	495	495
Fluo 3	503	506	526	526
Calcium Green 1	506	506	531	531
Rhod 2	556	553	576	576

Además de los indicadores fluorescentes, también se han desarrollado sensores fluorescentes codificados genéticamente para medir parámetros intracelulares. Estos sensores están formados por proteínas fluorescentes con dominios que se unen a la molécula de interés (Zhang *et al.* 2002).

1.3. Proteínas Fluorescentes.

Los sensores fluorescentes codificados genéticamente están formados por proteínas fluorescentes. La proteína GFP por sus siglas en inglés, es la primera proteína verde fluorescente que se descubrió, la cual es sintetizada por la medusa *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.* 1962). Está formada por 238 aminoácidos, de los cuales los residuos 65-67 (Ser-Tyr-Gly) forman espontáneamente el cromóforo de la GFP (Tsien 1998). La GFP está constituida por 11 láminas

β que forman un barril, y una hélice que atraviesa el centro de la proteína, adentro de ese barril está localizado el cromóforo (Figura 1.3). La estructura en forma de barril permite que el cromóforo esté aislado y no quede expuesto al medio. La GFP posee dos picos en su espectro de excitación, el pico máximo es de 395 nm que da una emisión de 508 nm y un pico mínimo de 475 nm que emite a un máximo de 503 nm. La GFP ha sido la proteína fluorescente más utilizada en ensayos biológicos de expresión de genes, localización de proteínas, interacciones proteína-proteína entre otras (Chudakov *et al.* 2005).

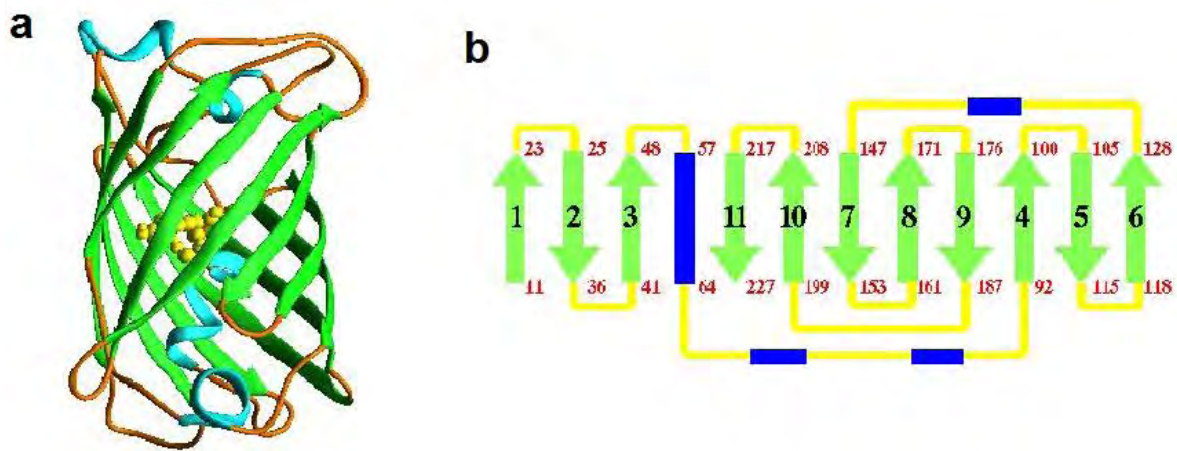


Figura 1.3. Estructura de la GFP. a. En su estructura tridimensional la GFP forma un barril de láminas β , el cromóforo se ubica casi en el centro. b. Representación en plano de la estructura de la GFP. Las hojas β están en color verde, las hélice α en azul y en amarillo se muestran las asas conectoras (Yang *et al.* 1996).

A partir de la GFP se han creado diferentes variantes a través de los avances en la ingeniería de proteínas fluorescentes. Esto se ha logrado por medio de ensayos de mutagénesis dirigida (Shaner *et al.* 2007). Se ha visto que los aminoácidos importantes en modificar las propiedades fluorescentes de estas proteínas son los residuos que forman el cromóforo o los que modifican su entorno. Estos cambios pueden alterar las transiciones electrónicas del cromóforo para modificar la fluorescencia de la proteína, con esto se ha logrado crear variantes como BFP, CFP, EGFP y YFP. En diferentes especies de colares se han podido aislar proteínas fluorescentes en el rango de anaranjado y rojo tales como DsRed, TagRFP, y tdTomato (Shaner *et al.* 2007). En la actualidad se ha logrado obtener proteínas fluorescentes que van en casi todo el rango del espectro visible (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Proteínas Fluorescentes y algunas de sus propiedades físicas. Modificado de Shaner *et al.* 2007.

Proteína	Color	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Cromóforo
EBFP2	Azul	383	448	SHG
ECFP	Cian	433/445	475/503	TWG
mEGFP	Verde	488	507	TYG
EYFP	Amarillo	514	527	GYG
tdTomato	Naranja	554	581	MYG
TagRFP	Naranja	555	584	MYG

1.4. Sensores fluorescentes codificados genéticamente.

Los sensores codificados genéticamente, reciben ese nombre porque son secuencias de DNA que pueden introducirse a las células a través de vectores para formar las proteínas que servirán como sensor (McCombs y Palmer 2008). Existen sensores genéticos fluorescentes para medir una gran variedad de moléculas como el Ca^{2+} , AMPc, GMPc, H_2O_2 , Cl^- entre otras (VanEngelenburg y Palmer 2008). Las proteínas fluorescentes que componen los sensores deben estar fusionadas a dominios proteicos que interaccionan con la molécula que se quiere medir para lograr cambios conformacionales que puedan modular o modificar las propiedades fluorescentes del fluoróforo (Mc Combs y Palmer, 2008). La naturaleza de esos dominios determinan el diseño y las propiedades del sensor, por eso es muy importante conocer con precisión las características funcionales de esos motivos (Mank y Griesbeck 2008).

Cabe mencionar que los indicadores fluorescentes sintéticos comunes y los codificados genéticamente tienen ciertas ventajas y desventajas dependiendo del tipo de estudio que se quiere llevar a cabo. Los indicadores químicos fluorescentes a diferencia de los codificados genéticamente son moléculas pequeñas con un rango dinámico amplio, una mayor sensibilidad y poseen una cinética de respuesta rápida (Palmer y Tsien 2006). Dentro de las desventajas que se presentan con el uso de indicadores químicos, es que la mayoría de estas moléculas sintéticas son esteres que entran a través de las membranas y su localización no puede ser controlada, por lo tanto no pueden dirigirse a un compartimiento intracelular específico, estos indicadores no se

pueden incorporar a tejidos intactos, además se van degradando o saliendo de las células, por lo tanto es difícil hacer experimentos de larga duración es decir horas o días (Palmer y Tsien 2006).

Algunas de las ventajas que tiene el uso de sensores codificados genéticamente son: 1) no necesitan cofactores ni sustratos para funcionar, 2) se puede dirigir su localización hacia algún compartimiento intracelular específico (Rocheffort *et al.* 2008), 3) la expresión y por lo tanto la producción del sensor puede ser inducida si se ponen bajo el control de determinados promotores, 4) además una vez incorporados en las células, en caso de transfecciones estables, se pueden llevar a cabo ensayos por periodos largos de tiempo (VanEngelenburg y Palmer 2008). Algunos de los problemas que podría traer el uso de estos sensores es presentar un rango dinámico bajo, y en el caso de los que utilizan una proteína fluorescente (un fluoróforo) pueden ser sensibles a cambios en el pH (Nakai *et al.* 2001).

Los sensores genéticos fluorescentes que miden calcio tienen como dominio de unión a Ca^{2+} la proteína calmodulina. La calmodulina (CaM) es una proteína presente en todas las células eucariontes. Esta proteína es relativamente pequeña ya que la CaM de vertebrados es de 148 aminoácidos (Chin y Means 2000). Esta proteína posee un dominio conocido como mano "EF", el cual es un sitio unión al Ca^{2+} que está formado por dos hélices y un bucle. La calmodulina tiene dos dominios globulares, en cada dominio hay dos sitios de unión a Ca^{2+} (Johnson 2006). La unión con el Ca^{2+} produce alteraciones en los ángulos helicoidales del motivo EF. Durante la unión del calcio con CaM, la proteína experimenta cambios estructurales, el más notable es la rotación de los dos dominios globulares que genera una conformación más abierta de la proteína (Figura 4). Los nuevos arreglos estructurales resultan en la exposición de sitios hidrofóbicos que le permiten interactuar con sus proteínas blanco como: fosfodiesterasas, adenilato ciclasas dependientes de CaM, cinasas, fosfatasa como la calcineurina entre muchas otras (Chin y Means 2000). La proteína CaM participa en la regulación de procesos celulares como el crecimiento, proliferación, movimiento etc. (Hoefflich y Ikura 2002).

Existen principalmente dos formas en las cuales operan los sensores genéticos fluorescentes para calcio: los que utilizan FRET (Förster resonance energy transfer) donde se requiere de dos fluoróforos, y los sensores que utilizan una proteína fluorescente con un solo fluoróforo (Mank y Griesbeck 2008).

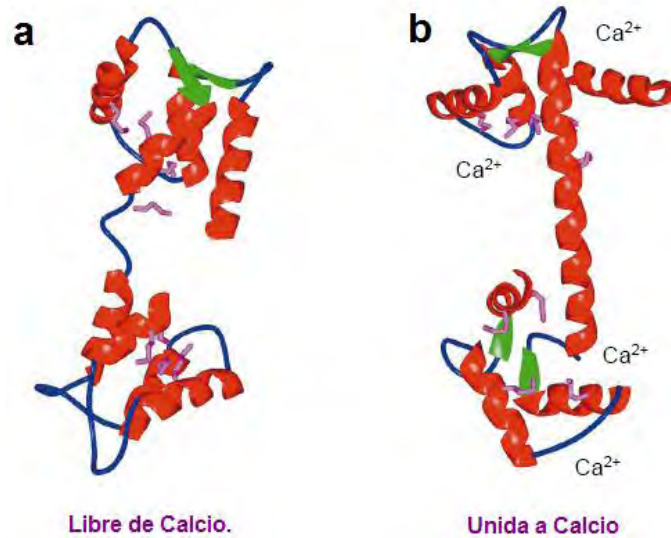


Figura 1.4. Calmodulina y su interacción con el Ca^{2+} . El ion calcio regula cambios conformacionales de CaM. **(a)** En ausencia de calcio, CaM adopta una conformación más cerrada. **(b)** Cuando se une el calcio la proteína presenta cambios estructurales en los dominios confiriéndole una conformación más abierta. En el esquema se muestran en morado residuos hidrofóbicos potenciales para interactuar con otras proteínas. Estos residuos están más expuestos cuando la proteína está unida a Ca^{2+} . Tomado y modificado de Chin y Means 2000.

1.4.1 Sensores de FRET.

FRET es un fenómeno de transferencia de energía que ocurre entre un fluoróforo donador y un aceptor localizados a una cierta proximidad molecular adecuada para que el espectro de emisión del donador sobrelape con el espectro de excitación del aceptor (Figura 1.4.1). Bajo estas condiciones la energía (E) es transferida del donador al aceptor con una eficiencia que es definida por la siguiente ecuación:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Donde r es la distancia que existe entre los dos fluoróforos y R_0 (llamada la distancia Förster), es la distancia a la cual el 50% de la energía se transfiere entre el donador y el aceptor. Es importante resaltar que R_0 es un valor específico particular de cada par de fluoróforos donador y aceptor, que además dependerá del sobrelape del espectro de emisión del donador y la excitación del aceptor. Generalmente las distancias Förster están en el rango de 20-80 Å (Zhang *et al.* 2002).

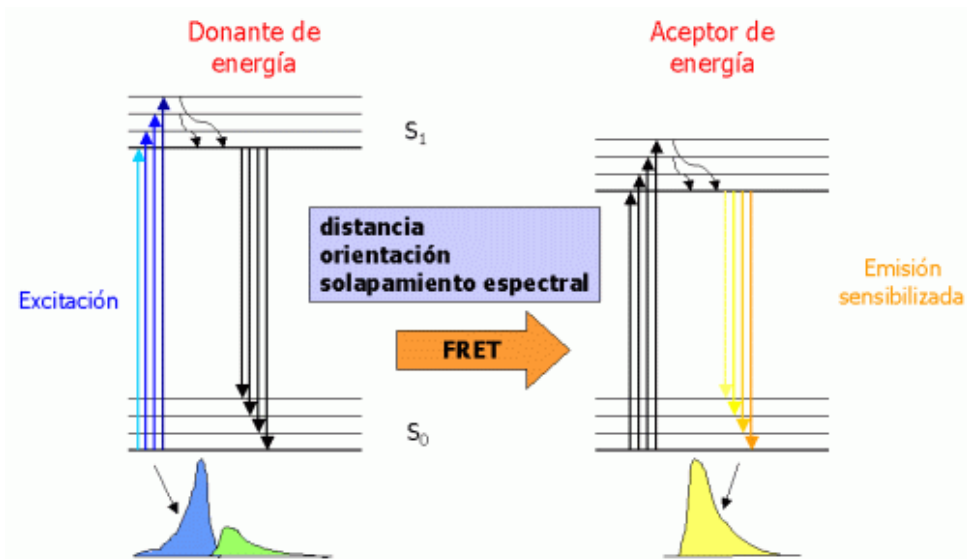


Figura 1.4.1. FRET. Para que ocurra FRET, la energía debe ser transferida de un fluoróforo donador en un estado electrónico excitado a otro fluoróforo aceptor. La longitud de onda de emisión de la molécula donadora debe ser la longitud de onda de excitación del aceptor, por lo tanto si ocurre FRET la porción de la luz que se observará será la de emisión del donador. Tomado y modificado de Fernández *et al.* 2005.

Los sensores de FRET están formados por dos proteínas fluorescentes (dos fluoróforos). Para que funcione el sensor, las dos proteínas fluorescentes deben tener acoplados dominios, que interactúan en la presencia de la molécula de interés. Al darse esta unión, ocurren cambios que permiten a las dos proteínas fluorescentes estar a una distancia adecuada para que ocurra FRET (Figura 1.4.1.1).

Los sensores de FRET tienen la ventaja de funcionar como indicadores de cociente porque se miden dos longitudes de onda (Rudolf *et al.* 2003).

El primer sensor de FRET de calcio que se construyó, fue un indicador llamado Camaleón (Figura 1.4.1.2.), este se construyó colocando a la proteína calmodulina y al péptido M13 que proviene de la cadena ligera de la cinasa de la miosina (MLCK), entre una proteína azul (BFP) o cian (CFP) y una verde (GFP) o amarilla (YFP) (Miyawaki *et al.* 1997). Cuando aumenta el calcio intracelular, el Ca^{2+} se une a CaM y esta interactúa con M13, al darse esta unión, las dos proteínas fluorescentes se ubican en una distancia adecuada para que ocurra FRET. Los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se midían por la disminución de la emisión del azul y el incremento en la emisión del verde.

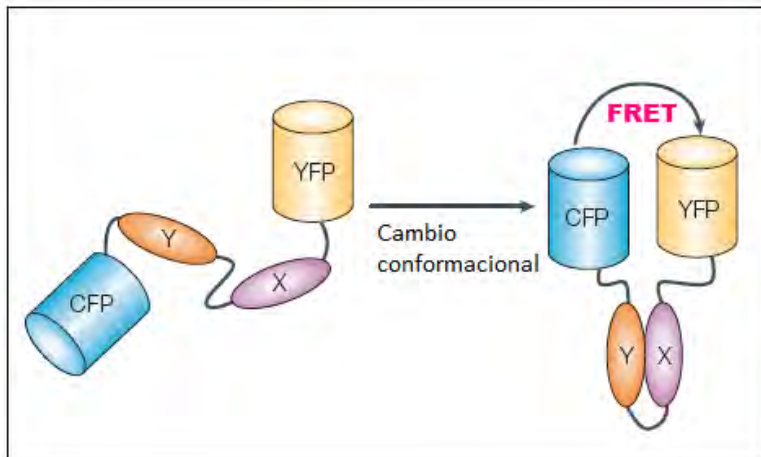


Figura 1.4.1.1. Diseño general de los sensores de FRET. Estos sensores tienen dos proteínas fluorescentes (p e. YFP y CFP) y estas se encuentran fusionadas a otras proteína (X, Y) que interactúan entre ellas ante la presencia de cierta molécula. Cuando las proteínas (X, Y) se unen producen que los fluoróforos de las proteínas fluorescentes estén en una proximidad adecuada para que ocurra FRET. Tomado y modificado de Zhang, 2002.

Desafortunadamente este sensor presentaba un rango dinámico muy pequeño (1.6 veces aumento en la fluorescencia), por lo tanto era difícil visualizar el cambio de fluorescencia producido por el calcio (Truong *et al.* 2001).

En la búsqueda por mejorar los sensores de FRET para calcio, se han probado otras proteínas que puedan servir como dominios de unión al calcio ya que la CaM es una proteína muy abundante en las células lo que podría ocasionar que esa CaM endógena se uniera al M13 del sensor y por lo tanto no detectar cambios en la fluorescencia. Se han creado sensores que emplean una parte de la troponina C como motivo de unión a Ca^{2+} (Heim y Griesbeck 2004). Para crear el sensor llamado TNXXL, se realizaron mutaciones específicas en residuos de aminoácidos de la secuencia de la troponina C del músculo esquelético de pollo para seleccionar los residuos que pudieran aumentar la sensibilidad de esa porción de la troponina C hacia el Ca^{2+} . Con esos ensayos se logró generar una secuencia de la troponina C que tuviera una alta afinidad por el Ca^{2+} (Mank *et al.* 2008). El sensor TNXXL está formado por dos proteínas fluorescentes: CFP y citrina, unidas por la porción modificada de la troponina C (Figura 1.4.1.3a).

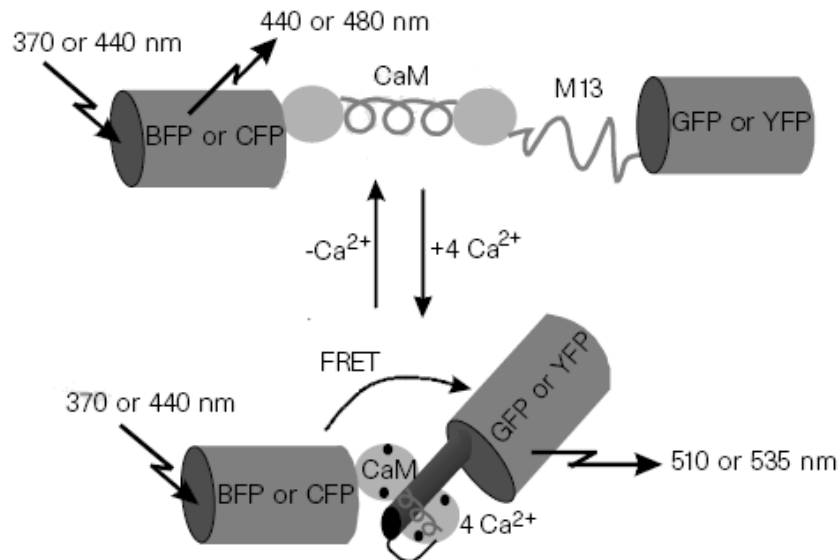


Figura 1.4.1.2. Sensores de calcio llamados Camaleones. Los cilindros representan las proteínas fluorescentes, en medio se encuentran fusionadas CaM y M13. Al estar presente el calcio CaM y M13 se unen, lo que ocasiona que ocurra FRET. Tomado de Miyawaki *et al*; 1997.

Otro sensor de FRET optimizado para medir calcio es el D3cpv (Wallace *et al.* 2008). Para la construcción de este sensor se utilizó a CaM y M13 modificados para que interactúen solamente entre ellos con mayor especificidad. Además en D3cpv la CaM endógena es incapaz de unirse al M13 del sensor. Para generar este sensor utilizaron un programa computacional para seleccionar los residuos de aminoácidos que pudieran modificar las propiedades de interacción entre CaM y M13 (Palmer *et al.* 2006). Las nuevas mutantes de CaM y M13 se nombraron D3 y se fusionaron a la proteína fluorescente cian (CFP) y a una proteína fluorescente venus permutada circularmente (cpV) (Figura 1.4.1.3b). El sensor TNXXL y D3cpv han resultado ser muy eficientes para hacer estudios de actividad neuronal en ratas (Rocheffort y Konnerth 2008).

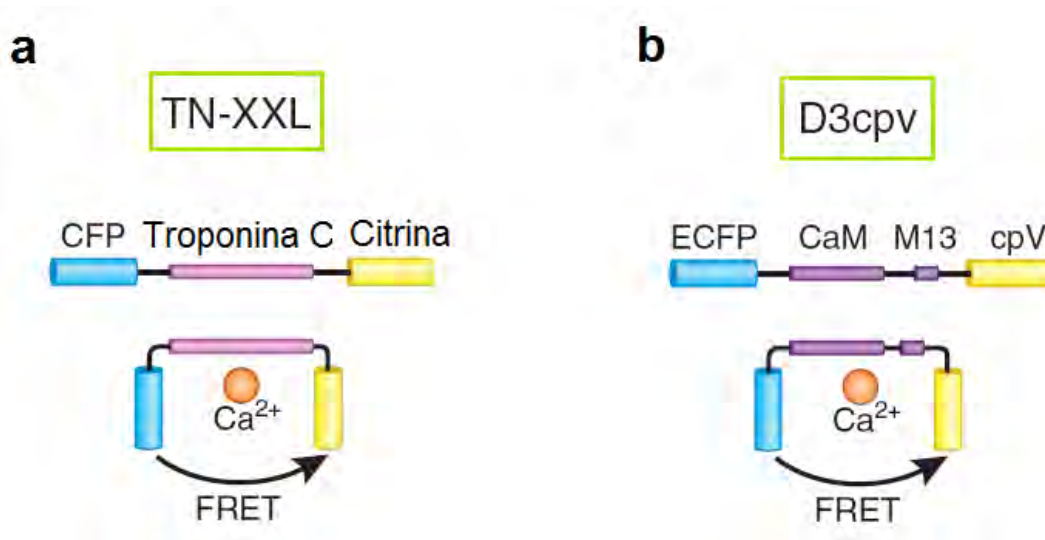
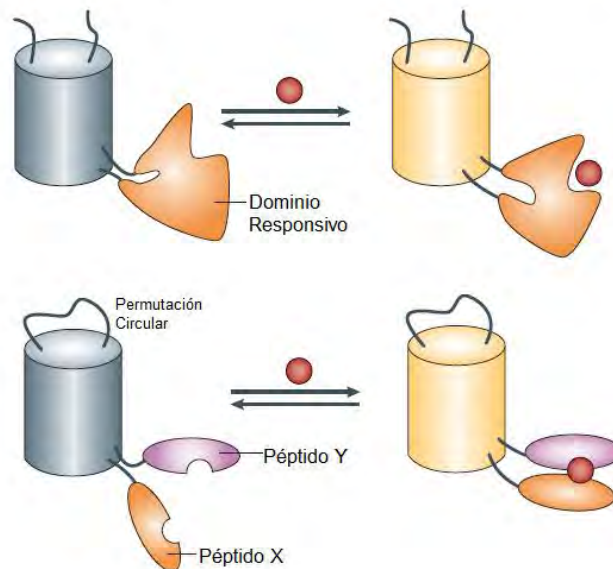


Figura 1.4.1.3. Sensores de FRET para Ca²⁺. (a). El sensor TN-XXL. Está formado por dos proteínas fluorescentes (CFP y Citrina) las cuales están unidas por una porción de la secuencia de la troponina C. (b). D3cpv, está formado por una proteína fluorescente azul (ECFP) y una amarilla venus permutada circularmente (cpV), las cuales están unidas por la CaM y el M13. Tomado de Rochefort y Konnerth 2008.

1.4.2. Sensores genéticos que utilizan un fluoróforo.

Estos sensores funcionan a través de cambios conformacionales en la proteína fluorescente que alteren el entorno donde se encuentra el cromóforo (McCombs y Palmer 2008). Para que sucedan esos cambios se deben insertar dominios que se unen a la molécula de interés en sitios cercanos al cromóforo (Figura 1.4.2). Cuando ocurre la interacción con la molécula de interés, se modifica la estructura de la proteína cerca del sitio del cromóforo, ya sea dejándolo más expuesto o menos expuesto al solvente y por lo tanto cambiará su estado de protonación. Cuando el cromóforo se encuentra desprotonado se favorece la deslocalización de los electrones y por lo tanto la fluorescencia aumenta (Nagai *et al.* 2001).

A Diseño general de sensores con una Proteína Fluorescente



B Sensores de calcio formados por una Proteína Fluorescente

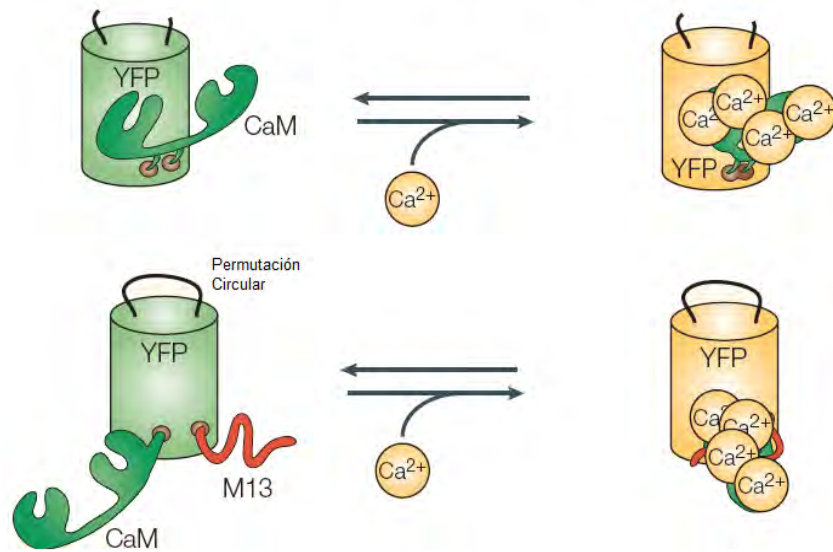


Figura 1.4.2. Sensores formados por una proteína fluorescente. **A.** En estos sensores la proteína fluorescente está fusionada a dominios sensibles a la molécula de interés, que al interactuar con la molécula experimentan cambios en la fluorescencia. **(B).** En los sensores de calcio se puede utilizar una YFP fusionada a la CaM, o puede ser una YFP permutada circularmente fusionada a CaM y M13. En los dos casos la presencia del calcio produce que la fluorescencia de la proteína cambie. Tomado y modificado de: Zahng et al; 2002 y Rudolf et al; 2003.

Como se muestra en la Figura 1.4.2.1 existen básicamente tres diseños de sensores para calcio que utilizan una proteína fluorescente (Mank y Griesbeck 2008). Los camgaroos son sensores formados por una YFP fusionada a CaM. Los GCaMP están contruidos a partir de una proteína fluorescente permutada circularmente. La permutación circular consiste en unir los extremos originales amino (N) y carboxilo (C) por un péptido de unión que va de 5-6 aminoácidos (VanEngelenburg y Palmer 2008). En los sensores GCaMP, en el extremo amino terminal está fusionado el péptido M13 y en el carboxilo terminal está CaM. Por último, los pericams son sensores casi iguales a los GCaMP, también están permutados circularmente pero la diferencia es que utilizan YFP.

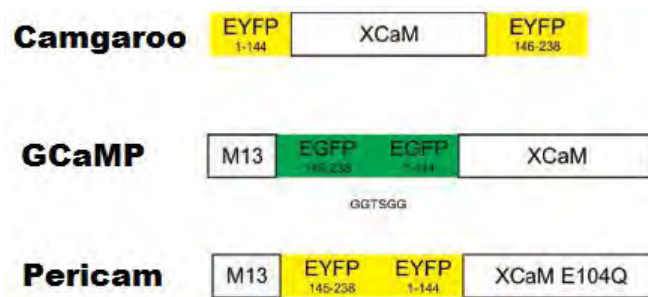


Figura 1.4.2.1. Diseño básico de sensores de calcio. En los camgaroos CaM está fusionada entre la posición 145 y 146 de una YFP. Los GCaMP y los pericam utilizan proteínas permutadas circularmente, los GCaMP utilizan proteínas verdes fluorescentes y los pericams utilizan amarillas. Tomado de Mank y Griesbeck 2008.

1.5. Sensor de Ca²⁺ Case 12.

Case 12 es un sensor fluorescente codificado genéticamente que modifica su fluorescencia ante cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ (Souslova *et al.* 2007). Este sensor está formado por una proteína fluorescente GFP permutada circularmente, en el residuo 146 se fusionó la CaM y en el 147 el M13 que proviene de la cadena ligera de la cinasa de la miosina (MLCK) (Figura 1.7). Los residuos de aminoácidos 145 y 148 de la proteína GFP original han mostrado ser determinantes en las propiedades fluorescentes porque se localizan cercanos al cromóforo (Nakai *et al.* 2001). Por lo tanto para hacer que el sensor Case 12 tuviera un rango dinámico más amplio, se hicieron varios ensayos de mutagénesis sitio dirigida cambiando los residuos de aminoácidos en las posiciones 145 y 148 (Souslova *et al.* 2007). En la Tabla 1.5 se muestran los aminoácidos clave en la

construcción del sensor, se encontró una mejor respuesta en cuanto al aumento de la fluorescencia cuando los residuos se cambiaron por Glu148/Thr145 (Souslova *et al.* 2007).

Tabla 1.5. Residuos de aminoácidos importantes en el diseño del sensor (Souslova et al; 2007).

Sensor	Sitios de unión a M13 y CaM	Residuo 148	Residuo 145	Residuo 203
Case 12	SSLEENVY---LEYNTRDQL	E	T	F
GFP nativa		H	Y	E

El sensor Case 12 funciona a través de la interacción entre CaM y M13. Cuando el Ca^{2+} se une a CaM, esta proteína cambia su estructura y expone residuos hidrofóbicos que hacen contacto con los residuos Trp4 y Phe17 de M13 (Figura 1.5). Al estar unidos CaM y M13, se produce un cambio conformacional en proteína fluorescente del sensor, la cual adopta una forma más cerrada y el cromóforo queda menos expuesto al solvente. Al estar menos expuesto se encuentra en un estado desprotonado. En el estado desprotonado la fluorescencia aumenta (Nagai *et al.* 2001).

1.6. Peróxido de Hidrógeno.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) es un término que se les da a ciertas moléculas que se forman de la reducción incompleta del oxígeno (D'Autreaux y Toledano 2007). Las especies reactivas de oxígeno son moléculas como el O^2 , H_2O_2 , OH, NO, etc. Las ROS pueden actuar como moléculas intracelulares de señalización (Covarrubias *et al.* 2008), y también se ha encontrado que pueden activar diferentes cascadas enzimáticas y factores de transcripción (Droge 2002). Se ha demostrado que pueden participar activamente en diversos procesos biológicos como: estrés oxidativo, crecimiento celular, muerte celular programada, proliferación, migración, diferenciación entre otros (Covarrubias *et al.* 2008).

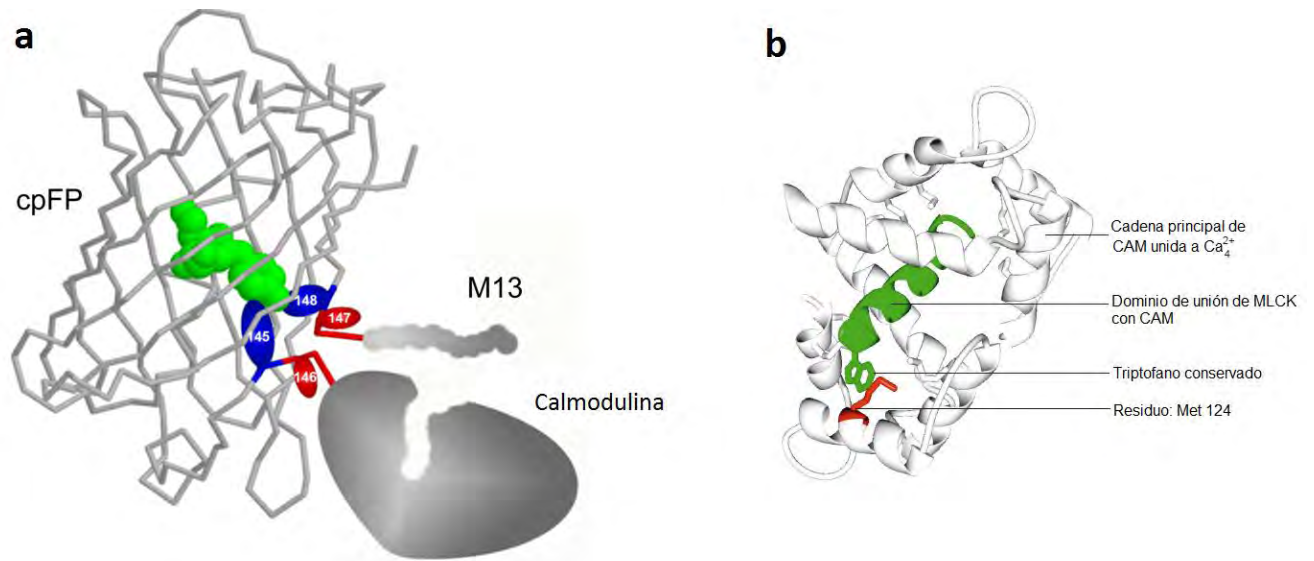


Figura 1.5. Sensor Case 12. (a) En el esquema se muestra a la proteína fluorescente permutada circularmente (cpFP), con el cromóforo en verde, los residuos de aminoácidos más próximos al cromóforo en azul y en rojo los residuos de aminoácidos donde se unió M13 y CaM. (b) Representación de la interacción de CaM con M13. MKCL está en verde y la cadena principal de CaM está en blanco. MLCK puede hacer contacto con la proteína CaM a través de su triptófano que interacciona con la Metionina 124 de CaM. Tomado de: Souslova *et al.* 2007 y Chin y Means 2000.

El H_2O_2 es muy conocido por sus efectos citotóxicos, pero últimamente se le ha empezado a considerar como un regulador importante en la transducción de señales intracelulares (Veal *et al.* 2007). En organismos multicelulares se ha reportado la participación del H_2O_2 en activar rutas para estimular la proliferación, diferenciación así como la apoptosis (Cai 2005). La utilización del H_2O_2 como una molécula señal por ser tan reactiva y tóxica representa un riesgo para las células, por lo tanto su producción y eliminación debe ser muy bien regulada (Ushio-Fukai 2006). Existen enzimas que se encargan de su degradación como la catalasa, glutatión peroxidasa y las peroxiredoxinas (Veal *et al.* 2007).

El H_2O_2 puede generarse por diversas fuentes, principalmente se produce por la catálisis de aniones superóxido (O_2^-) que se forman durante la respiración aeróbica y luego se convierte en H_2O_2 por la superóxido dismutasa, pero se ha visto que el H_2O_2 puede generarse a partir de O_2^- generado por NADPH oxidasas que son activadas por células del sistema inmune (fagocitos), factores de crecimiento o citosinas (Veal *et al.* 2007). El H_2O_2 también puede provenir del exterior, al ser una molécula no polar puede atravesar fácilmente las membranas. La concentración de

H₂O₂ intracelular es importante para regular las vías donde interviene, a bajas concentraciones puede activar diversas proteínas, pero en altos niveles puede dañar a las células (Veal *et al.* 2007).

Para que el H₂O₂ pueda ejercer su función como una molécula reguladora de procesos celulares, debe interactuar e influenciar en la actividad de otras proteínas que respondan a esta molécula. Existen diversas proteínas que interaccionan con el H₂O₂, por ejemplo las proteínas que contienen residuos de cisteínas que al estar desprotonados son muy susceptibles a ser oxidadas por el H₂O₂. La mayoría de los residuos de cisteína de proteínas citosólicas están protonados, por lo tanto no pueden reaccionar ante la presencia de H₂O₂, con esto se puede regular la función del peróxido de hidrógeno como molécula señal, solo se le permite interaccionar y activar ciertas proteínas específicas (Veal *et al.* 2007).

Es importante resaltar que la función de H₂O₂ en la regulación de diversas rutas apenas se está descubriendo, pero parece ser una molécula que participa en un gran número de procesos celulares importantes (Veal *et al.* 2007).

1.7. Sensor de H₂O₂ intracelular.

La visualización y medición de ROS intracelular se ha llevado a cabo comúnmente utilizando derivados de diclorofluoresceína (DCF). Estos compuestos no son específicos para medir un tipo de especie reactiva porque pueden reaccionar con todas las ROS, tampoco se puede dirigir su localización a compartimientos intracelulares específicos, al ser expuestos a la luz pueden producir más ROS.

Por lo anterior para estudiar la concentración de H₂O₂ intracelular de forma más eficiente, se han desarrollado sensores genéticos fluorescentes específicos para H₂O₂ como HyPer (Belousov *et al.* 2006). HyPer es un sensor formado por una proteína amarilla fluorescente permutada circularmente (cpYFP) insertada dentro del dominio regulatorio de la proteína OxyR. La proteína OxyR es un factor de transcripción en *E. coli* que se activa en presencia del peróxido de hidrógeno intracelular, el H₂O₂ oxida cisteínas de OxyR (Lee *et al.* 2004). OxyR está formada por dos dominios, un dominio de unión a H₂O₂ (aminoácidos 80-310), y un dominio de unión al DNA (aminoácidos 1-79). La activación de la proteína OxyR por el H₂O₂, ocurre cuando el peróxido de hidrógeno oxida la Cys 199 formando ácido sulfénico como intermediario, posteriormente se

genera un enlace disulfuro entre la Cys 199 y la Cys 208 (Choi *et al.* 2001). La formación de este nuevo enlace produce el cambio conformacional dramático en el dominio de unión de H₂O₂ especialmente dentro de las regiones flexibles que abarcan los residuos de aminoácidos 205-222 (Belousov *et al.* 2006). Cuando la OxyR pasa de su forma reducida a oxidada es capaz de unirse al DNA para reclutar a la RNA polimerasa para transcribir genes (Lee *et al.* 2004).

Para generar el sensor HyPeR, se fusionó una YFP permutada circularmente al dominio de unión de H₂O₂ de OxyR (Belousov *et al.* 2006). En el sensor HyPer la parte flexible del dominio de unión de H₂O₂ de OxyR se localiza cerca del cromóforo de la YFP, el cambio conformacional de OxyR causado por el H₂O₂ cambia el entorno del cromóforo, por lo tanto aumenta su fluorescencia. Para corroborar la especificidad de HyPer al H₂O₂, se probaron diferentes especies reactivas de oxígeno. En la Tabla 1.7 se muestra que ninguna de las otras ROS excepto el H₂O₂ fueron capaces de inducir cambios en la excitación de la YFP, por lo tanto el sensor HyPer puede ser usado para medir exclusivamente H₂O₂ intracelular (Belousov *et al.* 2006).

Tabla 1.7. Efecto de diferentes ROS en la excitación de HyPer (Belousov *et al.* 2006).

Oxidante	Fuente y concentración	Cambio en el ratio de excitación (500 nm/ 420 nm)
H₂O₂ Peróxido	H ₂ O ₂ (25nM)	1.5 +- 0.12
O₂- Superoxido	Xantina (30mM) – xantantina oxidasa (25mU)	1+- 0.04
GSSG Glutanión oxidizado	Glutanión oxidizado (1mM)	1 +- 0.02
NO Óxido Nítrico	Óxido nítrico S-nitroso- N- acetil penicilamina	1 +- 0.05
ONOO Peroxinitrito	Peroxinitrito 3- morfolinosidomina	1 +- 0.04

1.8. Insulators

Los *insulators* son secuencias de DNA que tienen la función de proteger genes de interacciones inapropiadas entre dominios adyacentes en la cromatina (Gazner y Felsenfeld, 2006). Existen básicamente dos formas en la cuales operan los *insulators*, una forma es que bloquean la interacción de *enhancers* con promotores, la otra forma es que pueden funcionar como barreras (West *et al.* 2002). Para que el *insulator* pueda bloquear la interacción de un *enhancer* con el promotor, debe estar localizado entre estos dos (Figura 1.8 a). Cuando el *insulator* actúa como barrera, ayuda en la prevención de la formación de la heterocromatina, por lo tanto el *insulator* ayuda a evitar que ocurra la condensación de la cromatina y como consecuencia el silenciamiento de ciertos genes (Figura 1.8b).

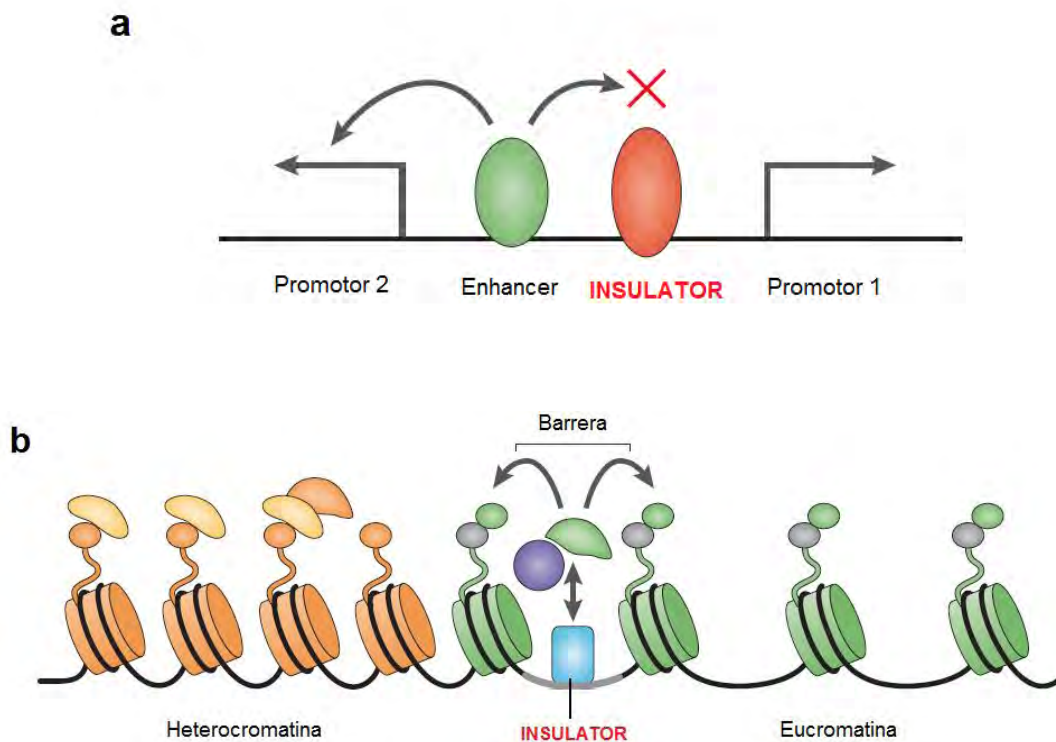


Figura 1.8. Funciones de los *Insulators*. (a). Las secuencias de los insuladores pueden bloquear la interacción de enhancers con promotores. (b). Cuando funcionan como barreras, no permiten que ocurra la formación de la heterocromatina. Tomado y modificado de Gazner y Felsenfeld 2006.

El primer *insulator* de vertebrados que se caracterizó fue el *HS4* que se encuentra en el extremo 5' del locus de la β -globina de pollo (Figura 1.8.1.). Este *insulator* posee las dos funciones, por una parte evita la interacción *enhancer*-promotor y también puede funcionar como barrera. Su

función para bloquear *enhancers* la lleva a cabo por medio de la unión a la proteína CTCF y la actividad de barrera la realiza a través de las proteínas USF1, USF2, FI, FIII y FV (Gaszner y Felsenfeld 2006).

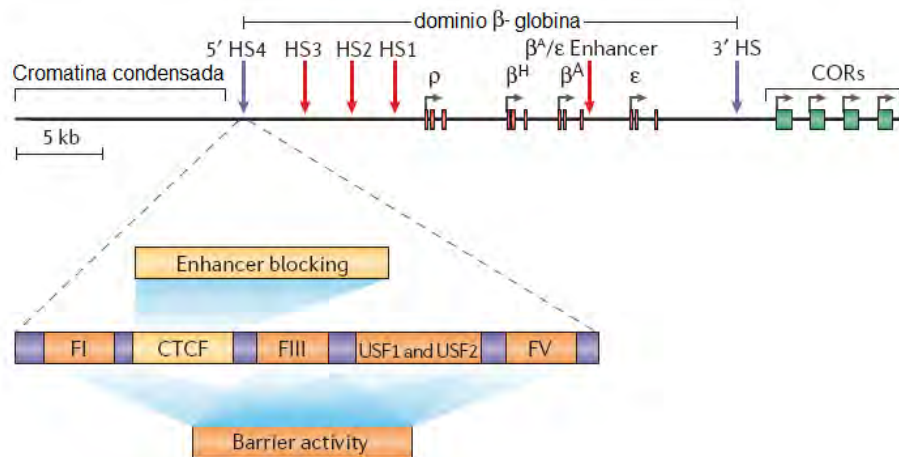


Figura 1.8.1. Locus β -globina de pollo. En el extremo 5' se encuentra la secuencia que funciona como *insulator*. La actividad de bloqueo del *enhancer* es regulada por la proteína CTCF, mientras que la función de barrera resulta del efecto combinado de USF1 y USF2, y las proteínas FI, FIII y FV. Tomado y modificado de Gaszner y Felsenfeld 2006.

1.9. Utilización de sensores fluorescentes genéticos en células ES.

Las células troncales embrionarias (ES), son células pluripotentes capaces de formar cualquier tipo de célula somática y de la línea germinal cuando son inyectadas en el embrión en la etapa de blastocisto (Baizabal y Covarrubias, 2008). Estas células pueden proliferar y mantener su pluripotencia en cultivo, y también *in vitro* se puede inducir su diferenciación al agregarse ciertos factores extrínsecos o moléculas para dirigirlos a formar un tipo celular específico (Murry y Keller 2008). Asimismo se ha probado que su diferenciación puede ocurrir si se colocan en tejidos o explantes que producen las moléculas y factores necesarios para inducir la formación de un tipo celular determinado, por ejemplo neuronas (Baizabal y Covarrubias 2008). En los últimos años se ha tenido interés en encontrar si en células ES el Ca^{2+} y H_2O_2 participan durante los procesos de diferenciación en la generación de neuronas. Los sensores fluorescentes codificados genéticamente parecen ser una herramienta útil para llevar a cabo ese tipo de estudios en estas células.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Sensor de Ca^{2+} Case12.

La primera caracterización del sensor de calcio Case12, lo realizó el grupo de investigación que lo construyó (Souslova *et al.* 2007). Primero determinaron el espectro de emisión y de excitación del sensor, y encontraron que Case12 posee un pico de excitación máximo de 491 nm y un pico de emisión máximo de 516 nm (Figura 2.1a). Posteriormente hicieron pruebas para determinar el funcionamiento del sensor utilizando diferentes líneas celulares. Primero emplearon células HeLa para ver la respuesta del sensor ante los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Observaron que la fluorescencia basal de las células era muy baja, pero al adicionar el ionóforo A23187 al medio el cual contenía 2 mM de Ca^{2+} , incrementó de 5-6 veces la fluorescencia, la cual disminuyó a niveles basales cuando se agregó EGTA (Figura 2.1a). El sensor también se probó en células de melanoma humano (M21) ante cambios de Ca^{2+} menos bruscos que entraran dentro del rango fisiológico. A las células M21 que expresaron Case12, se les agregó una concentración final de 100 μM de ATP, los cambios en la fluorescencia ocurrieron como espigas, por lo tanto la unión del calcio a la proteína del sensor es rápida y reversible, con esto se demostró que el sensor puede detectar oscilaciones rápidas de Ca^{2+} (Figura 2.1b). Otras de las pruebas del sensor se hicieron en PC12, las cuales son células neuronales derivadas de feocromocitoma de rata, antes de inducir cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ las PC12 se trataron con el factor de crecimiento neuronal (NGF) para inducir su diferenciación hacia neuronas. Transcurridos aproximadamente 170 segundos, se agregó al medio 500 μM de carbacol (CCH), después se hizo un lavado durante 10 minutos para retirarlo del medio. Los resultados mostraron que la intensidad de la fluorescencia aumentó cuando se agregó CCH, pero la fluorescencia disminuye cuando se retira el CCH de las células (Figura 2.1d). Con Estas pruebas los autores demostraron que Case12 tiene el potencial de utilizarse en líneas celulares para detectar y responder con un rango dinámico alto ante los cambios en las concentraciones de calcio intracelular (Souslova *et al.* 2007).

Existen pocos reportes sobre sensores genéticos fluorescentes de Ca^{2+} utilizados en células troncales embrionarias (ES). En 2009 Meyer y sus colaboradores reportaron el uso de un sensor fluorescente de Ca^{2+} codificado genéticamente llamado Camgaroo-2, el cual permitió hacer detecciones en los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células troncales embrionarias de ratón de la línea GSI1.

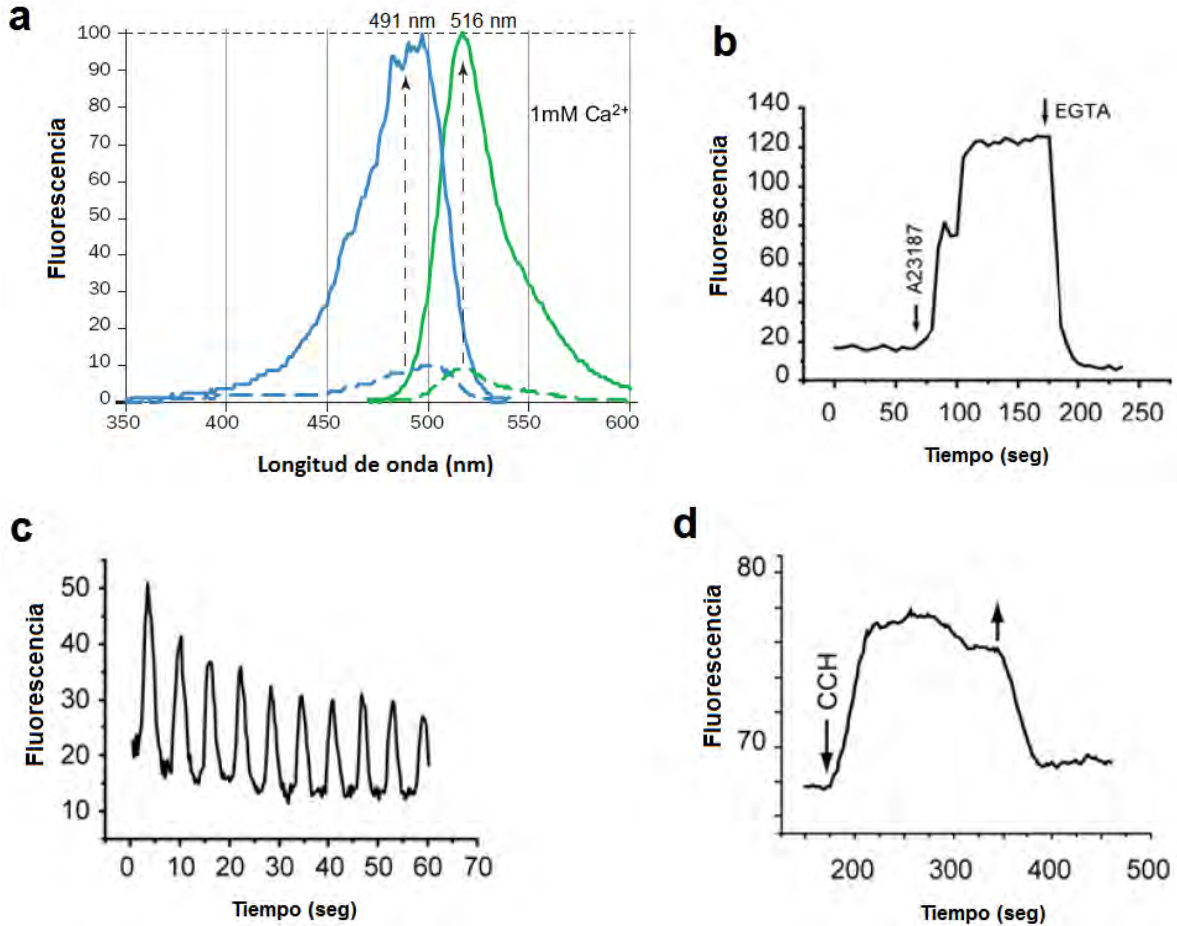


Figura 2.1. Caracterización de Case 12 en diferentes líneas celulares. (a). Picos máximos de excitación y emisión. Para determinar el espectro de fluorescencia de Case12 se utilizó 0.5mM de EGTA (líneas punteadas) y 1 mM de Ca^{2+} (líneas continuas). **(b).** Cambios detectados en la fluorescencia ante la adición del ionóforo A23187 y EGTA en células HeLa que expresaban Case12. **(c).** Fluorescencia de las células M21 en respuesta a la adición de 100 μM de ATP. **(d).** Respuesta de las células PC12 ante 500 μM de carbacol (CCH). La flecha hacia abajo indica el momento de la adición, la flecha hacia arriba indica el momento donde se hizo el lavado. Tomado y modificado de Souslova *et al.* 2007.

Los experimentos se realizaron tanto en células ES pluripotentes (indiferenciadas) como en ES diferenciadas a neuronas (Meyer *et al.* 2009). En la primera prueba se analizó la fluorescencia de células ES indiferenciadas cuando se adicionaba potasio (K^+) al medio. En medio sin K^+ las células exhibieron una fluorescencia basal baja (Figura 2.1.1a), pero cuando se agregaron altas concentraciones de K^+ (60 mM) ocurrió un incremento en la intensidad de la fluorescencia (Figura 2.1.1b). Como se ve en la gráfica (Figura 2.1.1c), el aumento de la fluorescencia causado por el K^+ , fue revertido al momento de hacer un lavado y quitar el potasio del medio.

En células ES que previamente se indujeron a la diferenciación neural, la fluorescencia basal también fue baja (Figura 2.1.1d). Al momento de la adición de 60mM de K^+ al medio, la fluorescencia de las células aumentó (Figura 2.1.1e), pero como lo muestra la gráfica de barras (Figura 2.1.1f) al quitar el medio con alto K^+ la fluorescencia vuelve a disminuir. Por último a células ES diferenciadas e indiferenciadas que expresaron camgaroo-2, se les agregó 10 mM de ionomicina al medio, que ocasionó aumento en la fluorescencia de las células comparada con la basal, pero esta vuelve a bajar a niveles casi basales cuando se remueve la ionomicina del medio (Figura 2.1.2a y b). Los resultados presentados en dicho trabajo indican que el sensor Camgaroo-2 puede ser utilizado para monitorear cambios de calcio intracelular en células ES y en su progenie, incluyendo las que se diferenciaron en neuronas (Meyer *et al.* 2009)

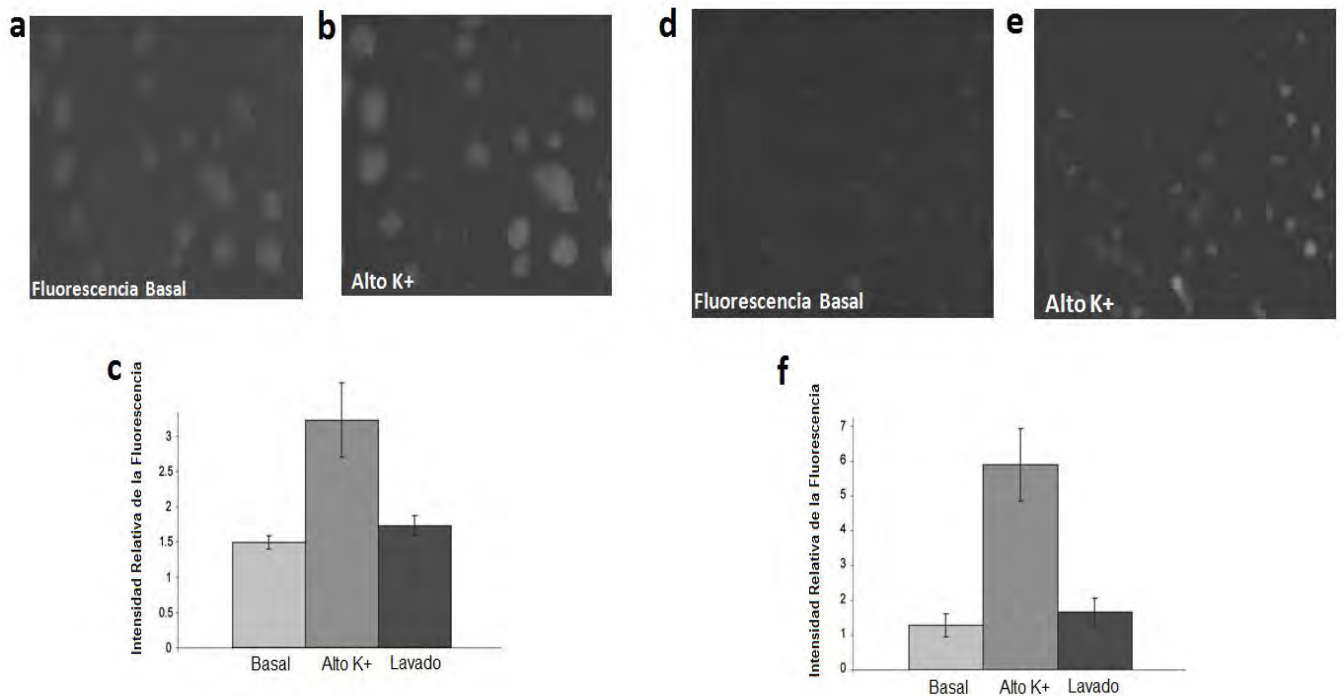


Figura 2.1.1 Cambios en la fluorescencia de ES indiferenciadas y diferenciadas que expresan Camgaroo-2. (a). La fluorescencia basal de las células era baja en condiciones normales. (b). Al adicionar 60mM de potasio al medio la fluorescencia de las células aumentó. (c). El aumento de la fluorescencia causado por el potasio se revertió al quitar el medio y hacer un lavado a las células. (d). Las células diferenciadas a neuronas presentaron una fluorescencia basal baja. (e). Al agregar 60 mM de potasio la fluorescencia aumentó. (f). La fluorescencia de las células vuelve a disminuir cuando se quita el potasio del medio. Tomado de Meyer *et al.* 2009.

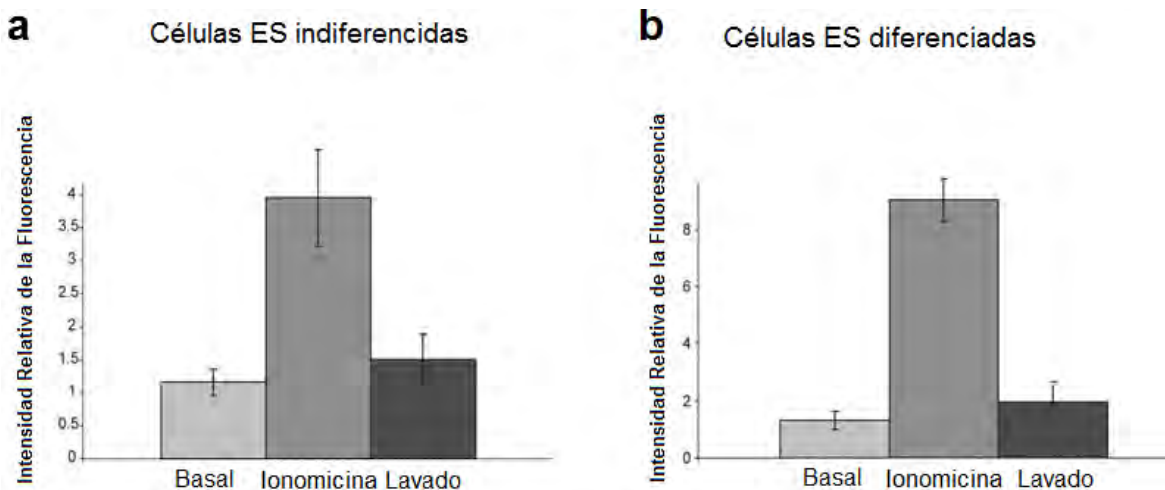


Figura 2.1.2. Células ES indiferenciadas y diferenciadas que expresaban Camgaroo-2. (a) y (b). La ionomicina produjo un aumento grande en la fluorescencia de las células ES indiferenciadas y las diferenciadas, pero la fluorescencia disminuye cuando se quitó la ionomicina del medio. Tomado de Meyer *et al*; 2009.

2.2. Sensor de H₂O₂ HyPer.

Belousov y colaboradores construyeron y caracterizaron el sensor HyPer. Determinaron que HyPer tiene dos picos de excitación a 420nm y 500nm, con un pico de emisión a 516nm (Figura 2.2a). En ausencia de H₂O₂ HyPer tiene los dos picos máximos de excitación de 420nm y de 500nm, cuando se une al H₂O₂, el pico de excitación a 420 nm disminuye proporcionalmente al aumento del pico de 500nm, por lo que se le puede considerar un sensor de cociente que permite hacer mediciones confiables de la concentración de H₂O₂ intracelular. También observaron que HyPer posee mayor sensibilidad *in vitro* que *in vivo*. En los estudios *in vitro* colocaron a la proteína fluorescente pura en un medio reductor y agregaron peróxido de hidrógeno al medio. La concentración mínima de H₂O₂ necesaria para inducir cambios en la fluorescencia de HyPer fue de 25 nM (Figura 2.2b). En cambio cuando se caracterizó la sensibilidad del sensor *in vivo* expresándose en el citoplasma de células *E. coli*, encontraron que la cantidad mínima para detectar cambios en la fluorescencia fue de 5 μM de H₂O₂ (Figura 2.2c). Mencionan que esto puede ocurrir porque en las células existen enzimas que se encargan de atrapar y degradar el H₂O₂, por lo tanto se requieren concentraciones más altas para que en células vivas se logre producir un cambio en la fluorescencia de la proteína del sensor.

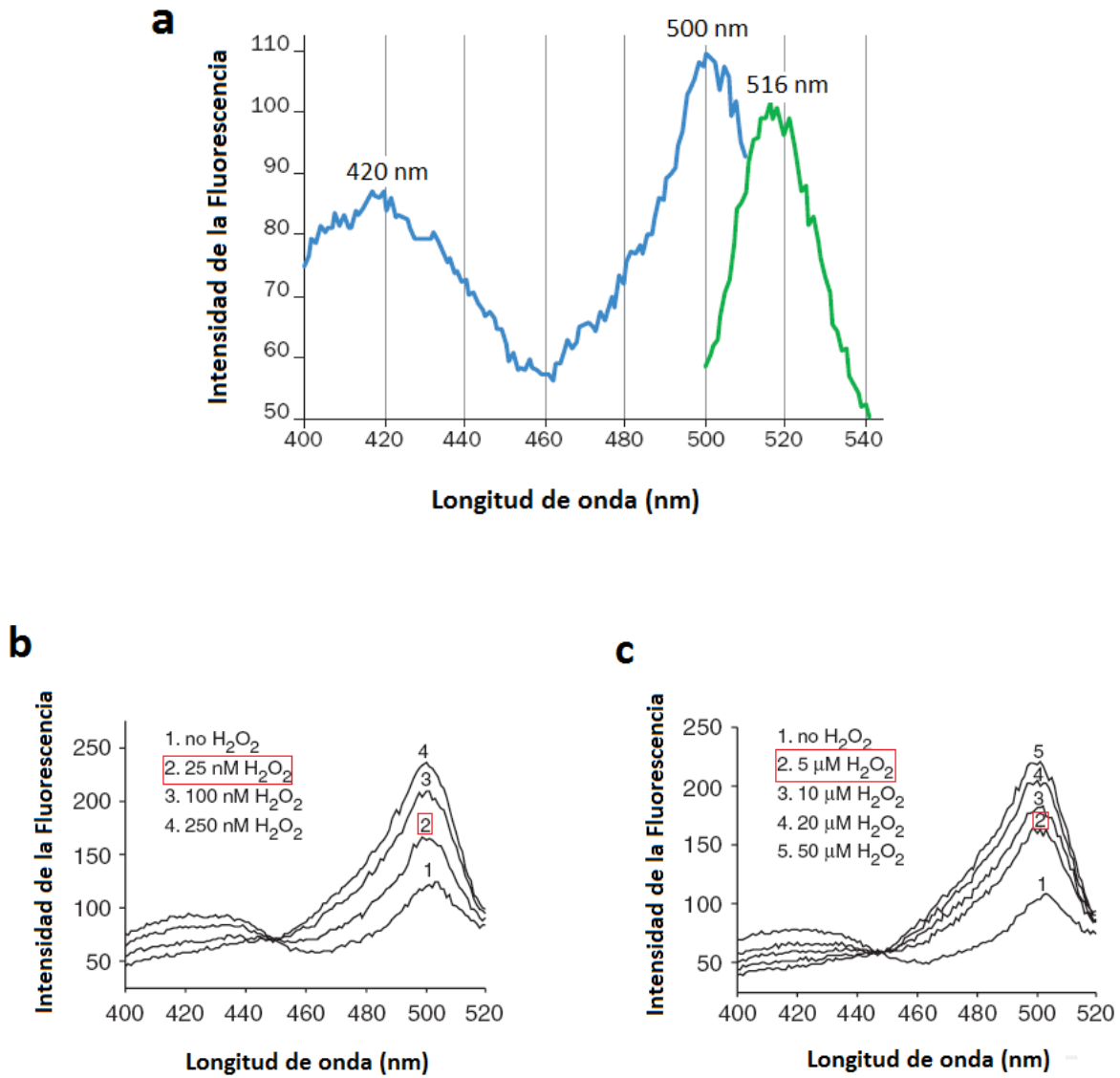


Figura 2.2 Propiedades espectrales de HyPer. (a). El espectro de excitación tiene dos picos máximos a 420nm y 500nm, y un pico de emisión a 516nm. **(b).** Caracterización de HyPer *in vitro*. La cantidad mínima de H_2O_2 para inducir cambios en la fluorescencia fue de 25 nM. **(c).** Caracterización de HyPer *in vivo* en células *E. coli*, la cantidad mínima para modificar la fluorescencia fue de 5 μM de H_2O_2 . Tomado y modificado de Belousov *et al.* 2006.

3. JUSTIFICACIÓN

No se han reportado estudios sobre la participación de Ca^{2+} o H_2O_2 en los procesos de diferenciación de las células ES para formar neuronas dopaminérgicas, por lo tanto sería novedoso buscar si estas moléculas tienen alguna participación importante en este proceso. Para hacer estos estudios se pretende utilizar sensores fluorescentes codificados genéticamente.

4. HIPÓTESIS.

En base a los antecedentes donde se ha logrado medir Ca^{2+} y H_2O_2 en células vivas por medio de sensores fluorescentes codificados genéticamente, se propone rediseñar vectores que contengan esos sensores y que también tengan la secuencia del *enhancer*-promotor CMV/CBA y los *insulators*, para poder medir los cambios en la concentración de Ca^{2+} y H_2O_2 intracelular en tiempo real en líneas celulares y en células troncales embrionarias de ratón.

5. OBJETIVO GENERAL

Rediseñar plásmidos con los sensores genéticos fluorescentes para monitorear la concentración de Ca^{2+} y H_2O_2 intracelular. Caracterizar su funcionamiento en las líneas celulares HEK293T y AD293 para su posterior uso en células ES de ratón.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- ☆ Construir los vectores con los sensores genéticos fluorescentes para Ca^{2+} y H_2O_2 , adicionándoles los *insulators* y *enhancer*-promotor CMV/CBA.
- ☆ Transfectar los plásmidos contruidos en las líneas celulares HEK293T y AD293 para caracterizar el funcionamiento de los sensores.
- ☆ Expresar los sensores en células ES.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES.

Para poder crecer a las células utilizamos los siguientes medios y soluciones:

Dubelco's Modified Medium (D-MEM)

1. Sobre con el medio DMEM (GIBCO 12100-046)
2. NaHCO₃ (3.7 g)
3. H₂O

Para preparar 1 litro:

- Disolvimos el sobre con el medio D-MEM en 800 ml de H₂O grado cultivo en vaso de precipitado de un litro.
- Se añadió el NaHCO₃ y se agitó hasta disolver.
- Se ajustó el pH a 6.9.
- En campana, se aforó en matraz de 1L
- Se esterilizó por filtración a través de membrana de 0.22 µm.
- Lo almacenamos a 4°C para utilizar en un periodo máximo de 2 meses.

Suero Fetal Bovino FBS (GIBCO 16000-044)

- Inactivamos el suero calentándolo a 56°C durante 30 min.
- Se puso el suero en alícuotas de 40 ml (tubos falcon de 50 ml) y se almacenó a -20°C.
- Para usarse, descongelamos la alícuota y se mantuvo a 4°C hasta por 1 mes.

GPS 100X (Glutamina/Penicilina/Estreptomicina)

Gluta-Max 200mM (GIBCO 35050 061)

Penicilina

Estreptomicina

Para preparar 100 ml:

- En campana, se añadió 500 mg de penicilina y 300 mg de estreptomicina a 10 ml de Gluta-Max.
- Se esterilizó por filtración a través de membrana de 0.22 µm.
- Agregamos la solución filtrada a 90 ml de Gluta-Max y se mezcló.
- En campana, se hicieron alícuotas de 5 ml y se almacenó a -20°C.
- Para utilizarlo, se descongeló y se mantuvo a 4°C hasta por 1 mes.

Solución amortiguadora salina de Fosfatos (PBS 1X).

Para 1L:

NaCl(136 mM)-----8 g

KCl (2 mM)-----0.2 g

Na₂HPO₄ (10mM)-----1.44 g

KH₂PO₄ (1mM)-----0.24 g

- Disolvimos los 4 compuestos en 900 ml de agua grado cultivo
- Aforamos a 1 litro.
- Se esterilizó por filtración a través de la membrana de 0.22 μm .
- Se almacenó a temperatura ambiente.

Tripsina 0.25 %

1. Tripsina 2.5 % (GIBCO 15090-046)
2. Verseno (GIBCO 15040-066)

Para 10 ml:

- En campana mezclamos 1 ml de tripsina al 2.5 % con 9 ml de verseno.
- Almacenamos a 4°C para poder usarla hasta por 1 mes.

Mem-Piruvato de Sodio 100X (GIBCO 11360-070)

Mem-Aminoácidos no esenciales 100X (GIBCO 11140-050)

Gelatina 1 %

Gelatina en polvo (Gelatin from porcine skin, Type A, SIGMA 084KO211)

Para 100 ml:

- Se agregó 1 g de gelatina en polvo en 300 ml de H₂O grado cultivo.
- Se calentó en el microondas hasta que se disuelva la gelatina, con el cuidado de que no se derrame.
- Filtramos a través de membrana de 0.22 μm .
- Se almacenó a temperatura ambiente para ser usado hasta por 2 meses.
- Para utilizarla, llevarla a una concentración de 0.1 % con H₂O grado cultivo.

Mitomicina (Roche 107409)

Para preparar una solución de 50X:

- Utilizamos guantes y cubrebocas porque es muy tóxica.
- Se tomó ½ ml de PBS 1X con jeringa y clavar la aguja en la tapa de plástico del frasco de mitomicina C (2 mg) para despresurizar y se inyectó el PBS para que se disolviera.
- Se destapó y se quitó el contenido con la jeringa.
- Se agregó el contenido a 3.5 ml de PBS en un tubo falcon de 15 ml.
- Se almacenó a 4°C en oscuridad cubriendo el tubo con aluminio hasta por 1 mes.

Se prepararon los siguientes medios dependiendo de la línea celular que se utilizaba:

Medio HEK293 y AD293

Para 250 ml:

- 220 ml de D-MEM
- 25 ml de FBS (final 10 %)
- 2.5 ml de GPS 100 X (final 1 X)
- 2.5 ml de piruvato de sodio (final 1 %)
- Se mezcló en campana y almacenó a 4°C hasta por 1 mes.

Medio STO

Para 250 ml:

- 230 ml de D-MEM
- 17.5 ml de FBS (final 7 %)
- 2.5 ml de GPS (final 1X)
- Se mezcló en campana y almacenó a 4°C hasta por 1 mes.

Medio COS-7

Para 250 ml:

- 222.5 ml de D-MEM
- 25 ml de FBS (final 10 %)
- 2.5 ml de GPS 100 X (final 1 X)

Medio M15

Para 250:

- 202.5 ml de D-MEM
- 37.5 ml de FBS (final 15 %)
- 2.5 ml de piruvato de sodio 100X (final 1 X)
- 2.5 ml de aminoácidos no esenciales 100X (final 1 X)
- 2.5 ml de b-Me 100X (final 1 X)
- 2.5 ml de GPS 100X (final 1 X)

Se almacenó a 4°C hasta por 1 mes.

Medio de Congelación (2 X)

Para 10 ml:

- 6 ml de D-MEM
- 2 ml de FBS (final 20 %)
- 2 ml de DMSO (final 20 %)

6.1.1. Subcultivo Celular

Para todas las líneas celulares utilizadas el subcultivo se realizó de la siguiente manera:

- Con la bomba de vacío se aspiró todo el medio de las células que estaban en la caja de cultivo.
- Se lavó con 10 ml de PBS (1X).
- Se quitó el PBS con la bomba de vacío.
- Se agregó 1 ml de tripsina 0.25 % para despegar las células.
- Incubamos durante 3 minutos a 37°C.
- Después de añadió 8 ml de medio D-MEM suplementado, previamente calentado a 37°C
- Pipeteamos suavemente para dispersar las células.
- Se transfirió a las células disgregadas a un tubo falcon de 15 ml.
- Centrifugamos a 1000 rpm durante 5 min.
- Se quitó el medio con la bomba de vacío cuidando de no llevarse la pastilla.

- Agregamos D-MEM suplementado para resuspender las células y se tomaron 10 μ l del disgregado para contar en la cámara de Neubauer (ver cuantificación en la cámara de Neubauer).
- Cuando ya sabíamos el número de células que teníamos resuspendidas, agregamos el volumen necesario para que la concentración fuera de 1×10^6 células por ml.
- En cajas de 10 cm de diámetro sembramos 5×10^5 células, y agregamos a la caja un volumen final de 10 ml de medio D-MEM suplementado.
- Pusimos las células en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

Células ES

- Cambiamos el medio al menos 2 a 3 horas antes de subcultivar las células.
- Se aspiró el medio con la bomba de vacío y se lavó 2 veces con PBS.
- Para una caja de 6cm, agregamos 0.5 ml de tripsina al 0.25% y para una de 10 cm agregamos 1 ml. La tripsina se repartió por toda la caja.
- Incubamos a 37°C durante 10 min.
- Añadimos al menos un volumen de medio M15 para inactivar la tripsina.
- Resuspendimos cuidadosamente las células pipeteando.
- Transferimos las células a un tubo estéril de 15 ml.
- Centrifugamos a 1000RPM durante 5 min.
- Se resuspendieron las células en D-MEM suplementado y tomamos 10 μ l para contar en la cámara de Neubauer (ver cuantificación en la cámara de Neubauer).
- Una vez conocido el número de células resuspendidas, se agregó D-MEM suplementado en un volumen tal que estuvieran en una densidad aproximada de 1×10^6 células/ml.
- Tomar 10 ml y contar en la cámara de Neubauer (ver cuantificación en la cámara de Neubauer).
- Sembramos aproximadamente 1×10^6 células/ml en una caja de 6cm de diámetro con células alimentadoras "feeders", y se agregó un volumen final de 6 ml de medio M15.

Cuantificación en la cámara de Neubauer.

- Ya que se tenían disgregadas las células, colocábamos 10 μ l del disgregado en la cámara de Neubauer.
- Seleccionábamos el objetivo de 10 X y contábamos las células que estaban en el cuadrante central. El mínimo de células que debía haber en el cuadrante era de 100 células para que el conteo fuera preciso, pero si eran menos entonces se contaban las células en las cuadrículas de los alrededores y se sacaba el promedio.
- Un cuadrante equivale a 0.1 μ l, por lo tanto multiplicábamos el número de células contadas por 10000, con esto obteníamos el número de células/ml. Para obtener el número total de células en la suspensión, multiplicábamos el valor obtenido de células por ml por el número de mililitros en los que se disolvió la pastilla.

6.1.2. Preparación de células alimentadoras “Feeders”

Las células ES crecen sobre una capa de células alimentadoras “*feeders*”, las cuales son células STO mitomizadas.

- Crecimos células STO a confluencia en cajas de 10 cm.
- Una vez que las células estaban confluentes, agregamos 200 μ l de mitomicina C de la solución de 50 X. De esta manera inactivamos mitóticamente a las células.
- Dejamos a las células durante 2 horas con la mitomicina en la incubadora a 37°C.
- Transcurridas las 2 horas, aspiramos el medio y se lavó dos veces con PBS para eliminar toda la mitomicina.
- Añadimos 1 ml de tripsina 0.25% y se esparció por toda la caja.
- Incubamos durante 4 min a 37°C.
- Después que las células desprendieron, agregamos al menos 4 ml de medio STO para inactivar la tripsina.
- Se pipeteó cuidadosamente para disgregar las células y se transfirieron a un tubo falcon estéril de 15 ml.
- Centrifugamos a 1000 RPM durante 5 min.
- Aspiramos el medio con la bomba de vacío sin llevarnos la pastilla. Agregamos D-MEM.
- Tomamos 10 μ l y contamos en la cámara de Neubauer.
- Se resuspendieron las células en un volumen tal para que la concentración fuera de aproximadamente 1×10^6 células/ml.
- Sembramos las células en la siguiente proporción:

3 millones de células para caja de 10 cm de diámetro.

1 millón de células para caja de 6 cm de diámetro.

½ millón de células para cajas de 3 cm de diámetro.

6.1.3. Congelación y descongelación de las líneas celulares.

Congelamiento

- Tripsinizamos las células siguiendo los pasos de subcultivo celular.
- Resuspendimos la pastilla de células en un volumen tal para que la densidad celular fuera de 6×10^6 células/ml.
- Agregamos cuidadosamente medio de congelación 2X a un volumen igual de al que estaban resuspendidas las células. Se mezcló delicadamente e hicimos alícuotas de 1 ml en crioviales (Corning 2028). Etiquetamos con el nombre de la línea celular, número de pases, densidad celular y fecha.
- Lo viales se guardaron a -70°C y se dejaron durante un día, después los almacenamos en el tanque de nitrógeno líquido.

Descongelamiento

- Sacamos el vial del tanque de nitrógeno líquido y lo colocamos en el baño de agua que está a 37°C, esperábamos a que el contenido del vial se descongelara.
- Se transfirió la solución a un tubo falcon de 15 ml y agregamos cuidadosamente 5 ml del medio correspondiente a la línea celular.
- Centrifugamos a 1000 rpm durante 5 min.

- Se aspiró el medio con la bomba de vacío.
- Se resuspendieron las células en 10 ml del medio D-MEM suplementado correspondiente.
- Sembramos en caja de 10 cm
- Se metieron las cajas en la incubadora a 37°C con 5 % de CO₂.

6.2. BIOLOGÍA MOLECULAR

6.2.1. Transformación de Bacterias por choque de calor.

1. Se prepararon los siguientes tubos:
 - 100 – 200 µl de bacterias competentes (DH5α) + DNA (1 µg/ml)
2. Dejamos los tubos en el hielo durante 15 minutos.
3. Después los tubos se pusieron a 42°C durante 45 segundos.
4. Posteriormente transferimos los tubos al hielo y se dejaron durante 2 minutos.
5. Centrifugamos los tubos a 12000 rpm.
6. Quitamos el sobrenadante y agregamos 900 µl de LB. Se vortexearon hasta que la pastilla de bacterias quedó perfectamente resuspendida en el medio.
7. Dejamos los tubos con bacterias en la incubadora durante 1 hora a 37°C con agitación vigorosa.
8. Trascorrida 1 hora, centrifugamos a 12000 rpm.
9. Quitamos el sobrenadante inclinando el tubo tratando de dejar 150 µl aproximadamente.
10. Se puso el tubo en el vortex hasta que la pastilla de bacterias quedó bien disuelta en el medio.
11. Plaqueamos las bacterias en cajas de LB con el antibiótico de selección correspondiente.
12. Dejamos las placas en la incubadora a 37°C durante toda la noche.

6.2.2. Minipreps

1. Primero preparábamos tubos con 3 ml de LB cada uno, a una concentración de 100 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml de kanamicina.
2. Tomábamos una colonia de bacterias con el aza, la metíamos en el tubo con LB y se frotaba suavemente.
3. Dejábamos toda la noche (14-16 horas) los tubos en la incubadora a 37°C en agitación vigorosa.
4. Trascorrida la incubación durante la noche, al momento de hacer los minipreps preparábamos las siguientes soluciones:

Solución P1:

Para 110 µl:

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

Solución P2:

Para 100 µl:

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

Solución P3:

- 5 M de acetato de potasio pH 5.5
- 5. Tomábamos 2 X 750 µl de cada tubo con bacterias y se transfería a un tubo eppendorf de 1.5 ml, para después centrifugarlo a 12000 rpm durante 1 minuto.
- 6. Se quitaba el sobrenadante sin llevarse la pastilla y agregábamos otros 750 µl del tubo con bacterias. Centrifugamos a 12000 rpm y removíamos todo el sobrenadante.
- 7. La pastilla de las bacterias se resuspendía en 110 µl de la solución P1 y vortexeamos hasta que la pastilla se disolvió bien en la solución.
- 8. Agregamos 100 ml de la solución P2 recién preparada y mezclamos suavemente invirtiendo los tubos unas 5-6 veces. La solución se debía ver viscosa y trasparente.
- 9. Después añadíamos 120 ml de la solución P3 y se mezclaba delicadamente invirtiendo los tubos unas 5-6 veces. Incubamos a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- 10. Posteriormente centrifugábamos a 12000 rpm durante 10 minutos. Transferíamos el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo, con cuidado de no llevarnos el precipitado.
- 11. Luego agregamos 200 µl de isopropanol (2-propanol) para precipitar el DNA del sobrenadante. Mezclamos vigorosamente invirtiendo el tubo unas 10 veces. Incubamos a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- 12. Centrifugamos a 14000 rpm durante 1 minuto. Se quitó el isopropanol
- 13. Añadimos 500 µl de etanol al 70 % y mezclamos invirtiendo el tubo. Centrifugamos a 14000 rpm durante 1 min.
- 14. Después se quitaba el etanol. Adicionalmente centrifugamos durante 1 minuto y quitamos el etanol restante utilizando la pipeta de 100 ml en caso de que era necesario.
- 15. Dejábamos el tubo destapado durante 10 minutos aproximadamente para secar el DNA.
- 16. Disolvimos en 20 µl de TE.

* Algunos de los minipreps se llevaron a cabo con el Kit de QUIAGEN

6.2.3. Maxipreps

1. Tomábamos una colonia de bacterias y se inoculaba en 100-200 ml de LB con el antibiótico correspondiente (ampicilina o kanamicina).
2. Dejamos los tubos en la incubadora durante toda la noche a 37°C con agitación vigorosa.
3. Al día siguiente trasferimos 100 ml de las bacterias divididos en 2 tubos falcon de 50 ml.
4. Centrifugamos a 3500 rpm durante 20 minutos.
5. Utilizamos las soluciones del Kit de QUIAGEN para maxipreps (Plasmid Maxi Kit)
6. Resuspendimos las bacterias en 10 ml de la solución P1 (5 ml para cada tubo). Vortexeamos para disolver perfectamente las bacterias en la solución.
7. Después juntamos los dos tubos con las bacterias disueltas en el solución P1.
8. Agregamos 10 ml de la solución P2, luego invertimos el tubo de 4-6 veces para mezclar, luego se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
9. Añadimos 10 ml de la solución P3 del kit previamente enfriado en hielo, mezclamos invirtiendo el tubo de 4-6 veces, y posteriormente lo dejamos en el hielo durante 20 minutos.
10. Centrifugamos a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C.
11. Pasamos el sobrenadante a un tubo nuevo para centrifugar.

12. Centrifugamos el sobrenadante a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente quitamos el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo.
13. Colocamos una columna QUIAGEN-tip 500 y la equilibramos agregando 10 ml de la solución QBT. Dejamos que toda la solución pasara por la columna.
14. Agregamos el sobrenadante que contiene el DNA a la columna y esperamos hasta que pasara todo.
15. Lavamos la columna con 2 X 30 ml de la solución QC.
16. Agregamos en la columna 15 ml de la solución QF, y se recolecto en un tubo falcon de 50 ml nuevo.
17. Para que precipitáramos el DNA, agregamos 10.5 ml de isopropanol en el tubo falcon.
18. Centrifugamos a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C.
19. Quitamos el isopropanol y agregamos 5 ml de etanol al 70 %.
20. Centrifugamos a 14000 rpm durante 10 minutos.
21. Quitamos el sobrenadante sin llevarnos el pellet.
22. Dejamos secar a temperatura ambiente de 5-10 minutos.
23. Por último resuspendimos en 300 µl de TE.

6.2.4. Geles de Agarosa.

Para prepara los geles de agarosa utilizamos TAE 1X y una concentración de agarosa al 1 %. Los geles se corrian con la solución amortiguadora TAE 1X a 25 V los primeros 3 minutos y luego se aumentaba a 100 V durante 15 a 20 minutos. Para preparar el TAE utilizábamos lo siguiente:

TAE 10X (500 ml):

- 400 mM Tris Base.....24.2 g
- 1.14% de ácido acético glacial.....5.7 ml
- 500 mM de EDTA (pH8.0).....10 ml

El marcador de DNA que siempre utilizamos fue el “*mass ruler DNA ladder*” de Fermentas.

6.2.5. Extracción de DNA de geles de agarosa.

1. Se cortaban las bandas de DNA del gel de agarosa.
2. Colocamos el fragmento de gel en un tubo limpio y se pesaba.
3. Posteriormente se siguieron los pasos del manual para extraer geles de agarosa de QUIAGEN.

6.2.6. Transfecciones

Para realizar las trasfecciones transitorias utilizando CaCl₂, primero se preparaban las siguientes soluciones:

a) HBS 2X

Para 100 ml:

- NaCl (273 mM)-----1.6 g
- KCl (9.9 mM)-----0.074 g
- Na₂HPO₄ (2.8 mM)-----0.04 g

- Dextrosa (11 mM)-----0.2 g
- HEPES (41 mM)-----1 g
- Disolvimos en 95 ml de agua grado cultivo.
- Se prepararon tres soluciones HBS.
- Ajustamos a cada una un pH distinto que estaba entre los 6.9 a 7.1
- Filtramos las soluciones en campana a través de membrana de 0.22 μm .
- Para determinar el HBS con mejor eficiencia (mínimo 70 %) se transfectó un vector de expresión de GFP, con los diferentes HBS 2X.

b) CaCl_2

Para 5 ml:

- CaCl_2 -----1.472 g
- Disolvimos en 5 ml de agua de cultivo y se filtró en la campana a través de la membrana de 0.22 μm .
- Colocamos cada 500 μl en tubos eppendorf.
- Almacenamos los tubos a - 70°C.

Tabla 6.2.6. Proporciones usadas para transfectar transitoriamente por CaCl_2 .

	Cajas de 10cm		Cajas de 35 mm		Cubreobjetos con cámara de cultivo de 0.8cm ²	
	1 Plásmido	Cotransfección	1 Plásmido	Cotransfección	1 Plásmido	Cotransfección
1) H₂O Cultivo	244.12 μl	--	38.75 μl	--	3.44 μl	--
2) DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	31.5 μg	15 μg (por plásmido)	5 μg	3 μg (por plásmido)	0.44 μg	0.26 μg (por plásmido)

Mezclar Perfectamente

3) CaCl_2 2M	39.37 μl	39.37 μl	6.25 μl	6.25 μl	0.55 μg	0.55 μg
---	---------------------	---------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------

Incubar 10 min. a temperatura ambiente

4) HBS 2X	315 μl	315 μl	50 μl	50 μl	4.44 μl	4.44 μl
Volumen Final	613 μl	613 μl	100 μl	100 μl	8.87 μl	8.87 μl

Procedimiento:

1. Sembrábamos un número determinado de células dependiendo del experimento que se iba a realizar.
2. En tubos eppendorf de 1.5 ml, preparábamos los tubos usando las proporciones que se muestran en la Tabla 6.2.6.
3. Una vez que teníamos preparados los tubos, se reducía el volumen del medio a la mitad.
4. Agregamos por goteo la mezcla que se hecha en el tubo eppendorf y se agitaba delicadamente para dispersar la mezcla.
5. Incubamos las células a 37°C con 5 % de CO₂

Trasfección con lipofectamina.

Para transfectar las células con lipofectamina, un día antes de la trasfección sembrábamos las células en cajas de 35 mm a una cierta densidad para que estuvieran a un 80-90 % de confluencia el día de la trasfección.

Para cada caja se preparaba dos tubos con las siguientes cantidades:

- a) Tubo 1: Diluimos 2-3 µg de plásmido en 200 µl de OptiMEM o DMEM sin suero y sin antibióticos con 1 % de Glutamax y piruvato.
- b) Tubo 2: Diluimos de 6-3 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 200 µl de OptiMEM o DMEM sin suero y sin antibióticos.

Una vez preparados los tubos, se combinaban y mezclábamos suavemente sin vortexear para obtener un volumen final 400 µl. Después se dejaban en la incubadora a temperatura ambiente durante 15-25 minutos. Cuando los tubos se estaban incubando, cambiábamos el medio de las células con 2 ml de OptiMEM o DMEM sin suero y sin antibióticos. Luego de dejar los tubos en reposo les agregábamos 600 µl de Opti MEM o DMEM sin antibióticos para obtener un volumen final de 1 ml. El contenido se agregaba a las células. Se dejaban las células con la solución de trasfección durante 4-6 hrs en la incubadora a 37°C con 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación agregábamos 1 ml de DMEM (10% de FBS, GPS y piruvato) a cada caja. Si veíamos toxicidad se quitaba el medio de trasfección y agregábamos 3 ml de medio DMEM (10 % de FBS, GPS y piruvato). Se remplazaba con medio completo y fresco de 18-24 horas después de la trasfección. Las células se podían observar con el microscopio de fluorescencia después de 24 horas de que se realizaba la trasfección.

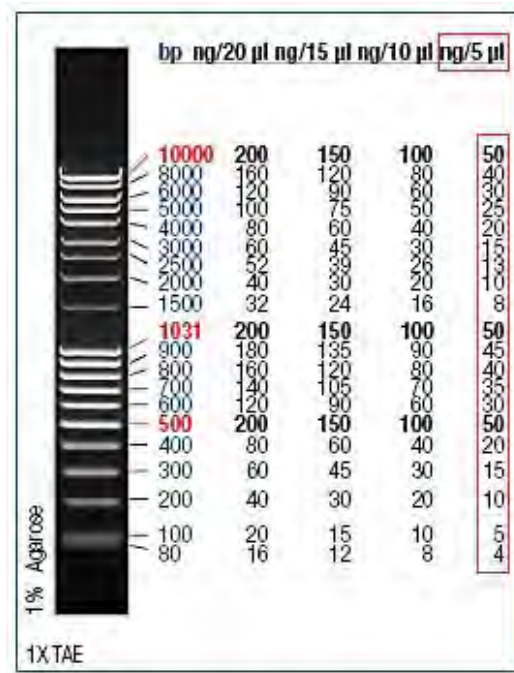
6.2.7. Ligaciones

Para hacer las ligaciones, primero determinábamos la cantidad de DNA que teníamos del inserto y del vector. Para hacer la cuantificación corríamos en un gel de agarosa al 1 % con las siguientes cantidades:

- 5 µl de marcador (*mass ruler DNA ladder*)
- 1 µl de vector + 9 µl de H₂O + 2 µl de la solución de carga 6X
- 1 µl de inserto + 9 µl de H₂O + 2 µl de la solución de carga 6X.

Las bandas que obteníamos en el gel se comparaban con la del marcador para saber la cantidad de vector y de inserto que teníamos. En este caso como se muestra la columna en rojo de la tabla 5.2.7 nosotros usamos 5 µl de marcador por lo tanto esos eran los valores que tomábamos dependiendo del tamaño de la banda que obteníamos en el gel.

Tabla 5.2.7. Tabla con las concentraciones de DNA. Tomado de *Fermentas Products*.



Después de haber determinado la cantidad de inserto y de vector que teníamos utilizábamos la siguiente fórmula:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{pb Inserto}}{\text{pb Vector}} (\text{ng de vector}) (3)$$

Donde pb significa el número de pares de bases del vector y del inserto. Se hace una multiplicación por tres porque necesitábamos que la relación fuera de 1 de vector por 3 de inserto (1:3).

Cuando ya habíamos determinado la cantidad que necesitábamos agregar para tener uno de vector por tres de inserto, preparábamos los siguientes tubos:

- Tubo con vector + inserto.
- 2 µl de *Buffer* para T4 DNA ligasa (Biolabs)
- 0.5 µl de la enzima T4 DNA ligasa (Biolabs)
- Agregábamos la cantidad necesaria de H₂O para obtener un volumen final de 20 µl.

Se dejaban los tubos con la ligación a 4°C durante toda la noche, o alternativamente se podían poner a 21°C durante 2 horas.

6.2.8. PCR

Para llevar a cabo el PCR se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

- ☆ NotHyper_R: (5'-3') TAG CGG CCG CAG AAT TCG AAG CTT TTA AAC C
- ☆ BamHyper_F: (5'-3') CTA GGG ATC CAA TGG AGA TGG CAA GCC AGC

Se prepararon 6 tubos con las siguientes cantidades:

Agua estéril	12.3 µl
10X Pfu Buffer con MgSO ₄	2 µl
10mM dNTP	0.5 µl
Primer I (0.3 µM)	2 µl
Primer II (0.3 µM)	2 µl
Templado (1ng/µl)	1 µl
DNA polimerasa <i>Pfu DNA Polymerase</i> (Fermentas)	0.2 µl
Final	20 µl

La T_m del oligo NotHyper-R nos dio un valor de 47.2°C y la del oligo BamHyper-F fue de 56.4°C. El PCR se hizo con un gradiente distinto de T_m que va de los 55°C-65°C, esto porque fue el primer PCR que realizábamos, entonces se necesitaba saber si la variación en la temperatura afectaba en la reacción y además queríamos encontrar si había una T_m más óptima para la amplificación de la secuencia.

	T _m		T _m
Tubo 1	55°C	Tubo 4	60.5°C
Tubo 2	56°C	Tubo 5	63.1°C
Tubo 3	59.1°C	Tubo 6	65°C

6.3. MICROSCOPIA

La captura de fotografías y videos de las células se hizo utilizando el microscopio Axio Observer Z1 (Zeiss, Alemania), con la cámara AxioCamMR3.

Los diferentes filtros utilizados fueron de acuerdo con el nombre y el número de catálogo del microscopio:

Nombre y número	Excitación	Emisión
Alexa Fluor # 489	450 – 490	515 - 565
Yellow Fluorescent Protein # 46	500 - 520	520 - 540
Propidium Iodid (PI) # 00	530 - 585	600 - 617
Rhodamine #2	546 - 570	575 - 640
Cy5 #50	630 – 640	650 - 670

6.3.1. Obtención de los valores de la fluorescencia.

El programa que se empleó para hacer las mediciones de fluorescencia de las células fue el Image J (ROI manager). Para calcular la fluorescencia, primero se seleccionaba dentro de la célula el área que se iba a considerar para hacer las mediciones, posteriormente el programa cuenta cada uno de los pixeles presentes en el área determinada y saca el valor para cada uno, por último se saca el promedio de esos valores y así se obtiene el valor de la fluorescencia para cada célula. Para poder quitar el fondo en las mediciones, se selecciona un área donde no hay células y se saca su valor de fluorescencia, lo que nos da como resultado el valor del fondo (F_0). Y luego se usa la siguiente ecuación:

$$F_{\text{célula}} = F - F_0$$

Donde F representa el valor de la fluorescencia y F_0 el fondo.

En los experimentos donde se realizaron adiciones a las células, se tuvo que normalizar los valores de la fluorescencia para obtener las gráficas.

Para normalizar, se sacaba el valor de la fluorescencia basal, luego cada uno de los valores de fluorescencia de las células se divide entre la fluorescencia basal para así obtener la fluorescencia de cada célula:

$$F_{\text{célula}} = F / F_{\text{basal}}$$

Donde F representa el valor de la fluorescencia por célula y F_{basal} es la fluorescencia basal antes de agregar los agentes que inducen cambios en la fluorescencia.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de vectores con el sensor para Ca^{2+} Case12.

La construcción de los primeros vectores se realizó partiendo del plásmido pCase12-cyto (Figura 7.1a). En el plásmido pCase12-cyto estaba contenida la secuencia que codifica para Case12 y el promotor CMV. Lo primero que se hizo fue introducir en el vector pCase12-cyto los *insulators* que provienen originalmente del plásmido pKS INS-INS, estos *insulators* provienen del locus de la β -actina de pollo (Figura 7.1b). Para introducir los *insulators* en el plásmido pCase12-cyto, se hizo una digestión a los plásmidos pCase12-cyto y pKS INS-INS con la enzima *AseI*. En la Figura 7.1 se muestran los sitios donde corta *AseI* en los dos plásmidos. Después de la digestión se llevó a cabo la ligación del vector pCase12-cyto con los fragmentos (*insulators*).

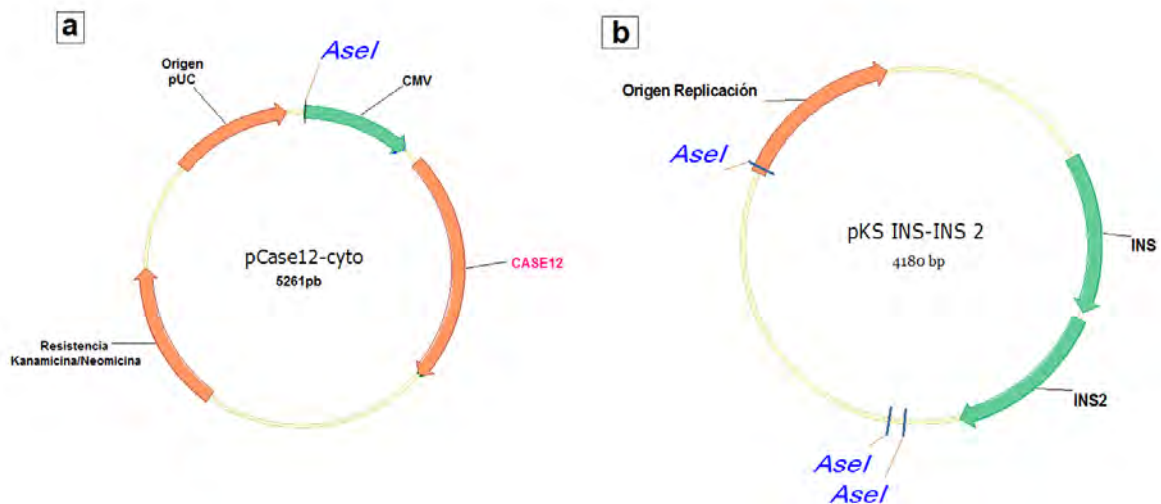


Figura 7.1. (a) Plásmido pCase12-cyto, y (b) plásmido pKS INS-INS.

El inserto de pKS-INS-INS se pudo haber incorporado de dos formas en el plásmido pCase12-cyto como se muestra en la Figura 7.1.1a y b. La orientación en la que necesitábamos que se hubieran insertado los *insulators* es como los contiene el plásmido Miniprep 2 (Figura 7.1.1a). Para poder seleccionar las colonias con el plásmido requerido se hicieron restricciones, una de estas digestiones se hizo con la enzima *SspI*. En la Figura 7.1.1c y d se muestran los sitios donde corta esta enzima para las dos posibilidades que teníamos en los plásmidos creados, en los dos casos se generan cuatro fragmentos pero dos difieren en el tamaño de los pares de bases. En Miniprep 2 se

generan fragmentos de 130 pb, 553 pb, 2816 pb y 4648 pb, y en el Miniprep 3 los fragmentos son de 130 pb, 553 pb, 3154 pb y 4310 pb (Figura 7.1.1 c y d)

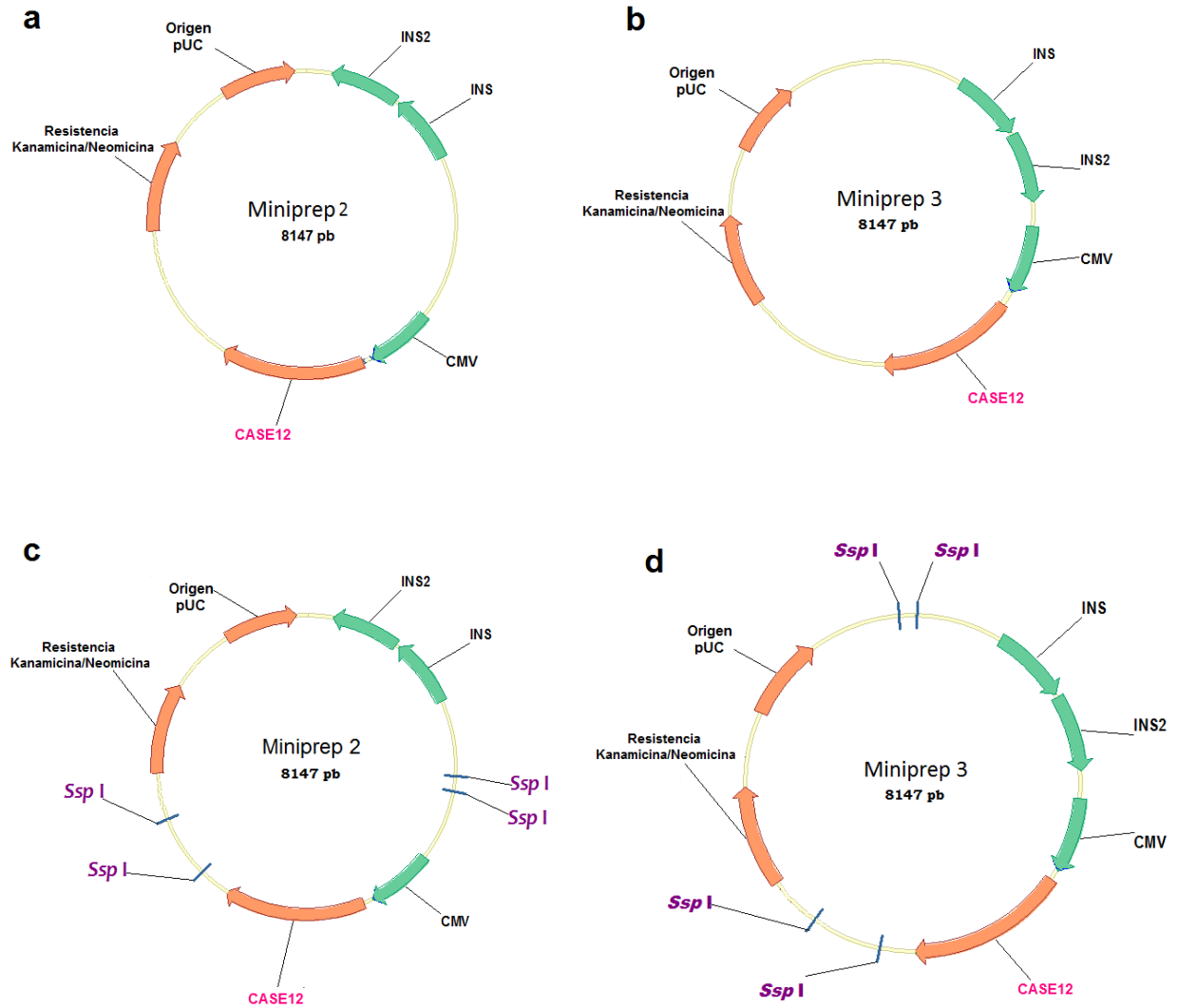


Figura 7.1.1. (a) Plásmido Miniprep 2. (b) Plásmido Miniprep 3. (c) y (d). Sitios de restricción para la enzima *Ssp I* en los plásmidos Miniprep 2 y Miniprep 3.

Después de seleccionar solamente los plásmidos que tenían el inserto como Miniprep 2 con la orientación correcta de los *insulators*, se les introdujo la secuencia del *enhancer*-promotor CMV/CBA. La inserción se llevó a cabo cortando con las enzimas *Bgl II* y *BamHI* el vector (Miniprep 2) y el plásmido pCDA-CMVCBA que contenía el *enhancer*-promotor CMV/CBA (Figura 7.1.2a y b).

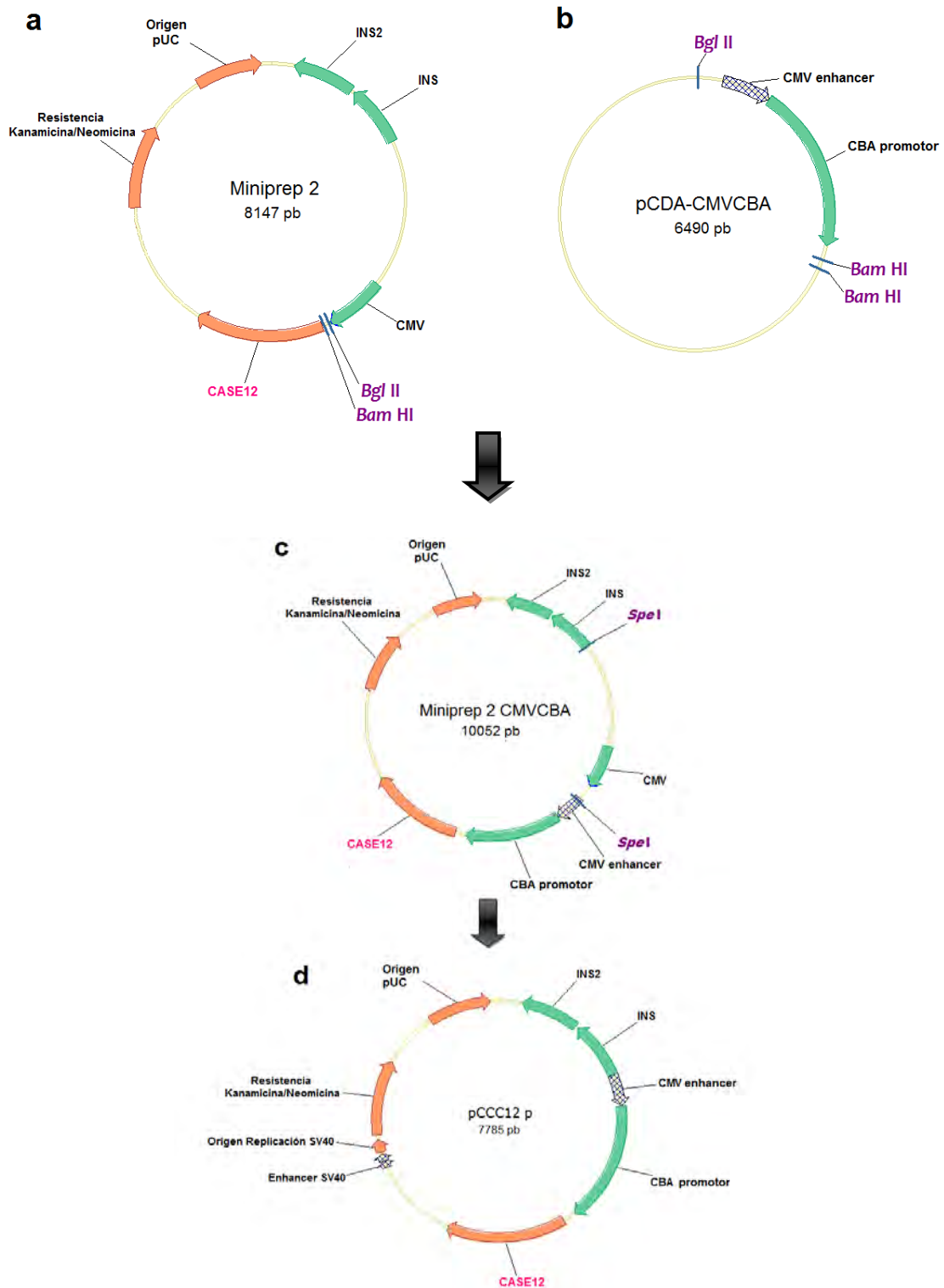


Figura 7.1.2. Generación del vector pCCC12p. (a) y (b). Sitios de restricción para *Bgl II* y *Bam HI* en Miniprep 2 y pCD-CMVCBA. (c). Plásmido Miniprep 2 CMVCBA generado a partir Miniprep 2 y pCD-CMVCBA. (d). Plásmido pCCC12p producido a partir del Miniprep 2 CMVCBA digerido con *Spe I*.

Una vez hecha la digestión de los plásmidos Miniprep 2 y pCDA-CMVCBA con *Bgl II* y *BamHI*, se ligaron los fragmentos. Como resultado se obtuvo el plásmido denominado Miniprep 2 CMVCBA (Figura 7.1.2c). En el Miniprep 2 CMVCBA había una porción sobrante entre los *insulators* y el *enhancer* CMV la cual necesitábamos quitar, para eso se le hizo al plásmido Miniprep 2 CMVCBA una digestión con la enzima *SpeI* (Figura 7.1.2c). Al cortar con esta enzima se perdió una pequeña porción del *enhancer* CMV. El plásmido resultante lo llamamos pCCC12p, que se muestra en la Figura 7.1.2d con sus características más sobresalientes.

Durante la construcción del vector pCCC12p, se obtuvieron otros dos plásmidos que también contienen la secuencia del sensor Case12. Uno de estos es el vector pCCC12c. Para su creación primero se cortó el plásmido Miniprep 2 que ya teníamos con las enzimas *NheI* y *SpeI* (Figura 7.1.3a), como resultado generamos plásmidos denominados Miniprep 2 cerrado (Figura 7.1.3b), luego cortamos a Miniprep 2 cerrado y al plásmido pCDA-CMVCBA con *BamHI* y *Bgl II*. Posteriormente se ligaron los fragmentos y obtuvimos finalmente el vector pCCC12c (Figura 7.1.3d), que es muy similar a pCCC12p, pero la diferencia es que en pCCC12c si hay un pequeño espacio de separación entre los *insulators* y el *enhancer* CMV, porque en el vector pCCC12p no existe dicho espacio. El otro plásmido construido fue el pCMVCBACase12, que se generó a partir del plásmido pCase-cyto. Primero metimos el *enhancer*-promotor CMV/CBA en pCase-cyto por medio de cortar con *Bgl II* y *BamHI* el vector pCDA-CMVCBA y pCase-cyto (Figura 7.1.4a y b), los fragmentos generados se ligaron y obtuvimos el vector que nombramos pCMVCBACase12 (Figura 7.1.4c), al que posteriormente se le quitó un fragmento sobrante con las enzimas *NheI* y *SpeI*, para obtener el plásmido pCMVCBACase12 que contiene el sensor Case12, el *enhancer*-promotor CMV/CBA, pero no tiene *insulators* (Figura 7.1.4d).

Para verificar que las secuencias requeridas estuvieran presentes en los plásmidos construidos, se hicieron digestiones con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* para los plásmidos pCCC12p y pCCC12c, y con las enzimas *NotI* y *XhoI* para pCMVCBACase12. En base a los mapas de restricciones de los vectores se calculó el tamaño y número de fragmentos esperados con las digestiones correspondientes (Figura 7.1.5).

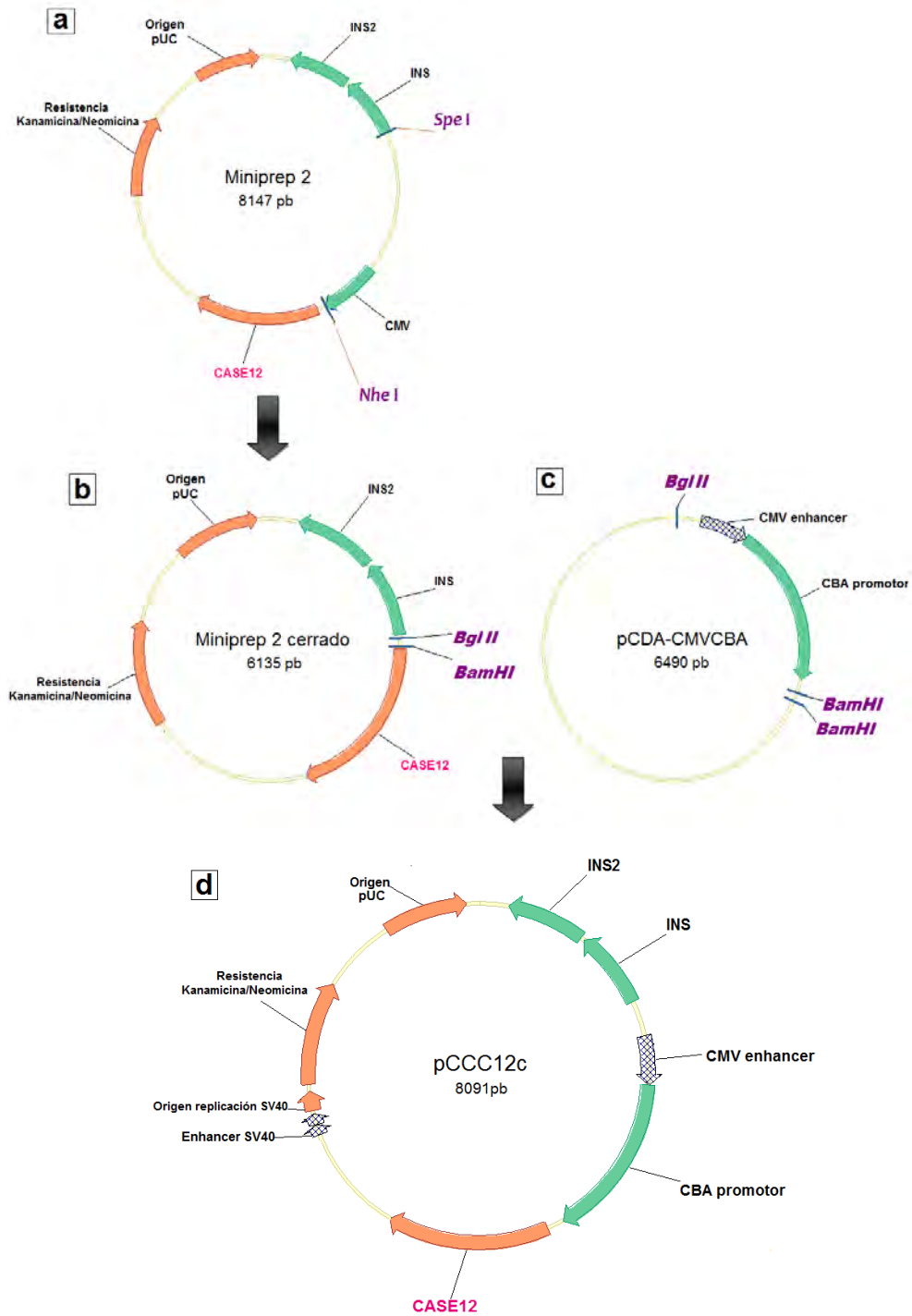


Figura 7.1.3. Generación del vector pCCC12c.(a). Sitios de restricción para *NheI* y *SpeI* en el plásmido Miniprep 2 (b) y (c). Miniprep 2 cerrado y pCDA-CMVCBA sus sitios para las enzimas *BamHI* y *BglII*, para generar el vector pCCC12c (d).

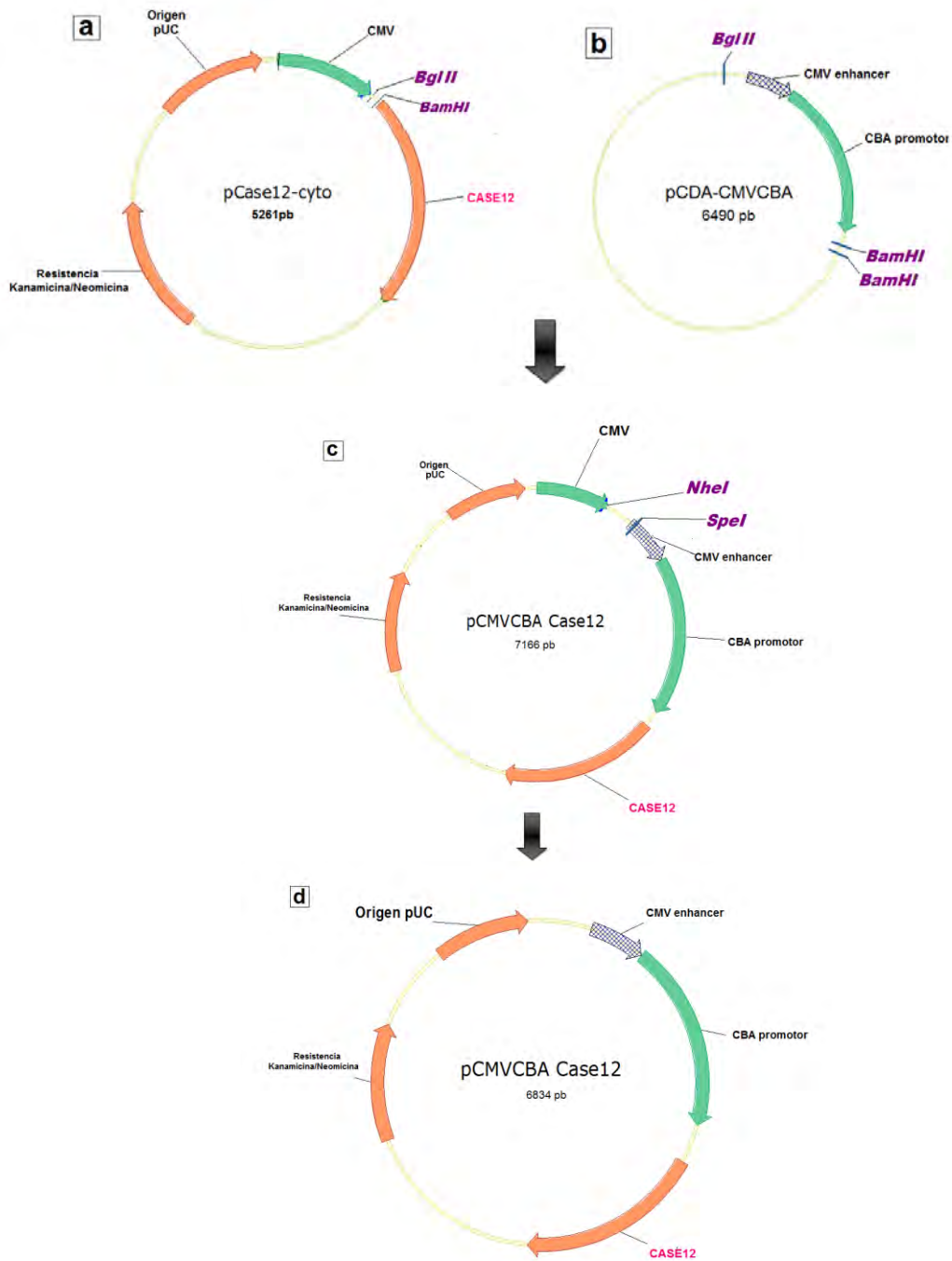


Figura 7.1.4. Generación del vector pCMVCBA Case12.(a) y (b). Plásmido pCase-cyto y pCDA-CMVCBA con sus sitios de restricción para *BamHI* y *Bgl II* (c). pCMVCBA Case12 se cortó con *NheI* y *SpeI*, para generar el plásmido final pCMVCBA Case12 (d).

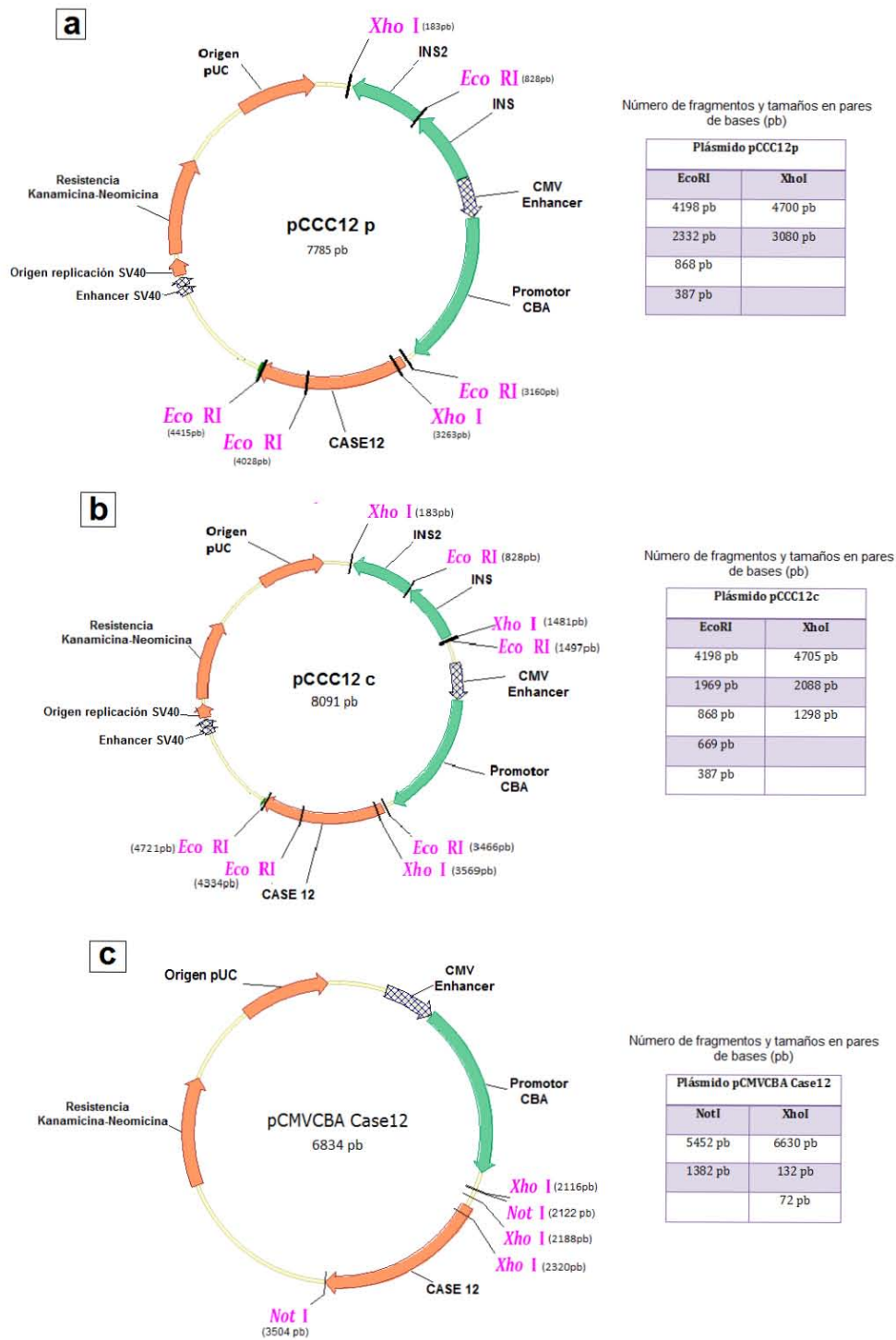


Figura 7.1.5. Del lado izquierdo de la figura se muestran los mapas con los sitios de restricciones de las enzimas que se utilizaron para cada plásmido **(a)** pCCC12p, **(b)** pCCC12c y **(c)** pCMVCBA Case12. Del lado derecho de la figura están las tablas con el número de fragmentos y tamaños de las bandas que se deben generar con las digestiones.

Las digestiones se sometieron a una electroforesis (Figura 7.1.6). El gel mostró que todos los plásmidos analizados presentaron el número de bandas con los tamaños esperados que se habían calculado teóricamente. Los fragmentos con tamaños muy pequeños no se lograron visualizar en el gel. Eso sucedió con el carril 2 (pCCC12p/*EcoRI*), donde no se ve la banda que corresponde a 387 pb, en el carril 7 (pCMVCBA Case12/*XhoI*), no aparecieron las bandas de 132 pb y 72 pb. La ausencia de bandas pequeñas pudo ser porque el gel que se utilizó fue de 1 % de agarosa, y para poder visualizar fragmentos de menor número de pares de bases es necesario utilizar geles con mayores porcentajes de agarosa entre 2 % o 3 %. En el caso de la banda de 387 pb que si aparece en pCCC12c y no en pCCC12p es quizás como lo muestra el gel porque hay más DNA en pCCC12c. El resultado de las digestiones confirmó que se construyeron de manera correcta los vectores con el sensor para Ca²⁺ Case12.

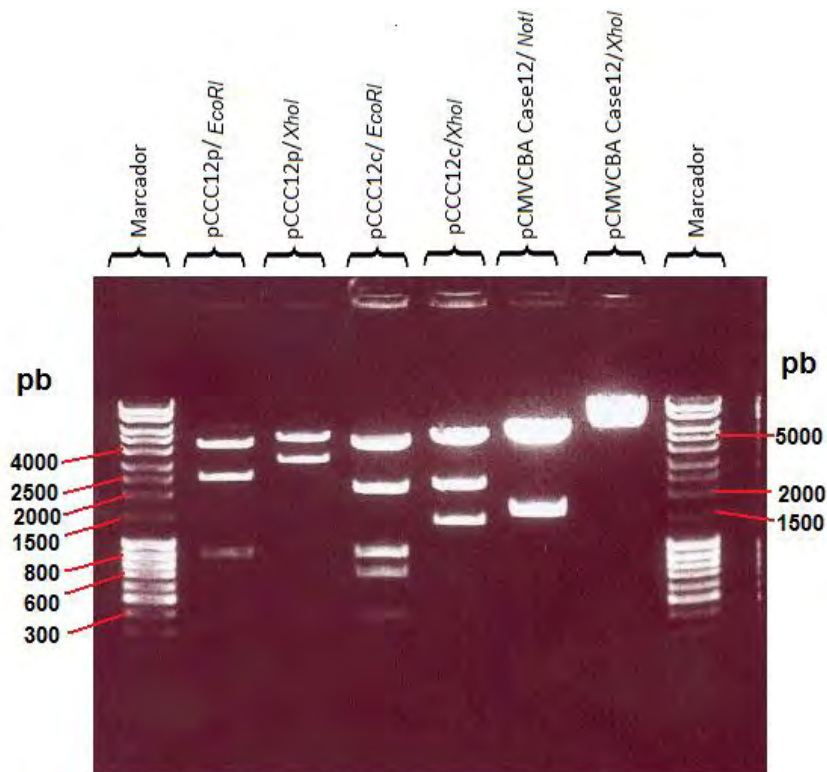


Figura 7.1.6. Electroforesis de las digestiones de los plásmidos pCCC12p y pCCC12c con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*, y el plásmido pCMVCBAcase12 digerido con las enzimas *NotI* y *XhoI*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y corrido con el amortiguador TAE 1X. Los números indican el tamaño de las bandas en pares de bases.

7.2. Obtención de vectores con sensor de H₂O₂ HyPer.

La generación de los vectores que portan la secuencia que codifica para el sensor HyPer, se hizo de manera similar a la elaboración de los vectores con los sensores para Ca²⁺. El plásmido pHyper-Cyto y el plásmido pKS INS-INS se cortaron con la enzima *AseI* (Figura 7.2a y b) para poder introducir en pHyper-cyto los *insulators* contenidos en pKS INS-INS. Como se muestra en la Figura 7.2c y d los plásmidos Miniprep HyPer1 y Miniprep HyPer2 representan las dos posibles formas en las que se pudo haber orientado el inserto.

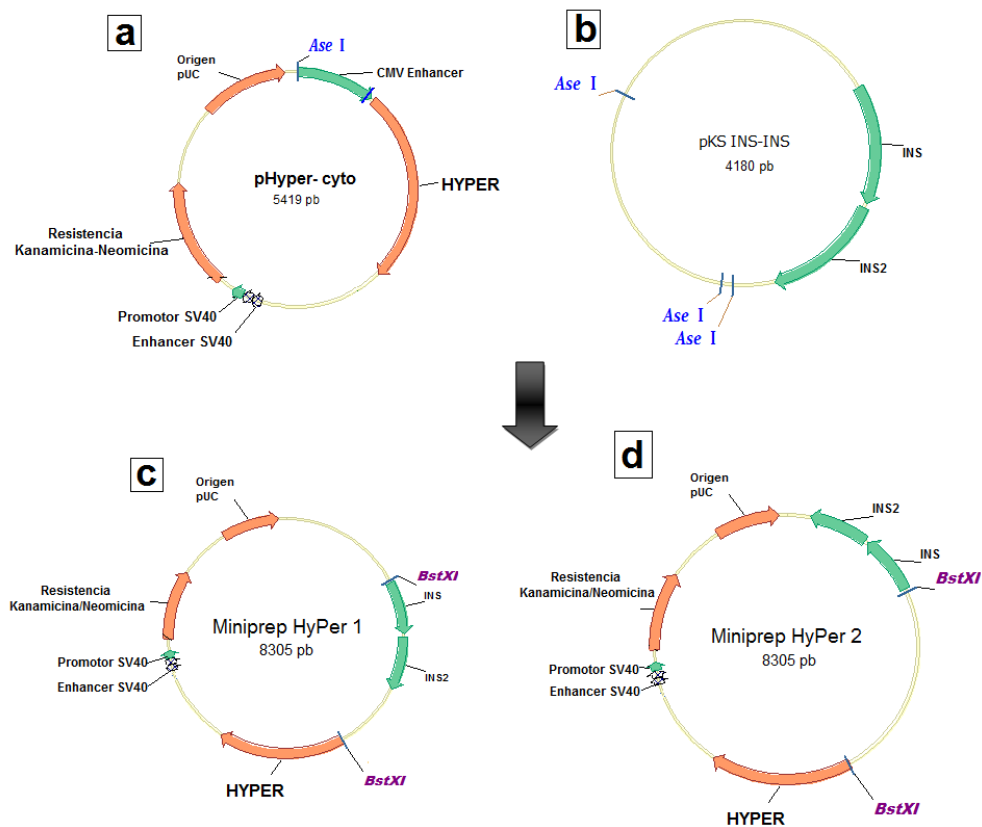


Figura 7.2. Generación de los vectores con HyPer y los *insulators*. **(a)** y **(b)** Plásmidos cortados con la enzima *AseI*. En **(c)** y **(d)** se muestran las dos posibilidades de cómo se pudieron haber introducido los *insulators* en pHyper-cyto.

Para corroborar la incorporación de los *insulators* en el plásmido pHyper-cyto, se prepararon minipreps de 6 clonas y se cortaron con la enzima *XhoI*. Al hacer el análisis del gel de la electroforesis se determinó que en las 6 clonas analizadas aparecieron una serie de bandas de un

tamaño aproximado de 300 y de 600 pb correspondientes a los *insulators* (Figura 7.2.1). Los *insulators* están formados por cuatro copias de una secuencia repetida de 300 pares de bases que es muy susceptible a recombinación. En este caso dos de las copias 300 y 600 pb se escindieron del vector. Cuando se hizo la introducción de los *insulators* en el plásmido pCase12-cyto no sucedió lo mismo. Una explicación puede ser que los *insulators* al ser secuencias repetidas pueden formar estructuras secundarias de asas que tienden a ser cortadas. En el plásmido pHyper-cyto cerca del lugar donde se metieron los *insulators* hay dos sitios para la enzima *BstXI* (Figura 7.2c y d). En bacterias se ha observado que al darse la formación de asas, sitios que estaban alejados se aproximan, al haber sitios cercanos con secuencias similares la replicación se puede recorrer unos pares de bases, el espacio vacío generado por la formación de el asa es sustituido por nuevas pares de bases, pero para el segundo ciclo de replicación el asa que se había formado es removida (DasGupta *et al.* 1987). No se puede decir con certeza que eso fue lo que sucedió en nuestro plásmido pero si pudimos determinar que el comportamiento de las secuencias depende del contexto, ya que los *insulators* se comportan de distintas maneras dependiendo del plásmido y el lugar donde se inserten. Por lo tanto para introducir los *insulators* se decidió utilizar una estrategia distinta.

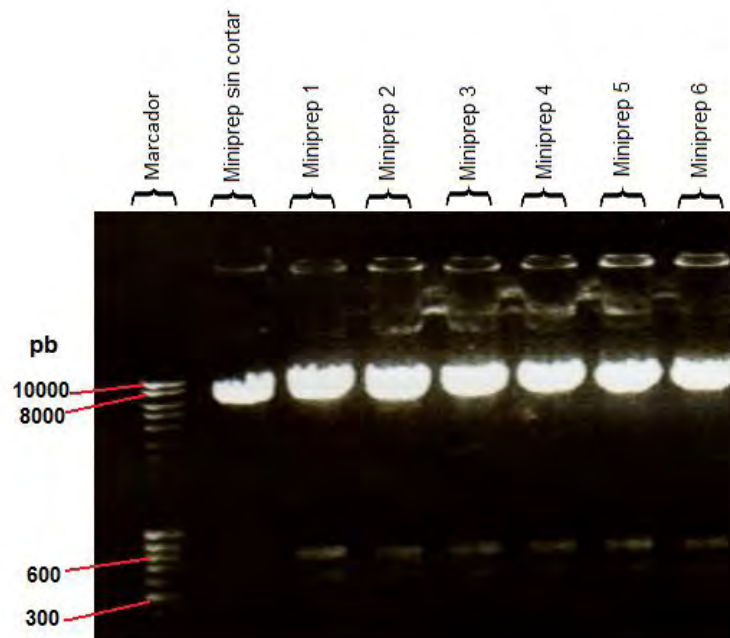


Figura 7.2.1. Electroforesis de las digestiones de los plásmidos Miniprep HyPer 1 y 2 con la enzima *XhoI*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y corrido con amortiguador TAE 1X.

Se hizo un análisis de los sitios de restricción en los vectores construidos con Case12 y se encontró que habían dos sitios en los extremos del gen Case12, estos sitios eran para las enzimas *NotI* y *BamHI*. Con esto podríamos quitar la secuencia Case12 y en su lugar meter la secuencia de HyPer para generar un vector con insulators, CMV/CBA y el sensor HyPer. Los sitios *NotI* y *BamHI* no estaban presentes en los extremos de la secuencia HyPer. Para poder introducir HyPer en el vector pCCC12c, necesitábamos esos dos sitios de restricción en la secuencia de HyPer. Para incorporarlos en la secuencia HyPer se hizo un PCR. Se diseñaron dos oligos, en los cuales una parte hibrida con una porción de la secuencia de HyPer y una parte del oligo no hibrida la cual corresponde a la secuencia del nuevo sitio de restricción. En el oligo complementario se incorporó la secuencia de *BamHI* y en el reversa la secuencia de *NotI*, además el PCR se llevó a cabo en gradientes con una T_m diferente para cada muestra (ver detalles de los oligos y las temperaturas en Materiales y Métodos).

Después se verificaron los productos de PCR por medio de una electroforesis en gel de agarosa (Figura 7.2.2).

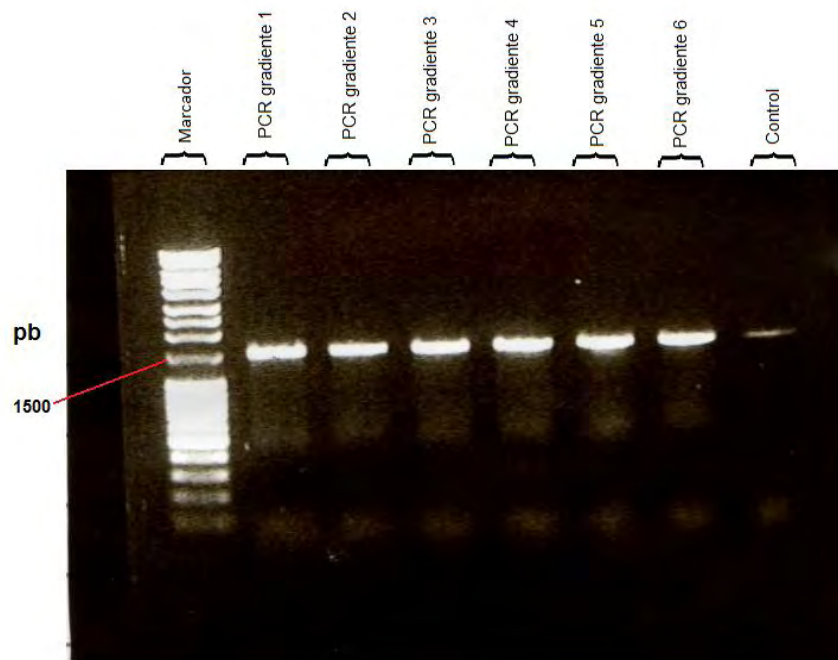


Figura 7.2.2. El PCR se llevó a cabo con diferentes temperaturas de alineamiento. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y corrido con amortiguador TAE 1X.

En todas las muestras aparece una banda de 1500 pb aproximadamente, tamaño que corresponde a la secuencia de HyPer, por lo tanto el PCR permitió amplificar de manera correcta la secuencia de HyPer con sus nuevos sitios de restricción. Las secuencias de HyPer amplificadas por PCR se incorporaron en el vector pCCC12c. Primero se cortó el plásmido pCCC12c que ya estaba construido y las secuencias obtenidas del PCR de HyPer con las enzimas *NotI* y *BamHI*. Una vez hechas las restricciones se hizo la ligación de los fragmentos HyPer con el vector pCCC12c. Se transformaron bacterias competentes con el DNA de la ligación y se tomaron 10 colonias para hacerles un “*screening*” rápido, con el fin de encontrar colonias con posibilidad de contener el vector con el inserto de interés. El *screening* rápido consiste en romper la membrana de las bacterias y correr directamente esa muestra en un gel. Usando esta técnica podemos distinguir que los plásmidos que contienen el inserto migran más lento que los plásmidos que no lo tienen. Con esto seleccionamos 3 colonias (1, 6 y 7) que parecían contener el inserto HyPer. Para verificar si las colonias seleccionadas contenía el vector con HyPer, se hizo minipreps para cada una y posteriormente se sometieron a digestiones usando las enzimas: *EcoRI*, *XmnI*, *NotI/BamHI*. En la Figura 7.2.3 se muestra el mapa de restricción del plásmido que se esperaba obtener de la ligación de pCCC12c con la secuencia de HyPer y los fragmentos que generan las enzimas utilizadas para el análisis.

Las digestiones se sometieron a electroforesis (Figura 7.2.3b). En la fotografía del gel se observa que con el miniprep 1 no se obtuvo DNA ya que en ninguno de los pozos donde se corrieron las muestras de este miniprep se pueden detectar bandas (carriles 2, 5 y 8). En el caso de los minipreps 6 y 7 se pudo determinar que estos plásmidos sí contenían la secuencia HyPer, porque el patrón de bandas corresponde con el tamaño y número de fragmentos calculados teóricamente. A los plásmidos obtenidos de los minipreps 6 y 7 se les nombró HyPer (Figura 7.2.3c).

Estos resultados verificaron que se pudo construir plásmidos que contienen el sensor HyPer, el *enhancer*-promotor CMV/CBA y los *insulators*.

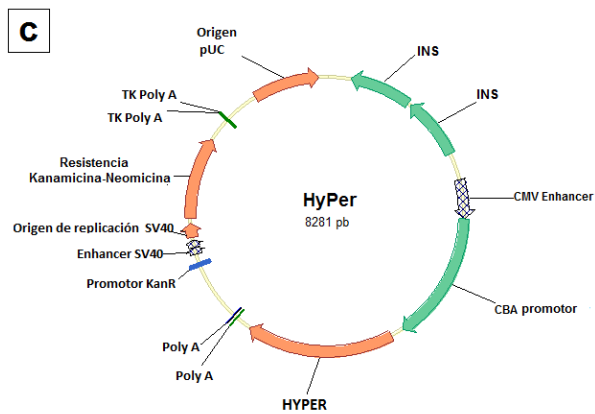
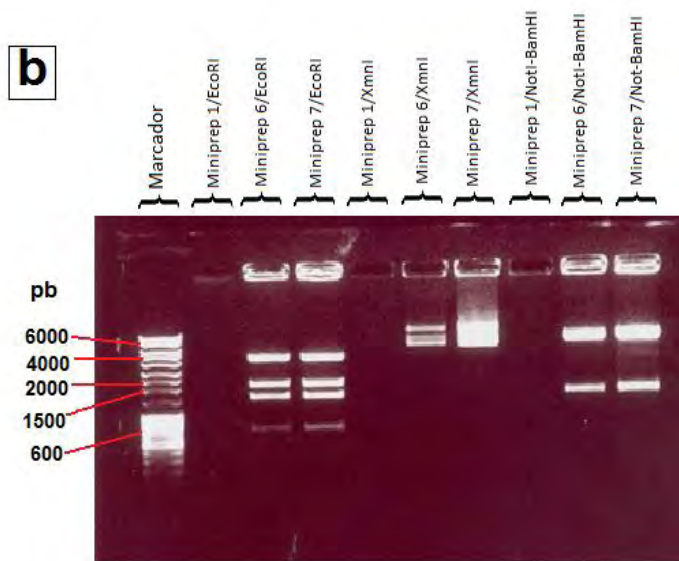
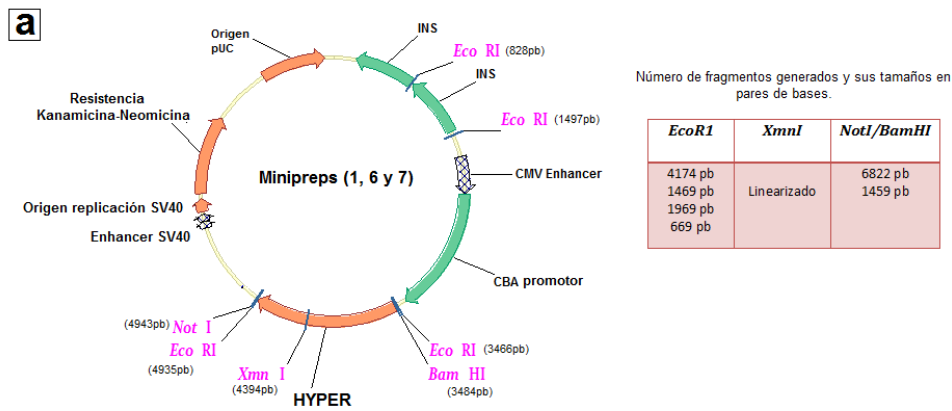


Figura 7.2.3. (a) Mapa de restricciones del plásmido de las clonas y tabla con los fragmentos calculados teóricamente. **(b)** Electroforesis de las digestiones de los minipreps 1, 6 y 7 con las enzimas *EcoRI*, *XmnI*, *NotI* y *BamHI*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **(c)** Vectores HyPer construidos.

7.3. Expresión de Case12 en células HEK293T.

Los vectores construidos (pCCCC12p, pCCC12c y pCMVCBA Case 12), con la secuencia que codifica para el sensor de Ca^{2+} intracelular Case12, se transfirieron y expresaron en la línea celular HEK293T. Se eligió esta línea celular porque son células fáciles de transfectar y además han mostrado tener un nivel de expresión bueno cuando se les incorpora plásmidos. La secuencia Case 12 que codifica para la proteína fluorescente está bajo el control de la actividad del *enhancer* CMV. Este *enhancer* es utilizado para dar una expresión constitutiva, por lo tanto las células serán en todo momento fluorescentes. Las células HEK293T fueron transfectadas transitoriamente con cada uno de los tres plásmidos con los sensores de Ca^{2+} construidos para poder hacer una comparación entre ellos. Las transfecciones se hicieron considerando la concentración y el tamaño de los plásmidos para que en los tres casos se tuviera la misma cantidad de DNA que se iba a transfectar.

Al analizar las células transfectadas, se encontró que el número de células fluorescentes depende del plásmido utilizado. En la transfección con el plásmido pCMVCBA Case12, se observó el mayor número de células fluorescentes comparado con las otras dos transfecciones (Figura 7.3a). Mientras que con el vector pCCCC12p se encontró el menor número de células expresaban el sensor y el plásmido pCCC12c mostró un número intermedio de células fluorescentes entre pCMVCBACase12 y pCCCC12p.

La concentración de células no fue un factor en determinar las diferencias en la expresión, ya que al observar las células transfectadas en campo claro para cada una de las cajas, las tres contenían aproximadamente la misma densidad celular (imágenes no mostradas). Por lo tanto la eficiencia en la transfección fue diferente con cada plásmido, donde la más eficiente fue utilizando el vector pCMVCBACase12 y la más baja fue con el vector pCCCC12p. También se analizó la intensidad de fluorescencia de células para cada transfección (Tabla 7.3). Se encontró que las células transfectadas con pCMVCBACase12 mostraron el mayor nivel de fluorescencia y las que presentaron el menor nivel de fluorescencia fueron las células transfectadas con pCCCC12p.

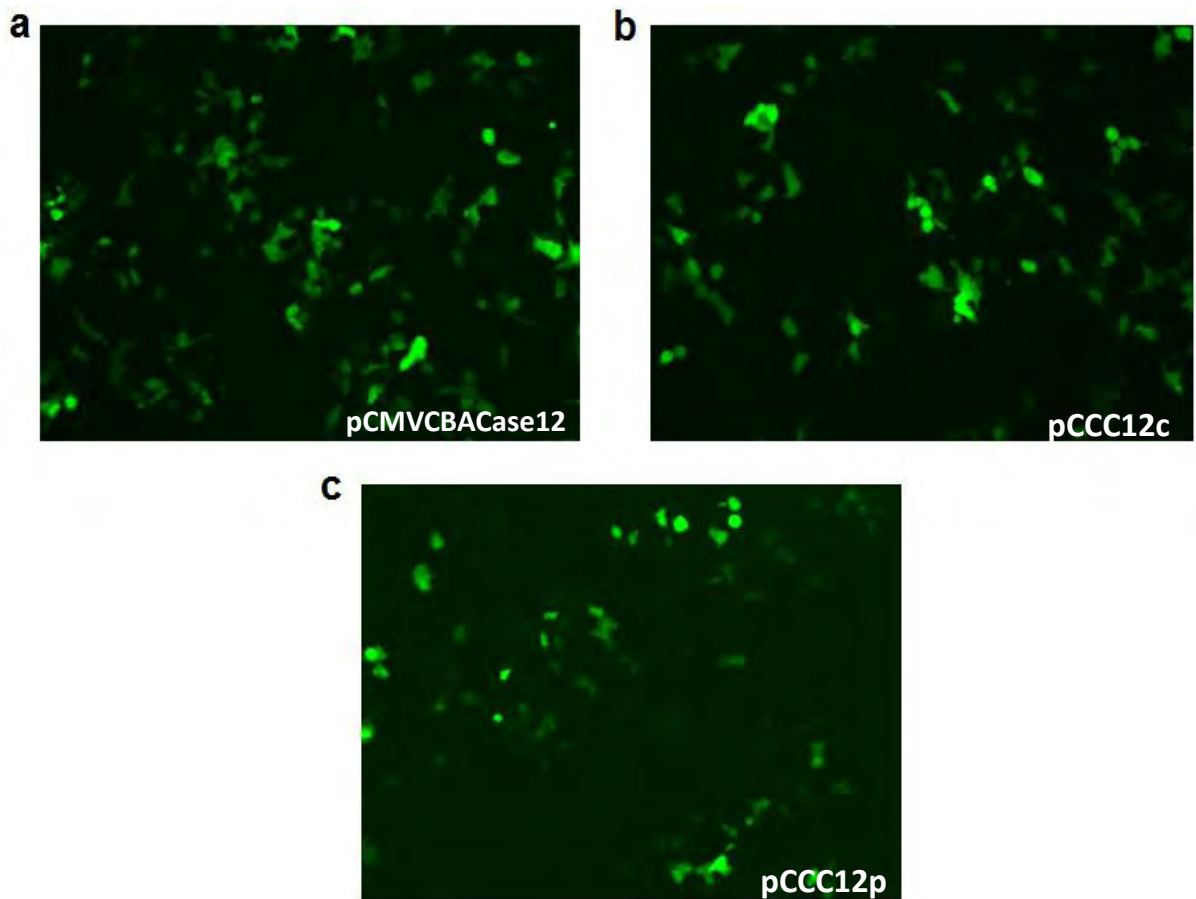


Figura 10. Transfección de células HEK293T con los vectores de Case 12. (a) Células que expresan Case12 transfectadas con el plásmido pCMVCBACase12. (b) Células transfectadas con el vector pCCC12c. (c) Células transfectadas con pCCC12p. Imágenes capturadas con el microscopio Axio Observer.Z1, objetivo: EC Plan-Neofluar 10x/0.30, filtro: Alexa Fluor 489, cámara: AxioCamMR3.

Tabla 7.3. Nivel de fluorescencia en las transfecciones.

Transfección	Número de Células fluorescentes analizadas.	Nivel de Fluorescencia
pCMVCBACase12	36	77.3
pCCC12c	36	65.7
pCCC12p	36	52.7

*. El nivel de fluorescencia es el promedio de los valores de fluorescencia para cada célula.

7.4. Expresión de HyPer en células HEK293T.

Los vectores construidos que contienen HyPer, también se transfectaron en células HEK293T. El 80 % de las células transfectadas con HyPer expresaron la proteína fluorescente del sensor (Figura 7.4b). Con esto se comprobó que era posible expresar el sensor HyPer en células HEK293T a través de los vectores construidos y que además la proteína HyPer mantiene su capacidad de ser fluorescente en estas células.

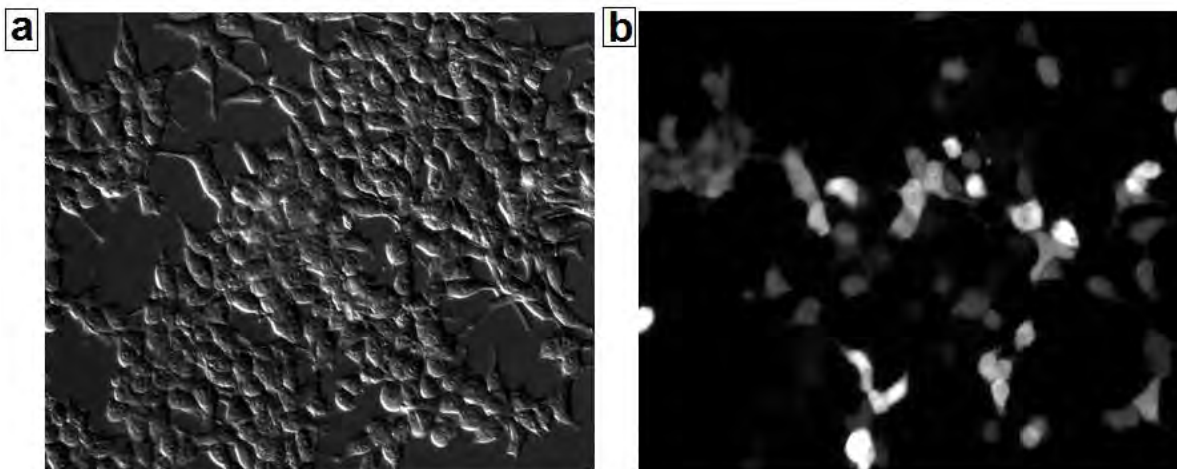


Figura 7.4. Transfección de células HEK293T con los vectores HyPer. (a) Células trasfectadas con el vector HyPer, vistas en campo claro con contraste de fases. **(b)** Las mismas células transfectadas vistas con fluorescencia. Imágenes capturadas el microscopio Axio Observer.Z1, objetivo: EC Plan-Neofluar 10x/0.30, filtro: Alexa Fluor 489, cámara: AxioCamMR3.

7.5. Caracterización funcional del sensor Case12 en células HEK293T.

Para determinar si el sensor Case12 contenido en los vectores construidos era capaz de cambiar su fluorescencia ante modificaciones en la $[Ca^{2+}]_i$, se llevaron a cabo pruebas en las células HEK293T transfectadas con los plásmidos pCCC12c. Durante los experimentos fue necesario inducir cambios en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$. Los agentes utilizados para modificar la concentración de Ca^{2+} intracelular fueron: 1) forskolina, la cual aumenta los niveles de AMPc de la célula al estimular la adenilato ciclasa (Seamon *et al.* 1981), 2) mentol, abre canales de Ca^{2+} de la familia de los TRP, en particular los canales TRPM8 (Mahieu *et al.* 2007), 3) Thapsigargina, bloquea la bomba Ca^{2+} ATPasa del retículo endoplásmico y el sarcoplásmico (Lytton *et al.* 1991), y por lo tanto produce la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. 4) Ionomicina, es un ionóforo que permite el paso de los iones Ca^{2+} a través de la membrana. En la primera prueba las adiciones de los

diferentes agentes se hicieron cada tres minutos en el siguiente orden: mentol, forskolina, thapsigargina y ionomicina. La gráfica de la Figura 7.5 representa el promedio de la fluorescencia de las células que fueron analizadas en este ensayo. Las flechas indican el momento de las adiciones. En este caso la fluorescencia basal va disminuyendo y al agregar el mentol, ocurrió un aumento en la fluorescencia de las células, al agregar la forskolina también la fluorescencia aumenta aunque en menor medida. Cuando se adicionó al medio la thapsigargina no se detectó ningún aumento en la fluorescencia de las células. Por último la adicionar 1 μ M de ionomicina, se dio un aumento muy grande en la fluorescencia (Figura 7.5).

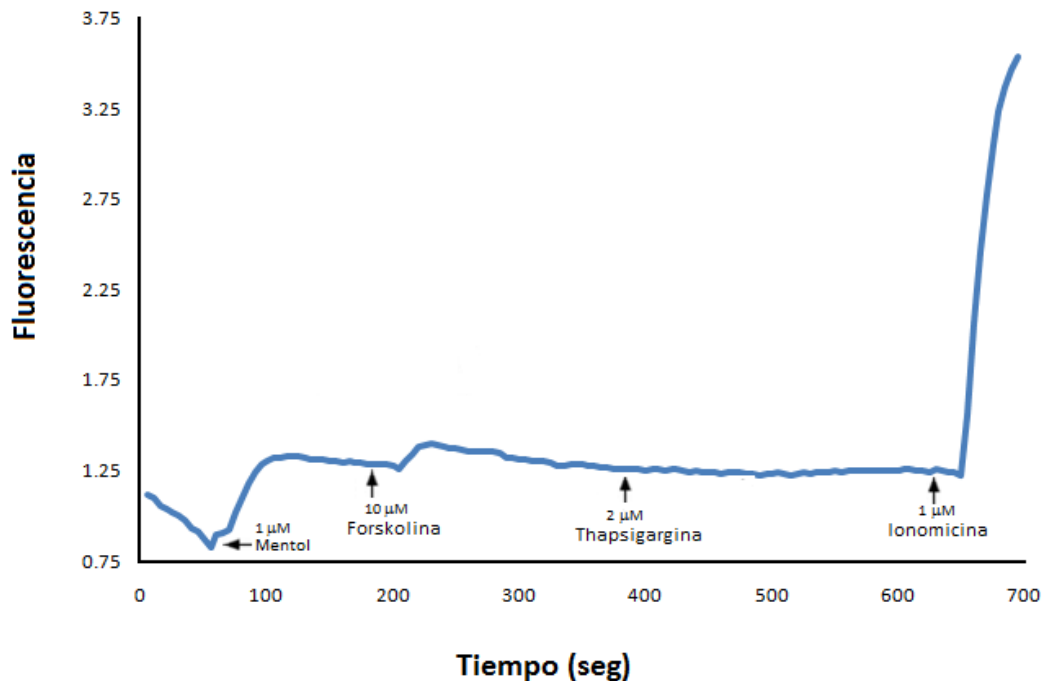


Figura 7.5. Primera prueba de caracterización de Case 12 en células HEK293T. La gráfica representa el promedio de la fluorescencia de las células analizadas (n=15). Las células se transfectaron con el vector pCCC12c. Imágenes capturadas con el Microscopio Axio Observer. Filtro: Alexa Fluor 489. Cámara: AxioCamMR3. Objetivo: EC Plan-Neofluar 10x/0.30. Tiempo de exposición: 500 ms. Imágenes capturadas cada 5 segundos.

La falta de respuesta a la thapsigargina pudo ocurrir porque al haber agregado antes el mentol, este produce la entrada de Ca^{2+} del exterior, este mismo Ca^{2+} tiene la capacidad de liberar más Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, entonces podría haber sucedido que en las pozas internas no quedó suficiente Ca^{2+} para que se diera un cambio en la fluorescencia al agregar thapsigargina. Por lo tanto para corroborar si eso fue lo que ocurrió, se llevó a cabo una segunda serie de

experimentos con células HEK293T trasfectadas con pCCC12c, donde primero se agregó la thapsigargina, luego el mentol y al final la ionomicina (Figura 7.5.1).

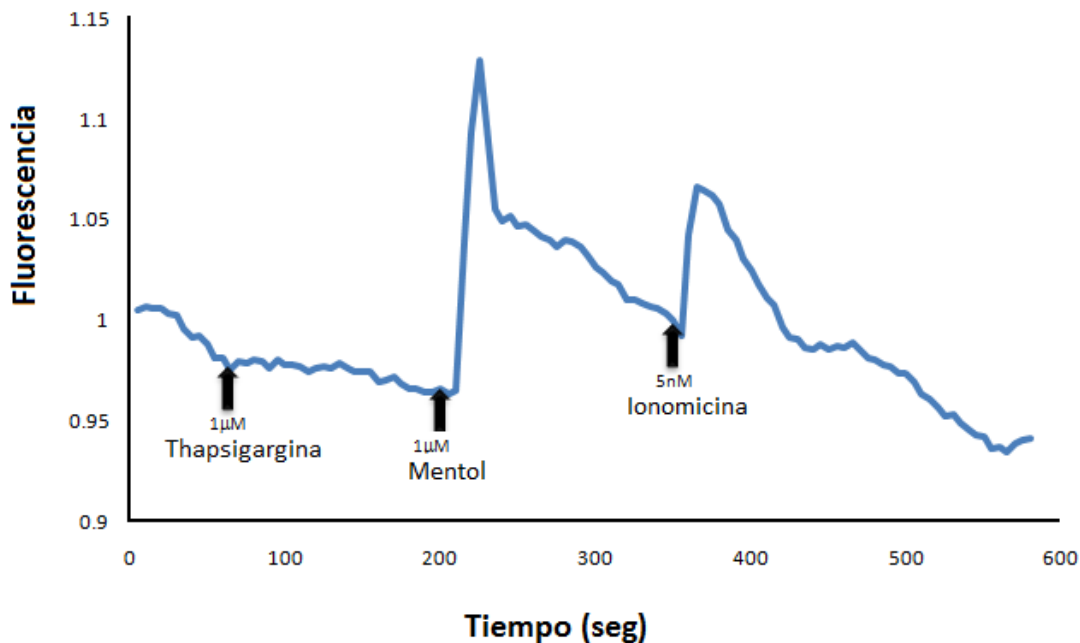


Figura 7.5.1 Segunda prueba de caracterización de Case 12 en células HEK293T. La gráfica representa el promedio de la fluorescencia de las células analizadas (n=26 células). Imágenes capturadas con el Microscopio Axio Observer. Filtro: Alexa Fluor 489. Cámara: AxioCamMR3. Objetivo: EC Plan-Neofluar 10x/0.30. Tiempo de exposición: 500 ms. Imágenes capturadas cada 5 segundos.

Como lo muestra la gráfica de la Figura 7.5.1, aunque primero se agregó la thapsigargina, no se observó aumento en la fluorescencia más bien comparada con la basal mantiene constante el nivel de fluorescencia. Pero al agregar mentol y ionomicina se observaron dos picos que corresponden al aumento en la fluorescencia. Se descartó que la ausencia de respuesta del sensor ante la thapsigargina ocurriera por el previo vaciamiento de los depósitos internos, porque la segunda prueba mostró que aunque se agregó primero la thapsigargina, las células no aumentaron su fluorescencia. Estas dos primeras pruebas nos permitieron determinar que en las células HEK293T que expresaron el sensor Case12, se modificó la fluorescencia ante los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. Cabe señalar que esta respuesta no fue de la misma intensidad con todos los agentes usados, cuando se utilizó ionomicina y mentol el cambio en la fluorescencia es grande, pero con forskolina y sobretodo con la thapsigargina no se detectaron incrementos grandes en la fluorescencia. Esto

porque la forskolina no actúa directamente en algún canal de Ca^{2+} , sino lo hace indirectamente a través de estimular a la adenilato ciclasa para que ocurra la producción de AMPc y este a su vez permita la entrada de Ca^{2+} a través de canales. Lo que también pudo haber sucedido es que al aumentar rápidamente el AMPc las fosfodiesterasas enzimas encargadas de la degradación de AMPc, disminuyen su concentración y quizás este no alcanza el nivel que le permita producir una respuesta significativa. Para corroborarlo, podría hacerse un ensayo donde se agregara un inhibidor de las fosfodiesterasas por ejemplo IBMX y entonces ver si el AMPc logra producir cambios más grandes en las concentraciones de Ca^{2+} . La escasa respuesta con thapsigargina pudo ser porque esta tampoco actúa directamente sobre algún canal para Ca^{2+} , sino que bloquea la bomba Ca^{2+} ATPasa de los depósitos internos, entonces tal vez el cambio que ocasiona en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no es suficiente para aumentar mucho la fluorescencia.

7.6. Pruebas para optimizar la incubadora acoplada al microscopio.

Uno de los propósitos en la utilización de los sensores es hacer estudios de larga duración y que además las células puedan ser observadas todo el tiempo. Por tal motivo se adquirió una cámara cerrada con una platina que puede proveer la temperatura y el CO_2 necesario para funcionar como incubadora adaptada en el microscopio. Debíamos establecer las condiciones adecuadas para el crecimiento óptimo de las células, porque la temperatura de la platina y de la caja se regulaban de forma independiente, por lo tanto teníamos que encontrar el balance entre las dos para que se mantuviera la temperatura óptima para las células. Para estos experimentos usamos las células COS-7. En la primera prueba (Figura 7.6a) las células se observaron durante aproximadamente 14 horas. Como lo muestran las imágenes casi el 80 % de las células murieron, en este caso al revisar la temperatura de la platina donde estaban las células, estaba entre $38.2\text{-}38.5^\circ\text{C}$, lo cual representaba una temperatura muy alta que no favoreció su supervivencia. En la segunda prueba, se logró mantener la temperatura a 37.5°C , y como se ve en la serie de imágenes de la Figura 7.6b aproximadamente el 90 % de las células sobrevivieron, pero no se detectó aumento en la población de células. Al analizar su comportamiento se vio que muchas trataban de dividirse pero no lo lograban, en este caso encontramos que casi todo el medio se había evaporado. En la última prueba para resolver el problema de la humedad, se metieron a un lado de la caja de las células dos tapitas con agua, y la temperatura se mantuvo entre $37.5\text{-}37.8^\circ\text{C}$. Los resultados de esta prueba aparecen en la Figura 7.6.1, en este caso las células se dejaron durante 48 horas, después

de ese tiempo se encontró que la población de células creció de manera normal. Estos ensayos nos permitieron establecer las condiciones óptimas y necesarias para crecer a las células eficientemente en esa incubadora siendo observadas bajo el microscopio durante varias horas.

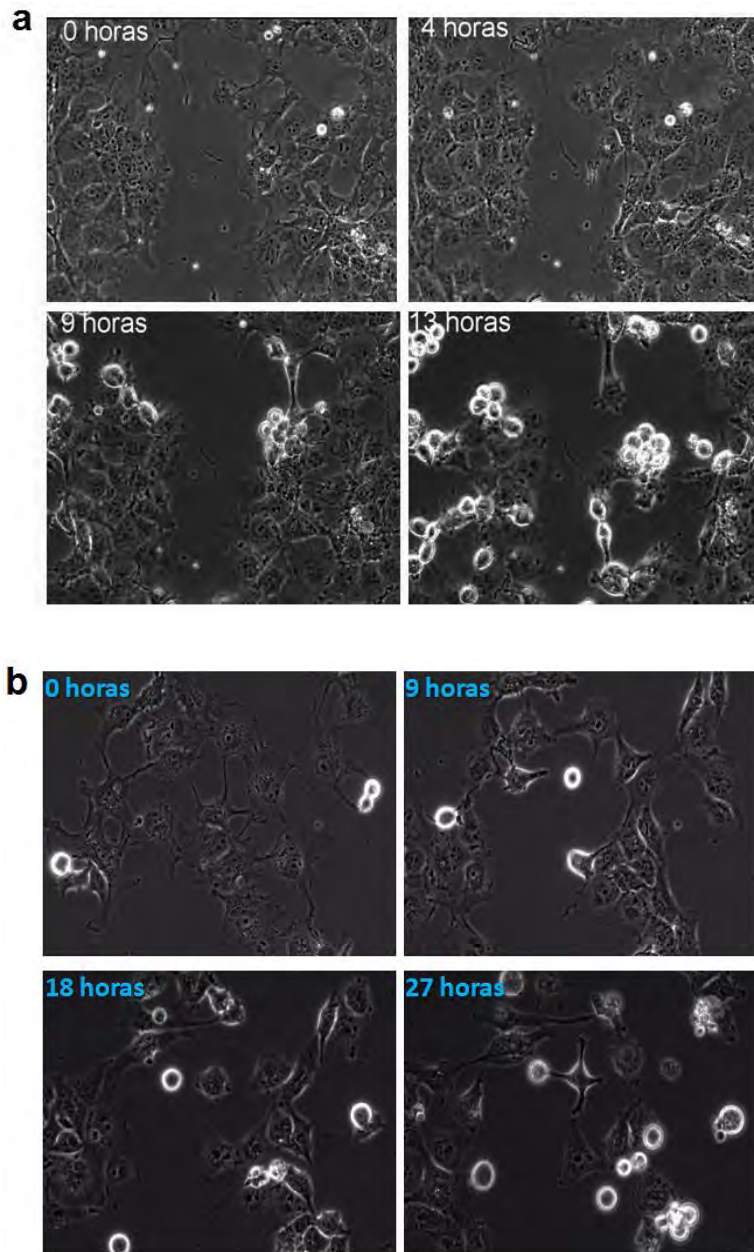


Figura 7.6. Primeras dos pruebas de crecimiento en la incubadora del microscopio. Para todas las pruebas se usaron células COS-7. **(a)** Células observadas durante 14 horas. En este caso la temperatura era de 38.2-38.5°C. **(b)** En la segunda la temperatura estaba en 37.5°C pero el medio de las células se evaporó. Imágenes capturadas con el Microscopio Axio ObserverZ1. Objetivo: EC Plan-Neofluar 20x/0.50 Ph 2 M27. Reflector: 02 DAPI. Condensador: Phase2. Cámara: AxioCamMR3. Tiempo de exposición: 100 ms. Imágenes capturadas cada 5 minutos.

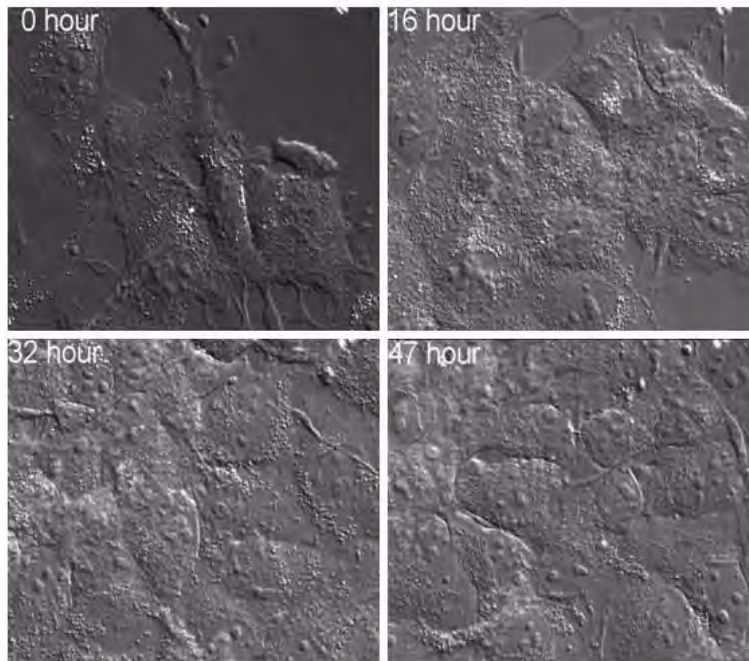


Figura 7.6.1 Última prueba de crecimiento en la incubadora del microscopio. En este último ensayo, las células se dejaron durante 48 horas y sobrevivieron exitosamente. Imágenes capturadas con el Microscopio Axio ObserverZ1. Objetivo: Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil, Reflector: Analy. DIC Trans.light. Condensador: DIC2. Cámara: AxioCamMR3. Tiempo de exposición: 100 ms. Imágenes capturadas cada 5 minutos.

7.7. Experimentos de larga duración con el sensor Case12.

Una vez establecidas las condiciones requeridas para crecer a las células en la incubadora del microscopio, se probó si células AD293 transfectadas con Case12 eran capaces de sobrevivir en la incubadora siendo observadas bajo la lámpara de fluorescencia. Las células se dejaron durante toda la noche aproximadamente 14 horas. Como se observa en la Figura 7.7, transcurridas las 14 horas, el 80 % de las células fluorescentes sobrevivieron de forma adecuada. Además las células que expresaban Case12 mantuvieron la fluorescencia todo el tiempo. El experimento nos permitió conocer que la mayoría de las células analizadas sobrevivieron aun siendo observadas bajo la lámpara de fluorescencia. También se determinó que es posible hacer uso de los sensores codificados en los vectores construidos para llevar a cabo ensayos por varias horas.

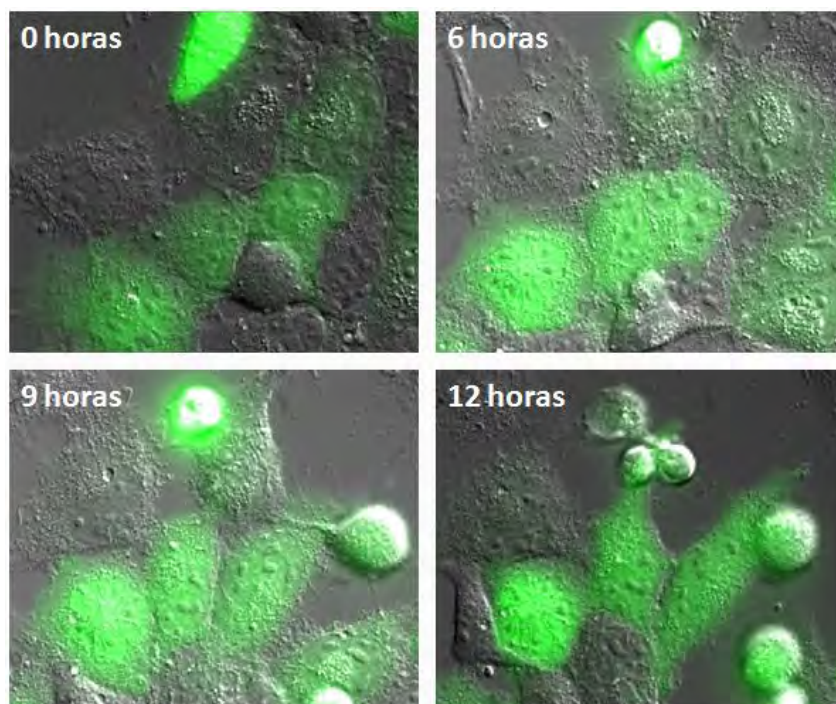


Figura 7.7. Prueba de Case12 durante toda la noche. Las células AD293 se dejaron en la incubadora del microscopio durante 14 horas. Algunas de las células fluorescentes murieron, pero aproximadamente el 90 % sobrevivió adecuadamente. Imágenes capturadas con el Microscopio Axio Observer. Z1 Filtro: Alexa Fluor 489 DIC Trans.light. Cámara: AxioCamMR3. Objetivo: Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil. Tiempo de exposición: 100 ms. Imágenes capturadas cada 5 minutos durante las 14 horas.

7.8. Respuesta de Case12 ante el ATP en células AD293.

El ATP es un agente que puede inducir aumentos en el Ca^{2+} intracelular. El ATP extracelular se puede unir a receptores celulares purinérgicos que pueden ser ionotrópicos (P2X) o metabotrópicos (P2Y) (Deli *et al.* 2007). Los receptores P2X son canales iónicos implicados en la entrada del Ca^{2+} intracelular, mientras que los P2Y1 son receptores transmembranales acoplados a proteínas G, que al unirse el ATP producen la activación de la fosfolipasa C y la liberación de Ca^{2+} de las pozas internas a través del IP3 (Masgrau *et al.* 2009). Con base en esos antecedentes, se probó si el ATP era capaz de inducir cambios en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que pudieran ser detectados con el sensor Case12. Se hizo una serie de pruebas en las células AD293 transfectadas con el plásmido pCCC12c. En el primer ensayo se adicionó $1\mu\text{M}$ de ATP. Se observó que al adicionar el ATP se modificó la fluorescencia de las células. Este aumento en la fluorescencia se atribuyó a que el ATP incrementó el Ca^{2+} intracelular y esto fue detectado por el sensor (Figura 7.8).

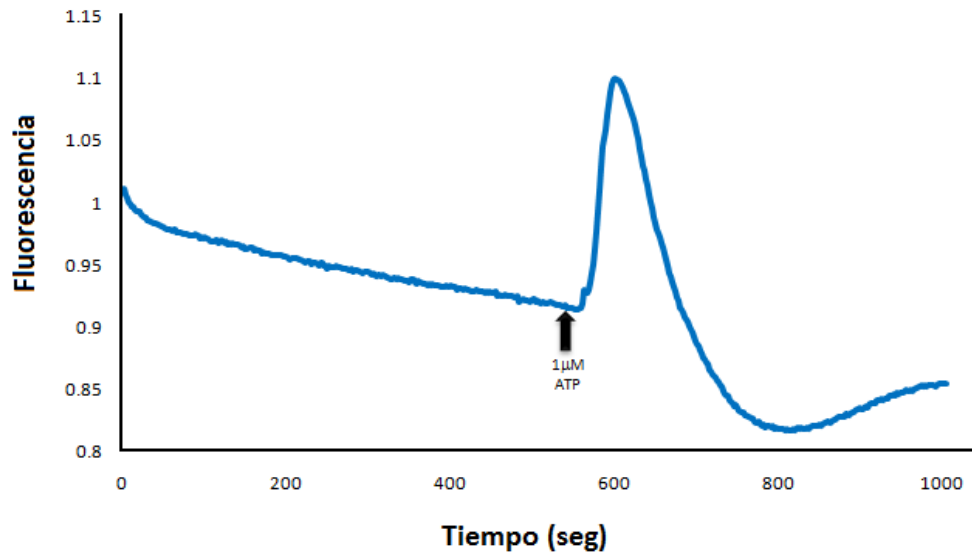


Figura 7.8. Respuesta de Case12 a de 1 μM de ATP. La gráfica es el promedio de la fluorescencia de células AD293 que expresaban Case12 ($n= 31$ células). Cuando se adicionó el ATP, la fluorescencia de las células aumentó. Microscopio: Axio Observer.Z1. Objetivo: EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27. Filtro Alexa Fluor 489. Cámara: AxioCamMR3. Tiempo de exposición: 200 ms.

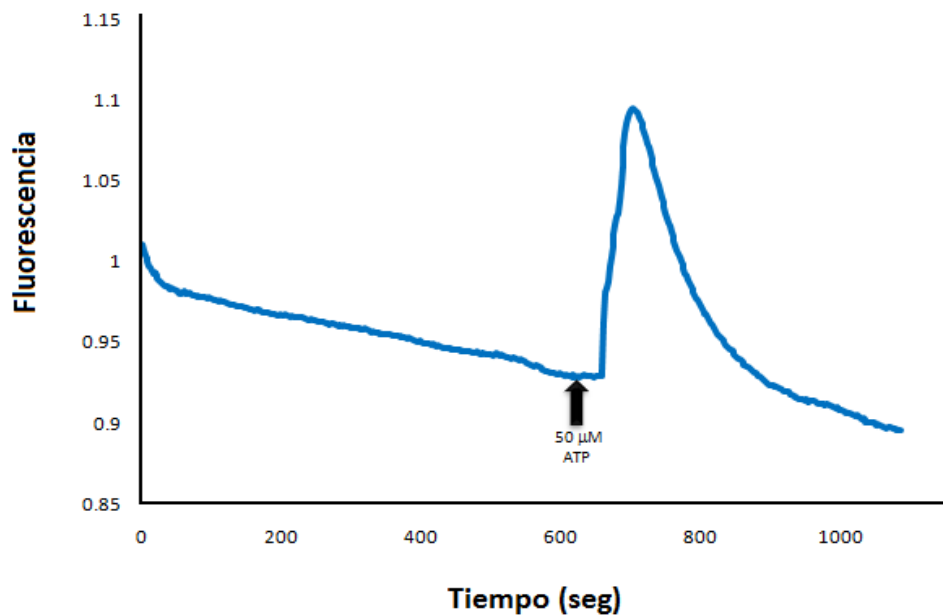


Figura 7.8.1 Fluorescencia de células AD293, con la adición de 50 μM de ATP. La adición de 50 mM de ATP ocasionó un aumento en la fluorescencia de las células ($n= 23$ células). Microscopio: Axio Observer.Z1. Objetivo: EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27. Filtro Alexa Fluor 489. Cámara: AxioCamMR3. Tiempo de exposición: 200 ms.

En el segundo experimento se agregó al medio de las células 50 μM de ATP. En este caso la adición del ATP también provocó un aumento en la fluorescencia de las células (Figura 7.8.1). Como se observa en las dos gráficas (Figura 7.8 y 7.8.1) la concentración de ATP no ocasionó diferencia en el aumento de la fluorescencia. En base a los resultados de estos dos experimentos, se corroboró que el ATP modifica la concentración de Ca^{2+} intracelular y este cambio es detectado por el sensor Case12.

7.9. Caracterización de los sensores de Ca^{2+} intracelular que usan FRET.

D3cpv y TNXXL, son sensores genéticos fluorescentes que emplean FRET para medir Ca^{2+} intracelular. Los plásmidos con la secuencia para D3cpv fueron proporcionados por el laboratorio de Roger Tsien (Palmer *et al.* 2006) y los de TNXXL por el laboratorio de Oliver Griesbeck (Mank *et al.* 2008). Estos plásmidos se transfirieron en las células AD293 y se hizo una comparación para poder determinar cual de los dos sensores producía una mejor respuesta ante cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en nuestras células. En los dos casos el agente que se utilizó para incrementar el Ca^{2+} fue el ATP. En estas pruebas se midió la fluorescencia individual de cada una de las dos proteínas de los sensores: citrina y CFP para el sensor TNXXL, Venus y CFP para D3cpv.

La Figura 7.9 muestra la respuesta de la fluorescencia de TNXXL y D3cpv cuando se añadió ATP. El sensor TNXXL tuvo un cambio más grande en su fluorescencia (Figura 7.9a). En el experimento para el sensor D3cpv prácticamente no se detectó ningún cambio en la fluorescencia después de agregar al medio el ATP (Figura 7.9b). En los dos casos está ocurriendo FRET pero el nivel de FRET es distinto, porque en TNXXL hay un nivel más grande comparado con D3cpv. La comparación entre las dos gráficas obtenidas del análisis de la fluorescencia de las células que expresaban los sensores de FRET, permitió determinar que TNXXL proporciona una mejor y más grande respuesta a los cambios en el Ca^{2+} intracelular inducidos por el ATP. Cabe mencionar que los dos sensores mostraron un cierto grado de variabilidad en las respuestas durante los experimentos, pero durante una serie de varias repeticiones de las pruebas, la respuesta de TNXXL fue en promedio mejor y más reproducible que con D3cpv, quizás estas diferencias se deben a que el TNXXL tienen una mayor afinidad por el Ca^{2+} (TNXXL $K_d = 800 \text{ nm}$ y D3cpv $K_d = 1.2 \mu\text{M}$).

Para hacer una comparación de la respuesta por parte del sensor Case12 contenido en nuestros vectores construidos y TNXXL, se hizo una prueba con los dos sensores modificando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con ATP (Figura 7.9.1)

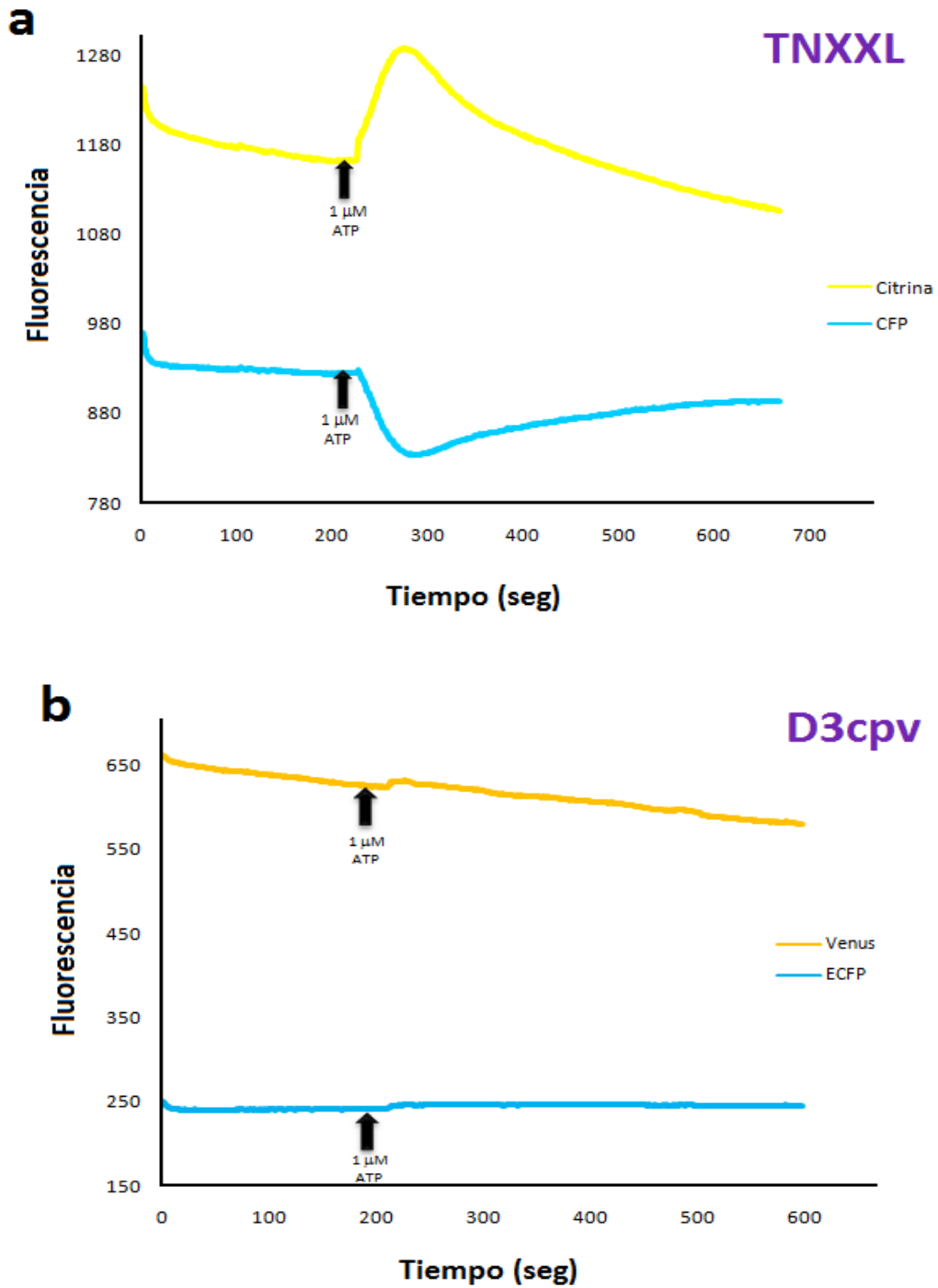


Figura 7.9 Comparación de TNXXL y D3cpv. (a) Respuesta de las células AD293 que expresaban TNXXL ante la adición de 1 μM de ATP. (b). Respuesta de las células AD293 transfectadas con D3cpv. Imágenes capturadas con el microscopio Axio Observer.Z1, EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27. Cámara Optosplit. Tiempo de exposición 100 ms.

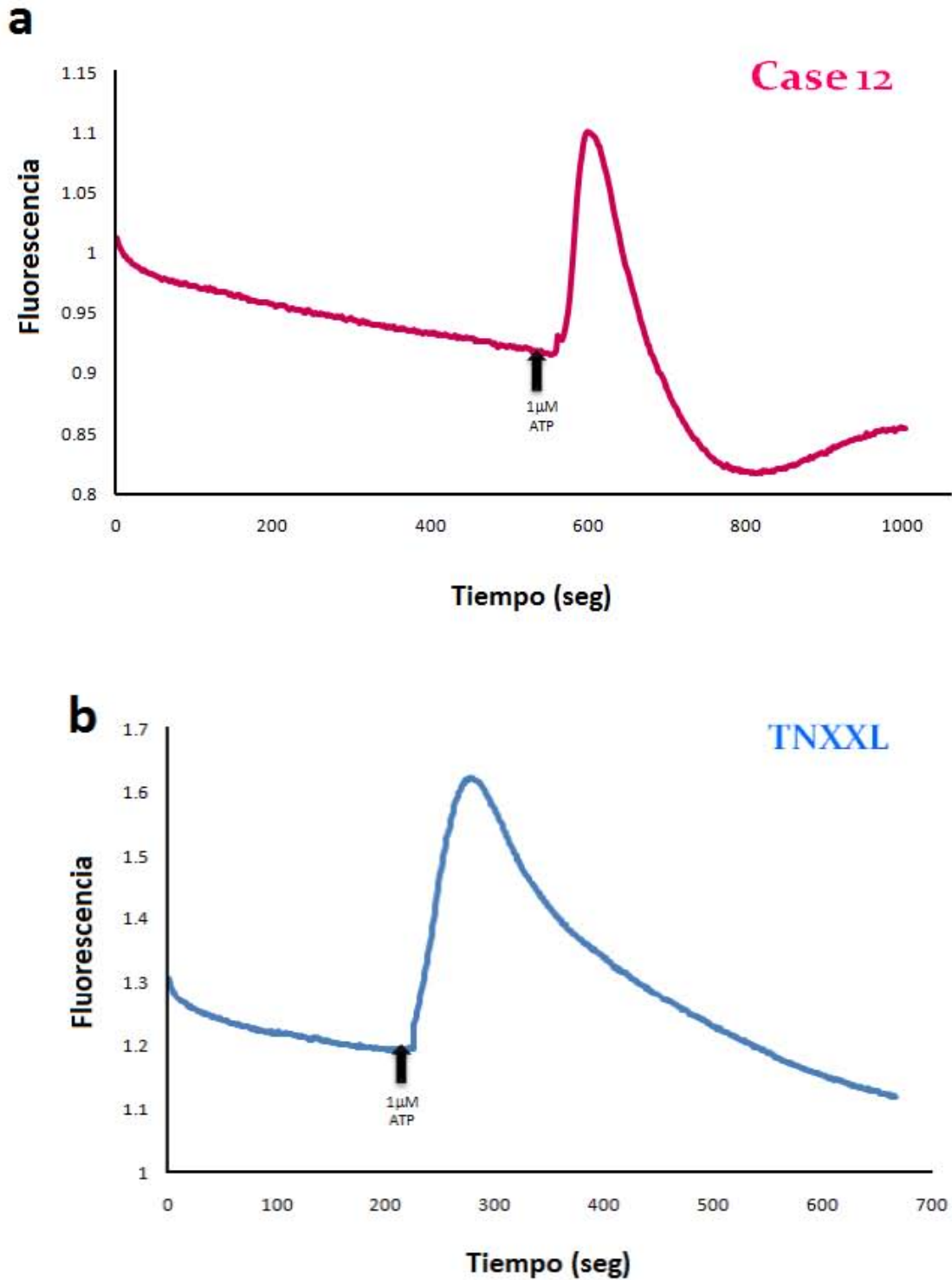


Figura 7.9.1. Comparación entre los sensores TNXXL y Case12. La flecha indica la adición de ATP. El sensor TNXXL (**b**) mostró un mayor aumento en la fluorescencia que Case12 (**a**) después de la adición de 1 μ M de ATP. Imágenes capturadas con el microscopio Axio Observer.Z1, EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27. Cámara Optosplit para TNXXL y AxioCamMR3 para Case12. Tiempo de exposición 100 ms.

La comparación entre los dos sensores permitió establecer que TNXXL en relación con Case12 incrementó más su fluorescencia ante el aumento en el nivel de Ca^{2+} intracelular. En los dos casos la bajada en la fluorescencia después del aumento es distinta, en Case12 la disminución de la fluorescencia es más grande y rápida que en TNXXL. Probablemente esto depende de que la K_d de Case12 ($K_d = 1 \mu\text{M}$), es más grande que la de TNXXL ($K_d = 800 \text{ nM}$), por lo tanto TNXXL no se separa tan rápido del Ca^{2+} como lo hace Case12. Aunque la respuesta de Case12 es menor con respecto a TNXXL, la diferencia entre ambos no es muy grande, lo que significa que los vectores construidos con el sensor Case12 pueden ser empleados de manera confiable y eficiente para poder detectar modificaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en líneas celulares. Además Case12 a diferencia de sensores de FRET representa un buen candidato para poder ser usado en las células ES porque se ha visto que los sensores utilizan una proteína fluorescente, pueden detectar cambios rápidos en el Ca^{2+} intracelular.

7.10. Caracterización funcional del sensor HyPer en las células HEK293T.

La primera prueba de funcionamiento del sensor HyPer contenido en nuestros vectores se llevó a cabo en células HEK293T. Primero determinamos cuál era la cantidad mínima de H_2O_2 requerida para que el sensor fuera capaz de cambiar su fluorescencia. En este ensayo las concentraciones finales de H_2O_2 empleadas fueron: $0.5 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$.

Los resultados muestran que el sensor HyPer modifica su fluorescencia en respuesta a los cambios en el H_2O_2 intracelular a partir de los $20 \mu\text{M}$ (Figura 7.10). Cabe mencionar que la sensibilidad del sensor en nuestros ensayos fue similar en comparación con las pruebas que hizo el grupo que construyó el sensor HyPer (Belousov *et al.* 2006). La diferencia en la cantidad requerida para detectar cambios en la fluorescencia puede ser por diferentes factores, entre los cuales está el tipo de células, ellos usaron como modelo a las células COS-7 y nosotros usamos células HEK293T. Además el sistema para agregar el H_2O_2 al medio también fue distinto.

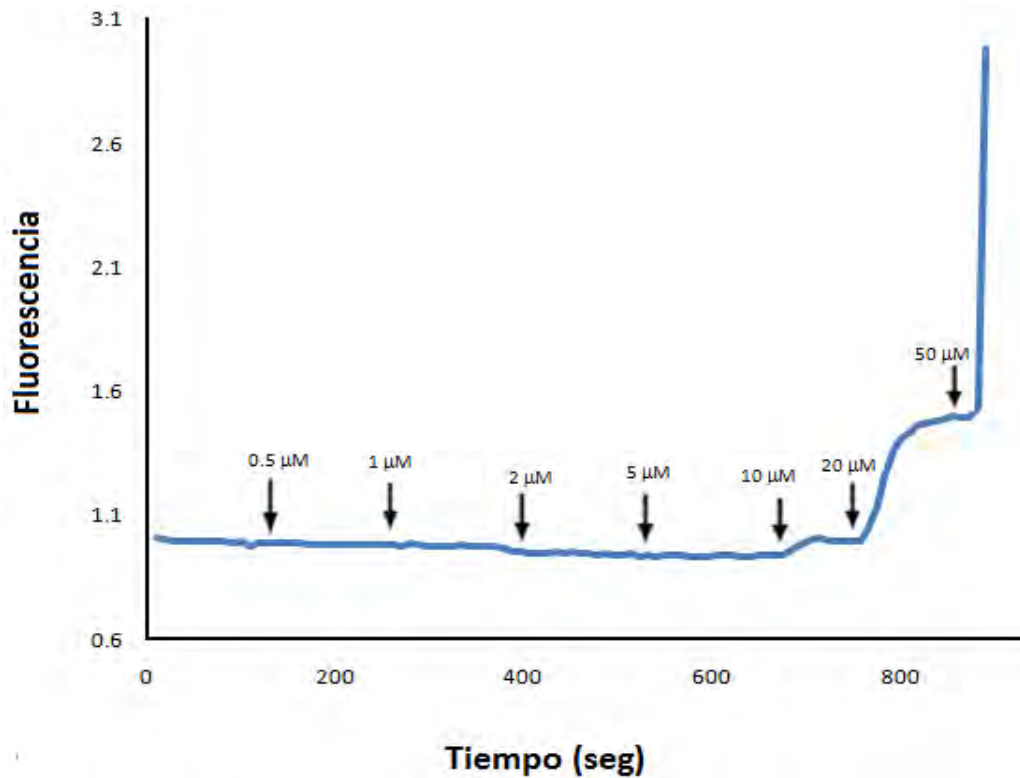


Figura 7.10. Caracterización de HyPer. La gráfica representa el promedio de la fluorescencia de las células HEK293T que expresaban HyPer. Cada una de las flechas indica la adición de H₂O₂ al medio. Microscopio: Axio Observer.Z1, Objetivo: C-Apochromat 40x/1.20 W Korr, Filtro: 10 Alexa Fluor 489, Cámara: AxioCamMR3, Tiempo de exposición: 100 ms.

Con este experimento se logró determinar que HyPer respondió al H₂O₂, aunque en este caso la respuesta no se dio a muy bajas concentraciones de H₂O₂, pero la respuesta está dentro de un rango aceptable, por lo que consideramos factible seguir usando estos vectores para los posteriores ensayos.

7.11. Efecto del EUK-134 ante cambios en el H₂O₂ intracelular.

El EUK-134 es una molécula sintética que tiene la capacidad de funcionar como catalasa y superóxido dismutasa (Melov *et al.* 2000). Para detectar si el EUK-134 era capaz de eliminar el H₂O₂ de las células HEK293T y por lo tanto eliminar la respuesta por parte del sensor. A las células trasfectadas con los vectores HyPer, una hora antes del experimento se agregó al medio de las células 2mM de EUK-134, como control para poder comparar, se pusieron células sin EUK-134.

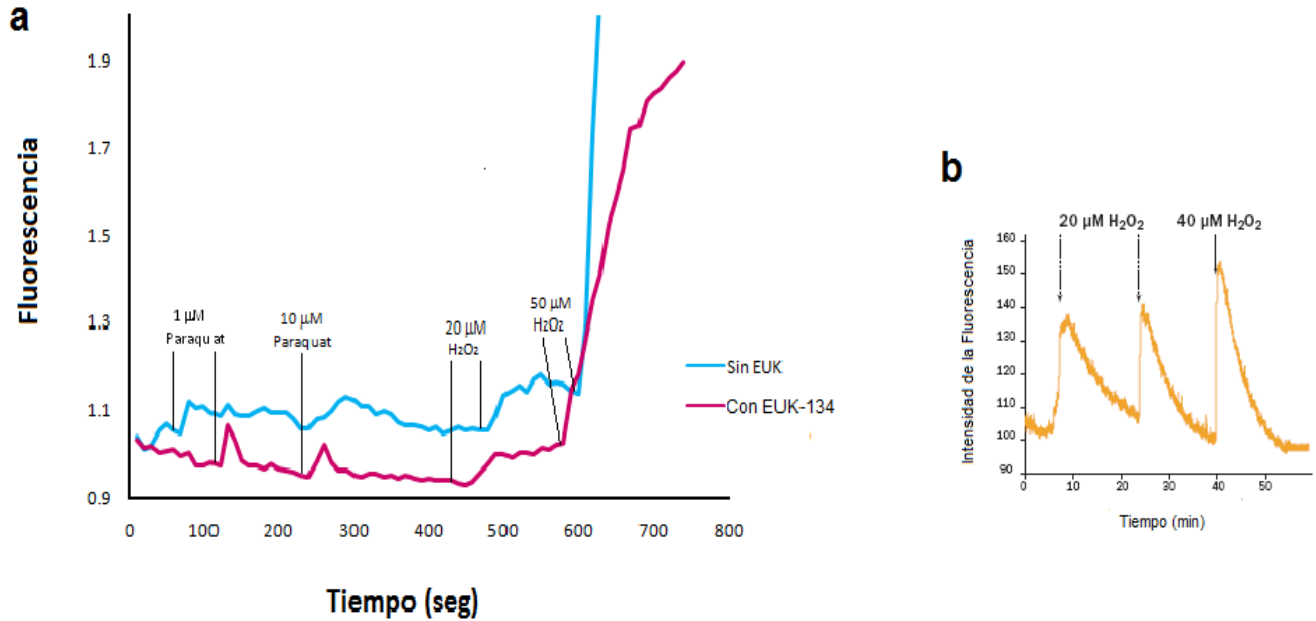


Figura 7.11. Fluorescencia de células HEK293T con y sin EUK-134. (a) La comparación de las dos líneas muestra que el EUK-134 no elimina por completo el H₂O₂, pero sí cambia la cinética de la respuesta ante cambios en el H₂O₂ intracelular. Microscopio: Axio Observer.Z1, Objetivo: EC Plan-Neofluar 20x/0.50 Ph 2 M27. Filtro: Alexa Fluor 489. Cámara: AxioCamMR3. **(b)** Gráfica que muestra la reversibilidad que tiene el sensor HyPer en célula *E. coli* adicionando diferentes concentraciones de H₂O₂ en un medio con 50 μM de catalasa. (Belousov *et al.* 2006).

Las células tratadas EUK-134 como las no tratadas, se sometieron a un ensayo adicionando paraquat y H₂O₂ al medio. El paraquat es una molécula desacopladora de la cadena respiratoria (Hernandez-Garcia *et al.* 2008). El paraquat puede ser reducido por un donador de electrones como el NADPH para producir superóxido que puede ser convertido a través superperóxido dismutasa en H₂O₂ (Nicotera *et al.* 1994). Al realizar la comparación de los cambios en la fluorescencia en los dos casos, se encontró que el EUK-134 no eliminó por completo el H₂O₂ de las células porque se siguieron detectando cambios en la fluorescencia de las células que fueron tratadas con EUK-134 (Figura 7.11a). El efecto que sí logró el EUK-134 fue modificar la cinética de respuesta, porque en las células que no se trataron con EUK-134 su fluorescencia se mantiene más constante y no disminuye tan rápidamente, en cambio las que tienen EUK-134, ocurrieron disminuciones rápidas en la en la fluorescencia. Al agregar el paraquat en las células con EUK-134 después de darse el aumento en la fluorescencia, se observó una disminución rápida que no sucedió con las células sin EUK-134. Es importante señalar esta propiedad de reversibilidad de la señal de HyPer, que puede mostrarnos aumentos y disminuciones de H₂O₂, que no es posible de

visualizar con otros indicadores que miden ROS como los compuestos de diclorofluoresceína (DCF). En la Figura 7.11b se muestra una gráfica obtenida por los autores de HyPer, para mostrar la reversibilidad que tiene el sensor en células *E.coli* que expresaban HyPer adicionándoles diferentes concentraciones de H_2O_2 en un medio con $50 \mu M$ de catalasa. Observaron que en estas condiciones el H_2O_2 primero reacciona con HyPer y después es degradado por la catalasa. En la prueba con el EUK-134 determinamos que en nuestro sistema, el EUK-134 no elimina por completo el H_2O_2 pero si está ayudando a disminuir la concentración de H_2O_2 intracelular de una forma más rápida.

7.12. Caracterización funcional de HyPer en células AD293.

La caracterización funcional de HyPer también se llevó a cabo en la línea celular AD293. En este caso también se utilizaron diferentes concentraciones finales de H_2O_2 para conocer la cantidad mínima que provocara aumentos en la fluorescencia.

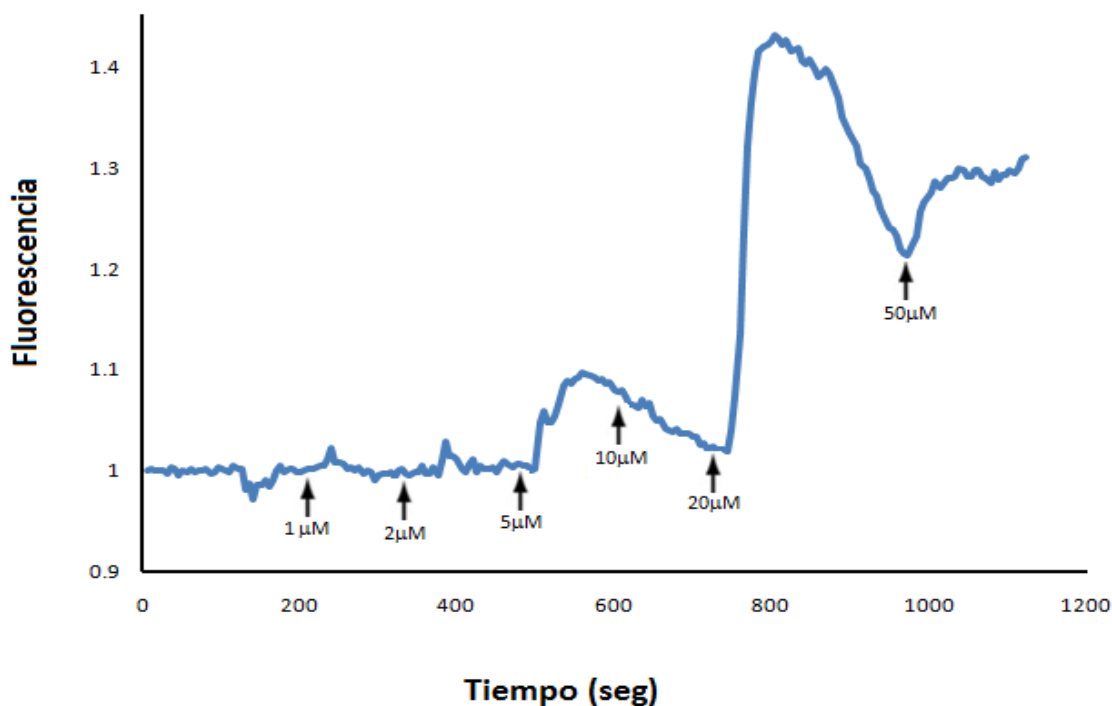


Figura 7.12. Fluorescencia de células AD293 con Hyper. La gráfica representa el promedio de la fluorescencia de células AD293 que expresaban HyPer (n=6 células). Microscopio: Axio Observer.Z1, Objetivo: C-Apochromat 40x/1.20 W Korr. Filtro: 10 Alexa Fluor 489. Cámara: AxioCamMR3. Tiempo de exposición: 100 ms. Imágenes capturadas cada 5 minutos.

Al analizar la fluorescencia de las células, se detectó que con 5 μ M de H₂O₂ se produce un aumento en la fluorescencia (Figura 7.12). Por lo tanto podría esperarse que a concentraciones mayores de 5 μ M el cambio en la fluorescencia fuera más grande, pero no fue así, al agregarse al medio 10 μ M de H₂O₂, no se detectó ningún aumento en la fluorescencia, por el contrario la fluorescencia disminuye. Se vuelve a observar incremento en la fluorescencia al adicionar 20 μ M y 50 μ M. Se puede descartar que este comportamiento sea por saturación, porque a concentraciones más altas el sensor ya no hubiera respondido lo cual no sucedió cuando se agregó 20 μ M y 50 μ M de H₂O₂. Una posible explicación puede ser por el método que empleamos el cual no es muy eficiente para adicionar el H₂O₂. La adición de H₂O₂ se hizo usando pipetas y las gotas solo caían en una parte de la superficie de la caja, quizás el H₂O₂ no se logró distribuir homogéneamente por toda la caja, en consecuencia no llega en la misma cantidad a todas las células. En general el ensayo mostró que el sensor HyPer en células AD293 cambia su fluorescencia ante la presencia de H₂O₂.

7.13. Funcionamiento de HyPer en células tratadas con Tamoxifen.

El tamoxifen es una droga que bloquea los receptores de estrógeno. Se ha utilizado en el tratamiento del cáncer y se ha probado que puede inducir apoptosis a través de inducir la liberación del citocromo C de la mitocondria(Nazarewicz *et al.* 2007). Los experimentos realizados con el tamoxifen, se hicieron para caracterizar el funcionamiento de HyPer en un periodo largo (aproximadamente 14 horas) en células tratadas con tamoxifen (30 μ M), para determinar si era posible detectar por medio de HyPer cambios en la concentración de H₂O₂ intracelular. Para tener un control se hizo la transfección de las células con Hyper y la proteína roja mCherry. Cherry se utilizó para monitorear cambios en la fluorescencia debidos a modificaciones en la morfología de las células. Como se observa en la gráfica de la Figura 7.13a, desde los primeros minutos del experimento la fluorescencia de Cherry va aumentando gradualmente pero la fluorescencia de HyPer no presentó este aumento. Después de aproximadamente 1 hora la mitad de las células comenzaron a morir, cambiaron su forma al hacerse más redondas y pequeñas (Figura 7.13b). Casi a los 50 minutos se observó una espiga en la fluorescencia de HyPer, la cual no se detecta en Cherry donde la fluorescencia siguió aumentando constantemente (Figura 7.13a). Este aumento de HyPer puede atribuirse a que se incrementó el nivel de H₂O₂ poco antes de que murieran las células. El cambio en la fluorescencia de HyPer si puede ser atribuido a incrementos en la concentración de H₂O₂ intracelular, porque esa espiga que representa un incremento grande en

fluorescencia no se detectó en Cherry. Este ensayo permitió establecer que durante la apoptosis de las células, nuestro sistema no es capaz de detectar si ocurren cambios rápidos (segundos) y transitorios en las concentraciones de H₂O₂ intracelular ya que cada imagen se capturó cada 5 minutos. Pero lo que sí se pudo detectar, fue que durante algunos minutos ocurrió un aumento significativo en la fluorescencia de las células, que puede ser atribuido a que antes de morir, las células se incrementó el H₂O₂ intracelular.

7.14. Expresión de los vectores HyPer en células troncales de ratón.

Una vez que se corroboró que el sensor HyPer contenido en nuestros vectores se expresaba y tenía la capacidad de cambiar su fluorescencia ante modificaciones del H₂O₂ intracelular en líneas celulares, se decidió probar si estos vectores hacen lo mismo en células troncales embrionarias de ratón (ES). Esto se hizo porque la aplicación a futuro más importante de estos vectores es en las células troncales de ratón.

Las células utilizadas fueron las células ES de ratón de la línea R1. En las cajas con las células ES transfectadas transitoriamente con lipofectamina, solo se logró encontrar una colonia que expresaba HyPer (Figura 7.14b). Las ES forman colonias y la transfección no se hizo con células en suspensión disgregadas y separadas, por lo tanto esto pudo favorecer que solo las células de la periferia de la colonia incorporaran el vector y las del centro no. Para corroborar que la fluorescencia encontrada no era autofluorescencia se excitó a las células con yoduro de propidio que no entra dentro de la longitud de excitación de HyPer, y se encontró que no había fluorescencia en las células que si eran fluorescentes con el filtro para HyPer (Figura 7.14c). Por lo tanto se pudo concluir que la proteína del sensor se está expresando y produciendo en estas células, aunque cabe mencionar que se debe de mejorar el método de transfección utilizado, ya que la eficiencia fue muy baja.

También se hizo transfección en células ES de la línea R1 para expresar Case12 pero en no se logró localizar ninguna colonia que expresara Case12. Las transfecciones para los dos casos solo se hicieron solo una vez.

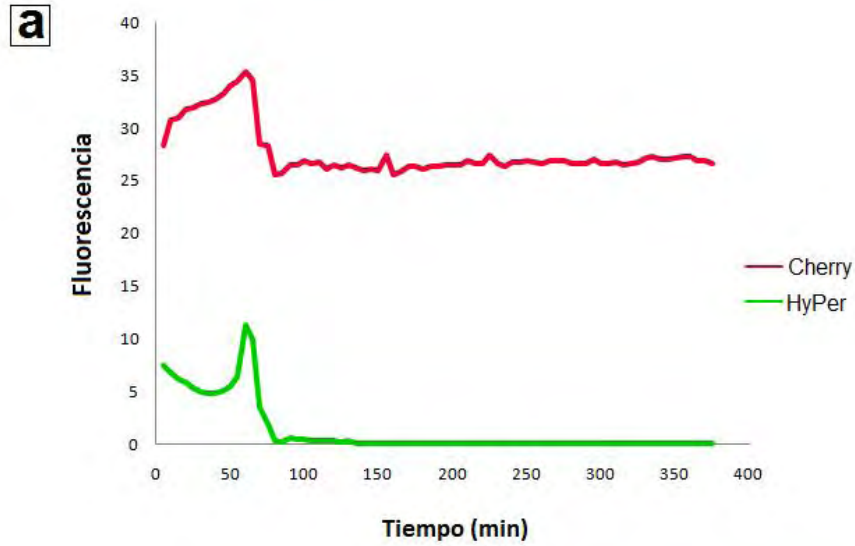


Figura 7.13. Fluorescencia de HyPer en células tratadas con Tamoxifen. (a) Gráfica del promedio de la fluorescencia de Cherry y HyPer. La medición de la fluorescencia se hizo en células que expresaran tanto HyPer como Cherry (n=3 células). **(b)** Células AD293 transfectadas con HyPer y Cherry, se agregó al medio una concentración final de $30\mu\text{M}$ de Tamoxifen. Microscopio: Axio Observer.Z1. Objetivo: Plan-Apochromat 63x/1.40 Aceite. Reflector: Analy. DIC Trans.light. Condensador: DIC 2. Cámara: AxioCamMR3. Tiempo de exposición: 14 ms. Imágenes capturadas cada 5 minutos.

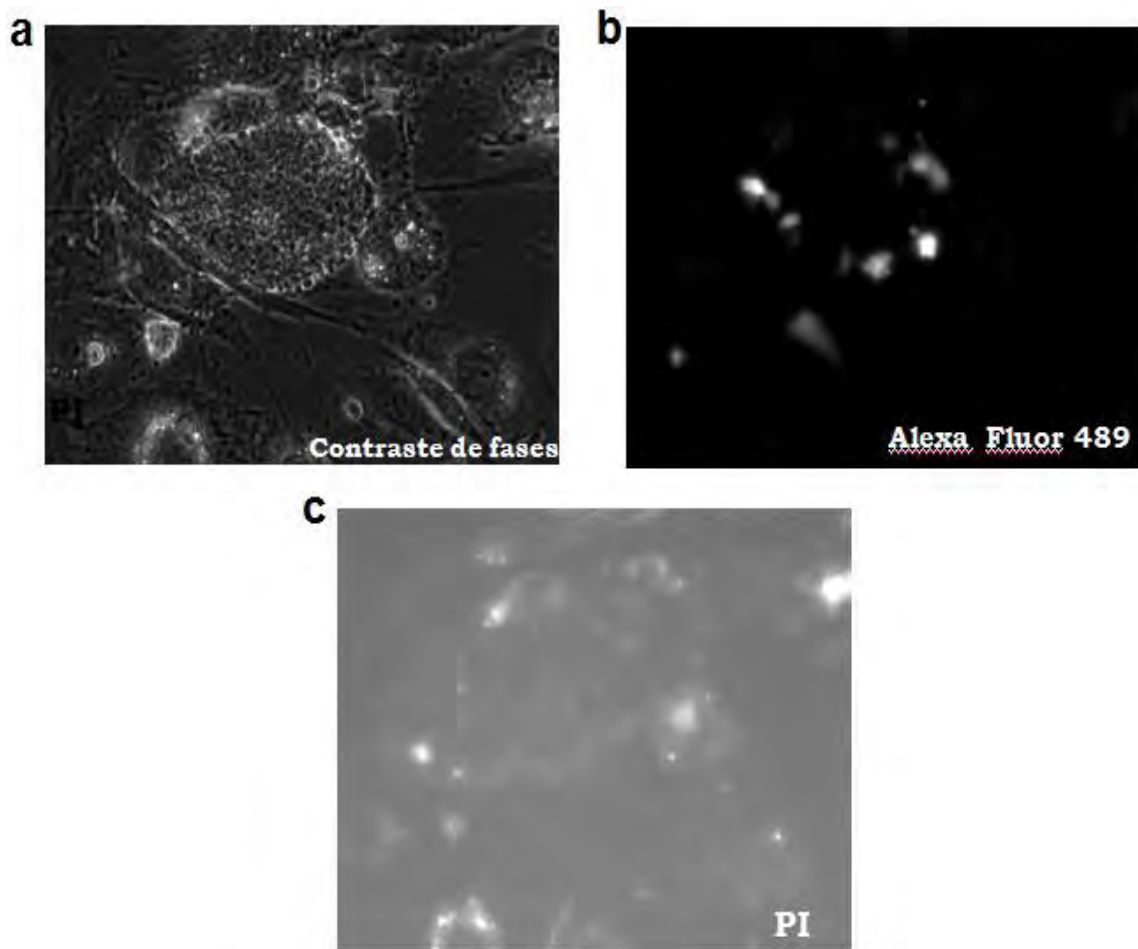


Figura 7.14. Células ES de ratón transfectadas con HyPer. Las transfecciones se llevaron a cabo en células embrionarias troncales de ratón de la línea R1. **(a)** Colonia de ES que expresó el sensor observada en contraste de fases. **(b)** La misma colonia de R1 que expresan el sensor HyPer vista con fluorescencia. **(c)** Se observó a la misma colonia con ioduro de propidio (PI) para corroborar que no era autofluorescencia de las células. Microscopio: Axio Observer.Z1. Objetivo: C-Apochromat 40x/1.20 W Korr. Cámara: AxioCamMR3.

8. DISCUSIONES

Es importante desarrollar métodos confiables y eficientes que permitan hacer ensayos precisos sobre las dinámicas que presentan ciertos parámetros intracelulares. Los sensores fluorescentes contenidos en los vectores construidos en este trabajo, representan una nueva herramienta para hacer estudios sobre el Ca^{2+} y H_2O_2 en líneas celulares y posiblemente en células ES de ratón. Los vectores se construyeron con las características necesarias utilizarse en células ES y con ellos generar una línea estable de célula ES de ratón que expresen los sensores. Las células ES al ser pluripotentes deben mantener muy bien regulada la expresión de sus genes, se ha visto que en células ES pluripotentes muchos genes se expresan en niveles muy bajos (Niwa 2007). Existen diversos mecanismos por los cuales las ES mantienen su estado pluripotente, ya sea genéticos o epigenéticos (Niwa 2007). Se ha reportado que es muy común que en células ES ocurra el silenciamiento de transgenes a través de elementos como los factores transcripcionales o proteínas represoras (Pfeifer *et al.* 2002). En muchos ensayos al incorporar genes al azar en el genoma de las ES de ratón, ha resultado en la pérdida de la expresión o el silenciamiento del gen introducido (Hadjantonakis y Nagy 2001). Por todos esos antecedentes se decidió incorporar las secuencias de los *insulators* en los plásmidos construidos con el fin de proteger de otros factores a los genes que codifican para los sensores.

Otro de los elementos requeridos en la construcción de los vectores fue el *enhancer*-promotor CMV/CBA. El promotor CMV es uno de los promotores más populares y utilizado para expresar genes en líneas celulares. En células ES de ratón el promotor CMV ha fallado en dirigir la expresión de genes (Chung *et al.* 2002). Pero cuando se ha utilizado en conjunto el *enhancer*-promotor CMV/CBA en células ES, se ha visto una buena expresión de los genes puestos bajo ese promotor. No se sabe con certeza porque el CMV no funciona en esas células. Una posible explicación que se ha dado, es porque las ES solo expresan un limitado número de genes para mantener su pluripotencia, y no expresan los factores necesarios para promover la actividad del CMV, pero si tienen los factores necesarios para la actividad del CBA (Chung *et al.* 2002). En las células HEK293T y en las AD293 el CMV/CBA funcionó bien. En las transfecciones de las ES con HyPer (Figura 7.14) detectamos en una colonia que si habían células fluorescentes que expresaban el sensor, por lo tanto en células ES de la línea R1, el CMV/CBA mantiene su actividad y está funcionando correctamente para que ocurra la expresión del sensor.

Los vectores construidos con el sensor Case12 mostraron tener diferente nivel de fluorescencia en las células HEK293T dependiendo del vector utilizado (pCCC12p, pCCC12c y pCMVCBA Case 12). Quizás en este caso los *insulators* pudieron afectar la expresión de la proteína del sensor aunque eso no lo podemos saber con certeza, porque en las células trasfectadas con pCMVCBA Case12 que no tienen *insulators* se encontró el mayor número de células fluorescentes. La función del *enhancer*-promotor CMV/CBA y principalmente el efecto de los *insulators* en la expresión de los sensores podrá corroborarse por completo solo hasta que se logre la generación de las líneas estables de células ES de ratón.

Respecto a la caracterización del funcionamiento de los sensores, se tuvieron más complicaciones en las pruebas con el H_2O_2 , en muchos experimentos no vimos ninguna respuesta por parte del sensor cuando se agregaba H_2O_2 al medio. El H_2O_2 puede interactuar y reaccionar fácilmente con otras moléculas. Por ejemplo, el medio donde se encontraban las células contiene ciertos metales como el magnesio (Mg^{2+}) que puede reaccionar fácilmente con el H_2O_2 . Además en las células existen diferentes enzimas que se encargan de degradar el H_2O_2 . En nuestro sistema no fue posible determinar con precisión la cantidad real que llegó a unirse al sensor para provocar un cambio en la fluorescencia ya que mucho del H_2O_2 agregado al medio reacciona con otros elementos o moléculas antes de llegar a unirse a la proteína OxyR de HyPer, y quizás por eso hubo muchas variaciones en las mediciones. Lo que si se logró definir utilizando nuestro sistema con el sensor HyPer, fue determinar un rango mínimo aproximado en el cual se producen cambios en la fluorescencia de las células, el cual va de entre 5 a 20 μM de H_2O_2 . Otra dificultad que se presentó en los experimentos fue en el mecanismo de adición de H_2O_2 , el cual se hizo a través de pipetas. El mecanismo que se propone para mejorar el sistema de adición de H_2O_2 para posteriores experimentos es a través del uso de cámaras de perfusión. En estas cámaras se puede ir agregando y quitando el medio, por lo tanto lo que se agrega llega homogéneo a las células de toda la caja. No se hizo la adquisición de este tipo de equipo porque el objetivo del proyecto no era caracterizar con detalles estos sensores, ya que eso ya está publicado, más bien era hacer pruebas rápidas y sencillas que nos permitieran saber que el sensor responde ante ciertos cambios en la concentración de H_2O_2 intracelular.

Es importante considerar que muchos de los cambios en la fluorescencia que ocurren durante las pruebas no se debe a modificaciones en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} o de H_2O_2 , por eso se debe tener en cuenta qué otros factores pueden estar produciendo cambios en la fluorescencia y discernir entre los que realmente suceden porque el sensor está midiendo un parámetro intracelular. Los cambios en la fluorescencia pueden ocurrir cuando se hacen las adiciones, porque las células se mueven o porque se crea cierta turbulencia en el medio. En los primeros experimentos se usó un medio para las células con indicador de pH (fenol rojo) que provocaba que el medio fuera autofluorescente y causaba problemas en las mediciones de la fluorescencia, por lo tanto se utilizó un medio sin colorantes. Otro de los inconvenientes que se podría presentar en el uso de este tipo de sensores que utilizan una proteína fluorescente, es que debido a que son proteínas permutadas circularmente como es el caso de Case12 y HyPer, suelen ser susceptibles a cambios en el pH. En la mayoría de los reportes donde se han utilizado los sensores Case12 y HyPer en células vivas, no se ha reportado que los cambios en la fluorescencia ocurran por modificaciones en el pH. Pero si es importante tener en cuenta que para futuros experimentos se deben utilizar indicadores o controles para poder excluir el pH como un factor que esté modificando la fluorescencia de los sensores.

En las pruebas con el ATP, la captura de las imágenes se hizo con una función de la cámara llamada “binning”. La función *binning* se usa para que la cámara trate a un conjunto de pixeles determinados como si fuera un solo pixel. Por ejemplo en un *binning* de 4X4, en cada cuadro de 4X4 se suman los pixeles para obtener el valor como si se tratara de un solo pixel. Esta función hace más sensible a la cámara. Por lo tanto al usar “binning” se lograron detectar cambios más notables y sin ruido en la fluorescencia de las células, a diferencia de los primeros ensayos donde no se usó.

En lo que se refiere a las transfecciones en las células ES, es necesario mejorar y perfeccionar este método. Se ha reportado que la transfección con lipofectamina tradicional no ha sido muy eficiente en este tipo de células, pero se han logrado muy buenos resultados al utilizar lipofectamina junto con una señal de localización nuclear (M9), la cual es una secuencia peptídica que se incorpora en los plásmidos en sitios del DNA para péptidos catiónicos, y que ayuda a dirigir los plásmidos al núcleo. Se pretende hacer la adquisición de este péptido, porque ha mostrado ser

muy útil para hacer transfecciones eficientes en células ES y también gracias a su uso se han generado líneas estables de ES que expresan transgenes (Ma *et al.* 2004).

9. CONCLUSIONES

- ☆ Se construyeron vectores que contienen la secuencia que codifica para el sensor fluorescente de calcio Case12 y el sensor de peróxido de hidrógeno HyPer. Además en estos plásmidos se pudo introducir las secuencias de los *insulators* y el *enhancer* promotor CMV/CBA.
- ☆ Se logró transfectar y expresar los plásmidos construidos en las líneas celulares HEK293T y AD293.
- ☆ Se pudieron hacer experimentos de varias horas en la incubadora del microscopio en células vivas que expresaban los sensores.
- ☆ El sensor Case12 y HyPer mostraron ser capaces de cambiar su fluorescencia ante modificaciones inducidas en las concentraciones de Ca^{2+} y H_2O_2 intracelular.
- ☆ Se logró la expresión del sensor HyPer en células ES de ratón de la línea R1.

10. PERSPECTIVAS

Los vectores que se obtuvieron en este trabajo representan una herramienta útil para llevar a cabo estudios sobre las dinámicas del Ca^{2+} y H_2O_2 intracelular en células vivas en tiempo real. La aplicación y el uso de estos vectores en las células ES podría traer muchas ventajas y generar nuevos conocimientos sobre estas células, el siguiente paso sería crear una línea estable de células ES que expresen los sensores. Estas células serían fluorescentes todo el tiempo, lo que podría ser muy útil en estudios con explantes, en tejidos o incluso en organismos vivos. Además de funcionar como marcadores de localización lo que más nos interesa hacer, es lograr que los sensores contenidos en los vectores puedan servir para estudiar y conocer si ocurren cambios importantes en la concentración de Ca^{2+} o de H_2O_2 intracelular durante los procesos de diferenciación de las células ES de ratón para generar células neuronales dopaminérgicas.

11. REFERENCIAS

1. Alberts, B., A. Jonson, J. L. Lewis, M. Raff, R. Keith and P. Walter (2008) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York
2. Baird, G. S., D. A. Zacharias and R. Y. Tsien (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 11241-6.
3. Baizabal, J. M. and L. Covarrubias (2008) The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev Biol.* **325**, 49-59.
4. Belousov, V. V., A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, D. B. Staroverov, K. S. Shakhbazov, A. V. Terskikh and S. Lukyanov (2006) Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods.* **3**, 281-6.
5. Berridge, M. J., M. D. Bootman and P. Lipp (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature.* **395**, 645-8.
6. Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**, 517-29.
7. Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **1**, 11-21.
8. Cai, H. (2005) Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res.* **68**, 26-36.
9. Carter, M. G., A. A. Sharov, V. VanBuren, D. B. Dudekula, C. E. Carmack, C. Nelson and M. S. Ko (2005) Transcript copy number estimation using a mouse whole-genome oligonucleotide microarray. *Genome Biol.* **6**, R61.
10. Clapham, D. E. (2007) Calcium signaling. *Cell.* **131**, 1047-58.
11. Covarrubias, L., D. Hernandez-Garcia, D. Schnabel, E. Salas-Vidal and S. Castro-Obregon (2008) Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev Biol.* **320**, 1-11.
12. Chin, D. and A. R. Means (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* **10**, 322-8.
13. Choi, H., S. Kim, P. Mukhopadhyay, S. Cho, J. Woo, G. Storz and S. Ryu (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell.* **105**, 103-13.
14. Chudakov, D. M., S. Lukyanov and K. A. Lukyanov (2005) Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends Biotechnol.* **23**, 605-13.
15. Chung, S., T. Andersson, K. C. Sonntag, L. Bjorklund, O. Isacson and K. S. Kim (2002) Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* **20**, 139-45.
16. D'Autreaux, B. and M. B. Toledano (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 813-24.
17. DasGupta, U., K. Weston-Hafer and D. E. Berg (1987) Local DNA sequence control of deletion formation in Escherichia coli plasmid pBR322. *Genetics.* **115**, 41-9.
18. Deli, T., H. Szappanos, G. P. Szigeti, J. Cseri, L. Kovacs and L. Csernoch (2007) Contribution from P2X and P2Y purinoreceptors to ATP-evoked changes in intracellular calcium concentration on cultured myotubes. *Pflugers Arch.* **453**, 519-29.
19. Diaz, O. (2003) El ion calcio: su regulación y función en las células β pancreática. *Rev Cubana Endocrinol.* **14**.

20. Doadrio, A. L. (2009) Las Redes de señales intracelulares del calcio. *Monografías de la Real Academia de Farmacia*. Monografía **XXIV**, 69-96.
21. Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* **82**, 47-95.
22. Fernández, C., B. Domingo, F. Picazo, J. M. Pérez, P. Tranque and J. Lopis (2005) Análisis de la dinámica celular con proteínas fluorescentes. *Biojurnal.net.* **1**, 1-15.
23. Fill, M. and J. A. Copello (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev.* **82**, 893-922.
24. Griesbeck, O. (2004) Fluorescent proteins as sensors for cellular functions. *Curr Opin Neurobiol.* **14**, 636-41.
25. Griesbeck, O., G. S. Baird, R. E. Campbell, D. A. Zacharias and R. Y. Tsien (2001) Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem.* **276**, 29188-94.
26. Hadjantonakis, A. K. and A. Nagy (2001) The color of mice: in the light of GFP-variant reporters. *Histochem Cell Biol.* **115**, 49-58.
27. Heim, N. and O. Griesbeck (2004) Genetically encoded indicators of cellular calcium dynamics based on troponin C and green fluorescent protein. *J Biol Chem.* **279**, 14280-6.
28. Hernandez-Garcia, D., S. Castro-Obregon, S. Gomez-Lopez, C. Valencia and L. Covarrubias (2008) Cell death activation during cavitation of embryoid bodies is mediated by hydrogen peroxide. *Exp Cell Res.* **314**, 2090-9.
29. Hoeflich, K. P. and M. Ikura (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell.* **108**, 739-42.
30. Jares-Erijman, E. A. and T. M. Jovin (2003) FRET imaging. *Nat Biotechnol.* **21**, 1387-95.
31. Johnson, C. K. (2006) Calmodulin, conformational states, and calcium signaling. A single-molecule perspective. *Biochemistry.* **45**, 14233-46.
32. Kaddour-Djebbar, I., V. Lakshmikanthan, R. B. Shirley, Y. Ma, R. W. Lewis and M. V. Kumar (2006) Therapeutic advantage of combining calcium channel blockers and TRAIL in prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* **5**, 1958-66.
33. Kapur, N., G. A. Mignery and K. Banach (2007) Cell cycle-dependent calcium oscillations in mouse embryonic stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* **292**, C1510-8.
34. Knopfel, T., J. Diez-Garcia and W. Akemann (2006) Optical probing of neuronal circuit dynamics: genetically encoded versus classical fluorescent sensors. *Trends Neurosci.* **29**, 160-6.
35. Lalonde, S., D. W. Ehrhardt and W. B. Frommer (2005) Shining light on signaling and metabolic networks by genetically encoded biosensors. *Curr Opin Plant Biol.* **8**, 574-81.
36. Lee, C., S. M. Lee, P. Mukhopadhyay, S. J. Kim, S. C. Lee, W. S. Ahn, M. H. Yu, G. Storz and S. E. Ryu (2004) Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol.* **11**, 1179-85.
37. Lichtman, J. W. and J. A. Conchello (2005) Fluorescence microscopy. *Nat Methods.* **2**, 910-9.
38. Lory, P., I. Bidaud and J. Chemin (2006) T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium.* **40**, 135-46.
39. Lytton, J., M. Westlin and M. R. Hanley (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem.* **266**, 17067-71.

40. Ma, H., Q. Liu, S. L. Diamond and E. A. Pierce (2004) Mouse embryonic stem cells efficiently lipofected with nuclear localization peptide result in a high yield of chimeric mice and retain germline transmission potency. *Methods*. **33**, 113-20.
41. Mahieu, F., G. Owsianik, L. Verbert, A. Janssens, H. De Smedt, B. Nilius and T. Voets (2007) TRPM8-independent menthol-induced Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum and Golgi. *J Biol Chem*. **282**, 3325-36.
42. Mank, M., A. F. Santos, S. Dierenberger, T. D. Mrcsic-Flogel, S. B. Hofer, V. Stein, T. Hendel, D. F. Reiff, C. Levelt, A. Borst, T. Bonhoeffer, M. Hubener and O. Griesbeck (2008) A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. *Nat Methods*. **5**, 805-11.
43. Masgrau, R., C. Hurel, F. Papastefanaki, N. Georgopoulou, D. Thomaidou and R. Matsas (2009) BM88/Cend1 regulates stimuli-induced intracellular calcium mobilization. *Neuropharmacology*. **56**, 598-609.
44. Matz, M. V., K. A. Lukyanov and S. A. Lukyanov (2002) Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *Bioessays*. **24**, 953-9.
45. McCombs, J. E. and A. E. Palmer (2008) Measuring calcium dynamics in living cells with genetically encodable calcium indicators. *Methods*. **46**, 152-9.
46. Melov, S., J. Ravenscroft, S. Malik, M. S. Gill, D. W. Walker, P. E. Clayton, D. C. Wallace, B. Malfroy, S. R. Doctrow and G. J. Lithgow (2000) Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science*. **289**, 1567-9.
47. Meyer, J. S., G. Tullis, C. Pierret, K. M. Spears, J. A. Morrison and M. D. Kirk (2009) Detection of calcium transients in embryonic stem cells and their differentiated progeny. *Cell Mol Neurobiol*. **29**, 1191-203.
48. Miyawaki, A., J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura and R. Y. Tsien (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. **388**, 882-7.
49. Morales Tlalpan, V., C. Saldaña and M. Díaz Muñoz (2007) Sorpresas Nucleares: Nuevas Prespectivas de las Dinámicas del Ca²⁺ intracelular. *Revista de Educación Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México*. **26**, 129-124.
50. Nagai, T., A. Sawano, E. S. Park and A. Miyawaki (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 3197-202.
51. Nakai, J., M. Ohkura and K. Imoto (2001) A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. **19**, 137-41.
52. Nazarewicz, R. R., W. J. Zenebe, A. Parihar, S. K. Larson, E. Alidema, J. Choi and P. Ghafourifar (2007) Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res*. **67**, 1282-90.
53. Nicotera, T. M., C. Privalle, T. C. Wang, M. Oshimura and J. C. Barrett (1994) Differential proliferative responses of Syrian hamster embryo fibroblasts to paraquat-generated superoxide radicals depending on tumor suppressor gene function. *Cancer Res*. **54**, 3884-8.
54. Niethammer, P., C. Grabher, A. T. Look and T. J. Mitchison (2009) A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. **459**, 996-9.
55. Niwa, H. (2007) How is pluripotency determined and maintained? *Development*. **134**, 635-46.
56. Nowycky, M. C. and A. P. Thomas (2002) Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci*. **115**, 3715-6.

57. O'Neil, R. G. and R. C. Brown (2003) The vanilloid receptor family of calcium-permeable channels: molecular integrators of microenvironmental stimuli. *News Physiol Sci.* **18**, 226-31.
58. Palmer, A. E. (2009) Expanding the repertoire of fluorescent calcium sensors. *ACS Chem Biol.* **4**, 157-9.
59. Palmer, A. E., M. Giacomello, T. Kortemme, S. A. Hires, V. Lev-Ram, D. Baker and R. Y. Tsien (2006) Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol.* **13**, 521-30.
60. Palmer, A. E. and R. Y. Tsien (2006) Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat Protoc.* **1**, 1057-65.
61. Pfeifer, A., M. Ikawa, Y. Dayn and I. M. Verma (2002) Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 2140-5.
62. Ridgway, E. B. and C. C. Ashley (1967) Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun.* **29**, 229-34.
63. Rochefort, N. L., H. Jia and A. Konnerth (2008) Calcium imaging in the living brain: prospects for molecular medicine. *Trends Mol Med.* **14**, 389-99.
64. Rochefort, N. L. and A. Konnerth (2008) Genetically encoded Ca²⁺ sensors come of age. *Nat Methods.* **5**, 761-2.
65. Rong, Y., S. R. Doctrow, G. Tocco and M. Baudry (1999) EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, prevents oxidative stress and attenuates kainate-induced neuropathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 9897-902.
66. Rudolf, R., M. Mongillo, R. Rizzuto and T. Pozzan (2003) Looking forward to seeing calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**, 579-86.
67. Seamon, K. B., W. Padgett and J. W. Daly (1981) Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**, 3363-7.
68. Shaner, N. C., G. H. Patterson and M. W. Davidson (2007) Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci.* **120**, 4247-60.
69. Shimomura, O., F. H. Johnson and Y. Saiga (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol.* **59**, 223-39.
70. Souslova, E. A., V. V. Belousov, J. G. Lock, S. Stromblad, S. Kasparov, A. P. Bolshakov, V. G. Pinelis, Y. A. Labas, S. Lukyanov, L. M. Mayr and D. M. Chudakov (2007) Single fluorescent protein-based Ca²⁺ sensors with increased dynamic range. *BMC Biotechnol.* **7**, 37.
71. Takahashi, A., P. Camacho, J. D. Lechleiter and B. Herman (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev.* **79**, 1089-125.
72. Truong, K., A. Sawano, H. Mizuno, H. Hama, K. I. Tong, T. K. Mal, A. Miyawaki and M. Ikura (2001) FRET-based in vivo Ca²⁺ imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nat Struct Biol.* **8**, 1069-73.
73. Tsien, R. Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* **67**, 509-44.
74. Ushio-Fukai, M. (2006) Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE.* **2006**, re8.
75. VanEngelenburg, S. B. and A. E. Palmer (2008) Fluorescent biosensors of protein function. *Curr Opin Chem Biol.* **12**, 60-5.
76. Veal, E. A., A. M. Day and B. A. Morgan (2007) Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell.* **26**, 1-14.
77. Verkhusha, V. V. and K. A. Lukyanov (2004) The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol.* **22**, 289-96.

78. Wallace, D. J., S. Meyer zum Alten Borgloh, S. Astori, Y. Yang, M. Bausen, S. Kugler, A. E. Palmer, R. Y. Tsien, R. Sprengel, J. N. Kerr, W. Denk and M. T. Hasan (2008) Single-spike detection in vitro and in vivo with a genetic Ca²⁺ sensor. *Nat Methods*. **5**, 797-804.
79. West, A. G., M. Gaszner and G. Felsenfeld (2002) Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* **16**, 271-88.
80. Yamazawa, T., H. Takeshima, M. Shimuta and M. Iino (1997) A region of the ryanodine receptor critical for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Biol Chem.* **272**, 8161-4.
81. Yang, F., L. G. Moss and G. N. Phillips, Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* **14**, 1246-51.
82. Zhang, J., R. E. Campbell, A. Y. Ting and R. Y. Tsien (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 906-18.