



**Universidad**  
Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

# **Caracterización de la interacción entre proteínas CKAMP y receptores de glutamato tipo AMPA**

Characterization of the interaction  
between CKAMP proteins and AMPA  
glutamate receptors

Autora:

Laura Gálvez Larrosa

Directora:

Beatriz Herguedas Francés

Instituto Universitario de Investigación, Biocomputación y Física de Sistemas  
Complejos

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Grado de Biotecnología

Curso 2020/21

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>1. ABSTRACT</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
2.1. FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES AMPA .....	1
2.2. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES AMPA .....	2
2.3. APERTURA Y CIERRE DEL CANAL .....	3
2.4. DIVERSIDAD DE LOS RECEPTORES AMPA .....	3
2.4.1. Subunidades auxiliares .....	4
<b>3. OBJETIVO</b> .....	7
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	7
4.1 ANALISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS PROTEINAS CKAMP .....	7
4.1.1. Obtención de secuencias y análisis bioinformático de las secuencias .....	7
4.2. OBTENCIÓN DE CONSTRUCTOS PARA LA EXPRESIÓN DE LAS CKAMP EN CELULAS DE MAMIFERO .....	7
4.2.1. Genes sintéticos .....	8
4.2.2. Diseño de oligos .....	8
4.2.3. Clonajes .....	9
4.2.4. Selección de colonias y crecimiento de cultivo para producción de DNA plasmídico .....	10
4.2.5. Aislamiento de DNA plasmídico y esterilización de DNA .....	10
4.2.6. Confirmación de correcto clonaje y secuenciación .....	10
4.2.7. Electroforesis horizontal en gel de agarosa .....	10
4.3. PRUEBAS DE EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN DE LAS CKAMP Y PURIFICACIÓN DE COMPLEJOS AMPAR-CKAMP .....	11
4.3.1. Líneas celulares y medios de cultivo .....	11
4.3.2. Transfección .....	11
4.3.3. Recolección de las células .....	12
4.3.4. Lisis de las células para prueba de expresión .....	12
4.3.5. Lisis de células y purificación del complejo a pequeña escala .....	12
4.3.6. Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida y Western Blot .....	13
<b>5. RESULTADOS</b> .....	13
5.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS .....	13
5.1.1. CKAMP39 .....	14
5.1.2. CKAMP44 .....	14
5.1.3. CKAMP52 .....	15
5.1.4. CKAMP59 .....	15

5.2. CLONAJE DE CKAMP .....	16
5.2.1. Clonaje de CKAMP39, CKAMP44 y CKAMP59 .....	16
5.2.2. Clonaje de CKAMP52 .....	17
5.3. PRUEBA DE EXPRESIÓN.....	17
5.4. PURIFICACION DE CKAMP Y DE COMPLEJOS AMPAR-CKAMP.....	19
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>23</b>
<b>7. CONCLUSIONS.....</b>	<b>23</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>24</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>26</b>
9.1. ANEXO I: ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE LA FAMILIA CKAMP .....	26
9.1.1. Alineamiento de CKAMP39 .....	26
9.1.2. Alineamiento de CKAMP44 .....	26
9.1.3. Alineamiento de CKAMP52 .....	27
9.1.4. Alineamiento de CKAMP59 .....	27
9.2. ANEXO II: GRADO DE IDENTIDAD Y SIMILITUD DE LAS SECUENCIAS.....	29
9.3. ANEXO III: ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA ORIGINAL DE CKAMP y GENES SINTÉTICOS.....	30
9.3.1. Alineamiento de CKAMP39 .....	30
9.3.2. Alineamiento de CKAMP44 .....	31
9.3.3. Alineamiento de CKAMP52 .....	32
9.3.4. Alineamiento de CKAMP59 .....	33
9.4. ANEXO IV: SECUENCIA DE LOS OLIGOS DISEÑADOS .....	35
9.5. ANEXO V: LISTA DE MEDIOS Y TAMPONES EMPLEADOS .....	36
9.5.1. Composición del medio SOB (1L) .....	36
9.5.2. Composición del medio LB-agar (1L).....	36
9.5.3. Composición del medio LB24 (1L).....	36
9.5.4. Composición de TBE (1L).....	36
9.5.5. SDS-PAGE .....	36
9.5.5. Composición de la solución de transferencia (1L) .....	36
9.6. ANEXO VI: MAPA DE LOS VECTORES pRK5.....	37
9.6.1. Mapa de pRK5 con CKAMP39-GFP .....	37
9.6.2. Mapa de pRK5 con CKAMP44-GFP .....	37
9.6.3. Mapa de pRK5 con CKAMP52-GFP .....	38
9.6.4. Mapa de pRK5 con CKAMP59-GFP .....	38
9.5.5. Mapa de pRK5 con TARP $\gamma$ 5-GFP (vector utilizado para el clonaje) .....	39
9.7. ANEXO VII: LISTADO DE ABREVIATURAS .....	40

## 1. RESUMEN

Los receptores AMPA (AMPA) son canales iónicos que median la mayor parte de la neurotransmisión excitatoria rápida en el sistema nervioso central y participan en la plasticidad neuronal. Los AMPAR contienen un núcleo tetramérico compuesto por diferentes combinaciones de las subunidades GluA y más de 30 subunidades auxiliares diferentes que generan un amplio grupo de complejos. La composición de los complejos determina las propiedades del receptor, incluyendo la expresión en la sinapsis, el tráfico celular, la farmacología o a las propiedades cinéticas. Las CKAMP son una familia de 4 proteínas (CKAMP39, CKAMP44, CKAMP52 y CKAMP59) recientemente identificadas como subunidades auxiliares del AMPAR. Hasta el momento no se ha realizado ningún estudio estructural de la interacción AMPAR-CKAMP, cuya topología transmembrana difiere del resto de subunidades auxiliares, ni se ha explorado la composición y estequiometría de los complejos que las contienen. En este proyecto se presenta el clonaje de las CKAMP mediante el método «IVA cloning», los ensayos de expresión y purificación de CKAMP, así como los intentos de aislar los complejos AMPAR-CKAMP para su posterior estudio estructural.

## 1. ABSTRACT

AMPA receptors (AMPA) are ion channels that mediate fast excitatory neurotransmission in the central nervous system and are involved in neuronal plasticity. AMPARs are composed of a tetrameric core of GluA subunits and more than 30 auxiliary proteins that generate a wide group of AMPAR complexes. Subunit composition determines all AMPAR properties, including expression at synapses, trafficking, pharmacology and kinetic properties. CKAMPs are a family of 4 proteins (CKAMP39, CKAMP44, CKAMP52 and CKAMP59) recently identified as AMPAR auxiliary subunits. Structural analysis of AMPAR-CKAMP interactions, whose transmembrane topology differs from the rest of the auxiliary subunits, has not yet been performed, nor have the composition, stoichiometry or interaction of CKAMPs with other AMPAR auxiliary subunits been analysed. Therefore, this project presents the cloning of CKAMPs by the IVA cloning method, the expression and purification of CKAMPs, as well as the optimization of the production and purification of the AMPAR-CKAMP complex.

## 2. INTRODUCCIÓN

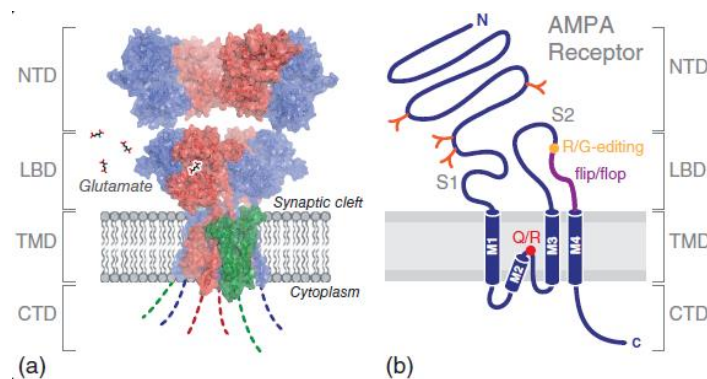
### 2.1. FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES AMPA

Los receptores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) son receptores ionotrópicos de glutamato, canales catiónicos activados por ligando, predominantemente permeables a los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , responsables de la mayor parte de la transmisión sináptica excitadora rápida en todo el sistema nervioso central. Además, están implicados en la plasticidad neuronal, el mecanismo por el cual se fortalecen o debilitan las conexiones sinápticas y en el que se cree que subyacen el aprendizaje y la memoria (1,2). Por otro lado, diversos trastornos neurológicos como la epilepsia, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Alzheimer llevan asociada una disfunción en los AMPAR, lo que los convierte en importantes dianas para el desarrollo de fármacos. Por todo ello, los receptores AMPAR son cruciales para el

correcto desarrollo y la función normal del sistema nervioso, y comprender su estructura y función resulta esencial para la comprensión de la neurotransmisión y el desarrollo de fármacos específicos (2).

## 2.2. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES AMPA

Los AMPAR son tetrámeros que se ensamblan como un dímero de dímeros, formados por una combinación de 4 subunidades GluA (GluA1-4), codificadas por genes distintos (*Gria1-4*). Los AMPAR pueden ensamblarse como heterotetrámeros, formados por una combinación de subunidades diferentes, o como homotetrámeros, formados por la misma subunidad (2–4). Las subunidades GluA contienen cuatro hélices transmembrana (M1-4), una de las cuales (M2) es un bucle reentrante desde el lado citoplasmático, dejando así el N-terminal en el lado extracelular y el C-terminal en el lado intracelular de la membrana (2). Cada subunidad adopta una estructura modular que contiene 4 dominios semiautónomos distintos dispuestos con una simetría doble aproximada. Estos cuatro dominios incluyen el dominio extracelular N-terminal (NTD, o dominio amino terminal, ATD), el dominio de unión a ligando (LBD), el dominio transmembrana (TMD), que forma el poro del canal iónico, y un dominio intracelular C-terminal (CTD). Cada uno de los dominios está interconectado mediante conectores polipeptídicos, dando lugar a un receptor modular flexible (**Figura 1a**) (2,4). En la primera región extracelular se encuentra el NTD, que comprende el 50% de la secuencia primaria y se pliega en una estructura similar a una concha. Desempeña un papel en el ensamblaje del receptor y en la oligomerización, en particular en la formación de heterómeros, y es además crucial para el anclaje de AMPAR en la sinapsis. Por su parte, el LBD está formado por dos regiones no contiguas del polipéptido (S1 y S2), que se pliegan en un dominio implicado en la unión de glutamato. El TMD está formado por 4 elementos helicoidales (M1-M4), en el que el segmento M2 forma una estrecha constricción en la base del poro del canal. El bucle M2 va seguido de la hélice transmembrana M3, región más conservada que forma la puerta del canal y está conectada por enlaces al LBD para la activación del canal. Por último, el CTD citoplasmático, cuya longitud varía entre las subunidades y las variantes de «*splicing*», es una secuencia polipeptídica aparentemente no estructurada que sigue a la hélice transmembrana M4 y contiene sitios de fosforilación, implicados en la conductancia del canal y en interacciones con otras proteínas que han sido ampliamente estudiadas en el tráfico del receptor a sitios sinápticos (**Figura 1b**) (2,3,5).



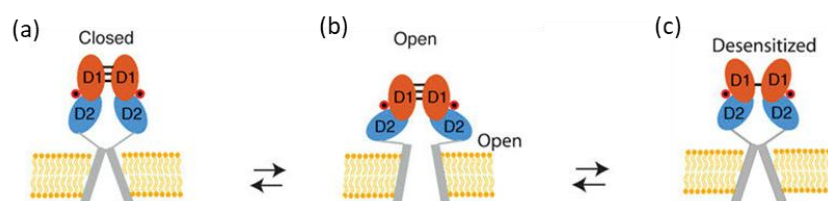
**Figura 1.** (a) Estructura del complejo heterómero AMPAR (GluA1 en azul y GluA2 en rojo)-TARP  $\gamma 8$  (verde). Se muestra la arquitectura general, las cuatro capas de dominios (NTD, LBD, TMD, CTD) y el sitio de unión a glutamato. (b) Esquema del receptor donde se muestra el N-terminal, las hélices transmembrana, los bucles S1 y S2 y el C-terminal. Imagen adaptada de Piggera et al, eLS 2020 (2).

### 2.3. APERTURA Y CIERRE DEL CANAL

Como canales iónicos activados por ligando, la activación de AMPAR por la unión de un agonista es una de las principales características de estos receptores de glutamato ionotrópicos. La unión de glutamato al LBD es el primer paso en la apertura del canal, siendo necesaria la unión de dos moléculas de glutamato para su activación.

El receptor presenta tres estados de conductancia (activado, desactivado y desensibilizado), cuyo pico de amplitud depende de las moléculas de glutamato unidas al receptor. El LBD controla la activación, desactivación y desensibilización y adopta una estructura autónoma en forma de concha con dos subdominios D1 (superior) y D2 (inferior) entre los cuales se localiza la cavidad de unión del glutamato. Cuando el receptor se encuentra en estado de reposo, la hendidura se encuentra abierta y los LBDs de las subunidades adyacentes forman dímeros unidos espalda con espalda entre sus dominios D1. La apertura del canal se inicia con la unión del glutamato en la hendidura del LBD, que induce el cierre de la concha alrededor del ligando. Este cambio conformacional provoca la separación de los subdominios D2, que tiran de los conectores que unen el LBD y las hélices transmembrana M3 (**Figura 2b**). Se produce así un desenrollado de las hélices M3, que abre el poro del canal para permitir el flujo de iones a través de la membrana. La conformación activada del canal es inestable y tiende a volver a un estado más estable (desensibilizado o desactivado). Una exposición prolongada al glutamato conduce a la desensibilización, que es un proceso con un curso temporal diferente en el que las hélices transmembrana se reposicionan en una conformación más relajada. La desensibilización se inicia con la ruptura de las interfaces D1-D2 entre las subunidades, en el que se produce la separación de los dímeros entre sí, que libera la tensión de los enlaces peptídicos conectados al poro del canal, impuesta por la unión del glutamato, lo que lleva al cierre del canal, que impide rápidamente el flujo de iones (**Figura 2c**). Por último, en la desactivación, hay un cambio conformacional del receptor en el que se produce la reapertura del LBD, lo que lleva a la liberación del glutamato y al cierre del canal (**Figura 2a**).

Las subunidades de AMPAR muestran diferencias en términos de desactivación, desensibilización y recuperación. Además, las subunidades auxiliares de AMPAR modulan la amplitud y los estados de conductancia (2,3).



**Figura 2.** Esquema de las transiciones entre los estados: (a) cerrado (desactivado), (b) abierto (activado) y (c) desensibilizado. D1 y D2 del dominio LBD se muestran en cian y naranja, respectivamente; los segmentos transmembrana que comprenden el poro iónico se muestran como un cilindro gris y el agonista se muestra como un círculo rojo. Imagen adaptada de Chauldry et al, Embo J 2009 (6).

### 2.4. DIVERSIDAD DE LOS RECEPTORES AMPA

Como se ha indicado previamente, los AMPAR son ensamblados homo o heterotetraméricos compuestos por diferentes combinaciones de las subunidades

GluA1-4. La composición de subunidades tiene grandes efectos en las propiedades del canal, principalmente en la conductancia y la permeabilidad de iones.

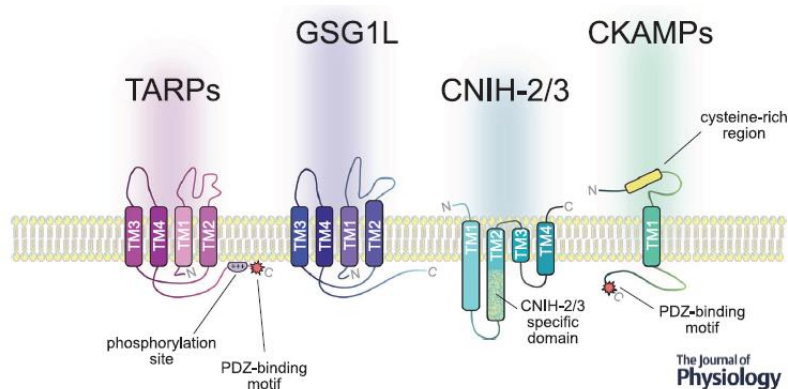
Además, mediante «*splicing*» alternativo se generan varias isoformas para cada una de las subunidades GluA, con diferencias en la región LBD (isoformas flip y flop) y en la región CTD (isoformas largas y cortas). Asimismo, se produce edición de RNA: los genes *Gria* tienen dos sitios de edición de RNA que implican un cambio de codón y alteran las propiedades del canal: el sitio R/G, en el que se cambia una arginina (R) por una glicina (G) en la posición 743 alterando las propiedades de ensamblaje de los receptores y acelerando la cinética del canal, y el sitio Q/R, único en GluA2, que implica un cambio de una glutamina (Q) por una arginina (R) en la posición 607, impidiendo así el paso de  $Ca^{2+}$  a través del canal (**Figura 1b**). Además, los receptores también están sometidos a modificaciones postraduccionales, principalmente, fosforilación, palmitoilación y glicosilación (2,3).

Por último, los AMPAR se ensamblan con una gran variedad de subunidades auxiliares que afectan al tráfico intracelular, a la expresión en las sinapsis y a la regulación de muchas de sus propiedades funcionales.

Por todo ello, existe una amplia variedad de combinaciones de subunidades que generan receptores con diferentes propiedades funcionales y distribución espacial (2,5).

#### 2.4.1. Subunidades auxiliares

Existen 4 familias principales de subunidades auxiliares que interaccionan con AMPAR a nivel transmembrana: TARP, Cornichon (CNIH), GSG1L y CKAMP (**Figura 3**). Estas subunidades auxiliares modulan las propiedades de activación de los AMPAR y afectan al tráfico y a la localización subcelular (3,7).



**Figura 3.** Ilustración esquemática de la topología de las diferentes familias de subunidades auxiliares del AMPAR. Se han resaltado dominios específicos (8).

##### **2.4.1.1. TARP**

La primera familia de subunidades auxiliares que se descubrió fue la de las TARP (del inglés, «*Transmembrane AMPA receptor regulatory proteins*»). Según las diferencias en su secuencia de aminoácidos y las propiedades funcionales, hay dos tipos de TARP: tipo-1 ( $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ , y  $\gamma 8$ ) y tipo-2 ( $\gamma 5$  y  $\gamma 7$ ). Esta familia de proteínas tiene cuatro hélices transmembrana con los extremos N y C situados en el interior de la célula. Las TARP interactúan con la región TMD del receptor hasta en cuatro sitios por tetrámero, y

contienen a su vez largos bucles extracelulares entre las hélices transmembrana que son capaces de interactuar con los LBD para modular la función del receptor (**Figura 3**).

Las TARP regulan a los receptores AMPAR en múltiples niveles, ya que alteran las cinéticas de desensibilización y desactivación, la farmacología, la conductancia del canal iónico, el tráfico y la localización de los receptores dentro de la neurona. Además, también estabilizan los receptores en la superficie celular. *In vivo*, la mayoría de AMPAR están asociados con TARP (2,3,5).

#### **2.4.3.2. CHIH**

La segunda familia de proteínas auxiliares que se identificó fue la de las proteínas Cornichon (CNIH2/3), que se asocian con el TMD del receptor en el mismo sitio que las TARP, pero tienen topología inversa, ya que contienen cuatro hélices transmembrana con los extremos N y C terminal situados extracelularmente (**Figura 3**).

Las proteínas CNIH ralentizan drásticamente el cierre del canal del receptor, prolongando la señalización sináptica en las regiones cerebrales en las que se expresan. Además, intervienen en el tráfico intracelular del receptor (2,3).

#### **2.4.3.3. GSG1L**

GSG1L comparte bastante homología con las TARP, ya que ambas pertenecen a la familia de homólogos de la claudina. GSG1L presenta cuatro hélices transmembrana con un dominio extracelular, con el que ejerce efectos sobre el receptor, y tanto el amino-terminal como el carboxilo-terminal están situados en el lado intracelular de la membrana, como las TARP (**Figura 3**). Sin embargo, a diferencia de las TARP, GSG1L actúa como una proteína inhibidora, ejerciendo una modulación supresora (3,9).

#### **2.4.3.4. CKAMP**

CKAMP (del inglés, «*Cysteine-knot AMPA receptor-modulating proteins*») constituye una familia de 4 proteínas recientemente identificadas que interactúan con los AMPAR. Está compuesta por CKAMP39 (shisa8) CKAMP44 (shisa9), CKAMP52 (shisa6) y CKAMP59 (shisa7). Los genes fueron denominados *shisa6*, *shisa7*, *shisa8* y *shisa9* basándose en similitudes con otros genes *shisa* (10). CKAMP44 se caracterizó como una proteína transmembrana de paso único que inducía una desensibilización rápida de las corrientes de AMPAR en el hipocampo. Posteriormente, se identificaron los otros tres miembros de la familia *shisa* que ejercen una función como proteínas moduladoras de AMPAR: CKAMP52 y CKAMP59 y CKAMP39.

Los miembros de esta familia comparten gran similitud estructural, pero muestran distintos perfiles de expresión regional a lo largo del cerebro y difieren en la modulación ejercida sobre la función del receptor (10,11). CKAMP44 es ampliamente expresada en todo el cerebro, siendo más abundante en el giro dentado del hipocampo; CKAMP52 se expresa en gran medida en el hipocampo, el estriado, la amígdala, el córtex y el bulbo olfativo; CKAMP59 está altamente expresada en el cerebelo y en todas las subregiones del hipocampo; y CKAMP39 esta mayormente expresada en el cerebelo y el bulbo olfativo (11). Además, en el caso de CKAMP39, aunque se ha visto que puede interactuar con AMPAR en células no neuronales (y por lo tanto podría ser una proteína auxiliar de los AMPAR), no ha podido confirmarse su interacción y función a nivel neuronal (10).



Todas las CKAMP son proteínas transmembrana de tipo 1 con un péptido señal, un dominio N-terminal extracelular rico en cisteína, una única hélice transmembrana y un gran dominio C-terminal intracelular con un motivo terminal PDZ tipo II, que es un módulo de interacción de proteínas bien definido (**Figura 3**) (10,12). Los dominios extracelulares ricos en cisteína de las CKAMP están muy conservados entre especies, lo que sugiere que son importantes para la función de la proteína, ya que los enlaces disulfuro entre estas cisteínas pueden estabilizar una estructura globular que es importante para la interacción o modulación de AMPAR. Además, la hélice transmembrana y un tramo corto de 20 aminoácidos localizados tras dicha hélice también parecen participar en la interacción con AMPAR. Por otro lado, el motivo de unión PDZ tipo II está altamente conservado y sirve como sitio de interacción para los miembros de la familia CKAMP con proteínas que contienen dominio PDZ como por ejemplo PSD95. Por último, parece probable que los diferentes miembros de la familia CKAMP se unan en la misma posición en el receptor y se sugiere que las proteínas CKAMP y las TARP se unen a regiones distintas de las subunidades GluA, ya que se han encontrado receptores que contienen ambas subunidades auxiliares.

Por otro lado, existen dos variantes de «*splicing*» de CKAMP44, CKAMP52 y CKAMP59, mientras que sólo existe una variante de «*splicing*» de CKAMP39. Las formas cortas de CKAMP52 y CKAMP59 son más abundantes en el cerebro que las formas largas. Los exones empalmados alternativamente codifican un tramo corto de aminoácidos intracelulares en la región localizada tras el dominio que interactúa con AMPAR y previa al motivo PDZ, cuya función es hasta ahora desconocida.

A nivel funcional, la diferente expresión de las CKAMP cambia la expresión superficial de AMPAR en las neuronas, influyendo en el número de receptores en la superficie celular de las neuronas cuando las CKAMP aumentan o disminuyen. Además, los miembros de la familia CKAMP pueden influir en el tráfico de los receptores hacia la superficie celular y en las corrientes sinápticas, ya sea modulando directamente la activación de los receptores o afectando a la composición de los receptores sinápticos. También se piensa que las CKAMP estabilizan los receptores en ciertas localizaciones en la membrana a través de interacciones con proteínas de andamiaje intracelulares que contienen dominios PDZ, siendo relevantes en la localización sináptica de los receptores (10).

Además, los miembros de la familia CKAMP influyen en las propiedades del receptor, ya que alteran su cinética (activación, desactivación, desensibilización y velocidad de recuperación de la desensibilización), las amplitudes de corriente o la afinidad aparente por el glutamato, entre otros. La influencia en las propiedades del receptor difiere entre los miembros de la familia CKAMP y a su vez depende de la subunidad GluA del receptor. Asimismo, los miembros de la familia CKAMP influyen en las corrientes sinápticas mediadas por AMPAR, modulan la plasticidad sináptica a corto plazo y se propone que desempeñan un papel en la plasticidad sináptica a largo plazo al modular la difusión, estabilizar los AMPAR en las sinapsis e influir en el tráfico de los AMPAR hacia la superficie celular (8,10).

Por último, es importante destacar que no se han realizado aun estudios estructurales de las interacciones de AMPAR con las CKAMP. Tampoco se conoce la composición precisa ni la estequiometría, así como la interacción de las CKAMP entre sí y/o con otras subunidades auxiliares del AMPAR. Esta información podría abrir nuevas vías para el

diseño racional de compuestos que actúan en las interfases moleculares de las proteínas auxiliares y el AMPAR, modulando de esta manera el receptor (11).

### 3. OBJETIVO

Existe un amplio conocimiento funcional y estructural de los AMPAR en complejo con sus proteínas auxiliares TARP, CNIH o GSG1L, que ha contribuido a comprender el mecanismo de acción de estos receptores y el efecto de la composición de subunidades en la función. Sin embargo, actualmente se desconoce la estructura, modo de interacción y bases estructurales de la modulación de las proteínas CKAMP a los AMPAR. En este contexto, el **objetivo general** del presente trabajo es iniciar el estudio de la interacción entre los AMPAR y las subunidades auxiliares CKAMP, para lo cual se ha explorado la reconstitución de un complejo estable *in vitro* que pueda ser producido posteriormente a gran escala para su caracterización mediante crio-microscopía electrónica. Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Llevar a cabo el clonaje de las distintas proteínas CKAMP en un plásmido compatible con la expresión en células de mamífero.
2. Explorar la expresión de las diferentes proteínas CKAMP en células de mamífero, así como la estrategia de solubilización y purificación de las mismas.
3. Explorar la producción y purificación de un complejo CKAMP-AMPAR estable.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 ANALISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS PROTEINAS CKAMP

##### 4.1.1. Obtención de secuencias y análisis bioinformático de las secuencias

Se obtuvieron las secuencias de los genes codificantes de las diferentes isoformas de shisa8 (CKAMP39), shisa9 (CKAMP44), shisa6 (CKAMP52) y shisa7 (CKAMP59) de las especies *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* y *Homo sapiens* en Genbank (13). Tras analizar la bibliografía disponible, se determinó cuál era la isoforma canónica de cada una de las proteínas. A continuación, se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas canónicas de cada CKAMP con *Clustal omega*, se determinó el grado de identidad y de similitud de las secuencias con el servidor *Lalign* de *Expasy*, y se determinó dónde estaba el dominio transmembrana en cada CKAMP con *Pfam* o en su defecto, con *Uniprot* (14–17) (ver anexo I-II).

#### 4.2. OBTENCIÓN DE CONSTRUCTOS PARA LA EXPRESIÓN DE LAS CKAMP EN CELULAS DE MAMIFERO

Se diseñaron constructos con el fin de expresar las CKAMP como proteínas de fusión con una GFP y una cola de histidinas (**Figura 4**). Para realizar el clonaje se empleó el método «IVA» (del inglés «In Vivo Assembly»), que se basa en un ensamblaje *in vivo* del DNA utilizando una vía de recombinación bacteriana endógena de *Escherichia coli* (*E. coli*) independiente de RecA, la vía RAIR (del inglés, «RecA-independent recombination»). Esta vía une eficazmente secuencias homólogas cortas de unos 15-30 pares de bases y es responsable de la recombinación de secuencias cortas superpuestas (18,19).



**Figura 4.** Esquema de la proteína de fusión. En rojo, CKAMP; en azul, sitio de corte de proteasas HRV 3C; en verde, GFP y en naranja, cola de 8 Histidinas.

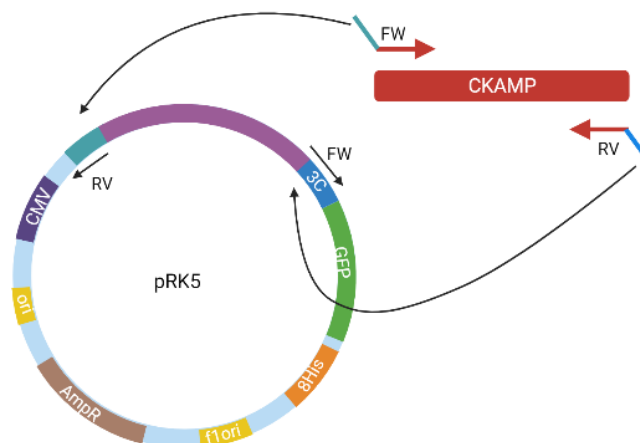
En el caso del constructo para la expresión de AMPAR se empleó un plásmido GluA4-pRK5 ya disponible en el laboratorio. Este plásmido incluye la región codificante Gria4 de *Rattus norvegicus* (isoforma de «*splicing*» flip larga) además de una etiqueta Flag localizada tras el primer residuo de la proteína madura.

#### 4.2.1. Genes sintéticos

Como punto de partida para el clonaje se optó por la compra de genes sintéticos a la compañía *Twist Bioscience*. Se utilizaron los DNA codificantes de las isoformas canónicas de CKAMP39 y CKAMP59 de *Rattus norvegicus* y CKAMP44 de *Rattus rattus*. Estas secuencias fueron optimizadas por *Twist Bioscience* para la expresión en células humanas y contienen dos adaptadores en cada uno de los extremos. En el caso de CKAMP52, dado que la empresa no pudo llevar a cabo la síntesis completa de la región codificante, se encargaron dos fragmentos (N-terminal y C-terminal) de 511 y 1122 pares de bases, respectivamente. En este caso los fragmentos carecían de adaptadores en ambos extremos y contenían regiones homólogas para permitir la recombinación (ver resultados y anexo III). Todos los fragmentos de DNA se diluyeron para obtener una concentración de 50 ng/μl siguiendo las indicaciones de la compañía.

#### 4.2.2. Diseño de oligos

Los oligos que se diseñaron para amplificar las CKAMP debían tener un máximo de 40 pares de bases, una zona de «*annealing*» y una zona de homología con el vector utilizado para el clonaje (pRK5) de unas 15 pares de bases (**Figura 5**). La temperatura de «*annealing*» debía estar en torno a 56-60°C. De esta forma, se diseñaron oligos para amplificar CKAMP39, CKAMP44 y CKAMP59 con la zona de «*annealing*» y la zona de homología (*Invitrogen*). Además, se diseñaron dos oligos que amplifican el vector GFP-pRK5 (*Invitrogen*) (ver anexo IV). Estos oligos se diluyeron en agua miliQ para obtener una concentración de 100 μM.



**Figura 5.** Ilustración esquemática del vector pRK5 (círculo), del inserto de CKAMP (rectángulo rojo) y de los oligos (flechas). En las flechas, se muestra la zona de «*annealing*» (rojo) y la zona de homología (azul) de los oligos. En morado se incluye la región codificante de una proteína no relacionada contenida en el plásmido original (ver Anexo VI, 9.6.5).

### 4.2.3. Clonajes

#### **4.2.3.1 Clonaje de CKAMP39, CKAMP44 y CKAMP59**

Se amplificaron los genes de las CKAMP y el plásmido GFP-pRK5 por separado por PCR. Cada tubo de PCR (25 µl) contenía: 2,5 µl de dNTPs 25 mM; 0,625 µl de DMSO 25%; 5 µl de betaína 5 M; 5 µl de buffer 5x; 9,625 µl de agua; 0,25 µl de DNA polimerasa Phusion HF; 1 µl de DNA a 1 µg/µl; 1 µl de oligos 100 µM. Cada PCR se llevó a cabo utilizando los siguientes ciclos:

- Un primer ciclo de 30 segundos a 98°C para que se produzca la desnaturalización del DNA.
- 18 ciclos de:
  - 10 segundos a 98°C para desnaturalizar el DNA.
  - 30 segundos a la temperatura de «*annealing*» (59, 60 o 62°C) para que se produzca la hibridación del DNA con los oligos.
  - 3 minutos y 30 segundos a 72°C para la elongación de la cadena de DNA.
- Un último ciclo de 10 minutos a 72°C para que termine la elongación.

Se probaron diferentes concentraciones de oligos (1:20 y 1:100) y diferentes temperaturas de «*annealing*» (59, 60 y 62°C). A continuación, se mezcló cada CKAMP con el vector en proporción 1:1 (v:v) y se trató con 1 µl de Dpn1 añadiendo 1 µl de Dpn1 (*Enzymes Fast Digest Thermofisher*) y calentando durante 15 minutos a 37°C. Después, se transformó el producto de PCR digerido mediante «*heat shock*» en bacterias competentes *E. coli XL10-gold*. Para ello, se añadió 4 µl del producto de PCR digerido a 100 µl de células descongeladas en hielo, se incubó durante 5 minutos a 4°C, se realizó un «*heat shock*» a 42°C durante 30 segundos, se mantuvieron las células 2 minutos a 4°C, se añadió 200 µl de medio SOB (ver anexo V) y se incubó en agitación durante 45 minutos. A continuación, se pipetearon 200 µl de las células transformadas sobre una placa Petri con medio LB-agar (ver anexo V) con ampicilina (100 µg/ml) y se extendió la solución con un asa estéril. Finalmente, las placas se mantuvieron en una estufa a 37°C durante una noche y después se conservaron en una nevera a 4°C selladas con parafilm.

#### **4.2.3.2. Clonaje de CKAMP52**

Se amplificó el vector prk5 por PCR con las mismas condiciones que las otras CKAMP utilizando una temperatura de «*annealing*» de 60°C. A continuación, se cargaron en el gel 0,5 µl de CKAMP 52 N-terminal y 0,5 µl de CKAMP52 C-terminal para comparar cantidad de DNA con el pRK5 amplificado. Posteriormente, se trató con Dpn1 el vector amplificado añadiendo 1 µl de Dpn1 (*Enzymes Fast Digest Thermofisher*) y calentando durante 15 minutos a 37°C, y se añadió 0,5 µl de CKAMP 52 N-terminal y 0,5 µl de CKAMP52 C-terminal. Después, se transformó en bacterias competentes *E. coli XL10-gold*. Para ello, se añadió 4 µl de la mezcla a 100 µl de células descongeladas en hielo, se incubó 5 minutos a 4°C, se realizó un «*heat shock*» a 42°C durante 30 segundos, se mantuvieron las células 2 minutos a 4°C, se añadió 200 µl de medio SOB y se incubó en agitación durante 45 minutos. A continuación, se pipetearon 200 µl de las células transformadas sobre una placa Petri con medio LB-agar con ampicilina y se extendió la solución con un asa estéril. Finalmente, la placa se mantuvo en una estufa a 37°C durante una noche y después, se conservó en una nevera a 4°C, sellada con parafilm.

#### 4.2.4. Selección de colonias y crecimiento de cultivo para producción de DNA plasmídico

Varias colonias de cada placa de células transformadas se seleccionaron al azar con el propósito de cultivarlas y aislar su DNA plasmídico. En esterilidad, se añadieron 3 ml de medio LB24 (ver anexo V) más 3 µl de ampicilina 1000x por colonia en un tubo de 15 ml. A continuación, con ayuda de puntas de pipeta se picaron al azar varias colonias. Éstas se incubaron durante medio día a 37°C y 220 rpm en un agitador orbital.

#### 4.2.5. Aislamiento de DNA plasmídico y esterilización de DNA

El DNA plasmídico se aisló de las colonias seleccionadas mediante Miniprep utilizando las disoluciones P1, P2, N3, y PE preparadas según la descripción del kit de *Qiagen*.

En primer lugar, se centrifugaron las bacterias a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 250 µl de buffer P1 (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNAsaA), se añadieron 250 µl de buffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), se agitó el tubo, se añadieron 350 µl de buffer N3 (4,2 M Gu-HCl, 0,9 M acetato de potasio pH 4,8), se agitó el tubo y se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm. El sobrenadante se pasó a una columna *EconoSpin™* y se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante de abajo de la columna y se añadieron 750 µl de buffer PE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 80% etanol). Se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se volvió a centrifugar 2 minutos a 13000 rpm y se descartó de nuevo el sobrenadante. Después, se pasó la columna a un tubo de 1,5 ml y se añadieron 50 µl de buffer EB (10 mM Tris HCl pH 8). Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 2 minutos a 13000 rpm. Finalmente, se midió la concentración del DNA plasmídico en un *Nanodrop*.

Con el propósito de obtener DNA estéril para poder transfectar células en suspensión sin que haya contaminación, se realizó una esterilización del DNA. Para ello, se añadieron 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 6,2, se añadieron 2,5-3 volúmenes de etanol 93%, se incubó en hielo durante 15 minutos, se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. A continuación, se resuspendió el pellet en etanol al 70%, se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en el buffer de elución de TE (*Invitrogen*). Finalmente, se midió de nuevo la concentración del DNA plasmídico en un *Nanodrop*.

#### 4.2.6. Confirmación de correcto clonaje y secuenciación

Se realizaron ensayos de enzimas de restricción con cada DNA plasmídico aislado. Para CKAMP39 y CKAMP44 se utilizaron BamHI y XhoI; para CKAMP52 NdeI y XhoI y para CKAMP59, XbaI y XhoI (Enzymes Fast Digest *ThermoFisher*) (ver anexo VI). Para esta reacción, se añadió 0,2 µl de enzima por cada 200 ng de DNA, buffer 10x, agua y 200 ng de DNA. A continuación, se digirió el DNA a 37°C durante 10 minutos. Después, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Aquellas que tenían el patrón deseado se secuenciaron en la empresa *MacroGen* enviando muestras con concentración de 100 ng/µl de DNA con los oligos necesarios para secuenciar (SV40 o SP6) diluidos 1/20 (100 µM).

#### 4.2.7. Electroforesis horizontal en gel de agarosa

En primer lugar, se calentaron 0,3 g de agarosa en 30 ml de TBE 0,5x (ver anexo V) en un microondas a alta potencia durante 1 minuto y medio. Se dejó enfriar ligeramente, se

añadió 1 µl de *GreenSafe (Invitrogen)* y se agitó generosamente. Posteriormente, se vertió la solución en un soporte de electroforesis previamente preparado y se dejó solidificar. Una vez solidificado, se añadió en el primer pocillo 0,5 µl de marcador (*Invitrogen 1kb Plus DNA ladder*) y en los siguientes pocillos las muestras previamente preparadas (5 µl de DNA con un 1 µl de tampón de carga). El gel se corrió durante 30-45 minutos a 150 voltios. Tras esto, el patrón de bandas de cada muestra pudo ser visualizado en un *Chemidoc*.

### 4.3. PRUEBAS DE EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN DE LAS CKAMP Y PURIFICACIÓN DE COMPLEJOS AMPAR-CKAMP

#### 4.3.1. Líneas celulares y medios de cultivo

Se utilizó la línea celular EXPI 293F (*ThermoFisher*), una línea celular derivada de la línea HEK 293F desarrollada para la producción de proteínas a gran escala en cultivos en suspensión. Esta línea celular se mantuvo tanto en cultivo en suspensión (medio *FreeStyle F17* suplementado con el 2% de Glutamax (*ThermoFisher*) como en cultivos adherentes (DMEM completo: DMEM, 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina). Los cultivos en suspensión se dividieron tres días a la semana manteniendo una densidad de células de entre  $10^6$  y  $4 \cdot 10^6$  células/ml. Las células en cultivo adherente se mantuvieron en un «*flask*» de 75 cm<sup>2</sup> y se realizaron 3 divisiones semanales utilizando diluciones 1/5 y 1/7.

#### 4.3.2. Transfección

##### **4.3.2.1. Cultivo adherente**

En primer lugar, se dividieron las células EXPI293F de un «*flask*» de 75 cm<sup>2</sup> cuando se encontraron en estado confluyente. Para ello se aspiró el medio, se lavó con 5 ml de PBS, se añadió 1 ml de tripsina (0,05% EDTA, 0,02% PBS) y tras una incubación corta se añadieron 9 ml de DMEM completo y se resuspendieron las células. Después, se realizó la dilución en otro «*flask*» de 75 cm<sup>2</sup> nuevo y las células sobrantes se utilizaron para preparar las placas de 6 pocillos que se utilizaron para transfectar.

Cada pocillo se incubó durante 5 minutos con 1 ml de poli-L-lisina diluida 1/10 en agua MilliQ, se lavó con 1 ml de PBS, se añadieron 2,7 ml de medio precalentado DMEM completo y 300 µl de células. Finalmente, se dejó la placa en una estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Al día siguiente, en el microscopio, se comprobó que las células estaban con una confluencia del 80-90%. Después, se prepararon dos tubos con 150 µl de DMEM (*Pan-Biotech*) sin FBS ni P/S a temperatura ambiente para cada pocillo. A uno de ellos se le añadió 3 µg de DNA y al otro 4,5 µl de PEI<sub>max</sub> 1 µg/µl (ratio DNA:PEI<sub>max</sub> 1:1,5). A continuación, se añadió el PEI<sub>max</sub> sobre el DNA y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el medio de los pocillos, se añadió 2,7 ml de DMEM completo y posteriormente se añadió a las células la mezcla de PEI<sub>max</sub> y DNA (20). En el caso de co-transfección con alguna subunidad de AMPAR se añadió el inhibidor del receptor ZK 200775 a una concentración de 20 nM para evitar la muerte celular inducida por excitotoxicidad que se produce en las transfecciones de subunidades AMPAR permeables a calcio. Finalmente, se incubaron las células a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante dos días.

#### **4.3.2.2. Células en suspensión**

El conteo de las células y estimación de su viabilidad se realizó mediante una cámara de Neubauer realizando una dilución del cultivo celular 1:1 con azul trypan (10 µl de azul trypan y 10 µl de cultivo). Una vez estimada la densidad de células se añadió medio *Freestyle* para ajustar la densidad celular a 2,5 millones de células/ml. Las transfecciones se realizaron sobre 5 ml de células en suspensión. Se prepararon dos tubos con 200 µl de medio *FreeStyle* a temperatura ambiente. A uno se le añadió PEI<sub>max</sub> y al otro DNA (1,1 µg/ml medio y GluA y CKAMP en proporción 1:1 en µg DNA). El DNA y el PEI<sub>max</sub> debe estar en un ratio 1:2,7. Posteriormente, se añadió el PEI<sub>max</sub> sobre el DNA y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a las células la mezcla de PEI<sub>max</sub> y DNA, se añadió Gluta<sub>max</sub> (*ThermoFisher*) al 2% (100 µl) y 5 µl del inhibidor del receptor ZK 200775 a 20 nM. Finalmente, se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en agitación durante dos días (21).

#### 4.3.3. Recolección de las células

##### **4.3.3.1. Cultivo adherente**

Tras observar la fluorescencia de las células en el microscopio de fluorescencia Leica DMI600, se retiró el medio y se lavó con 1 ml de PBS frío. Después, se añadió 1 ml de PBS e inhibidores de proteasas (1x) y se despegaron las células del pocillo con una espátula. Se centrifugó 10 minutos a 13.000 rpm y 4°C, y se descartó el sobrenadante.

##### **4.3.3.2. Células en suspensión**

Se centrifugaron las células a 800 g durante 5 minutos a 4°C.

#### 4.3.4. Lisis de las células para prueba de expresión

Se resuspendió el pellet en 250 µl de solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, inhibidores de proteasas 1x, 0,5-1% DDM), se incubó durante 45-90 minutos en rotación a 4°C. Después, se centrifugó el lisado a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se empleó en las etapas posteriores.

#### 4.3.5. Lisis de células y purificación del complejo a pequeña escala

Para la purificación del complejo a pequeña escala se utilizaron columnas anti-GFP y anti-FLAG, que permiten la purificación de los complejos que contienen CKAMP-GFP (resina anti-GFP) o de todos los complejos que contienen subunidad GluA (resina anti-FLAG). En primer lugar, se resuspendieron las células en TBS (50 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl) con inhibidores de proteasas 1x y detergente (1% de triton, DDM o GDN), se incubó durante 45-90 minutos en rotación a 4°C y después, se centrifugó el lisado a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se retiró una alícuota de 15 µl del sobrenadante para seguir la purificación mediante Western Blot (INPUT) y el resto se añadió sobre 40 µl de resinas anti-FLAG (*GenScript*) o anti-GFP previamente equilibradas en TBS suplementado con 0,015% de detergente. La resina anti-GFP se preparó en el laboratorio expresando un nanobody anti-GFP en *E. coli BL21 gold*, seguido de una purificación de afinidad con una columna de *Histrap*, cromatografía de exclusión molecular *HiLoad 16/60 Superdex 200* e inmovilización covalente en una resina CNBR seferosa. Una vez se añadió el sobrenadante de la centrifugación procedente del lisado celular sobre las resinas, se incubó en rotación a 4°C durante 1 hora. A continuación, se

centrifugó a 1000 g durante 5 minutos a 4°C, se recogió una alícuota de 15 µl para realizar el Western blot (alícuota FT) y se descartó el resto de sobrenadante, que contenía la fracción de proteínas que no se unen a las resinas. Posteriormente, se hicieron tres lavados de 20 volúmenes con solución de lavado centrifugando a 1000 g durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se realizaron dos eluciones ácidas añadiendo 60 µl de 0,1M glicina pH 2 sobre las resinas, centrifugando 1 minuto, recogiendo el sobrenadante y neutralizando finalmente con 6 µl de 1M Tris-HCl pH 8. Las resinas se reequilibraron inmediatamente en buffer TBS para su reutilización posterior.

#### 4.3.6. Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida y Western Blot

Con el objeto de demostrar la expresión de las CKAMP y la purificación de estas subunidades o la obtención de complejo, se realizó una electroforesis vertical en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS PAGE). Éste consta de una parte superior conocida como gel concentrador con poliacrilamida al 4% y una parte inferior llamada gel separador con poliacrilamida, en este caso al 10% o 12% (ver anexo V). El gel se cargó con 18 µl de la solución obtenida de mezclar 15 µl de proteína, 3,3 µl de tampón de carga de electroforesis 6x y 2 µl de DTT 1M. Se cargaron además 0,75 µl de patrón molecular (*ThermoFisher 11832124*). La electroforesis se llevó a cabo durante 90 minutos a 150 voltios en tampón separador.

Posteriormente se llevó a cabo una electrotransferencia semi seca con un equipo *Trans-Blot Turbo* (BIORAD). Para ello, se colocaron 6 papeles *Wypall 60* humedecidos en 20 ml de solución de transferencia (BIORAD) (ver anexo V). Después se colocó la membrana de nitrocelulosa humedecida en solución de transferencia, el gel y 6 papeles *Wypall 60* mojados en 20 ml de solución de transferencia. Todos se colocaron eliminando burbujas. A continuación, se llevó a cabo la electrotransferencia a 25 V en 7-10 minutos. Tras la transferencia, la membrana se colocó en un recipiente con solución de bloqueo (BIORAD, *Every Blot Blocking Buffer 12010020*) y se bloqueó durante 5 minutos a temperatura ambiente en un balancín. Tras esto se añadió el anticuerpo primario *mouse anti-GFP* (*Roche 11814460001*) diluido 1:1000 y anticuerpo primario *rabbit anti-GluA4* (*EMD Milipore AB1508*) diluido 1:2000 (todos diluidos en solución de bloqueo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en un balancín. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados consecutivos de 5 minutos con PBS-Tween al 0,5% y se añadió el anticuerpo secundario *anti-mouse-HRP light chain* (*EMD Milipore AP200P*) diluido 1:5000 o *anti-rabbit-HRP light chain* (*EMD Milipore MAB201P*) diluido 1:10000, todos en solución de bloqueo, y se incubaron durante 45 minutos. Después, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween al 0,5%. Finalmente, se añadió la solución de peróxido y luminov como sustratos (BIORAD), se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente y se visualizó en el *Chemidoc* durante 300-600 segundos.

## **5. RESULTADOS**

### 5.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS

Aunque existe una alta similitud entre los AMPAR de rata, humano y ratón, en el grupo de investigación se trabaja con los genes *Gria* de rata, mientras que toda la bibliografía disponible de las CKAMP se centra en los genes de *M. musculus*. Por ello, antes de



encargar los genes sintéticos de *R. norvegicus* se realizó un análisis bioinformático de las distintas secuencias de CKAMP y un estudio comparativo entre especies, con el fin de clonar las isoformas más relevantes de rata.

### 5.1.1. CKAMP39

Se encontraron tres isoformas de *Homo Sapiens*, una isoforma de *Mus musculus* y una isoforma de *Rattus norvegicus* (13). La secuencia canónica es la de ratón de 399 aminoácidos (22). Dos isoformas humanas son mucho más largas que la isoforma canónica de ratón, por lo que solo se alinearon las secuencias de *Mus musculus* (399 aminoácidos), *Rattus norvegicus* (399 aminoácidos) y la isoforma más corta de *Homo Sapiens* (397 aminoácidos) (ver anexo I).

Las secuencias de rata y ratón son muy similares (97% de identidad y 98,5% de similitud), solo difieren en algunos residuos específicos. Sin embargo, la secuencia humana se diferencia más (80,3% de identidad y 88,6% de similitud respecto a la secuencia de rata), ya que posee muchos residuos específicos (ver anexo II). Todos los residuos específicos se sitúan en N-terminal y C-terminal, la secuencia que forma la parte transmembrana (139-161) es igual en las 3 especies (16).

```

Homo_sapiens      MARAGARGGGGRRPPGLRLALALRLALLLARPSGRAGAPEAQEAAAGTTAPGGDRC      60
Mus_musculus      MERAGARGQRCGRRSHGLP--LALRLALLLAGSPSGRAGAPEQETAGSGTVPAPAGGDRC      58
Rattus_norvegicus MERAGARGQRCGRRPHGLP--LALRLALLLAGSPSGRAGAPEAQEATAASGTVPAPAGGDRC      58
* *****      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Figura 6.** Fragmento del alineamiento de las secuencias canónicas de CKAMP39 de *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* En verde, residuos específicos humanos; en azul, residuos específicos de ratón y en amarillo, residuos específicos de rata.

### 5.1.2. CKAMP44

Se encontraron varias isoformas de CKAMP44 de *R. norvegicus*, *H. sapiens*, *R. rattus* y *M. musculus*, pero la secuencia canónica de CKAMP44 es la isoforma de ratón de 424 aminoácidos, la isoforma larga (13,23). Esta secuencia es muy parecida a la de *R. rattus* (97,2 % de identidad y 98,8% de similitud) y a la de *H. sapiens* (94,1% de identidad y 98,4% de similitud respecto a la secuencia de *R. rattus*), difiriere en algunos residuos específicos que se encuentran mayoritariamente en el C-terminal (ver anexo II). La secuencia de *R. norvegicus* parece estar mal anotada. El dominio transmembrana (152-175) no varía en ninguna especie, solo en la de *R. norvegicus* por la mala anotación (16). Además, excepto la secuencia de *R. norvegicus*, que tiene 429 aminoácidos, el resto tienen 424 aminoácidos (ver anexo I).

```

Rattus_norvegicus MPRVLRLLLGCFLETELCARMCRAQERAGHGQLAOXGRVLLLTGSNSLGAAPGEAVEGVGG      60
Homo_sapiens      MRRVLRLLLGCFLETELCARRCRAQERAGHGQLAOLGGVLLLAGGNRSGAASGEAEGEGVGG      60
Rattus_rattus     MRRVLRLLLGCFLETELCARMCRAQERAGHGQLAOLGGVLLLTGSNRSGAASGEAGEGVGG      60
Mus_musculus      MRRVLRLLLGCFLETELCARMCRAQERRSHGQLAOLGGVLLLTGGNRSGAASGEAGEGVGG      60
* *****      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Figura 7.** Fragmento del alineamiento de las secuencias canónicas de CKAMP44 de *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*, *Rattus rattus* y *Mus musculus*. En amarillo, residuos probablemente mal anotados de *Rattus Norvegicus*; en verde, residuos específicos humanos; en rosa, residuos específicos de ratón y en azul, residuos específicos de rata.

Se intentó corregir la secuencia de aminoácidos de *R. norvegicus* explorando las secuencias de «Expressed Sequence Tags» (EST) en el servidor BLAST, utilizando como referencia la secuencia de nucleótidos de ratón (24) y después observando el marco de lectura con la herramienta Translate en Expasy (25). Aunque se identificaron algunos de los residuos correspondientes al N-terminal no fue posible reconstruir una

secuencia fiable para la CKAMP de *R. norvegicus*, por lo que se decidió utilizar la secuencia de *R. rattus* para el diseño del gen sintético.

### 5.1.3. CKAMP52

Se encontraron tres isoformas de *H. sapiens*, una con el extremo N-terminal truncado; dos isoformas, corta y larga, de *M. musculus*, y dos isoformas de *R. norvegicus*, corta y larga (13). La secuencia canónica es la isoforma corta de ratón de 525 aminoácidos (15,26). Se alinearon solo las isoformas cortas de *M. musculus* (525 aminoácidos), *H. Sapiens* (500 aminoácidos) y *R. norvegicus* (521 aminoácidos) (ver anexo I). La identidad y similitud de las tres secuencias está por encima del 90% (ver anexo II). Sin embargo, la isoforma de *H. sapiens* tiene una delección en la región citoplasmática de unos 25 residuos. La región transmembrana (173-199) no varía en ninguna de las tres especies (16).

Homo_sapiens	RELNGTARAPGIPEAGSRRGQPAAA <span style="background-color: #90EE90;">A</span> ---AAASAAVTYETCWGYDVSQGYDKEFECNN	112
Mus_musculus	RELNSTARASGVPEAGSRRGQSA <span style="background-color: #FFFF00;">AAAA</span> AAASATVTYETCWGYDVSQGYDKEFECNN	118
Rattus_norvegicus	RELNSTARGSGVSEAGSRRGQSA <span style="background-color: #FFFF00;">AAAA</span> ---AAASATVTYETCWGYDVSQGYDKEFECNN	114
	****.***. *: ***** **.	*****:*****:*****
Homo_sapiens	ETISAIDTSPKENTPVRSSSKNHYPVRTAKQTP-----EKP <small style="text-decoration: underline;">MNN</small>	273
Mus_musculus	ETISAIDTSPKENTPVRSTSKNHYPVRTAKQTPGDRQYNHPILSSATQTP <small style="text-decoration: underline;">THEK</small> PRMNN	298
Rattus_norvegicus	ETISAIDTSPKENTPVRSTSKNHYPVRTAKQTPGDRQYNHPILSSATQTP <small style="text-decoration: underline;">THEK</small> PRMNN	294
	*****:*****:*****	*****

**Figura 8.** Fragmentos del alineamiento de las secuencias canónicas de CKAMP52 de *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*. En verde, residuos específicos humanos; en amarillo, residuos específicos de rató. La parte subrayada es el fragmento que falta en *Homo sapiens*.

Se utilizó la secuencia de *R. norvegicus* para diseñar el gen sintético. Dado que la empresa no fue capaz de sintetizar el gen completo (probablemente debido a una región de repeticiones en la región N-terminal) se sintetizaron dos fragmentos solapados correspondientes al N y C-terminal.

### 5.1.4. CKAMP59

Se encontró la isoforma corta de *Homo sapiens*, la isoforma larga de *R. norvegicus* y las isoformas cortas y largas de CKAMP59 de *M. musculus*. La isoforma más frecuente en el cerebro es la corta, pero para ensayos de caracterización se había usado la isoforma larga de ratón (558 aminoácidos) y para entonces no estaba disponible la corta de *R. norvegicus*, así que se decidió utilizar la isoforma larga de *R. norvegicus* para sintetizar el gen sintético a pesar de no ser la más frecuente, ya que era la única isoforma de rata que estaba disponible y validada (10,27). Estas isoformas solo se diferencian en 17 aminoácidos (**Figura 9**) (ver anexo I). Respecto a la diferencia entre especies, hay muy pocos residuos específicos (grado de identidad y similitud por encima del 90%) (ver anexo II). El dominio transmembrana (190-210) no varía en ninguna isoforma (15).

Homo_sapiens	MPALLL---VLLASSAGQA <span style="background-color: #FFFF00;">R</span> ARPSNATSAEPAGPLPALLAHLRRLTGALGGGGAASPG	57
Mus_musculus_corta	MPALLLGTVALLASAAGPAGARPSNDTSSVAPGPLPALLAHLRRLTGALAGGGSAAAGT <span style="background-color: #90EE90;">S</span>	60
Rattus_norvegicus_corta	MPALLLIGTVALLASTAGPVGARPSNDTSAVAPGPLPALLAHLRRLTGALAGGGSAAAGAN	60
Mus_musculus_larga	MPALLLGTVALLASAAGPAGARPSNDTSSVAPGPLPALLAHLRRLTGALAGGGSAAAGT <span style="background-color: #90EE90;">S</span>	60
Rattus_norvegicus_larga	MPALLLIGTVALLASTAGPVGARPSNDTSAVAPGPLPALLAHLRRLTGALAGGGSAAAGAN	60
	*****: .***.*** . ***** **.	*****:*****:***.***.
Homo_sapiens	TRPDRARSSSLTPGLGGPDSMPRTPKKNLYNTVKTPN-----LDWRA <span style="background-color: #FFFF00;">L</span>	280
Mus_musculus_corta	TRPDRARSSSLTPGLGGPDSMAPRTPKKNLYNTMKPSN-----LDWRAM	283
Rattus_norvegicus_corta	TRPDRARSSSLTPGLGGPDSMAPRTPKKNLYNTMKPSN-----LDWRAM	283
Mus_musculus_larga	TRPDRARSSSLTPGLGGPDSMAPRTPKKNLYNTMKPSNLDNLHYNVNSPKHHAATLDWRAM	300
Rattus_norvegicus_larga	TRPDRARSSSLTPGLGGPDSMAPRTPKKNLYNTMKPSNLDNLHYNVNSPKHRAATLDWRAM	300
	*****:***.*** *****:*** *	*****:

**Figura 9.** Fragmento del alineamiento de las secuencias de CKAMP52 de *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus*. En amarillo, residuos específicos humanos; en verde, residuos

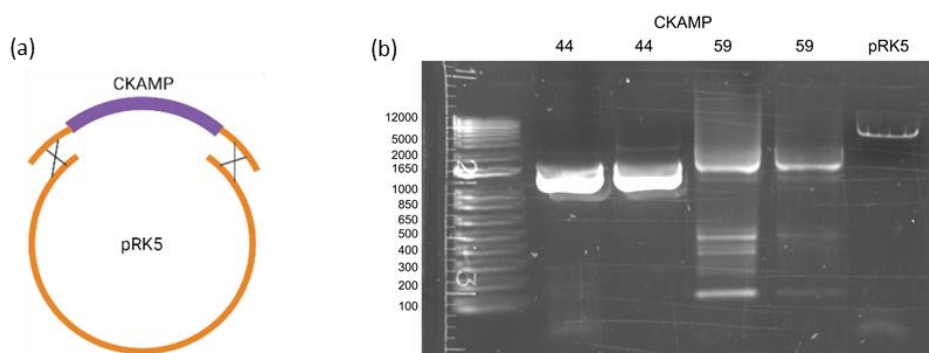
específicos de ratón; en azul, residuos específicos de rata. La parte subrayada en rosa es el fragmento que está en la isoforma larga y no en la corta.

## 5.2. CLONAJE DE CKAMP

### 5.2.1. Clonaje de CKAMP39, CKAMP44 y CKAMP59

Los genes que codifican CKAMP39, CKAMP44 y CKAMP44 fueron sintetizados por la empresa *Twist Bioscience* como fragmentos de DNA. Dado que se deseaba sobreexpresar la proteína en células EXPI293F, los codones fueron optimizados por *Twist Bioscience* para la expresión en *H. sapiens*. En el anexo III se muestra un alineamiento de la secuencia original de cada gen con la secuencia optimizada, en el que se observa que las secuencias de nucleótidos son significativamente dispares después de la optimización. Las proteínas traducidas son idénticas.

Se consiguió clonar las proteínas CKAMP39 y CKAMP44 como proteínas de fusión con una GFP y una cola de histidinas por el método «*IVA cloning*». Tras la amplificación por PCR ( $T_m$  de 60°C) de los fragmentos de DNA y el vector, el inserto tenía una región homóloga con el vector en cada extremo para direccionar el ensamblaje y permitir la recombinación *in vivo* por parte de la bacteria (**Figura 10a**)



**Figura 10.** (a) Esquema del inserto (morado) con la secuencia homóloga del vector pRK5 (naranja). (b) Gel de agarosa al 1% donde se observa CKAMP44 amplificado con los oligos diluidos 1/20 (1272 pb), CKAMP44 amplificado con los oligos diluidos 1/100, CKAMP59 amplificado con los oligos diluidos 1/20 (1674 pb), CKAMP59 amplificado con los oligos diluidos 1/100 y el vector pRK5 amplificado (6599 pb).

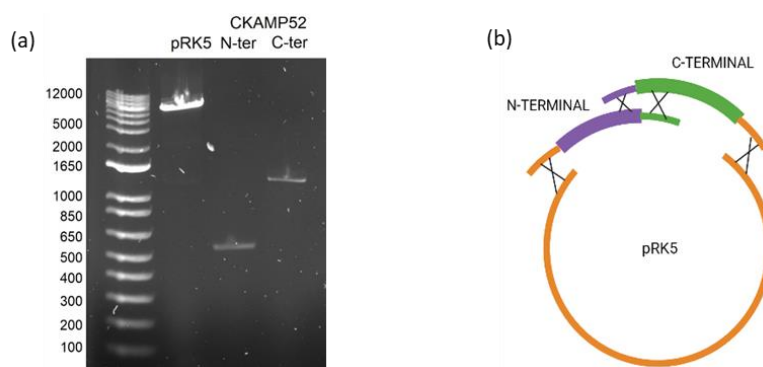
No se consiguió sin embargo clonar CKAMP59. Tras realizar la PCR se observaron varias bandas secundarias, pero dado que existía una banda principal del tamaño esperado (**Figura 10b**) se optó por proseguir la transformación con el amplificado con los oligos diluidos 1/100. Al aislar el DNA plasmídico y realizar ensayos de enzimas de restricción, se observó el patrón de bandas deseado, pero al realizar la secuenciación se observó que todos los constructos obtenidos carecían de un fragmento de 120 pares de bases en el extremo 5' del gen en una región rica en GCs (**Figura 11**).

CKAMP59 H210413-048_J03_1F6DZAA048_premix.ab1	-----ATGCCGGCCCTGCTGTGATCGGGACCGTCGCGCTGCTAGCCTCCACCGCGGG CTTGGAAATGCCGGCCCTGCTGTGATCGGGACCGTCGCGCTGCTAGCCTCCACCGCGGG *****	53 300
CKAMP59 H210413-048_J03_1F6DZAA048_premix.ab1	CCCGGTGGGGGCGCGCCATCCAACGACACAAGCGCCCTGGCCCCGGGCCCGCTGCCCGC CCCGGG *****	113 306
CKAMP59 H210413-048_J03_1F6DZAA048_premix.ab1	GCTACTCGCGCACCTGCGGGCCTGACCGGGCTCTGGCGGGCGGGGAGCGCAGCGGG -----	173 306
CKAMP59 H210413-048_J03_1F6DZAA048_premix.ab1	CGCCAACGCCAACGCCAACGACCCCGCGGGTGGCACGGGTGCAGCGGCACGGGC -----GCCAACGCCAACGACCCCGCGGGTGGCACGGGTGCAGCGGCACGGGC *****	233 359

**Figura 11.** Fragmento de un alineamiento del gen sintético con un DNA plasmídico secuenciado donde se observa una delección de 120 pb en el DNA plasmídico aislado (subrayado en rojo).

### 5.2.2. Clonaje de CKAMP52

El gen que codifica CKAMP52 fue sintetizado por la empresa *Twist Bioscience* en dos fragmentos de DNA, dado que no fue posible la síntesis en único fragmento. El fragmento N-terminal contenía una región homologa del vector pRK5 y una región homologa con el otro fragmento, el C-terminal. El fragmento C-terminal contenía de igual forma una región homologa con el N-terminal y una región homologa con el vector pRK5 (**Figura 12b**). De esta forma, se consiguió dirigir el ensamblaje y permitir la recombinación *in vivo* en *E. coli*.



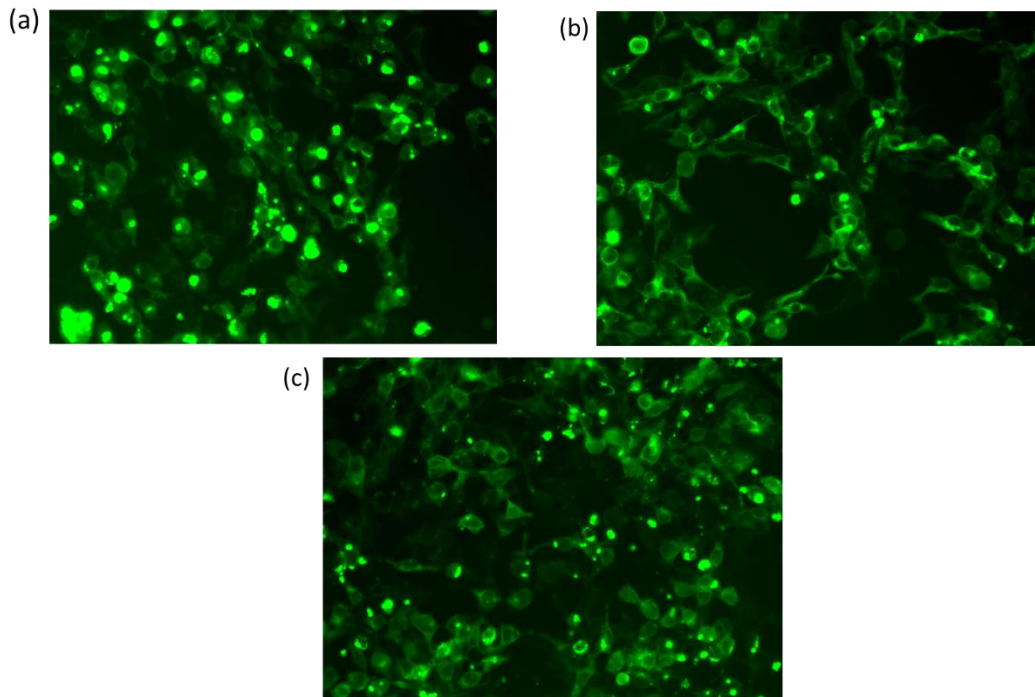
**Figura 12.** (a) Gel de agarosa al 1% donde se observa el vector pRK5 amplificado (6599 pb), el fragmento N-terminal (511 pb) y el fragmento C-terminal (1122 pb). (b) Esquema del ensamblaje del vector y de los insertos (N-terminal y C-terminal) con las regiones homologas.

Ambos fragmentos fueron optimizados para la expresión en células humanas. En el anexo III se muestra un alineamiento de la secuencia original de CKAMP52 de *Rattus norvegicus* con la secuencia optimizada de cada fragmento, en el que se observa que las secuencias de nucleótidos son significativamente dispares después de la optimización. Sin embargo, las proteínas traducidas son idénticas.

### 5.3. PRUEBA DE EXPRESIÓN

Se transfectaron células EXPI293F en cultivo adherente con los constructos codificantes de CKAMP39, CKAMP44 y CKAMP52 en forma de proteínas de fusión con GFP. Posteriormente, se visualizaron mediante un microscopio de fluorescencia Leica DMI600 (**Figura 13**).

Se observó expresión de proteína de fusión en los tres casos. Al tratarse de proteínas de membrana, se observa una mayor concentración de CKAMP en la membrana, siendo más superficial la expresión en el caso de CKAMP44-GFP y CKAMP52-GFP (**Figura 13b,c**). En el caso de CKAMP39-GFP, se observan grandes gránulos en el citoplasma, que podría ser debido a que expresa mucho esta proteína de fusión, a acumulación en el aparato de Golgi o podría ser un indicativo de una agregación de la proteína (**Figura 13a**). En CKAMP44-GFP y CKAMP52-GFP también se observa algún granulo en el citoplasma en alguna célula, pero en menor medida y de menor tamaño. En cualquier caso, la proteína que se expresa más superficialmente es CKAMP44-GFP.

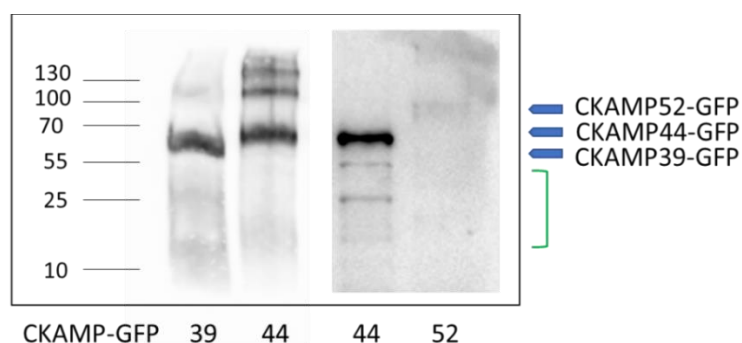


**Figura 13.** Imágenes de células EXPI293F transfectadas de manera transitoria con CKAMP-GFP obtenidas en el microscopio de fluorescencia Leica DMI600 (objetivo 20x). (a) CKAMP39-GFP. (b) CKAMP44-GFP. (c) CKAMP52-GFP.

Posteriormente, se realizó el lisado y extracción de membranas de las células transfectadas con 0,5-1% DDM y se realizaron Western Blots utilizando un anticuerpo primario anti-GFP para detectar la expresión de las proteínas (**Figura 14**).

Se observó expresión de proteína de fusión en los tres casos. Al tratarse de proteínas de membrana, se observa una mayor concentración de CKAMP en la membrana, siendo más superficial la expresión en el caso de CKAMP44-GFP y CKAMP52-GFP. En el caso de CKAMP39-GFP, se observan grandes gránulos en el citoplasma, que podría ser debido a que expresa mucho esta proteína de fusión, a acumulación en el aparato de Golgi o podría ser un indicativo de una agregación de la proteína. En CKAMP44-GFP y CKAMP52-GFP también se observa algún granulo en el citoplasma en alguna célula, pero en menor medida y de menor tamaño. En cualquier caso, la proteína que se expresa más superficialmente es CKAMP44-GFP.

Posteriormente, se realizó el lisado y extracción de membranas de las células transfectadas con 0,5-1% DDM y se realizaron Western Blots utilizando un anticuerpo primario anti-GFP para detectar la expresión de las proteínas (**Figura 14**).





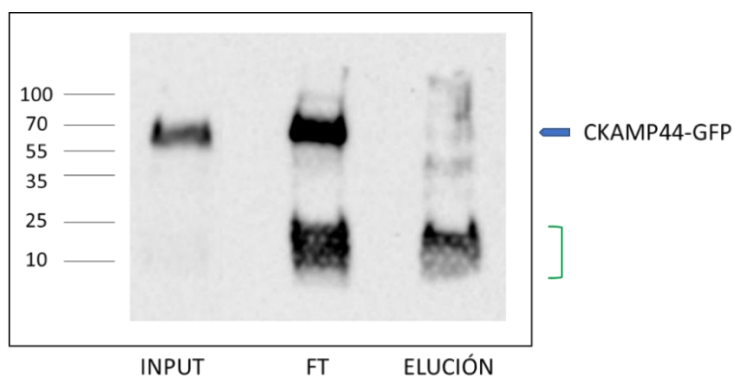
**Figura 14.** Membranas reveladas que muestran la expresión de CKAMP39-GFP, CKAMP44-GFP y CKAMP52-GFP mediante un Western Blot con el anticuerpo primario anti-GFP. Se trata de dos Western blot alineados, dado que no fue posible observar la expresión de CKAMP52-GFP en el mismo Western blot en el que se expresó CKAMP39-GFP. En azul, flechas que indican las bandas de las CKAMP-GFP; en verde, llave que indica las bandas de degradación de CKAMP44-GFP.

Aunque no se cuantificó la cantidad de CKAMP-GFP solubilizada en cada caso utilizando como referencia la banda de actina, la cantidad de proteína solubilizada partiendo de un volumen de células similar es claramente superior para CKAMP39-GFP y CKAMP44-GFP frente a CKAMP52-GFP. Además, en el segundo Western blot se observa más producto de degradación de CKAMP44-GFP.

#### 5.4. PURIFICACION DE CKAMP Y DE COMPLEJOS AMPAR-CKAMP

Como CKAMP44-GFP presentaba mayor expresión que la CKAMP52-GFP y dado que el papel de CKAMP39 como subunidad auxiliar del AMPAR *in vivo* no está confirmado, se escogió la CKAMP44-GFP para realizar ensayos de coexpresión con GluA4 con el fin de purificar el complejo AMPAR-CKAMP.

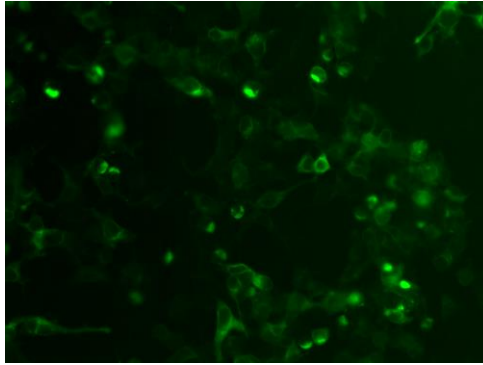
En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de purificación de CKAMP44-GFP con el detergente tritón, empleado en las primeras inmunoprecipitaciones de esta subunidad auxiliar (28). Se utilizaron resinas anti-GFP para la purificación y se realizó un Western Blot utilizando un anticuerpo primario anti-GFP. Se consiguió purificar una pequeña cantidad de CKAMP44-GFP, pero la mayor parte de la proteína se perdió en el «flow through», lo que indica que la proteína no se unió adecuadamente a la resina. Además, se observa una importante degradación de la proteína en la elución (**Figura 15**).



**Figura 15.** Membrana revelada que muestra la extracción y purificación de CKAMP44-GFP con tritón y resinas anti-GFP mediante un Western Blot con el anticuerpo primario anti-GFP. En azul, flecha que indica la banda de CKAMP44-GFP; en verde, llave que indica la degradación de CKAMP44-GFP.

Debido a esto y a que en los ensayos preliminares con DDM no se había observado degradación se decidió utilizar otros detergentes más suaves (DDM y GDN) para evitar la ruptura de los complejos AMPAR-CKAMP durante su extracción y purificación.

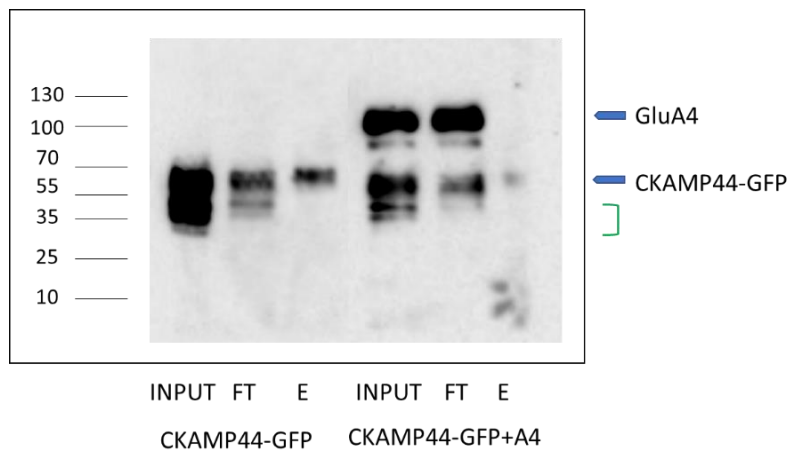
Para reconstituir el complejo AMPAR-CKAMP se cotransfectaron células EXPI293 en cultivo adherente con los plásmidos codificantes de CKAMP44-GFP y GluA4-Flag (proporción en  $\mu\text{g}$  de DNA 1:1) para obtener una expresión transitoria de ambas proteínas (**Figura 16**).



**Figura 16.** Imágenes de células EXPI293F transfectadas de manera transitoria con CKAMP-GFP y GluA4-Flag obtenidas en el microscopio de fluorescencia Leica DMI600 (objetivo 20x).

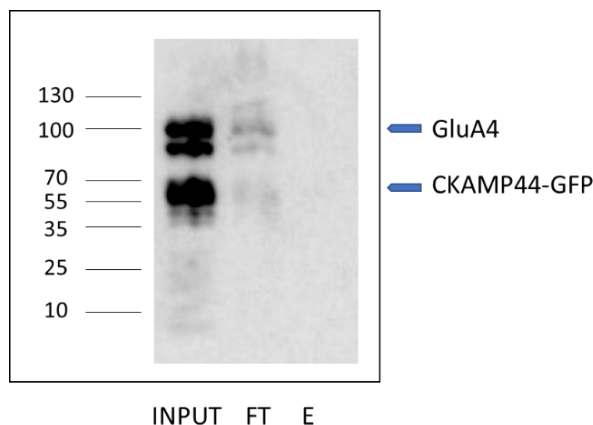
La expresión de la proteína de fusión CKAMP44-GFP es menor al coexpresarla con GluA4 porque se añade una menor cantidad de DNA de CKAMP44-GFP. Además, se observan menos gránulos en el citoplasma que cuando se expresa CKAMP44-GFP sola.

Se extrajeron las membranas de las células transfectadas en DDM al 1% y se purificaron las proteínas utilizando resinas anti-GFP seguidas de un Western Blot utilizando anti-GluA4 y anti-GFP como anticuerpos primarios (**Figura 17**). En la purificación de CKAMP44-GFP, se consiguió eluir CKAMP44-GFP, pero se perdió gran cantidad de proteína en el «flow through», indicando una unión defectiva a las resinas anti-GFP. Por otro lado, en la coexpresión de CKAMP44 con GluA4, se consiguió purificar una pequeña cantidad de CKAMP44-GFP, pero se perdió la mayor parte de CKAMP44-GFP y todo el GluA4 en el «flow through», lo que indica que CKAMP44-GFP no se ha conseguido unir adecuadamente a las resinas anti-GFP y que en estas condiciones no se forma un complejo estable CKAMP44-GFP-GluA4.



**Figura 17.** Membrana revelada que muestra la purificación de CKAMP44-GFP y de CKAMP44-GFP+GluA4 con DDM y resinas anti-GFP mediante un Western Blot con los anticuerpos primarios anti-GFP y anti-GluA4. La membrana fue cortada a mitad del último pocillo. En azul, flechas que indican las bandas de GluA4 y CKAMP44-GFP; en verde, llave que indica la degradación de CKAMP44-GFP.

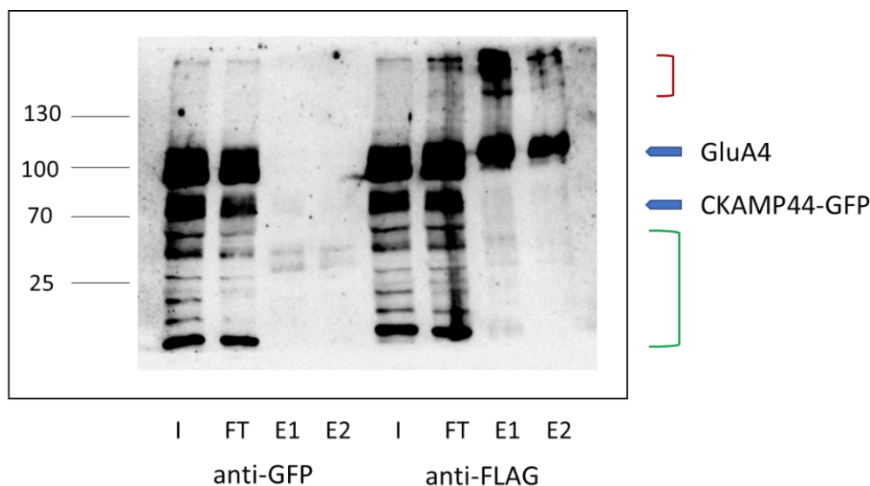
Con el propósito de encontrar condiciones de formación del complejo se decidió coexpresar CKAMP44-GFP con GluA4-Flag en células adherentes extrayendo las membranas trasfectadas y purificando las proteínas con GDN, un detergente más suave que el DDM, y con resinas anti-GFP (**Figura 18**).



**Figura 18.** Membrana revelada que muestra la purificación de CKAMP44+GluA4 con GDN y resinas anti-GFP mediante un Western Blot con los anticuerpos primarios anti-GFP y anti-GluA4. En azul, flechas que indican las bandas de GluA4 y CKAMP44-GFP.

No se consiguió purificar ni CKAMP44 ni GluA4, por lo que no se pudo determinar si el complejo GluA4-CKAMP44 se formaba. Las proteínas se perdieron seguramente en los lavados, ya que ni el «flow through» ni en las eluciones había mucha intensidad de bandas.

Con el fin de incrementar la producción de ambas subunidades, se transfectaron células EXPI293F en cultivos en suspensión con los plásmidos codificantes de CKAMP44-GFP y GluA4 Flag. Además de utilizar resinas anti-GFP, se utilizaron en paralelo resinas anti-FLAG para purificar todos los complejos que contienen GluA4-Flag. Se realizó un Western Blot utilizando anti-GluA4 y anti-GFP como anticuerpos primarios (**Figura 19**).



**Figura 19.** Membrana revelada que muestra la purificación de CKAMP44+GluA4 con GDN y con resinas anti-GFP y resinas anti-FLAG mediante un Western Blot con los anticuerpos primarios anti-GFP y anti-GluA4. En rojo, llave que indica la agregación de GluA4; en azul, flechas que indican las bandas de GluA4 y CKAMP44-GFP; en verde, llave que indica la degradación de CKAMP44-GFP.

En la purificación con resinas anti-GFP se consiguió eluir muy poca cantidad de CKAMP-GFP y no se observó co-elución de GluA4, por lo que no se pudo demostrar la formación de complejo GluA4-CKAMP44. Hubo una unión defectiva de CKAMP44-GFP a las resinas anti-GFP, ya que se observa muy poca intensidad de banda en la elución. Por otro lado, en la purificación con las resinas anti-FLAG se consiguió eluir GluA4 y una pequeña cantidad de CKAMP44-GFP (intensidad tenue de bandas), por lo que se



demuestra la formación del complejo GluA4-CKAMP44 a pesar de que la señal es muy tenue.

En ambas purificaciones se observan numerosos productos de degradación de CKAMP44-GFP, por lo que pudieron fallar los inhibidores de proteasas. También, se perdió mucha cantidad de proteína en el «flow through». El hecho de que en todos los ensayos con resinas anti-GFP (que se utilizan rutinariamente en el grupo con otras proteínas auxiliares) se pierda gran cantidad de proteína en el «flow through», sugiere que en esta proteína de fusión la GFP podría no ser accesible para la interacción con las resinas, o que la proteína se encuentra agregada.

## 6. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo era llevar a cabo la purificación de un complejo AMPAR-CKAMP. Para ello, se han llevado a cabo clonajes de proteínas de fusión CKAMP-GFP (**Figuras 10 y 12**), ensayos de expresión de CKAMP (**Figuras 13-14**) y ensayos de purificación del complejo AMPAR-CKAMP (**Figuras 17-19**).

Se consiguió clonar por el método «*IVA cloning*» todas las subunidades CKAMP en forma de proteínas de fusión GFP, excepto CKAMP59, en el que se produce una delección de 120 pb en la amplificación del fragmento de DNA, probablemente debido a la cantidad de GCs de la región 5' del gen (**Figura 11**). Para el clonaje de esta subunidad se podría llevar a cabo un clonaje con dos fragmentos similar al realizado con CKAMP52, amplificando, con unos nuevos oligos, el vector donde se clonó la CKAMP59 que contiene la delección, y amplificando un fragmento de 400-500 pb de CKAMP59 desde el N-terminal, donde se incluya la zona donde se producía delección en la amplificación y una región homóloga al vector con el clonaje de la CKAMP59 delecionada.

Mediante microscopia de fluorescencia, utilizando la fluorescencia de la GFP, se observó la expresión de las CKAMP en células EXPI293F transfectadas (**Figura 13**). La expresión de CKAMP44-GFP y CKAMP52-GFP es compatible con su presencia en membranas, ya que se observa mayoritariamente en la superficie. Sin embargo, en el caso de CKAMP39, no es tan clara la expresión superficial, ya que se observan numerosos gránulos en el citoplasma. En el caso de esta subunidad todavía no se ha confirmado su papel como subunidad auxiliar de AMPAR (10).

En cuanto a la purificación de CKAMP, se consiguió solubilizar CKAMP44 en tritón, pero se observó degradación (**Figura 15**), por lo que se decidió proseguir con DDM, consiguiendo solubilizar la proteína con menor degradación (**Figura 17**).

Con respecto a la purificación del complejo AMPAR-CKAMP, tras coexpresar CKAMP44-GFP y GluA4-Flag en cultivo adherente (**Figura 16**) y extraer las proteínas en DDM, se consiguió solubilizar CKAMP44 y GluA4, pero no se consiguió purificar el complejo (**Figura 17**). Se prosiguió sustituyendo el DDM por GDN, un detergente más suave, pero tampoco fue posible la purificación del complejo GluA4-CKAMP44 (**Figura 18**). Finalmente, se expresó CKAMP44-GFP y GluA4-Flag en células en suspensión y se purificaron las proteínas con GDN, utilizando resinas anti-GFP y resinas anti-FLAG, observándose en este último ensayo una débil señal de formación de complejo (**Figura 19**). Actualmente se está tratando de confirmar la formación del complejo utilizando

geles nativos. En estos ensayos se explorarán más detergentes para obtener condiciones de extracción que impliquen una menor degradación de CKAMP y mayor estabilidad de los complejos. No obstante, es de destacar que en los ensayos de proteómica en los que se identificaron inicialmente los complejos AMPAR-CKAMP se utilizaron detergentes más agresivos (28). En estos ensayos estaban también presentes otras subunidades como las TARP o las CHIH, que podrían estabilizar el complejo. Por ello, la interacción AMPAR-CKAMP podría requerir de la presencia de otras subunidades auxiliares, como ocurre por ejemplo con SINDYG4, una proteína periférica que recientemente se ha demostrado que interacciona en la zona transmembrana tanto con AMPAR, como con CHIH2 (29). También se ha visto en ensayos de proteómica distintas correlaciones de CKAMP44 con las distintas subunidades de AMPAR, siendo la menor correlación la de GluA4 (30). De este modo, se va a explorar la formación del complejo AMPAR-CKAMP utilizando otras subunidades GluA así como subunidades auxiliares adicionales (TARP o CHIH).

Por último, en todos los ensayos se ha visto una unión defectiva de las CKAMP-GFP con las resinas anti-GFP (**Figuras 15, 17, 18 y 19**). Esta unión defectiva podría deberse a la agregación de la CKAMP-GFP o a que la GFP no es accesible para la unión con el nanobody inmovilizado en la resina. En posteriores ensayos de purificación de CKAMP, se quiere cambiar la estrategia de purificación añadiendo una FLAG en N-terminal o C-terminal para poder utilizar resinas anti-FLAG. Además, se explorará la creación de mutantes en los que se eliminará la región C-terminal citosólica, que no es esencial para la interacción con el receptor.

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados de clonajes de proteínas de fusión CKAMP-GFP, ensayos de expresión de CKAMP-GFP y ensayos de estabilización del complejo AMPAR-CKAMP nos permiten obtener las siguientes conclusiones:

- Se ha conseguido clonar todas las subunidades CKAMP en forma de proteínas de fusión con GFP, excepto CKAMP59, que contiene una región rica en GCs que dificulta su amplificación.
- Se ha observado expresión de las subunidades mediante expresión transitoria. De acuerdo a los ensayos de fluorescencia, CKAMP44-GFP y CKAMP52-GFP presentan una mayor expresión superficial que CKAMP39-GFP.
- Se ha conseguido solubilizar adecuadamente CKAMP44-GFP en DDM, pero su purificación falla debido a problemas de unión de la GFP a las resinas, así como a la degradación de la proteína fusión a lo largo del proceso.
- A pesar de haber observado evidencia de formación de complejo GluA4-CKAMP44, no ha sido posible encontrar unas condiciones adecuadas para la producción y purificación del complejo.

## 7. CONCLUSIONS

The results of CKAMP-GFP fusion protein cloning, CKAMP expression assays and AMPAR-CKAMP complex stabilisation assays lead us to the following conclusions:

- All CKAMPs subunits have been cloned as GFP fusion proteins, except CKAMP59, which contains a GC-rich region that hinders its amplification.
- Expression of the subunits has been observed by transient expression. According to fluorescence assays, CKAMP44-GFP and CKAMP52-GFP show higher surface expression than CKAMP39-GFP.
- CKAMP44 was adequately solubilised in DDM but purification failed due to GFP not binding to beads as well as degradation of the fusion protein.
- Although GluA4-CKAMP44 complex signal has been observed, it has not been possible to find suitable conditions for the formation of the complex.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. AMPA Receptor | Centre for Synaptic Plasticity | University of Bristol [Internet]. [cited 2021 Jan 12]. Available from: <http://www.bristol.ac.uk/synaptic/receptors/ampar/>
2. Pinggera A, Watson JF, Greger IH. AMPA Receptors. *eLS*. 2020;1:635–44.
3. Miguez Cabello FJ. New insights into ionotropic glutamate receptors in physiological and pathological conditions. Universitat de Barcelona; 2020.
4. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, et al. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 2010;62(3):405–96.
5. Greger IH, Watson JF, Cull-Candy SG. Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron*. 2017;94(4):713–30.
6. Chaudhry C, Weston MC, Schuck P, Rosenmund C, Mayer ML. Stability of ligand-binding domain dimer assembly controls kainate receptor desensitization. *EMBO J*. 2009;28(10):1518–30.
7. Khodosevich K, Jacobi E, Farrow P, Schulmann A, Rusu A, Zhang L, et al. Coexpressed Auxiliary Subunits Exhibit Distinct Modulatory Profiles on AMPA Receptor Function. *Neuron*. 2014;83(3):601–15.
8. Jacobi E, von Engelhardt J. Modulation of information processing by AMPA receptor auxiliary subunits. *J Physiol*. 2020;0:1–13.
9. Chen S, Gouaux E. Structure and mechanism of AMPA receptor — auxiliary protein complexes. *Curr Opin Struct Biol*. 2019;54:104–11.
10. von Engelhardt J. AMPA receptor auxiliary proteins of the CKAMP family. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6):1460.
11. Abdollahi Nejat M, Klaassen R V., Spijker S, Guus Smit AB. Auxiliary subunits of the AMPA: The Shisa family of proteins. *Curr Opin Pharmacol*. 2021;58:52–61.
12. Lee HJ, Zheng JJ. PDZ domains and their binding partners: Structure, specificity, and modification. *Cell Communication and Signaling*. 2010;8:1–18.
13. GenBank Overview [Internet]. [cited 2021 May 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
14. Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI [Internet]. [cited 2021 May 3]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

15. UniProt [Internet]. [cited 2021 May 18]. Available from: <https://www.uniprot.org/>
16. Pfam: Home page [Internet]. [cited 2021 May 18]. Available from: <https://pfam.xfam.org/>
17. LALIGN Server [Internet]. [cited 2021 Jun 24]. Available from: [https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html)
18. García-Nafría J, Watson JF, Greger IH. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Sci Rep.* 2016;6(May):1–12.
19. Watson JF, García-Nafría J. In vivo DNA assembly using common laboratory bacteria: A re-emerging tool to simplify molecular cloning. *J Biol Chem.* 2019;294(42):15271–81.
20. Aricescu AR, Lu W, Jones EY. A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 2006;62(10):1243–50.
21. Herguedas B, Watson JF, Ho H, Cais O, García-Nafría J, Greger IH. Architecture of the heteromeric GluA1/2 AMPA receptor in complex with the auxiliary subunit TARP g8. *Science.* 2019;364(6438).
22. Farrow P, Khodosevich K, Sapir Y, Schulmann A, Aslam M, Stern-Bach Y, et al. Auxiliary subunits of the CKAMP family differentially modulate AMPA receptor properties. *Elife.* 2015;4:9693.
23. Kunde SA, Rademacher N, Zieger H, Shoichet SA. Protein kinase C regulates AMPA receptor auxiliary protein Shisa9/CKAMP44 through interactions with neuronal scaffold PICK1. *FEBS Open Bio.* 2017;7(9):1234–45.
24. Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query [Internet]. [cited 2021 May 16]. Available from: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
25. ExpASY - Translate tool [Internet]. [cited 2021 May 16]. Available from: <https://web.expasy.org/translate/>
26. Klaassen R V., Stroeder J, Coussen F, Hafner AS, Petersen JD, Renancio C, et al. Shisa6 traps AMPA receptors at postsynaptic sites and prevents their desensitization during synaptic activity. *Nat Commun.* 2016;7(1):1–12.
27. Schmitz LJM, Klaassen R V., Ruiperez-Alonso M, Zamri AE, Stroeder J, Rao-Ruiz P, et al. The AMPA receptor-associated protein Shisa7 regulates hippocampal synaptic function and contextual memory. *Elife.* 2017 Dec 4;6.
28. Von Engelhardt J, Mack V, Sprengel R, Kavenstock N, Li KW, Stern-Bach Y, et al. CKAMP44: A brain-specific protein attenuating short-term synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Science.* 2010;327(5972):1518–22.
29. Yu J, Rao P, Clark S, Mitra J, Ha T, Gouaux E. Hippocampal AMPA receptor assemblies and mechanism of allosteric inhibition. *Nature.* 2021;594(7863):448–53.
30. Schwenk J, Baehrens D, Haupt A, Bildl W, Boudkazi S, Roeper J, et al. Regional diversity and developmental dynamics of the AMPA-receptor proteome in the mammalian brain. *Neuron.* 2014;84(1):41–54.

## 9. ANEXOS

### 9.1. ANEXO I: ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE LA FAMILIA CKAMP

#### 9.1.1. Alineamiento de CKAMP39

**Verde:** Residuos específicos de humano

**Azul:** Residuos específicos de ratón

**Amarillo:** Residuos específicos de rata

Homo_sapiens	MARAGARG <sup>GG</sup> GRRPPGLR <sup>LL</sup> LALRLALLLAR <sup>PS</sup> GRAGAPEAQ <sup>FAA</sup> GTAP <sup>GG</sup> DRC	60
Mus_musculus	MERAGARGQRCGR <sup>SS</sup> HGLP--LALRLALLLAGSPS <sup>GR</sup> AGAPE <sup>QE</sup> TA <sup>SG</sup> TVAPAGGDRC	58
Rattus_norvegicus	MERAGARGQRCGR <sup>PH</sup> GLP--LALRLALLLAGSPS <sup>GR</sup> AGAPEAQ <sup>ETA</sup> ASGTVAPAGGDRC	58
	* ***** ** * * * ***** * ***** * * . * . * . * . * . *	
Homo_sapiens	RGYYDVMGQWDPPFNCS <sup>SG</sup> YSFCCGTCGYRFC <sup>CH</sup> DGPRRLDQSRCSNYDTPAWVQTGRP	120
Mus_musculus	RGYYDVMGQWDPPFNCS <sup>SG</sup> VYSFCCGTCGYRFC <sup>CH</sup> DGPRRLDQSRCSNYDTPAWVQTGRP	118
Rattus_norvegicus	RGYYDVMGQWDPPFNCS <sup>SG</sup> VYSFCCGTCGYRFC <sup>CH</sup> DGPRRLDQSRCSNYDTPAWVQTGRP	118
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
Homo_sapiens	PARARDTAAPRDPGRERSHTAVYAVCGVAALLVLAGIGARLGLERAHSPRARRTVTRALT	180
Mus_musculus	PARARDTAAPRDPARERSHTAVYAVCGVAALLVLAGIGARLGLERAHSPRARRTVTRALT	178
Rattus_norvegicus	PARARDTAAPRDPARERSHTAVYAVCGVAALLVLAGIGARLGLERAHSPRARRTVTRALT	178
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
Homo_sapiens	ELLKQPGPQEPLPPTLGGCQVQMGDGLPRGSPHNSADKKRLNNAAPRGSAAAPGPPR	240
Mus_musculus	ELLKQPGPQEPLPPTLGGCQVQMGDGLPRGSPHNSADKKRLNNAAPRGSAAAPGPPR	238
Rattus_norvegicus	ELLKQPGPQEPLPPTLGGCQVQMGDGLPRGSPHNSADKKRLNNAAPRGSAAAPGPPR	238
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
Homo_sapiens	GPRLQGGGSLTLQPDYAKYATFKAAALKAAEAAPRDF <sup>OR</sup> FP <sup>ES</sup> PR <sup>PAR</sup> PR <sup>PR</sup>	300
Mus_musculus	GPRLQGGGSLTLQPDYAKFATLKAAALKATE <sup>V</sup> APQDFYQRF <sup>ST</sup> ET <sup>GP</sup> R <sup>TL</sup> PARV <sup>PR</sup> PE	298
Rattus_norvegicus	GPRLQGGGSLTLQPDYAKFATLKAAALKATE <sup>E</sup> APQDFYQRF <sup>ST</sup> ET <sup>SG</sup> R <sup>TL</sup> PARV <sup>PR</sup> PE	298
	*** *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
Homo_sapiens	DLPALDACPWAPP <sup>Y</sup> APPAAP-- <sup>EP</sup> YAAWTSSRPAP <sup>PL</sup> SH <sup>PAR</sup> F <sup>QV</sup> PR <sup>PR</sup> CH <sup>A</sup>	357
Mus_musculus	DLPALDACPWAPP <sup>Y</sup> PAGPVSSVYAAWTAGRPAP <sup>PL</sup> PRSH <sup>VA</sup> QVSPAP <sup>PR</sup> PH <sup>AP</sup>	358
Rattus_norvegicus	DLPALDACPWAPP <sup>Y</sup> PAGPVSSVYAAWTAGRPAP <sup>PL</sup> PRSH <sup>VA</sup> QVSPAP <sup>PR</sup> PH <sup>AP</sup>	358
	*** ***** * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
Homo_sapiens	RRQFSV-K <sup>P</sup> ET <sup>EP</sup> Q <sup>LF</sup> G <sup>Y</sup> SAGRGS <sup>RL</sup> TNSK <sup>E</sup> EVTV	397
Mus_musculus	RRQFSVEKLEAFSAQ <sup>AS</sup> FSYSSAGRGRPHLSTNSKAEVTV	399
Rattus_norvegicus	RRQFSVEKLEAFSAQ <sup>PT</sup> FSYSSAGRGRPHLSTNSKAEVTV	399
	***** * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	

#### 9.1.2. Alineamiento de CKAMP44

**Amarillo:** Residuos probablemente mal anotados

**Verde:** Residuos específicos de humano

**Azul:** Residuos específicos de rata

**Rosa:** Residuos específicos de ratón

Rattus_novergicus	M <sup>PR</sup> VRLRLLLGCFLTEL <sup>C</sup> ARM <sup>C</sup> RAQERAGHG <sup>Q</sup> LAQ <sup>XGR</sup> VLLLTGSN <sup>SL</sup> GAA <sup>P</sup> GEA <sup>V</sup> EGVGG	60
Homo_sapiens	M <sup>RR</sup> VRLRLLLGCFLTEL <sup>C</sup> AR <sup>C</sup> RAQERAGHG <sup>Q</sup> LAQLGGVLLLAGNRS <sup>GA</sup> ASGEA <sup>EG</sup> EG <sup>EG</sup>	60
Rattus_rattus	M <sup>RR</sup> VRLRLLLGCFLTEL <sup>C</sup> ARM <sup>C</sup> RAQERAGHG <sup>Q</sup> LAQLGGVLLLTG <sup>S</sup> NRS <sup>GA</sup> ASGEAGEGVGG	60
Mus_musculus	M <sup>RR</sup> VRLRLLLGCFLTEL <sup>C</sup> ARM <sup>C</sup> RAQER <sup>S</sup> HG <sup>Q</sup> LAQLGGVLLLTGGNRS <sup>GA</sup> ASGEAGEGVGG	60
	* *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
Rattus_novergicus	SDAPPTRAPT <sup>AG</sup> LLS <sup>G</sup> VLRV <sup>TLA</sup> QWDPPFNCK <sup>KL</sup> GR <sup>LS</sup> IFX <sup>CG</sup> L <sup>G</sup> FRF <sup>AAL</sup> YRS <sup>R</sup> PT <sup>NQ</sup> ST	120
Homo_sapiens	SDAPPTRAPT <sup>PD</sup> CRGYFDV-MGQWDPPFNCS <sup>SG</sup> DFIFCCGTCGFR <sup>F</sup> CCTFK <sup>KR</sup> RLNQST	119
Rattus_rattus	SDAPPTRAPT <sup>PD</sup> SCRGYFDV-MGQWDPPFNCS <sup>SG</sup> DFIFCCGTCGFR <sup>F</sup> CCTFK <sup>KR</sup> RLNQST	119
Mus_musculus	SDAPPTRAPT <sup>PD</sup> SCRGYFDV-MGQWDPPFNCS <sup>SG</sup> DFIFCCGTCGFR <sup>F</sup> CCTFK <sup>KR</sup> RLNQST	119
	***** . * : * .*****. * : : *****.*****.*****.*****.*****.*****	
Rattus_novergicus	<sup>L</sup> V <sup>T</sup> N <sup>X</sup> T <sup>T</sup> P <sup>PL</sup> A <sup>X</sup> R <sup>G</sup> K <sup>A</sup> Q <sup>ARK</sup> DDPLHDPT <sup>TE</sup> Q <sup>DP</sup> N <sup>P</sup> X <sup>S</sup> L <sup>H</sup> H <sup>L</sup> R <sup>G</sup> V <sup>V</sup> A <sup>M</sup> V <sup>L</sup> V <sup>G</sup> I <sup>S</sup> T <sup>O</sup> V <sup>G</sup> L <sup>E</sup>	180
Homo_sapiens	C-TNYDTP <sup>L</sup> W <sup>L</sup> N <sup>T</sup> G <sup>K</sup> P <sup>P</sup> ARK <sup>DD</sup> PLHDPT <sup>K</sup> D <sup>K</sup> T--NLIVYIICGVVAV <sup>M</sup> V <sup>L</sup> V <sup>G</sup> I <sup>F</sup> TK <sup>L</sup> G <sup>L</sup> E	176
Rattus_rattus	C-TNYDTP <sup>L</sup> W <sup>L</sup> N <sup>T</sup> G <sup>K</sup> P <sup>P</sup> ARK <sup>DD</sup> PLHDPT <sup>K</sup> D <sup>K</sup> T--NLIVYIICGVVAV <sup>M</sup> V <sup>L</sup> V <sup>G</sup> I <sup>F</sup> TK <sup>L</sup> G <sup>L</sup> E	176
Mus_musculus	C-TNYDTP <sup>L</sup> W <sup>L</sup> N <sup>T</sup> G <sup>K</sup> P <sup>P</sup> ARK <sup>DD</sup> PLHDPT <sup>K</sup> D <sup>K</sup> T--NLIVYIICGVVAV <sup>M</sup> V <sup>L</sup> V <sup>G</sup> I <sup>F</sup> TK <sup>L</sup> G <sup>L</sup> E	176
	* * * * * *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
Rattus_novergicus	<sup>K</sup> R <sup>T</sup> P <sup>A</sup> P <sup>R</sup> E <sup>H</sup> M <sup>G</sup> E <sup>R</sup> ALADVMR <sup>P</sup> Q <sup>G</sup> HCNTDHMERDLNIVVHVQHYENMD <sup>T</sup> RTP <sup>I</sup> NNLHT <sup>T</sup> Q <sup>M</sup>	240
Homo_sapiens	KAHRPQREHM-SRALADVMR <sup>P</sup> Q <sup>G</sup> HCNTDHMERDLNIVVHVQHYENMD <sup>T</sup> RTP <sup>I</sup> NNLHT <sup>T</sup> Q <sup>M</sup>	235
Rattus_rattus	KAHRPQREHM-SRALADVMR <sup>P</sup> Q <sup>G</sup> HCNTDHMERDLNIVVHVQHYENMD <sup>T</sup> RTP <sup>I</sup> NNLHT <sup>T</sup> Q <sup>M</sup>	235
Mus_musculus	KAHRPQREHM-SRALADVMR <sup>P</sup> Q <sup>G</sup> HCNTDHMERDLNIVVHVQHYENMD <sup>S</sup> RTP <sup>I</sup> NNLHT <sup>T</sup> Q <sup>M</sup>	235
	* * * * * *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	

Rattus_novergicus	NNAVPTSPLLQMQMGHPSYPNLGQISNPFYEQQPPGKELNKYASLKAVGNA	300
Homo_sapiens	NNAVPTSPLLQMQMGHPSYPNLGQISNPFYEQQPPGKELNKYASLKAVGSSDGDWAV	295
Rattus_rattus	NNAVPTSPLLQMQMGHPSYPNLGQISNPFYEQQPPGKELNKYASLKAVGNA	295
Mus_musculus	NNAVPTSPLLQMQMGHPSYPNLGQISNPFYEQQPPGKELNKYASLKAVGNSDGDWAVATLK *****:*****:***	295
Rattus_novergicus	SPKADKVNDDFYTKRRHLAELAAKGNLPLHPVVEDEPRAFSPPEHGPAQNGQKSRTNKM	360
Homo_sapiens	SPKADKVNDDFYTKRRHLAELAAKGNLPLHPVVEDEPRAFSPPEHGPAQNGQKSRTNKM	355
Rattus_rattus	SPKADKVNDDFYTKRRHLAELAAKGNLPLHPVVEDEPRAFSPPEHGPAQNGQKSRTNKM	355
Mus_musculus	SPKADKVNDDFYTKRRHLAELAAKGNLPLHPVVEDEPRAFSPPEHGPAQNGQKSRTNKM *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	355
Rattus_novergicus	PHPPLAYNSTANFKTWDPSDQSLRRQAYGNKGLGIAESGSCDPLGTRTQHFPPPTQPYFI	420
Homo_sapiens	PHPPLAYSTNFKGWFQSLRRQAYGNKGLGIAESGSDPLGTRTQHPPPTQPYFI	415
Rattus_rattus	PHPPLAYNSTANFKTWDPSDQSLRRQAYGNKGLGIAESGSCDPLGTRTQHFPPPTQPYFI	415
Mus_musculus	PHPPLAYNSTANFKTWDPSDQSLRRQAYGNKGLGIAESGSCDPLGTRTQHFPPPTQPYFI *****:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:*****	415
Rattus_novergicus	TNSKTEVTV 429	
Homo_sapiens	TNSKTEVTV 424	
Rattus_rattus	TNSKTEVTV 424	
Mus_musculus	TNSKTEVTV 424 *****	

### 9.1.3. Alineamiento de CKAMP52

Verde: Residuos específicos de humano

Amarillo: Residuos específicos de ratón

Homo_sapiens	RELNGTARAPGIPEAGSRRGQAAA	112
Mus_musculus	RELNSTARASGVPEAGSRRGQAAAA	118
Rattus_norvegicus	RELNSTARASGVSEAGSRRGQAAAA ***:*:*:* *:***** **:	114
Homo_sapiens	SESGLYCCGTCYRFFCKKRHEKLDQRQCTNYQSPVWVQTPSTKVVSFGPENKYDPEKD	172
Mus_musculus	SESGLYCCGTCYRFFCKKRHEKLDQRQCTNYQSPVWVQTPSTKVVSFGPENKYDPEKD	178
Rattus_norvegicus	SESGLYCCGTCYRFFCKKRHEKLDQRQCTNYQSPVWVQTPSTKVVSFGPENKYDPEKD *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	174
Homo_sapiens	KTNFTVYITCGVIAFVIVAGVFAKVSYDKAHRPPREMIHRALADILRQQGPIPIAH CER	232
Mus_musculus	KTNFTVYITCGVIAFVIVAGVFAKVSYDKAHRPPREMIHRALADILRQQGPIPIAH CER	238
Rattus_norvegicus	KTNFTVYITCGVIAFVIVAGVFAKVSYDKAHRPPREMIHRALADILRQQGPIPIAH CER *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	234
Homo_sapiens	ETISAIDTSPKENTPVRSSSKNHYPVRTAKQTP-----EKPMMN	273
Mus_musculus	ETISAIDTSPKENTPVRSTSKNHYPVRTAKQTPGDRQYNHPILSSATQPTTHEKPRMN	298
Rattus_norvegicus	ETISAIDTSPKENTPVRSTSKNHYPVRTAKQTPGDRQYNHPILSSATQPTTHEKPRMN *****:*****:*****	294
Homo_sapiens	ILTSATEPYDLSFRRSRYQNLALHLPSSYESAVKTNPSKYSSLKRLTDKEADEYMRRLHP	333
Mus_musculus	ILTSATEPYDLSFRRSRYQNLALHLPSSYESAVKTNPSKYSSLKRLTDKEADEYMRRLHP	358
Rattus_norvegicus	ILTSATEPYDLSFRRSRYQNLALHLPSSYESAVKTNPSKYSSLKRLTDKEADEYMRRLHP *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	354
Homo_sapiens	DLAARGTLPLNVIQMSQQKPLPRERPRRPIRAMSQDRVLSPPRGLPDEFMPYDRILSDE	393
Mus_musculus	DLAARGTLPLNVIQMSQQKPLPRERPRRPIRAMSQDRVLSPPRGLPDEFMPYDRILSDE	418
Rattus_norvegicus	DLAARGTLPLNVIQMSQQKPLPRERPRRPIRAMSQDRVLSPPRGLPDEFMPYDRILSDE *****:*****:*****	414
Homo_sapiens	QLLSTERLHSQDPLLSPERTAFPEQSLRAISHTDVFVSTPVLDYRMSKMHSHPSASNN	453
Mus_musculus	QLLSTERLHSQDPLLSPERTAFPEQSLRAISHTDVFVSTPVLDYRMTKMHSHPSASNN	478
Rattus_norvegicus	QLLSTERLHSQDPLLSPERTAFPEQSLRAISHTDVFVSTPVLDYRMTKMHSHPSASNN *****:*****:*****	474
Homo_sapiens	SYATLGQSQTAAKRFASRRHNTVEQLHYIPGHHTCYTASKTEVTV	500
Mus_musculus	SYATLGQSQTAAKRFASRRHNTVEQLHYIPGHHTCYTASKTEVTV	525
Rattus_norvegicus	SYATLGQSQTAAKRFASRRHNTVEQLHYIPGHHTCYTASKTEVTV *****:*****:*****	521

### 9.1.4. Alineamiento de CKAMP59

Amarillo: Residuos específicos humanos

Verde: Residuos específicos de ratón

Azul: Residuos específicos de rata

Rosa: Residuos de la isoforma larga que no están en la corta

Homo_sapiens	MPALLLL--VLLASSAGQAARPSNATSAEPAGPLPALLAHLRRLTGALGGGGAASPG	57
Mus_musculus_corta	MPALLLLGTVALLASAAGPAGARPSNDTSSVAPGPLPALLAHLRRLTGALAGGGAAGT	60
Rattus_norvegicus_corta	MPALLLLGTVALLASTAGPVGARPSNDTSSAVAPGPLPALLAHLRRLTGALAGGGAAGAN	60
Mus_musculus_larga	MPALLLLGTVALLASAAGPAGARPSNDTSSVAPGPLPALLAHLRRLTGALAGGGAAGT	60
Rattus_novergicus_larga	MPALLLLGTVALLASTAGPVGARPSNDTSSAVAPGPLPALLAHLRRLTGALAGGGAAGAN	60
	*****: .****:* * . ***** **: *****:*****:***.*.*.	
Homo_sapiens	ANGTRTGPAGCAGAARARPPPAELCHGYDVMGQYDATFNCSTGSYRFCCGTCHYRFCC	117
Mus_musculus_corta	ANATKTS PASGTGAARARPPPAELCHGYDVMGQYDATFNCSTGSYRFCCGTCHYRFCC	120
Rattus_norvegicus_corta	ANATKTS PASGTGAARARPPPAELCHGYDVMGQYDATFNCSTGSYRFCCGTCHYRFCC	120
Mus_musculus_larga	ANATKTS PASGTGAARARPPPAELCHGYDVMGQYDATFNCSTGSYRFCCGTCHYRFCC	120
Rattus_novergicus_larga	ANATKTS PASGTGAARARPPPAELCHGYDVMGQYDATFNCSTGSYRFCCGTCHYRFCC	120
	**.*.*.*.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Homo_sapiens	HRHMRLAQASCSNYDTPRWATTPPPLAGGAGGAGGGGPGPQAGWLEGGRTGGAGGRG	177
Mus_musculus_corta	HRHMRLAQASCSNYDTPRWATTPPPLAGGAGGAGGGGPGPQAGWLEGGRAGGAGGRG	180
Rattus_norvegicus_corta	HRHMRLAQASCSNYDTPRWATTPPPLAGGAGGAGGGGPGPQAGWLEGGRAGGAGGRG	180
Mus_musculus_larga	HRHMRLAQASCSNYDTPRWATTPPPLAGGAGGAGGGGPGPQAGWLEGGRAGGAGGRG	180
Rattus_novergicus_larga	HRHMRLAQASCSNYDTPRWATTPPPLAGGAGGAGGGGPGPQAGWLEGGRAGGAGGRG	180
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Homo_sapiens	GEGPGGSTAYVVCVVISFALAVGVGAKVAFSKASRAPRAHREINVPRALVDILRHQAGP	237
Mus_musculus_corta	GEGPGGSTAYVVCVVISFALAVGVGAKVAFSKASRAPRAHREINVPRALVDILRHQAGP	240
Rattus_norvegicus_corta	GEGPGGSTAYVVCVVISFALAVGVGAKVAFSKASRAPRAHREINVPRALVDILRHQAGP	240
Mus_musculus_larga	GEGPGGSTAYVVCVVISFALAVGVGAKVAFSKASRAPRAHREINVPRALVDILRHQAGP	240
Rattus_novergicus_larga	GEGPGGSTAYVVCVVISFALAVGVGAKVAFSKASRAPRAHREINVPRALVDILRHQAGP	240
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Homo_sapiens	TRPDRARSSSLTPGIGGPDSPMPRTPKNLYNTVKTPN-----LDWRAI	280
Mus_musculus_corta	TRPDRARSSSLTPGLGGPDSPMPRTPKNLYNTMKPSN-----LDWRAM	283
Rattus_norvegicus_corta	TRPDRARSSSLTPGLGGPDSPMPRTPKNLYNTMKPSN-----LDWRAM	283
Mus_musculus_larga	TRPDRARSSSLTPGLGGPDSPMPRTPKNLYNTMKPSNLDNLHYNVNSPKHHAATLDWRAM	300
Rattus_novergicus_larga	TRPDRARSSSLTPGLGGPDSPMPRTPKNLYNTMKPSNLDNLHYNVNSPKHHAATLDWRAM	300
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Homo_sapiens	PPSPSLHYSTLSCSRSFHNLSHLPPSYEAAVKSELNRYSSLKRLAEKDLDEAYLKRR	340
Mus_musculus_corta	PPSPSLHYSTLSCSRSFHNLSHLPPSYEAAVKSELNRYSSLKRLAEKDLDEAYLKRR	343
Rattus_norvegicus_corta	PPSPSLHYSTLSCSRSFHNLSHLPPSYEAAVKSELNRYSSLKRLAEKDLDEAYLKRR	343
Mus_musculus_larga	PPSPSLHYSTLSCSRSFHNLSHLPPSYEAAVKSELNRYSSLKRLAEKDLDEAYLKRR	360
Rattus_novergicus_larga	PPSPSLHYSTLSCSRSFHNLSHLPPSYEAAVKSELNRYSSLKRLAEKDLDEAYLKRR	360
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Homo_sapiens	EMPRGTLPHALRRPPTGGGYRMDGWWGPEELGLAPAPNPRRVMSQEHLLDGGRASRYE	399
Mus_musculus_corta	EMPRGTLPHALRRPPTGGGYRMDGWWGPEELGLAPAPNPRRVMSQEHLLDGGRASRYE	403
Rattus_norvegicus_corta	EMPRGTLPHALRRPPTGGGYRMDGWWGPEELGLAPAPNPRRVMSQEHLLDGGRASRYE	403
Mus_musculus_larga	EMPRGTLPHALRRPPTGGGYRMDGWWGPEELGLAPAPNPRRVMSQEHLLDGGRASRYE	420
Rattus_novergicus_larga	EMPRGTLPHALRRPPTGGGYRMDGWWGPEELGLAPAPNPRRVMSQEHLLDGGRASRYE	420
	*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Homo_sapiens	FTLPRARLVSQEHLHLLSSPEALRQSRHLLSPPRSALPPDPTTRASLAASHSNLLGPG	459
Mus_musculus_corta	FTLPRARLVSQEHLHLLSSPEALRQSRHLLSPPRSALPPDPTTRASLAASHSNLLGPG	463
Rattus_norvegicus_corta	FTLPRARLVSQEHLHLLSSPEALRQSRHLLSPPRSALPPDPTTRASLAASHSNLLGPG	463
Mus_musculus_larga	FTLPRARLVSQEHLHLLSSPEALRQSRHLLSPPRSALPPDPTTRASLAASHSNLLGPG	480
Rattus_novergicus_larga	FTLPRARLVSQEHLHLLSSPEALRQSRHLLSPPRSALPPDPTTRASLAASHSNLLGPG	480
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Homo_sapiens	GPPTPLRGLPPSSSLHAHHHHALHGSPQPAWMSDAGGGGTLARRPPFQROGTLEQLQFI	519
Mus_musculus_corta	GPPTPLHGLPP-SGLHAHHHHALHGSPQPAWMSDAGGGGTLARRPPFQROGTLEQLQFI	522
Rattus_norvegicus_corta	GPPTPLHGLPP-SGLHAHHHHALHGSPQPAWMSDAGGGGTLARRPPFQROGTLEQLQFI	522
Mus_musculus_larga	GPPTPLHGLPP-SGLHAHHHHALHGSPQPAWMSDAGGGGTLARRPPFQROGTLEQLQFI	539
Rattus_novergicus_larga	GPPTPLHGLPP-SGLHAHHHHALHGSPQPAWMSDAGGGGTLARRPPFQROGTLEQLQFI	539
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Homo_sapiens	PGHHLQHLRTASKNEVTV	538
Mus_musculus_corta	PGHHLQHLRTASKNEVTV	541
Rattus_norvegicus_corta	PGHHLQHLRTASKNEVTV	541
Mus_musculus_larga	PGHHLQHLRTASKNEVTV	558
Rattus_novergicus_larga	PGHHLQHLRTASKNEVTV	558
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	

## 9.2. ANEXO II: GRADO DE IDENTIDAD Y SIMILITUD DE LAS SECUENCIAS

**Tabla 1.** Grado de identidad y similitud de las secuencias respecto de la secuencia de *Rattus norvegicus* en CKAMP39, CKAMP52 y CKAMP59 (isoforma corta), y respecto de *Rattus rattus* en CKAMP44, obtenidos en el servidor *Lalign* de *Expasy*. (17)

<b>CKAMP</b>	<b>Especie con la que se compara</b>	<b>Grado de identidad</b>	<b>Grado de similitud</b>
CKAMP39	<i>Mus musculus</i>	97,0%	98,5%
	<i>Homo Sapiens</i>	80,2%	88,6%
CKAMP44	<i>Mus musculus</i>	97,2%	98,8%
	<i>Homo sapiens</i>	94,1%	98,4%
CKAMP52	<i>Mus musculus</i>	97,9%	98,7%
	<i>Homo Sapiens</i>	90,2%	92,6%
CKAMP59	<i>Mus musculus</i>	97,6%	99,6%
	<i>Homo Sapiens</i>	91,6%	97,1%



### 9.3. ANEXO III: ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA ORIGINAL DE CKAMP y GENES SINTÉTICOS

#### 9.3.1. Alineamiento de CKAMP39

CKAMP39_RAT	ATGGAGCGCGCTGGGGCGGGGACAGCGTTGTGGCCGGCGCCGCATGGGCTCCCGCTC	60
CKAMP39_syn	ATGGAAAGAGCGGGTGCAAGGGGACAAAGATGCGGAAGGAGACCACCGTCTGCCACTG	60
	*****	
CKAMP39_RAT	GCGCTCCGGTGGCGTGTGCTGGCGGGTTCGCGTCCGGCCGCGGGGGCTCCCGAG	120
CKAMP39_syn	GCTTTGCGTCTTGCTTTGTTGCTCGCCGGCTCTCCCTCTGGGCGGGTGGAGCCCTGAA	120
	**	
CKAMP39_RAT	GCGCAGGAGACCGCAGCGTCCGGCACCGTGGCACCGCGGGAGGGGACCGTGC	180
CKAMP39_syn	GCACAAGAAACAGCCCAAGTGGGACTGTCGCCCTCCCGCGGAGATAGATGTAGAGGG	180
	**	
CKAMP39_RAT	TATTACGACGTGATGGGCCAGTGGGACCCGCCCTTCAACTGCAGCTCCGGTGTCTACAGC	240
CKAMP39_syn	TACTATGATGTCATGGGACAATGGGATCCCCCTTTAATTGTTCTAGTGGGGTGTATTCC	240
	**	
CKAMP39_RAT	TTCTGCTGCGGCACGTGCGGCTACCGCTTCTGTTGCCACGACGGCCCGCGCCCTGGAC	300
CKAMP39_syn	TTTGTGTGGAACATGTGGGTATCGGTTTGTGCTGATGATGGACCCAGAAGGCTTGAT	300
	**	
CKAMP39_RAT	CAGAGCCGCTGCTCCAACACTACGACACACCGGCCCTGGGTGCAGACTGGCCGCCCCCGCC	360
CKAMP39_syn	CAATCCCGGTGTAGTAATTATGATACCCCGCGTGGGTCCAACAGGGCGTCCCCAGCA	360
	**	
CKAMP39_RAT	CGCGCCCGTGACACCGCGCTCCGCGCGACCCGCGCGAGCGCAGCCACTGCGGTC	420
CKAMP39_syn	AGGGCACGGGATACAGCAGCCCTCGCGATCCCGCACGGGAAAGGTCTCATACAGCCGTG	420
	*	
CKAMP39_RAT	TACGCGGTGTGCGGTGTGCGCCGACTGCTCGTGTGGTCCGATCGGGGCACGCCTGGGT	480
CKAMP39_syn	TATGCACTGTGGCGTGGGTGCTCTCTGGTACTCGTAGGTATTGGAGCCAGGTTGGGG	480
	**	
CKAMP39_RAT	CTGGAGAGAGCGCACAGCCCCGCGCTCGCCGACCGGTGACCAGGACACTGACAGAACTT	540
CKAMP39_syn	TTGGAACGAGCCCATTTCCCCACGAGCGCTCGTACAGTTACGCGAACTCTTACCAGGCTC	540
	****	
CKAMP39_RAT	CTCAAGCAGCCAAGCCCCAAGAACCCTGCCTCCACCTCTGGGTCCATCCTTGGGTAAC	600
CKAMP39_syn	TTGAAACAACCCAGCCACAGGACCTCTTCCCGCCCTTGGCCCGAGCCTGGGCAAT	600
	*	
CKAMP39_RAT	TGCGTCCAGGTACAAATGGGTGACGGTGTCTCCGGGTTCTCCCCACAACAGCACAGAC	660
CKAMP39_syn	TGTGTTCAAGTGCAGATGGGCGATGGCGTGTGAGAGGGAGCCACATAATTCTACCGAT	660
	**	
CKAMP39_RAT	AAGAAACGCTCAATAATGCGCCTCTGGGTCCGCCACCCAGGACCCCGCGCGGTCCG	720
CKAMP39_syn	AAGAAGCGGTTGAACAACGCTCCCTCGGATCAGCAACACCCGCGCCACCCAGAGGACCC	720
	*****	
CKAMP39_RAT	CGGCCGAGGTTGGTGGCAGCCTGACGTTGACGCTGACTATGCCAAGTTTGCTACTCTC	780
CKAMP39_syn	CGCCCTCAAGGCGCGGTCATTGACTCTCCAACAGATTACGCGAAATTCGCCACATTG	780
	**	
CKAMP39_RAT	AAAGCAGCTGCGCTCAAGGCCACAGAGGCTGCGCCCGAGGACTTCTATCAACGTTTCCC	840
CKAMP39_syn	AAGCCGCGAGCCCTTAAGCTACCAGCAGCCCTCAAGATTCTACCAGAGGTTCCCA	840
	**	
CKAMP39_RAT	TCTACCAGTGGGCGCGGACTCTCCCTGCGCGGGTCCCGCGCCTCCAGAGGACTTG	900
CKAMP39_syn	TCAACGAAAGCGGTCCTCCGTTCCAGCCAGAGTACCTCGTCCACCCGAAGATCTG	900
	**	
CKAMP39_RAT	CCTGCGCTGCTCGACGCTGTCCTGGGCCCTCCGGTTATGTACCTCCCGCGGCCCT	960
CKAMP39_syn	CGGCTCTCCTTGATGCTTGCCATGGGCGCGCCCGGCTACGTTCCCTCCAGGACCA	960
	**	
CKAMP39_RAT	GTCTCGTCCGTCCTTATGCGGCTGGACCGCAGGCGCCCGCGAGACCGCTCCCGGT	1020
CKAMP39_syn	GTGAGCTCTGTGCCCTACGAGCATGGACTGCTGGCAGGCTGCCCGACCACTGCCTAGA	1020
	**	
CKAMP39_RAT	AGCCACTTGGTGGCTCAGTTTCTCCAGCGCCCGCGGCCAGCCACGCGCGCGGCGT	1080
CKAMP39_syn	TCCCATCTCGTTGACAAAGTACGCCCCGCTCCTCGCCAGCGTCCCATGCTCCAGCAGA	1080
	***	
CKAMP39_RAT	CAGTTCAGCGTGGAGAAGCTGCCGAGGCTTCAGCGCGCAGCCACGAGCTTTTACAGC	1140
CKAMP39_syn	CAATTTTTCAGTTGAAAAGCTTCTGAAAGCGTTTTCGGCTCAACCAACATCTTCTATAGT	1140
	**	
CKAMP39_RAT	AGCGCGGCGAGGACCCCGCATCTAAGACCAACAGCAAAGCTGAGGTTACTGTTTAA	1200
CKAMP39_syn	AGTGTGGGCGAGGGCCTAGACACCTTAGTACGAATAGCAAGCAGAAGTACGCGGTGATG	1200

### 9.3.2. Alineamiento de CKAMP44

CKAMP44syn	ATGCGCGGGTGTGAGATTTGTGCTGGGATGTTTCTTACGGAATTGTGCGCTAGAATG	60
SecuenciaCKAMP44_RAT	ATGCGCCGAGTCCCTCCGGCTCTCTCGGCTGCTTCCCTCACCGAGCTGTGTGCCCGCATG	60
	*****	
CKAMP44syn	TGTAGAGCCCAAGAACGCGCAGGTCATGGCCAATTGGCCAGCTTGGCGGGGTTTGTGTG	120
SecuenciaCKAMP44_RAT	TGCCGGGCGCAGGAGCGAGCTGGGACGCGGCACTGGCGCACTGGCGGCGTGTGTGCTG	120
	**	
CKAMP44syn	TTGACCGGTTCCAACCGTAGTGGTGCAGCAAGCGGGGAAAGCTGGGGAAGGAGTGGGCGGA	180
SecuenciaCKAMP44_RAT	CTCACAGGGAGCAATCGCTCGGGGCGCCCTCCGGAGAGGCCGGGAGGCGCTCGGGGGC	180
	*****	
CKAMP44syn	TCTGATGCCCCGCTACTCGGGCCCTACCCTGATTCTTGCAGGGGTTATTTGACGTG	240
SecuenciaCKAMP44_RAT	TCCGACGCACCGCCGACTCGAGCGCCACGCCGGACTCCTGTCCGGGGTACTTCGATGTC	240
	**	
CKAMP44syn	ATGGGGCAATGGGATCCCCATTAAATGTTCTTCTGGGGATTTTATATTTTGTGTGGA	300
SecuenciaCKAMP44_RAT	ATGGGCCAGTGGGACCCGCCGTCAACTGCAGCTCGGGCGACTTCACTTCTGTGCTGCGGG	300
	*****	
CKAMP44syn	ACGTGCGGATTTCCGCTTTTGTGTACCTTCAAGAAGCGACGGCTCAATCAATCAACATGC	360
SecuenciaCKAMP44_RAT	ACTTGTGGTTCCGGTTCGTGTCACGTTTAAGAAGCGCGACTGAACAGGAGCACCTGT	360
	**	
CKAMP44syn	ACGAATTATGATACACCTCTGTGGCTCAATACCGGTAAACCGCTGCCCGCAAGACGAT	420
SecuenciaCKAMP44_RAT	ACCAACTACGACACGCCACTCTGGCTTAAACAGGGCAAGCCCCAGCGGTAAGGATGAC	420
	**	
CKAMP44syn	CCACTGCATGATCCGACTAAAGATAAAACAAATTTGATTGTTATATAATTTGTGGAGTA	480
SecuenciaCKAMP44_RAT	CCCTTGCACGACCCCTACCAAGGACAAGACCAACCTTATCGTCTACATCATCTGCCGGGTG	480
	**	
CKAMP44syn	GTTGCCGTGATGGTCTTGGTTGGTATTTTCACGAAACTGGCTTGGAAAAGGCTCATAGA	540
SecuenciaCKAMP44_RAT	GTGGCTGTCATGGTGTGGTGGGCATCTTCCAAAGCTGGGGCTGGAGAAAGCACACCGG	540
	**	
CKAMP44syn	CCTCAGCGGGAGCATATGTCACGGGCTCTGGCTGACGTGATGCGACCTCAAGGTCATTGT	600
SecuenciaCKAMP44_RAT	CCCCAAAGGGAACACATGTCAGAGCCCTTGCAGGATGTCATGAGGCCACAGGGCCACTGC	600
	**	
CKAMP44syn	AATACAGATCATATGGAACGAGATTTGAATATCGTGGTGCATGTCACACACACAAAAT	660
SecuenciaCKAMP44_RAT	AACACTGACCACATGGAGAGAGACCTTAAACATTTGCTGCCAGCTGACGATTTATGAGAAC	660
	**	
CKAMP44syn	ATGGATACGCGAACGCCGATTAACAACCTGCACACAACACAAATGAATAACGCCGTTCTC	720
SecuenciaCKAMP44_RAT	ATGGACACAAGAACCCCATAAATAATCTCCATACCACTCAGATGAACAATGCAGTGGCC	720
	*****	
CKAMP44syn	ACCAGCCCCCTTCTGCAACAAATGGGCCATCCCCACAGCTATCCGAATCTCGGGCAAATA	780
SecuenciaCKAMP44_RAT	ACTTCTCCTCTGCTCCAGCAGATGGGACACCCACATTATACCCCAACTGGGCGAGATT	780
	**	
CKAMP44syn	TCCAACCCTACGAGCAACAACCCCGGGGAAGGAACCTAATAAATACGCTAGCTTGAATA	840
SecuenciaCKAMP44_RAT	TCTAATCCATATGAACAGCAGCTCCAGGCAAGAGCTCAACAAGTATGCCTCCTTAAAG	840
	**	
CKAMP44syn	GCGGTGGGAAACGACAGCAGGATTTGGGCCGTTGCTACACTGAAATCCCCGAAGGCCGAT	900
SecuenciaCKAMP44_RAT	GCAGTAGGAAATGCTGATGGTGAAGTGGCAGTGGCAACGCTTAAAGTACCAAAAAGCTGAC	900
	**	
CKAMP44syn	AAAGTTAACGACGATTTCTATACTAAACGACGCCATCTTGCCGAATTGGCCGCAAAAGGG	960
SecuenciaCKAMP44_RAT	AAGGTCAATGATGACTTCTACACCAAGAGAAGGCACCTGGCAGAGCTAGCTGCCAAGGGA	960
	**	
CKAMP44syn	AACCTGCCCTTGCATCCGTTTTCGCTCGAGGACGAACCAAGAGCTTTTAGCCCCGAACAT	1020
SecuenciaCKAMP44_RAT	AATCTCCCTTTGCACCCGGTAAGAGTGAAGATGAGCCTCGGGCCTTTCAGCCAGAGCAC	1020
	**	
CKAMP44syn	GGACCCGCTCAACAAAACGGCCAGAAATCCCGGACTAATAAATGCCGCCTCACCTCTT	1080
SecuenciaCKAMP44_RAT	GGGCCTGCCAGCAGAAATGGACAGAAGTCTCGCACCAACAAGATGCCCCCGCATCCCCTG	1080
	**	
CKAMP44syn	GCTTATAATAGCACTGCAAAATTTCAAACATGGGATCCCTCAGATCAAAGCCTGCGCCGA	1140
SecuenciaCKAMP44_RAT	GCCTACAACTTACAGCCAACTTAAAGACCTGGGACCCCACTGACCAGTCTCTCCGGCGG	1140
	**	
CKAMP44syn	CAAGCCTATGGTAATAAAGGAAACTCGGAATTGCAGAAAGCGGGAGTTGTGATCCATTTG	1200
SecuenciaCKAMP44_RAT	CAGGCTTACGGCAACAAGGGCAAGCTTGGCATAGCTGAGTCAGGCTCTTGCAGCCCCCTG	1200
	**	
CKAMP44syn	GGCACCAGAACAACATTTTCCGCCAACCAACCTTATTTATTACGAATAGTAAGACT	1260
SecuenciaCKAMP44_RAT	GGGACTCGCACCCAGCACTTCCCACCCACAGCCATACTTATCACAACAGCAAAAACA	1260
	**	
CKAMP44syn	GAGGTAACGGTGTAG	1275

```

SecuenciaCKAMP44_RAT      GAAGTGACTGTCTGA      1275
** ** ** ** **
CKAMP52syn_Cterminal     ----- 0

```

### 9.3.3. Alineamiento de CKAMP52

**Amarillo:** Residuos de pRK5

**Verde:** Solapamiento de la secuencia de los fragmentos N-terminal y C-terminal

```

CKAMP52_RAT      -----ATGGCGCTGCGCCGCTCCTGCTGTCGCCTCT 32
CKAMP52syn_Nterminal  TTTTGTGGATGCTCTACTTTTCTTGGAAATGGCTTTCGGGAGACTGCTTCTCAGTCCATT 60

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      GCTGCTGTCGCTGCTGCTGTCGCTCGCTCCCTGCACCTGCCGCCGGCGCAGACGCCGC 92
CKAMP52syn_Nterminal GCTCCTCTCACTCTTGCTTAGCCTGGCTAGCCTTCATCTCCACCTGGGGCTGATGCAGC 120

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      CCGTGGCCGCTCCGCTAACCGGACCTGAGCGGGGAGCCGTCGGAGGTCGGCGAGCGGG 152
CKAMP52syn_Nterminal TAGAGGCCGGAGTGCTAATCGTACTCTTAGTGCCGGTGCGGTGGGGCCGAAGGGCCGG 180

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      GAGCGCCCTGGCCGAGCGACCGCGAGCTCAACAGCACCCGCGTGGGTCCGGCGTCTC 212
CKAMP52syn_Nterminal CTCAGCTCTCGCAAGGGGAGATAGGGAAGTGAATTCCTACTGCAAGAGGCAGTGGGGT 240

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      GGAGGCGGGCAGCCGGCGGGGACAGTCCGCAGCGGGCGGGCGGGCCAGCGCGACTGT 272
CKAMP52syn_Nterminal TGAAGCCGGTCCCGCAGGGGCCAAGCGCTGCTGCCCGCTGCTGCTTCCGCAACCGT 300

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      TACTTACGAGACGTGCTGGGCTACTACGAGTACGCGGCCAGTACGACAAGGAGTTCGA 332
CKAMP52syn_Nterminal GACCTATGAAACCTGTGGGGATATATGATGTATCCGGCAATATGACAAAGAATTCCA 360

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      GTGCAACAACAGCGAGAGCGGCTACCTGTACTGCTGCGGCACCTGCTACTATCGCTTCTG 392
CKAMP52syn_Nterminal ATGCAACAATAGCGAGTCAAGGTACCTGTACTGCTGTGGTACCTGCTACTATCGGTTCTG 420

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      CTGCAAGAAGGCCACGAGAAGCTGGACCAGCGCCAGTGCACCAACTACCAAGCCCGGT 452
CKAMP52syn_Nterminal TTGCAAGAAACGCCACGAGAACTGGACCAGCGTCAGTGCACCAACTACCAAGCCCGGT 480

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      ATGGGTGCAGACGCCACCAAGGTAGTGTGCGCGGGCCGAGAACCAAGTACGACCC 512
CKAMP52syn_Nterminal ATGGGTCCAGACACCTTCCACCAAGGTGTT----- 511
                **.* : *****.*

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      TGAAAAGGACAAGACCAACTTTACAGTTTACATCACTTGCGGAGTGATCGCATTCGTCT 110
CKAMP52syn_Nterminal AGAGAAGGACAAGACCAACTTTACCGTCTACATCACTTGCGGGTGATAGCCTTCGTCT 572
                ----- 511

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      CGTGCAGGTGTATTTCGCGAAGGTTTCATATGACAAGGCCACAGGCCACCTCGCGAGAT 170
CKAMP52syn_Nterminal CGTGGCGGGTGTCTTCGCGAAGGTTTCATATGACAAGGCCACAGGCCCTCGCGAGAGAT 632
                ----- 511

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      GAACATTCACAGGGCCTCGCGACATCCTGCGACAACAGGGCCCTATCCCATCGCACA 230
CKAMP52syn_Nterminal GAACATTCACAGGGCTCTGGCTGACATCCTAAGACAACAGGGACCAATCCCATAGCACA 692
                ----- 511

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      CTGTGAACGCGAAACCATCAGTGCCATCGATACCTCTCCCAAAGAGAACACGCCAGTACG 290
CKAMP52syn_Nterminal CTGTGAAAGAGAAACCATCTCGGCCATCGATACCTCTCCCAAAGAGAACACGCCCGTCCG 752
                ----- 511

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      TTCAACTAGCAAGAACCCTACACACCTGTGCGTACAGCCAAGCAGACCCAGGGGATCG 350
CKAMP52syn_Nterminal ATCAACCTCCAAAACCCTACACCCCTGTGCGCACAGCCAAGCAGACTCCAGGTGATCG 812
                ----- 511

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      TCAGTATAATCATCCGATTTCTCAGCTCCGCCACACAGACGCCACCCATGAGAAACCTAG 410
CKAMP52syn_Nterminal TCAGTATAATCATCCTATATTAAGCAGCGCTACCCAGACCCCTACGCATGAGAAACCCAG 872
                ----- 511

CKAMP52syn_Cterminal ----- 0
CKAMP52_RAT      AATGAATAACATCCTGACCAGTGCCACGGAGCCCTATGACCTCTCTTTCAGTCCGCTCCTA 470
CKAMP52syn_Nterminal GATGAATAACATCCTGACATCAGCCACAGAGCCCTATGACCTCTCTTTCGCGCTCTTA 932

```

CKAMP52syn_Nterminal	-----	511
CKAMP52syn_Cterminal	CCAGAACCTGGCGCACCTCCCCCATCTTATGAAAGCGCTGTGAAGACAAATCCGAGCAA	530
CKAMP52_RAT	CCAGAACTTAGCCCATTTGCCTCCATCATATGAATCTGCAGTGAAGACAAATCCGAGCAA	992
CKAMP52syn_Nterminal	-----	511
CKAMP52syn_Cterminal	GTACTCTTCTCTGAAGCGACTGACTGACAAGGAAGCGGATGAGTATTACATGCGGCGGAG	590
CKAMP52_RAT	GTACTCATCTCTGAAGAGGCTAACGGACAAGGAAGCTGATGAGTATTACATGAGAGGAG	1052
CKAMP52syn_Nterminal	-----	511
CKAMP52syn_Cterminal	ACACCTGCCCCGATCTCGCGCCAGAGGAACCTTCCATTGAACGTCATACAGATGTCACA	650
CKAMP52_RAT	GCACCTGCCAGATCTTGACGCCCGTGGTACTCTCCCCCTCAACGTCATCCAGATGTCTCA	1112
CKAMP52syn_Nterminal	-----	511
CKAMP52syn_Cterminal	ACAGAAACCTCTGCCTCGCGAAAGGCCCGCCGACCTATACGCGCCATGTCCCAGGATCG	710
CKAMP52_RAT	ACAGAAGCCTTCTCCTCGAGAACGGCCACGAGGCCATTAGGGCCATGTCCCAGGACAG	1172
CKAMP52syn_Nterminal	-----	511
CKAMP52syn_Cterminal	AGTCTTGTCCTCGCGGGGCTTCCCGATGAATTCGGCATGCCTTATGACCGCATCCT	770
CKAMP52_RAT	GGTCTTGCTCCACGTCGGGATGGCCAGATGAATTCGGCATGCCTTATGACCGCATCCT	1232
CKAMP52syn_Nterminal	-----	511
CKAMP52syn_Cterminal	CTCTGATGAACAGTTGCTCTCCACCGAGCGGCTTCACTCTCAGGACCCCTGCTGTCTCC	830
CKAMP52_RAT	GTCTGATGAACAGTGTCTCTCCACAGAGCGCTGCACCTCCAGGACCCGTTGCTGTCCCC	1292
CKAMP52syn_Nterminal	-----	511
CKAMP52syn_Cterminal	TGAGAGAACTGCTTTCCTTGAGCAGAGTCTGAGCCGGGCCATAAGTCACACAGAGTCTT	890
CKAMP52_RAT	AGAGAGGACAGCTTTCCTGGAGCAGTCTGCTCGCGGGCCATCTCGCACACGGAGTCTT	1352
CKAMP52syn_Nterminal	-----	511
CKAMP52syn_Cterminal	TGTGTCAACACCTGTGCTGGACAGATACCGAATGACCAAAATGCACAGCCATCCGCTCTGC	950
CKAMP52_RAT	TGTGTCCACACAGTGTGACCGGTTACCGCATGACCAAGATGCACCTCCATCCAGTGC	1412
CKAMP52syn_Nterminal	-----	511
CKAMP52syn_Cterminal	CAGCAATAACAGTTATGCCACTCTTGGCCAGAGCCAGACTGCAGCCAAGAGGCATGCCTT	1010
CKAMP52_RAT	CTCCAATAACTCCTATGCCACCTGGGCCAGAGCCAGACGGCAGCCAAGCGCCATGCCTT	1472
CKAMP52syn_Nterminal	-----	511
CKAMP52syn_Cterminal	TGCTAGCAGGAGACATAACACAGTGAACAGTTGCACTATATCCCGGGCCATCACACCTG	1070
CKAMP52_RAT	TGCCCTCTCGCAGACATAACACGGTGAACAGCTGCACATATATCCCGGGCCATCACACCTG	1532
CKAMP52syn_Nterminal	-----	511
CKAMP52syn_Cterminal	CTACACGGCGTCCAAGACCGAAGTGCAGTGTCTGAGGTGCTGTTTCAGGGA	1122
CKAMP52_RAT	CTACACAGCCAGCAAGACCGAAGTGCAGTGTGA-----	1566
CKAMP52syn_Nterminal	-----	511

### 9.3.4. Alineamiento de CKAMP59

CKAMP59_RAT	ATGCCGGCCCTGCTGTTGATCGGGACCGTCGCGCTGCTAGCCTCCACCGGGGCCCGGTG	60
CKAMP59syn	ATGCCGGCCCTGCTGTTGATCGGGACCGTCGCGCTGCTAGCCTCCACCGGGGCCCGGTG	60
	*****	
CKAMP59_RAT	GGGGCGCGCCATCCAACGACACAAGCGCCGTGGCCCCGGGCCGCTGCCGCGCTACTC	120
CKAMP59syn	GGGGCGCGCCATCCAACGACACAAGCGCCGTGGCCCCGGGCCGCTGCCGCGCTACTC	120
	*****	
CKAMP59_RAT	GCGCACCTGCGGCGCCTGACCGGGGCTCTGGCGGGCGGGGAGCGCAGCGGGCCCAAC	180
CKAMP59syn	GCGCACCTGCGGCGCCTGACCGGGGCTCTGGCGGGCGGGGAGCGCAGCGGGCCCAAC	180
	*****	
CKAMP59_RAT	GCCAACGCCACCAAGACCAGCCCCGCGGGTGGCACGGGTGCAGCGGCACGGGCGCCCCCT	240
CKAMP59syn	GCCAACGCCACCAAGACCAGCCCCGCGGGTGGCACGGGTGCAGCGGCACGGGCGCCCCCT	240
	*****	
CKAMP59_RAT	CCGGCCGAGCTCTGCCATGGCTACTACGATGTATGGGCCAGTACGACGCCACCTTCAAC	300
CKAMP59syn	CCGGCCGAGCTCTGCCATGGCTACTACGATGTATGGGCCAGTACGACGCCACCTTCAAC	300
	*****	
CKAMP59_RAT	TGCAGCACCGGCTCCTACCGCTTCTGCTGTGGCACCTGCCACTACCGTTTCTGCTGCGAG	360
CKAMP59syn	TGCAGCACCGGCTCCTACCGCTTCTGCTGTGGCACCTGCCACTACCGTTTCTGCTGCGAG	360
	*****	
CKAMP59_RAT	CACCGCCACATGCGCCTGGCGCAGGCCTCCTGCTCCAACACGACACACCACGCTGGGCC	420
CKAMP59syn	CACCGCCACATGCGCCTGGCGCAGGCCTCCTGCTCCAACACGACACACCACGCTGGGCC	420
	*****	

CKAMP59_RAT	ACCACGCCCGCCGCTGGCTGGAGCGCCGGGGCGCTGGGGGTGCGGGTGGGGGGCCA	480
CKAMP59_syn	ACTACACCTCCTCCTTGAGGTGGAGCTGGTGGAGCAGGTGGAGCTGGAGGAGGACCA ** **.* ****	480
CKAMP59_RAT	GGGCCAGGCCAGGCAGGTTGGCTGGAAGGGGGCAGGCCGGGGCGCTGGGGTTCGTGGG	540
CKAMP59_syn	GGTCCAGGTCAAGCAGGATGGTTGGAAGGTGGTAGAGCAGGTGGTGCAGGTGGAAGAGGT ** **.* ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ****	540
CKAMP59_RAT	GGAGAGGGCCAGGGGCGAGCACAGCCTACGTGGTGTGCGGAGTCATCAGTTTCGCTCTG	600
CKAMP59_syn	GGTGAAGGACCAGGGGCGAGCACAGCCTACGTGGTGTGCGGAGTCATCAGTTTCGCTCTG **.* ** ** **^** ** ** **^** ** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	600
CKAMP59_RAT	GCGGTGGGCGTCGGTGCCAAAGTGGCCTTACGCAAGGCGTCACGTGCGCCAGGGCGCAC	660
CKAMP59_syn	GCGGTGGGCGTCGGTGCCAAAGTGGCCTTACGCAAGGCGTCACGTGCGCCAGGGCGCAC ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	660
CKAMP59_RAT	CGGGAGATCAACGTGCCAGAGCTCTGGTGGATATTCTCAGGCATCAAGCAGGACCTGCA	720
CKAMP59_syn	CGGGAGATCAACGTGCCAGAGCTCTGGTGGATATTCTCAGGCATCAAGCAGGACCTGCA ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	720
CKAMP59_RAT	ACCCGCCCGGACCGGGCCAGAAGCAGTTCTTGACCCAGGGCTGGGAGGCCAGAGAGC	780
CKAMP59_syn	ACCCGCCCGGACCGGGCCAGAAGCAGTTCTTGACCCAGGGCTGGGAGGCCAGAGAGC ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	780
CKAMP59_RAT	ATGGCCCTTAGGACGCCAAGAACCTTTACAACACCATGAAGCCCTCCAACCTTGATAAC	840
CKAMP59_syn	ATGGCCCTTAGGACGCCAAGAACCTTTACAACACCATGAAGCCCTCCAACCTTGATAAC ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	840
CKAMP59_RAT	CTGCATACAACGTCAACAGTCCCAAGCACCAGCCGCCACACTGGACTGGCGTGCTATG	900
CKAMP59_syn	CTGCATACAACGTCAACAGTCCCAAGCACCAGCCGCCACACTGGACTGGCGTGCTATG ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	900
CKAMP59_RAT	CCACCGCCAGCCCTTCCCTGCACTACTCTACGCTGTCTCGATCCTTCCACAAC	960
CKAMP59_syn	CCACCGCCAGCCCTTCCCTGCACTACTCTACGCTGTCTCGATCCTTCCACAAC ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	960
CKAMP59_RAT	CTCTCTCATCTTCCCCATCGTATGAGGCGGCTGTGAAATCAGAATTGAATCGATACTCT	1020
CKAMP59_syn	CTCTCTCATCTTCCCCATCGTATGAGGCGGCTGTGAAATCAGAATTGAATCGATACTCT ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	1020
CKAMP59_RAT	TCCCTCAAGAGACTGGCTGAGAAAGTCTGGATGAAGCCTACCTGAAGCGCAGACATCTA	1080
CKAMP59_syn	TCCCTCAAGAGACTGGCTGAGAAAGTCTGGATGAAGCCTACCTGAAGCGCAGACATCTA ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	1080
CKAMP59_RAT	GAGATGCCACGTGGAACACTGCCTTTGCATGCACTCCGGCGGCCAGGCACTGGAGGTGGC	1140
CKAMP59_syn	GAGATGCCACGTGGAACACTGCCTTTGCATGCACTCCGGCGGCCAGGCACTGGAGGTGGC ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	1140
CKAMP59_RAT	TACCGCATGGATGGCTGGGGTGGCCCTGAGGAGCTGGGCCTGGCACCGGCACCCAACCCC	1200
CKAMP59_syn	TACCGCATGGATGGCTGGGGTGGCCCTGAGGAGCTGGGCCTGGCACCGGCACCCAACCCC ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	1200
CKAMP59_RAT	CGGCGGGTTATGTCCCAGGAGCACCTGCTGGGTGATGGCGCCGAGCTTCCCGTATGAG	1260
CKAMP59_syn	CGGCGGGTTATGTCCCAGGAGCACCTGCTGGGTGATGGCGCCGAGCTTCCCGTATGAG ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	1260
CKAMP59_RAT	TTACATTTGCTCGAGCGCCTGGTGTCTCAAGAACACCTGCTGCTATCCTCACCGGAG	1320
CKAMP59_syn	TTACATTTGCTCGAGCGCCTGGTGTCTCAAGAACACCTGCTGCTATCCTCACCGGAG ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	1320
CKAMP59_RAT	GCGCTTCGCGAGAGTCGCGAGCACCTGCTGTACCCCCACGAAGTCCTGCACTGCCCCCA	1380
CKAMP59_syn	GCGCTTCGCGAGAGTCGCGAGCACCTGCTGTACCCCCACGAAGTCCTGCACTGCCCCCA ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	1380
CKAMP59_RAT	GATCCCACCACCCGGGCCAGCCTGGCTGCCTCACACTCCAACCTGTGCTGGGGCCTGGG	1440
CKAMP59_syn	GATCCCACCACCCGGGCCAGCCTGGCTGCCTCACACTCCAACCTGTGCTGGGGCCTGGG ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	1440
CKAMP59_RAT	GGCCCCCACCACCCCTGCATGGGTTGCCTCCATCAGGCCTGCATGCCACCATCACCAT	1500
CKAMP59_syn	GGCCCCCACCACCCCTGCATGGGTTGCCTCCATCAGGCCTGCATGCCACCATCACCAT ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	1500
CKAMP59_RAT	GCCCTTCATGGCTCTCCTCAGCCAGCCTGGATGTCTGATGCGGGCGGGGTGGGGGCACA	1560
CKAMP59_syn	GCCCTTCATGGCTCTCCTCAGCCAGCCTGGATGTCTGATGCGGGCGGGGTGGGGGCACA ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	1560
CKAMP59_RAT	CTGGCCCGCAGGCCACCTTTCAGCGCCAGGGAACCTGGAGCAGCTGCAGTTCATTCTCT	1620
CKAMP59_syn	CTGGCCCGCAGGCCACCTTTCAGCGCCAGGGAACCTGGAGCAGCTGCAGTTCATTCTCT ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	1620
CKAMP59_RAT	GGGCACCCTTGCCCCAGCACCTGCGCACTGCCAGCAAGAACGAAGTACTGTCTGA	1677
CKAMP59_syn	GGGCACCCTTGCCCCAGCACCTGCGCACTGCCAGCAAGAACGAAGTACTGTCTGA ** ** **^** ** **^** ** **^** ** **^** **^**	1677

#### 9.4. ANEXO IV: SECUENCIA DE LOS OLIGOS DISEÑADOS

**Tabla 2.** Secuencia de los oligos diseñados. En azul secuencia del pRK5 (zona de homología), en rojo, secuencia de nucleótidos de la proteína (zona de «*annealing*»).

Cebador	Secuencia	Temperatura de « <i>annealing</i> »
CKAMP39_pRK5_FW	TGCTCTACTTTTCTTGGAAATGGAAAGAGCGGGTG CAAGG	56,3°C
CKAMP39_pRK5_RV	CTGAAACAGCACCTCCAGCACCGTCACTTCTGCCT TGC	55,9°C
CKAMP44_pRK5_FW	TGCTCTACTTTTCTTGGAAATGCGCGGGTGTTGAG ATTG	56,3°C
CKAMP44_pRK5_RV	GAAACAGCACCTCCAGCACCGTTACCTCAGTCTTA CTATT	54°C
CKAMP59_pRK5_FW	ATGCTCTACTTTTCTTGGAAATGCCGGCCCTGCTGT TG	54,9°C
CKAMP59_pRK5_RV	TGAAACAGCACCTCCAGGACAGTCACTTCGTTCTT GC	51,8°C
pRK5_FW	CTGGAGGTGCTGTTTCAGGGACC	60,6°C
pRK5_RV	TTCCAAGAAAAGTAGAGCATCCACAAAATATCCC	60,8°C

## 9.5. ANEXO V: LISTA DE MEDIOS Y TAMPONES EMPLEADOS

### 9.5.1. Composición del medio SOB (1L)

- 20 g triptona
- 5 g levadura
- 2 ml de 5M NaCl
- 2,5 ml de 1M KCl
- 10 ml de 1M MgCl<sub>2</sub>
- 10 ml de 1M MgSO<sub>4</sub>
- H<sub>2</sub>O miliQ hasta 1L

### 9.5.2. Composición del medio LB-agar (1L)

- 10 g triptona
- 10 g NaCl
- 5 g levadura
- 950 ml H<sub>2</sub>O miliQ

### 9.5.3. Composición del medio LB24 (1L)

- 10 g triptona
- 5 g NaCl
- 24 g levadura
- 950 ml H<sub>2</sub>O miliQ

### 9.5.4. Composición de TBE (1L)

- 54g Tris
- 27,5 g ácido bórico
- H<sub>2</sub>O miliQ hasta 1L

### 9.5.5. SDS-PAGE

**Tabla 3.** Composición de dos geles de electroforesis SDS-PAGE con 10 o 12% de acrilamida, incluyendo la del gel concentrador (4% en acrilamida).

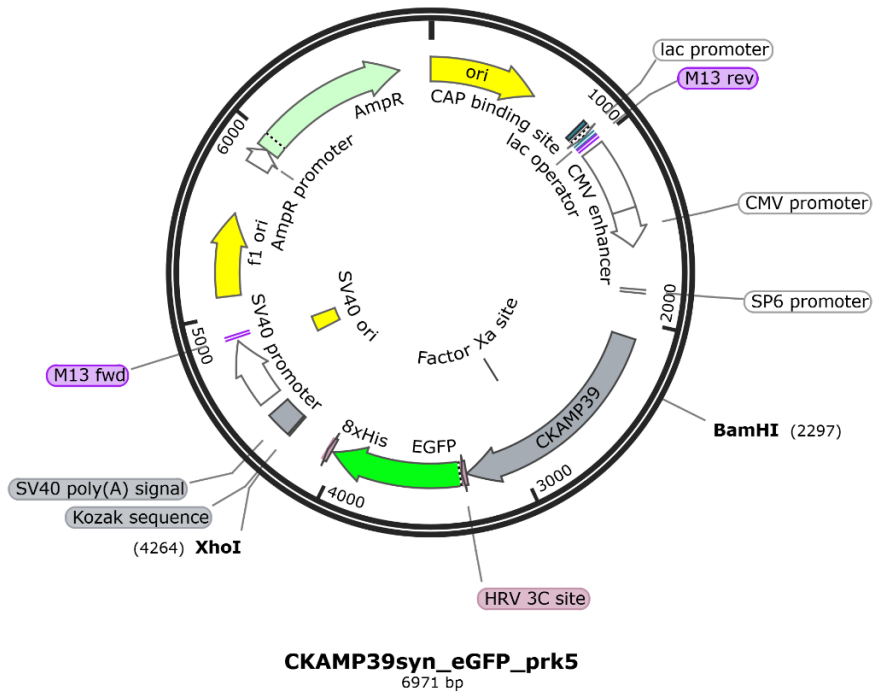
	<b>Gel separador 10%</b>	<b>Gel separador 12%</b>	<b>Gel concentrador 4%</b>
H <sub>2</sub> O mQ	4 ml	3,34 ml	3,2 ml
Acrilamida 30%	3,33 ml	4 ml	666 µl
Tris 1,5M pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	
Tris 1M pH 6,8			625 µl
SDS 20%	50 µl	50 µl	25 µl
APS 20%	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	5 µl

### 9.5.5. Composición de la solución de transferencia (1L)

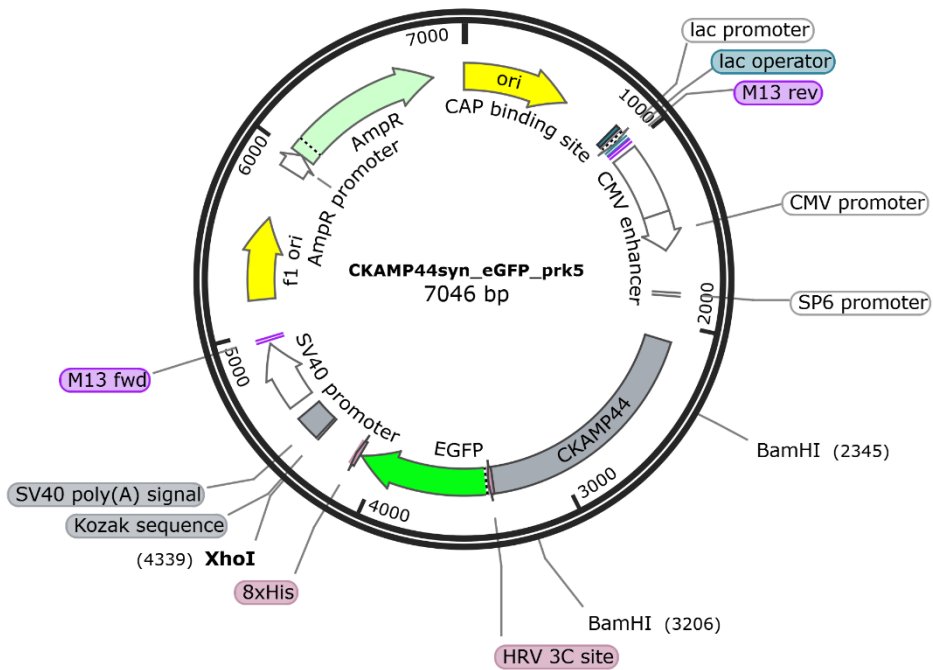
- 200 ml de transfer buffer 5x (*BIORAD*)
- 600 ml de H<sub>2</sub>O miliQ
- 200 ml de etanol puro

## 9.6. ANEXO VI: MAPA DE LOS VECTORES pRK5

### 9.6.1. Mapa de pRK5 con CKAMP39-GFP

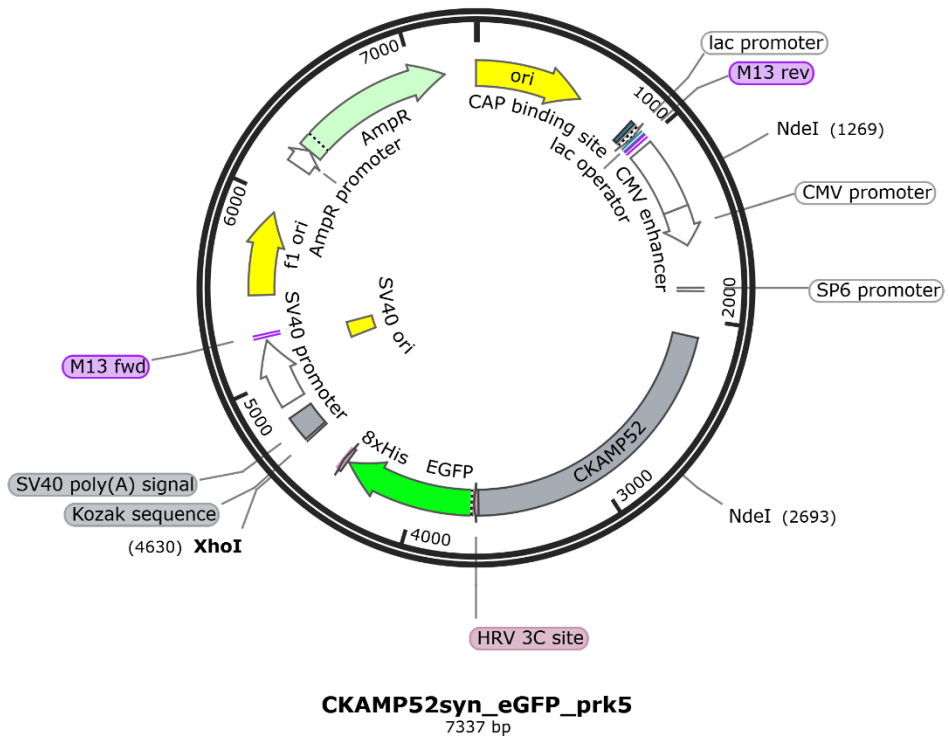


### 9.6.2. Mapa de pRK5 con CKAMP44-GFP

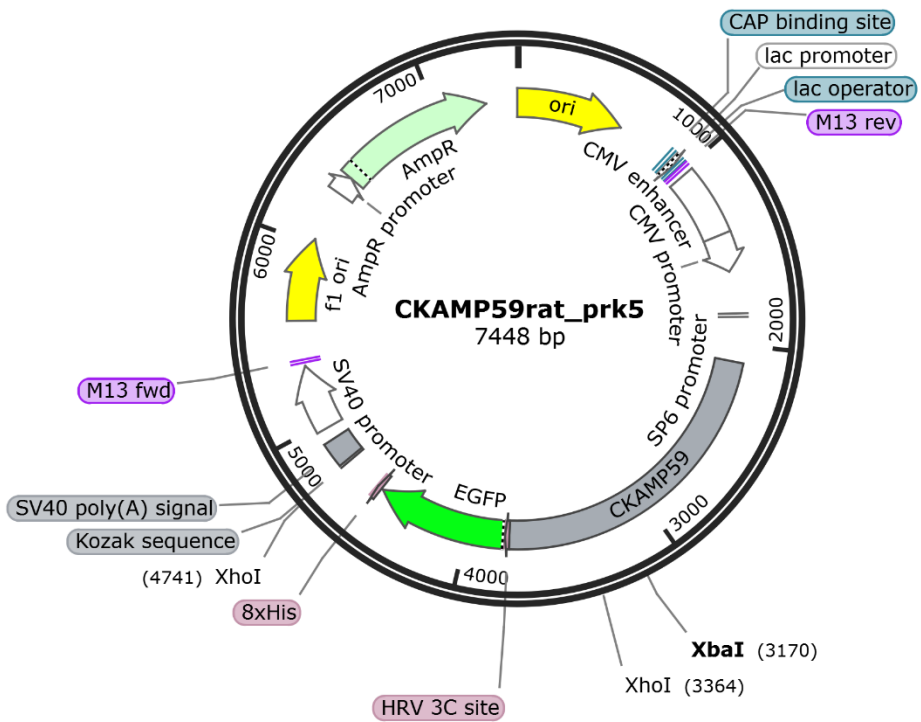




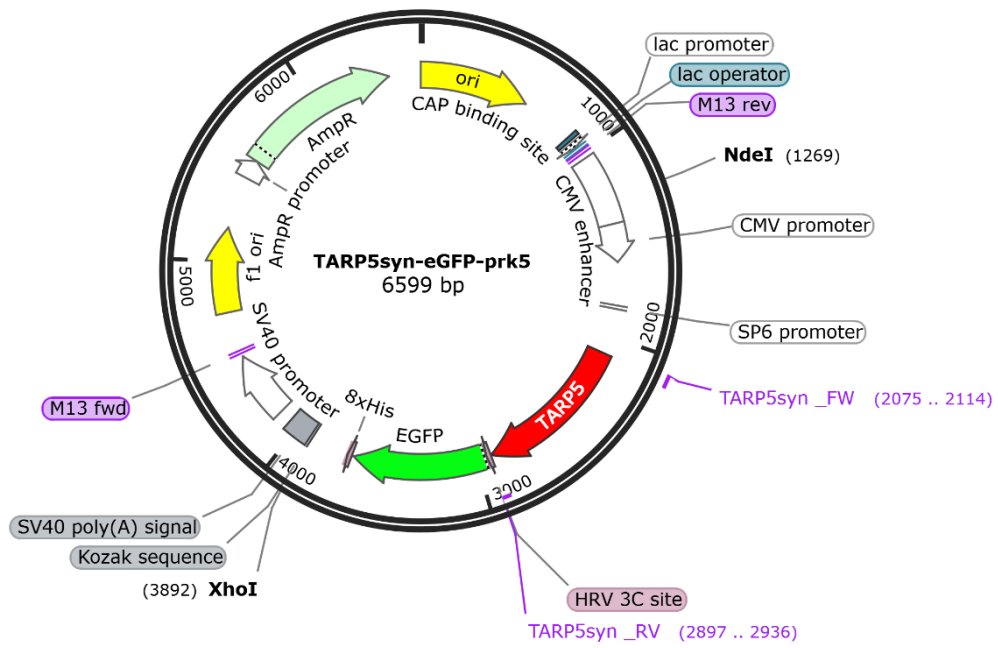
9.6.3. Mapa de pRK5 con CKAMP52-GFP



9.6.4. Mapa de pRK5 con CKAMP59-GFP



9.5.5. Mapa de pRK5 con TARP $\gamma$ 5-GFP (vector utilizado para el clonaje)



## 9.7. ANEXO VII: LISTADO DE ABREVIATURAS

AMPAR	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico receptor
ATD	Dominio amino-terminal
CKAMP	Cysteine-knot AMPAR modulatory protein
CNIH	Cornichon homolog
CTD	Dominio intracelular C-terminal
C-terminal	Carboxilo terminal
DDM	Detergente n-Dodecyl-beta-Maltoside
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EST	Expressed Sequence Tags
FBS	Suero fetal bovino
FT	Flow through
g	Fuerza centrífuga
g	Gramo
GC	Guanina y citosina
GDN	Glyco-diosgenin
GFP	Green Fluorescent Protein
GluA	Glutamate AMPA receptor
HRP	Horseradish peroxidase
IVA	In Vivo Assembly
L	Litro
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LBD	Dominio de unión a ligando
M	Concentración molar
ml	Mililitro
mM	Concentración milimolar
ng	Nanogramo

nM	Concentración nanomolar
NTD	Dominio N-terminal
N-terminal	Amino terminal
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Polimerase Chain Reaction
PEI	Polietilenimina
P/S	Penicilina/estreptomicina
RAIR	RecA-independent recombination
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOB	Super optimal broth
TARP	Transmembrane AMPAR regulatory protein
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
T <sub>m</sub>	Melting temperature
TMD	Dominio transmembrana
V	Voltio
°C	Grado centígrado
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Concentración micromolar