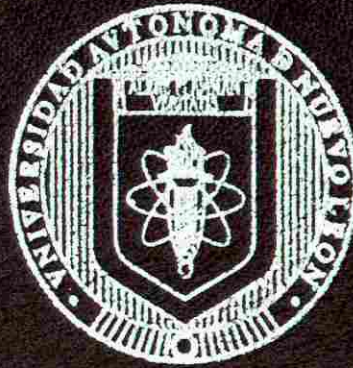


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**CLONACION DE UN PROMOTOR ESPECIFICO
DE NEURONAS DOPAMINERGICAS MESENCEFALICAS
Y SU ANALISIS FUNCIONAL *in vitro***

**POR
M.C. DIANA LAURA CASTILLO CARRANZA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ORIENTACION EN MORFOLOGIA**

AGOSTO 2006

TD

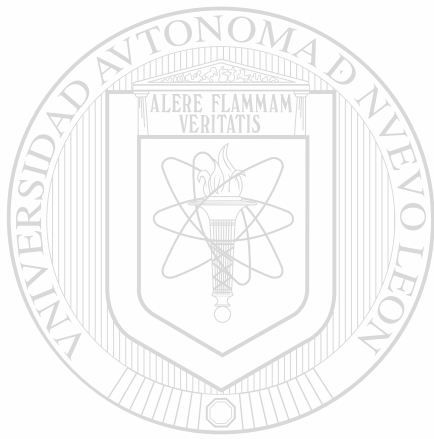
QP563

D66

C37

2006

e.1



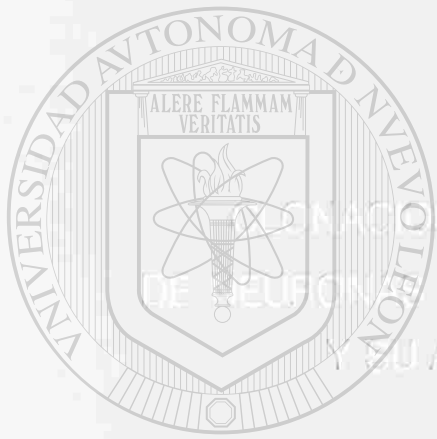
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



DESIGNACIÓN DE UN PROMOTOR ESPECÍFICO
DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS MESENFALICOS
Y SU ANÁLISIS FUNCIONAL *in vitro*

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POR

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ORIENTACION EN MORFOLOGIA

AGOSTO 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CLONACIÓN DE UN PROMOTOR ESPECÍFICO DE NEURONAS
DOPAMINÉRGICAS MESENFÁLICAS Y SU ANÁLISIS FUNCIONAL**

in vitro

UANL

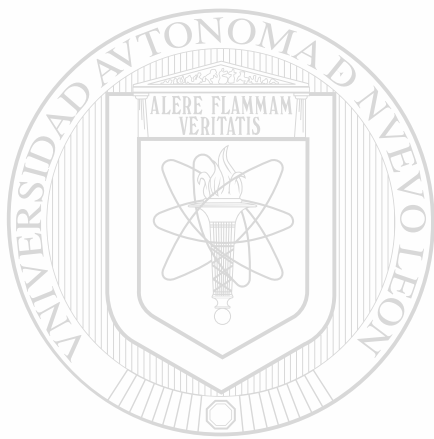
Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
M.C. DIANA LAURA CASTILLO CARRANZA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Orientación en Morfología**

Agosto, 2006



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL y en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la codirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna y el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



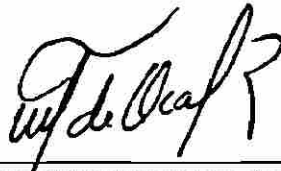
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**CLONACIÓN DE UN PROMOTOR ESPECÍFICO DE NEURONAS
DOPAMINÉRGICAS MESENFALICAS Y SU ANÁLISIS
FUNCIONAL *in vitro***

Aprobación de la Tesis:



DRA. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS
Director de Tesis



DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
Co-Director de Tesis



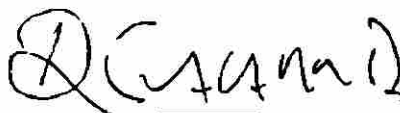
DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Co-Director de Tesis



DRA. MARIA ESTHELA MORALES PÉREZ
Comisión de Tesis



DR. JOSÉ CARLOS JAIME PÉREZ
Comisión de Tesis

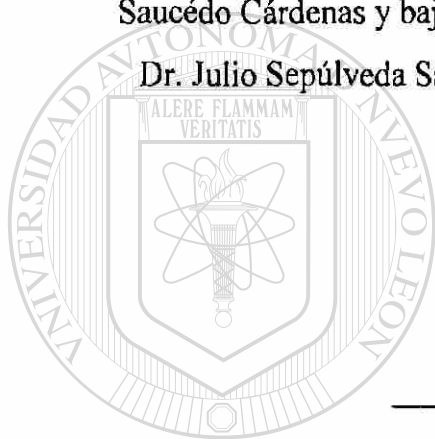


DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Postgrado

**CLONACIÓN DE UN PROMOTOR ESPECÍFICO DE NEURONAS
DOPAMINÉRGICAS MESENCEFÁLICAS Y SU ANÁLISIS FUNCIONAL**
in vitro

Presentado por la M.C. Diana Laura Castillo Carranza

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucédo Cárdenas y bajo la co-dirección de: Dr. Roberto Montes de Oca Luna y el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL



Dra. Odila Saucédo Cárdenas

Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dr. Roberto Montes de Oca Luna

Co-Director

Dr. Julio Sepúlveda Saavedra

Co-Director

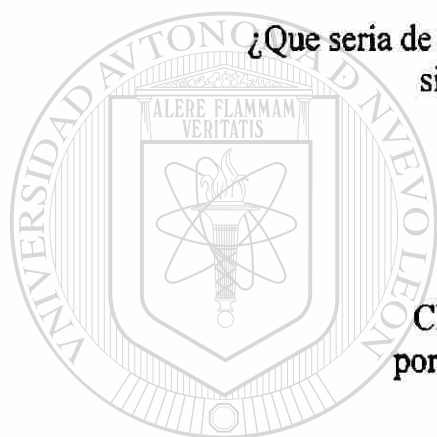
DEDICATORIA

A mis padres

Por que siempre han estado conmigo y han tenido la paciencia de soportar muchas de mis necesidades pero sobre todo por que siempre me han permitido ser yo misma.
Los quiero mucho.

A mis hermanos

Quique y Chuy, por que:
¿Que seria de la vida sin un hermano con quien discutir?, simplemente gracias por existir.



A mis sobrinos

Chuy, Anaid, Quiquín y la chuky por tener una tía tan paciente, jajaja.

A mi familia

Muchas gracias.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mi flaco

Por que está siempre conmigo en las buenas, en las malas, pero sobre todo por la paciencia que tiene forzosamente para conmigo.

TQM

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, al CONACYT por la beca proporcionada que me permitió continuar con mis estudios de postgrado.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por aceptarme en el postgrado en Morfología por segunda ocasión y por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por todo el tiempo invertido en mi desarrollo profesional y por su ayuda en las diferentes etapas de la realización de este trabajo.

A la comisión de tesis: Dr. José Carlos Jaime Pérez por sus comentarios siempre alentadores, y a la Dra. María Estela Morales Pérez muchas gracias.

Al Dr. Arturo Chávez Reyes por dejarme fusilar sus reactivos y por toda la ayuda, brindada, mil gracias.

A mis compañeros de Laboratorio: Blanca, Cecy, Maribel, Arnulfo de Zavala, Lalo, Adolfo, Cristian, Laura, Marichu, Julio, Alicia, Vivi, Katy, por todos los gratos momentos que me llevo y que recordare siempre.

Pero sobre todo muchas gracias a aquellos que sin estar involucrados en este trabajo fueron de gran ayuda, Marisela, Carmen, Claudio, Lety e Iram.

Al personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL por facilitar sus instalaciones para la realización de este trabajo.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
NOMENCLATURA	iii
RESUMEN	iv
CAPITULO 1. INTRODUCCION	
1.1 Neuronas dopaminérgicas mesencefálicas	2
1.1.1 Genes involucrados en la diferenciación de Neuronas dopaminérgicas Mesencefálicas	3
1.2 Knockout condicional	4
1.3 Sistema Cre/loxP	4
1.3.1 Cre recombinasa	5
1.3.2 Función de Cre recombinasa en el bacteriófago P1	5
1.3.3 LoxP	6
1.3.4 Mecanismo de recombinación	6
1.3.5 Aplicaciones del sistema Cre/loxP	8
1.3.6 Expresión de la enzima Cre recombinasa en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas	10
1.4 Pitx3	10
1.4.1 Organización estructural del gen Pitx3	11
1.4.2 Deleción en la región 5' del gen Pitx3.	12
1.5 Justificación	14
1.6 Objetivos	15
1.6.1 Objetivo general	15
1.6.2 Objetivos específicos	15
1.7 Estrategia experimental	16

CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS

2.1	Material	17
2.1.1	Origen de los reactivos	17
2.1.2	Material biológico	18
2.2	Equipo	19
2.3	Métodos	20
2.3.1	Construcción de un vector de expresión de la enzima Cre recombinasa	20
2.3.1.1	Subclonación del gen de la enzima Cre recombinasa.	20
2.3.1.1.1	Digestión con enzimas de restricción	20
2.3.1.1.2	Purificación de fragmentos	20
2.3.1.1.3	Ligación	21
2.3.1.1.4	Transformación	21
2.3.1.1.5	Extracción de ADN plasmídico (minipreparación de plásmidos).	22
2.3.1.1.6	Linearización del vector pBS-Cre con enzimas de restricción	23
2.3.1.1.7	Conversión de los extremos cohesivos en extremos en romos	23
2.3.2.3	Amplificación y clonación de la región 5' del gen Pitx3	24
2.3.2.3.1	Extracción de ADN genómico	24
2.3.2.3.2	PCR	25
2.3.2.3.3	Clonación de la región 5' del gen Pitx3	26
2.3.2.3.4	Extracción de ADN plasmídico a gran escala.	27
2.3.2	Análisis de la actividad promotora del gen Pitx3 <i>in vitro</i>	28
2.3.2.1	Cultivo celular	28
2.3.2.2	Transfección de las líneas celulares	28
2.3.2.2.1	Obtención de las células transfectadas con tripsina-EDTA	29
2.3.2.3	Obtención del ARN total de las líneas celulares transfectadas	30
2.3.2.3.1	RT-PCR	31
2.3.2.3.2	Amplificación por PCR de diversos genes a partir del ADNc de las células transfectadas	32
2.3.2.4	Obtención de proteínas de las líneas celulares transfectadas.	33
2.3.2.4.1	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	33
2.3.2.4.2	Western blot	34
2.3.2.4.3	Revelado y fijación de la película aurtorradiográfica	35
2.3.3	Análisis de la actividad recombinante de la Cre recombinasa <i>in vitro</i>	35
2.3.3.1	Obtención de ADN plasmídico de las líneas celulares transfectadas	35
2.3.3.2	Determinación del evento de recombinación por PCR.	36

CAPITULO III. RESULTADOS

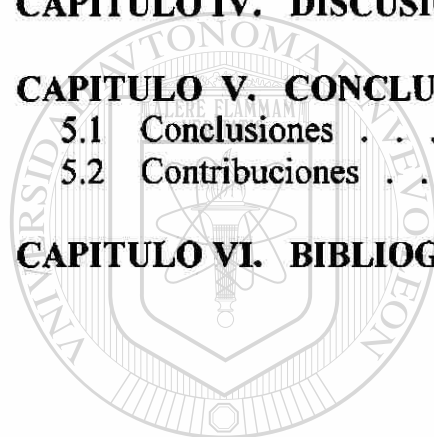
3.1	Subclonación del gen de la enzima Cre recombinasa	37
3.2	Amplificación y clonación de la región 5' del gen Pitx3.	39
3.3	Expresión específica del gen Pitx3 en la línea celular SH-SY5Y	40
3.4	Análisis funcional del promotor Pitx3 clonado en el vector pPit-cre.	41
3.5	Identificación de la enzima Cre recombinasa por Western blot	43
3.6	Determinación de la actividad de la enzima Cre recombinasa <i>in vitro</i>	44
3.6.1	Confirmación de la presencia de los vectores que portan el gen de la Cre-recombinasa (pPit-Cre y pCMV-Cre) en la línea celular SH-SY5Y	44
3.6.2	Recombinación <i>in vitro</i> de los sitios loxP del plásmido pLoxA por la enzima Cre recombinasa dirigida por la región promotora del gen Pitx3	46

CAPITULO IV. DISCUSION DE RESULTADOS 48

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIONES

5.1	Conclusiones	55
5.2	Contribuciones	56

CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA 57



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

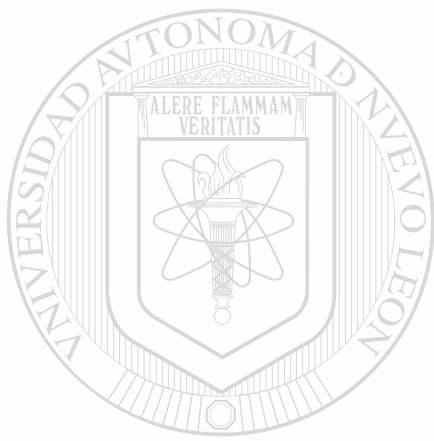
LISTA DE TABLAS

PAGINA

Tabla 1. Amplificación de la región 5' del gen Pitx3: condiciones de reacción. .25

Tabla 2. Programa utilizado en la amplificación de la región 5' del gen Pitx3 . .26

Tabla 3. RT-PCR: condiciones de reacción.31



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 1. Secuencia nucleotídica de un sitio LoxP	6
Figura 2. Reconocimiento de secuencias LoxP por la enzima Cre recombinasa	7
Figura 3. Mecanismo de recombinación de secuencias LoxP	8
Figura 4. Estrategia experimental	16
Figura 5. Digestión enzimática de los vectores pCMV-Cre y pBSKS	37
Figura 6. Caracterización enzimática del plásmido recombinante pBS-Cre	38
Figura 7. Amplificación de la región 5' del gen Pitx3 y su sitio de clonación en el vector pBS-Cre linearizado.	39
Figura 8. Caracterización enzimática del plásmido recombinante pPit-Cre . .	40
Figura 9. Expresión del gen Pitx3 en la línea celular SH-SY5Y	41
Figura 10. Expresión del gen de la Cre recombinasa	42
Figura 11. Identificación de la proteína Cre recombinasa mediante análisis de Western Blot.	43
Figura 12. Amplificación del gen de la Cre recombinasa por PCR, a partir del ADN plasmídico recuperado de la transfección de la línea celular SH-SY5Y.	45
Figura 13. Actividad de la enzima Cre recombinasa <i>in vitro</i>	47

NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	DNA complementario al RNA mensajero
EDTA	Acido etilen diamino tetracético
ARN	Acido ribonucleico
a.a.	Amino ácidos
μ M	Concentración micromolar
mM	Concentración milimolar
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
°C	Grados centígrados
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
KO	Knockout
UV	Luz ultravioleta
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
mQ	MiliQ
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central
TH	Tirosina hidroxilasa
UTR	No traducible

RESUMEN

Diana Laura Castillo Carranza
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Agosto del 2006

Título del estudio: CLONACIÓN DE UN PROMOTOR ESPECÍFICO DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESENFALICAS Y SU ANÁLISIS FUNCIONAL *in vitro*

Número de páginas: 60

Candidata para el grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Morfología

Área de estudio: Morfología

Objetivo y Método del estudio: El factor de transcripción *Nurr1* es importante para la diferenciación y mantenimiento de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Esto quedó demostrado, al ser inactivado mediante recombinación homóloga en un animal murino. Los ratones knockout recién nacidos mueren durante el primer día de vida y aún se desconoce cual de las regiones donde se eliminó la expresión del gen *Nurr1* es la responsable del fenotipo obtenido. Para la obtención de un Knockout condicional del gen *Nurr1* en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, es necesario desarrollar dos líneas de ratones. Una de ellas que contenga el gen *Nurr1* flanqueado por secuencias *LoxP* y otra que exprese la enzima *Cre* recombinasa únicamente en el mesencéfalo. En la progenie obtenida de la cruce de ambos ratones, ocurrirá la recombinación de las secuencias *LoxP* y por lo tanto la eliminación del gen *Nurr1* situado entre ellas. Para dirigir la expresión de la enzima *Cre* recombinasa en el mesencéfalo, se utilizó la región 5' del gen *Pitx3*. El factor de transcripción *Pitx3* se expresa exclusivamente en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y en ninguna otra región del Sistema Nervioso. La región promotora del gen *Pitx3*, aún no ha sido delimitada, ni se ha utilizado para dirigir la expresión de algún gen en ensayos *in vitro*. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Obtener un vector para la expresión de la *Cre* recombinasa bajo la regulación de la posible región promotora del gen *pitx3*. 2) Demostrar la funcionalidad como promotor de la región 5' del gen *pitx3*. 3) Evaluar la actividad de la enzima *Cre* recombinasa del vector de expresión construido.

Contribuciones y conclusiones: Se obtuvo un cassette de expresión para la enzima *Cre* recombinasa bajo la regulación de la región 5' del gen *Pitx3* murino. Con la construcción obtenida, pudimos comprobar que la secuencia de 4.1 kb de la región 5' utilizada, tiene la capacidad de actuar como promotor al permitir la transcripción del gen de la enzima *Cre* recombinasa. Asimismo, comprobamos que la enzima *Cre* recombinasa transcrita por el promotor del gen *Pitx3*, es funcional al recombinar secuencias *LoxP* presentes en el plásmido *pLoxA* mediante estudios *in vitro*. Estos resultado demuestran que la construcción obtenida podrá ser utilizada para desarrollar una línea de ratones transgénicos que expresen la enzima *Cre* recombinasa específicamente en el mesencéfalo.



Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Asesor

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano es uno de los organismos más complejos en cuanto a organización y función. Estructuralmente esta formado por más de 200 diferentes tipos de células, cada una de ellas con un tiempo de vida promedio. Una vez que estas células mueren, son renovadas manteniendo así la homeostasis del tejido al que pertenecen. Sin embargo existe un tipo celular que una vez que han sido diferenciadas en su totalidad, se mantienen presentes durante toda la etapa de vida del individuo sin sufrir recambio. Este tipo de células se conocen como neuronas y pertenecen al tejido nervioso. Normalmente hay una pérdida constante de neuronas durante la vida de un individuo, sin embargo una exposición prolongada de estas células a los efectos tóxicos de diferentes tipos de compuestos químicos y drogas de uso común, pueden provocar disfunción mitocondrial y daño citotóxico, sin excluir factores genéticos que conducen a la pérdida acelerada de este tipo celular.

Por otra parte, el aumento del promedio de vida del hombre ha conducido a un incremento en el número de individuos con enfermedades de tipo degenerativas, siendo el tejido nervioso uno de los más susceptibles a dañarse conforme avanza la edad del individuo. El sistema nervioso tiene como función regular todas las actividades motoras, cognitivas y de conducta de un individuo. La región del sistema nervioso más

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

susceptible a sufrir muerte neuronal de manera considerable, es la región ventral del mesencéfalo o cerebro medio. En esta región, las neuronas dopaminérgicas están agrupadas en dos núcleos principalmente, el área ventral tegmentaria y la sustancia negra. Esta última recibe su nombre debido a que las neuronas tienen en su citoplasma el pigmento melanina, que les confiere un color parduzco. La función de la melanina se desconoce, pero se piensa que es un producto residual de la síntesis del neurotransmisor dopamina. En el humano la principal enfermedad que se caracteriza por la muerte progresiva de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, es la enfermedad de Parkinson.



1.1 Neuronas dopaminérgicas mesencefálicas

La principal función de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, se relaciona con el control de movimientos voluntarios, al producir el neurotransmisor dopamina y liberarlo al cuerpo estriado, de tal forma que al morir las neuronas dopaminérgicas se rompe esa comunicación y se presentan los síntomas de la enfermedad de Parkinson. Los síntomas principales son el temblor en reposo, lentitud de movimientos, afasia y alteraciones posturales entre otras, llegando a la incapacidad total del individuo.

1.1.1 Genes involucrados en la diferenciación de Neuronas dopaminérgicas mesencefálicas

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, las células progenitoras de células nerviosas se diferencian a fenotipos celulares específicos. Actualmente se conocen varios genes que están involucrados en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas¹⁻³. Entre ellos se encuentra el gen TH o tirosina hidroxilasa. Su expresión inicia a los 11.5 días del desarrollo embrionario en el ratón y su función está implicada en la síntesis del neurotransmisor dopamina⁴. El gen Pitx3 es un factor de transcripción que se une a la región promotora del gen TH y lo transcribe^{5, 6}. Pitx3 comienza a expresarse en precursores dopaminérgicos mesencefálicos y en el cristalino de embriones de ratón. Su expresión inicia a los 11 días del desarrollo embrionario del ratón y se mantiene hasta la etapa adulta⁷.

Otro gen involucrado en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas es el gen Nurr1, un factor de transcripción que se expresa a los 10.5 días del desarrollo embrionario de ratón^{8, 9} y cuya función aún no es completamente entendida. Se considera que la expresión del gen Nurr1 es básica para que las células adquieran un fenotipo dopaminérgico ya que su inactivación en ratones, provocó la falta de expresión de marcadores dopaminérgicos y muerte celular por apoptosis en la región ventral del mesencéfalo¹⁰⁻¹². A pesar de que el gen Nurr1 se expresa en varias regiones del sistema nervioso central, únicamente la región ventral del mesencéfalo fue afectada. Las neuronas que mueren en el knockout Nurr1, son las mismas que se pierden en los

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

pacientes con enfermedad de Parkinson, por ello el KO Nurr1 se consideró como un posible modelo animal de dicha enfermedad. A partir de ese momento el KO Nurr1 ha sido ampliamente utilizado en investigación para determinar la base molecular que conduce a la muerte neuronal, con la finalidad de poder relacionarlo de forma directa con la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, para poder determinar el impacto del gen Nurr1 específicamente en el mesencéfalo es importante eliminar de forma específica la expresión del gen Nurr1 en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.

1.2 Knockout condicional

Este tipo de estrategias han sido utilizadas desde principios de los 90's cuando se desarrolló una nueva tecnología de transgénicos en ratones, que permite controlar la expresión génica en tiempo y espacio^{13, 14}. Donde el encendido o apagado de un gen es condicionado por un estímulo específico y por lo tanto hace posible determinar la función de un gen letal en la etapa embrionaria, en animales adultos. Para realizar esta técnica se requiere de dos sitios de recombinación específicos flanqueando el gen que se desea eliminar y la expresión de una recombinasa en el tejido ó en las células donde se desea ocurra la delección, a este sistema se le conoce como Cre/LoxP.

1.3 Sistema Cre/LoxP

El sistema Cre/LoxP fue descubierto en 1984¹⁵⁻¹⁷, pero a finales de los 80's y principios de los 90's se determinó que podía funcionar en células eucariotas en

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro* cultivo¹⁸. El sistema tiene la ventaja de no requerir cofactores o secuencias adicionales para que ocurra la recombinación. Los únicos elementos requeridos son: la enzima de recombinación, Cre recombinasa y dos sitios de reconocimiento llamados LoxP¹⁹.

1.3.1 Cre recombinasa

La enzima Cre recombinasa fue aislada del bacteriófago P1. Es una topoisomerasa tipo I que pertenece a la familia de integrasas de recombinación sitio específico. La enzima de 38 kDa, esta formada por dos dominios unidos por una secuencia corta aminoacídica. El dominio del amino terminal contiene 5 hélices alfa. El dominio del carboxi terminal es principalmente helicoidal y contiene el sitio activo. Este último contiene tres residuos catalíticos conservados, la arginina, histidina, arginina^{20,21}.

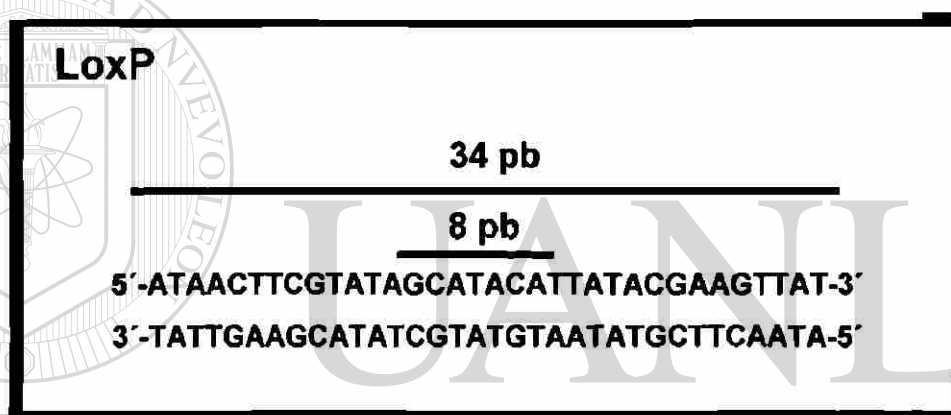
1.3.2 Función de Cre recombinasa en el bacteriófago P1

Los bacteriófagos para su reproducción requieren de células hospederas. Cuando el bacteriófago P1, infecta una célula, integra su material genético en el ADN del hospedero y utiliza la maquinaria transcripcional de la célula infectada para su replicación. El genoma del fago contiene un sitio LoxP, de tal forma que cuando se produce una duplicación del genoma del fago, la enzima reconoce dos sitios LoxP y los recombina eliminando una de las copias del genoma del fago (región situada entre los dos secuencias LoxP), de esa manera mantiene una copia del fago durante la etapa lisogénica asegurando con esto la supervivencia del bacteriófago.

1.3.3 LoxP

Un sitio LoxP es una secuencia de 34 pb. La región central del sitio LoxP es asimétrica, mide 8 pb, y esta flanqueada por dos secuencias palindrómicas (repeticiones invertidas) de 13 pb. El centro asimétrico define la orientación de la secuencia LoxP^{22, 23}.

Figura 1. Secuencia nucleotídica de un sitio loxP

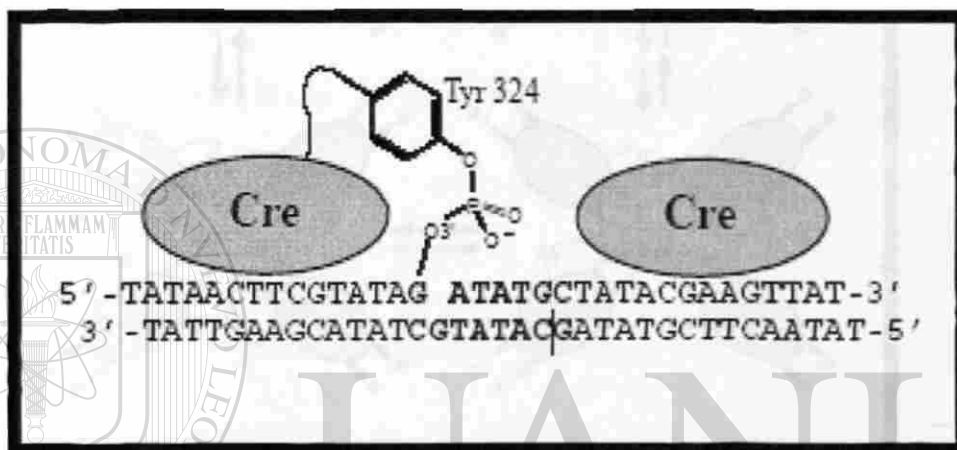


1.3.4 Mecanismo de recombinación

Para que ocurra la recombinación deben existir al menos dos sitios LoxP flanqueando la secuencia de interés. Una sola molécula de la enzima Cre recombinasa se une a cada una de las mitades palindrómicas de un sitio LoxP. Por lo que en cada sitio LoxP se unen 2 moléculas de la enzima Cre recombinasa. En consecuencia, en el momento de la recombinación de los dos sitios LoxP, se forma un tetrámero con las cuatro moléculas de la Cre recombinasa. En cada uno de los sitios LoxP, una enzima

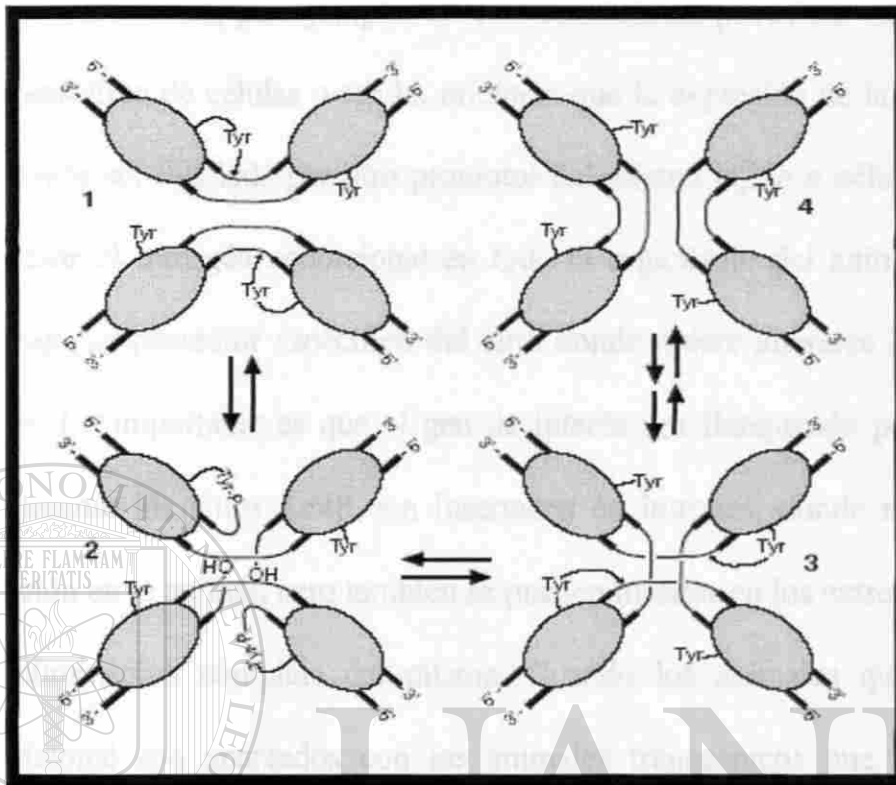
corta el enlace fosfato entre la guanina y citosina (bases adyacentes) del centro asimétrico del LoxP en dirección 5' a 3' en una de las cadenas complementarias de ADN. En la otra cadena complementaria y opuesta, la ruptura ocurre entre la primera adenina y timina (adyacentes) del centro asimétrico del sitio LoxP.

Figura 2. Reconocimiento de secuencias LoxP por la enzima Cre recombinasa



El mecanismo por el cual la enzima rompe el ADN entre las bases nucleotídicas, es el siguiente: el aminoácido tirosina del sitio activo de la Cre recombinasa, se une al oxígeno 3' del enlace fosfato entre las bases GC y AT respectivamente. Entonces los grupos hidroxilo 5' liberados en el rompimiento del enlace, forman un nuevo enlace fosfodiéster con el fosfato de la tirosina del otro sitio LoxP, recombinando de esta forma ambos sitios. Como el rompimiento ocurre en cadenas opuestas en una doble hélice de ADN, el sitio LoxP queda dividido a la mitad pero con extremos cohesivos. En el momento de la recombinación la cadena de ADN entre los dos sitios LoxP, se dobla formando un asa, permitiendo que cada mitad de un sitio LoxP reacciona con una mitad del otro sitio LoxP²⁴.

Figura 3. Mecanismo de recombinación de secuencias LoxP



De esta manera se elimina cualquier secuencia de ADN situada entre ambos sitios. Cuando las secuencias LoxP están en la misma dirección, ocurre una delección mediada por la enzima Cre recombinasa. Cuando los sitios LoxP están en direcciones opuestas la enzima invierte la secuencia situada entre ellos.

1.3.5 Aplicaciones del sistema Cre/LoxP

Este sistema ha sido ampliamente utilizado tanto en ensayos *in vitro* como en sistemas *in vivo*. En transgénicos se utiliza para eliminar de forma específica un gen en

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

una sola región sin alterar la expresión del gen blanco en el resto del animal y se le conoce como “knockout” condicional. Para producir un knockout condicional pueden utilizarse varias alternativas, por ejemplo, el alelo condicional puede ser expresado por un promotor específico de células o tejido, mientras que la expresión de la enzima Cre recombinasa puede ser regulada por otro promotor del mismo tejido o célula. También se puede expresar el transgén condicional en todo el organismo del animal y la Cre recombinasa bajo un promotor específico del sitio donde quiere alterarse la expresión del gen blanco. Lo importante es que el gen de interés sea flanqueado por los sitios LoxP. Generalmente los sitios LoxP son insertados en intrones, donde no producen ninguna alteración en el animal, pero también se pueden insertar en los extremos del gen e inducir la eliminación completa del mismo. Cuando los animales que portan el transgén condicional son apareados con los animales transgénicos que expresan la enzima Cre recombinasa en un tejido particular, en la progenie de esa cruce ocurre la deleción, inversión ó translocación de material genético en el sitio donde la enzima Cre recombinasa sea producida.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El rango de corte de la Cre recombinasa es sorprendentemente grande, logrando eliminar regiones de hasta 400 kb, lo que hace que el sistema Cre/LoxP sea una herramienta importante en el campo de la investigación biomédica^{25, 26}. Lo más interesante del sistema Cre/LoxP es que se puede eliminar un gen en un tejido específico aunque ese gen se exprese en muchas regiones de forma normal. Para lograr esto es importante utilizar la región promotora de un gen específico del sitio donde se desea eliminar el gen blanco para dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa. Por

ejemplo, actualmente no existe un modelo animal de la enfermedad de Parkinson, donde pueda desarrollarse la muerte de neuronas dopaminérgicas de manera progresiva. Sin embargo este tipo de estrategia representa una alternativa interesante.

1.3.6 Expresión de la enzima Cre recombinasa en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas

Para poder dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa específicamente en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, es necesario utilizar la región promotora de un gen que se exprese únicamente en este tipo celular. En el mesencéfalo se expresan varios genes, entre ellos, el gen *Nurr1*, *TH*, *Sonic hedgehog*, *AADH*, *forskolin*, y *Limx1b* entre otros^{2, 27-29}. Sin embargo cada uno de ellos se expresa en otras regiones del sistema nervioso central. *Pitx3* es el único gen que se expresa en la región ventral mesencefálica a nivel del sistema nervioso central. Por lo que, la región promotora del gen *Pitx3* puede utilizarse para dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa de manera específica en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo del ratón.

1.4 Pitx3

El gen *Pitx3* pertenece a la familia de factores de transcripción y genes homeóticos *Pitx*. Otros miembros de esta familia son los genes *Pitx1* y *Pitx2*. Ambos genes se expresan en la hipófisis, de allí deriva su nombre “pit-x”(pituitary homeobox)³⁰. El homeodominio de estos genes es altamente conservado y difiere en uno

o dos aminoácidos. Inicialmente se pensó que al igual que los miembros de su familia se expresaba en la hipófisis, sin embargo no fue así. La expresión de Pitx3 se localizó en el sistema dopaminérgico, específicamente en la región ventral del mesencéfalo y posteriormente se descubrió que también se expresa en el cristalino.

1.4.1 Organización estructural del gen Pitx3

El gen Pitx3 mide 12.6 kb y está organizado en 4 exones y 3 intrones. Los exones miden 125, 129, 210 y 927 pb respectivamente. Los intrones son de 10729, 196 y 379 pb respectivamente. El homeodominio es interrumpido por un intrón en la posición 46. El codón de inicio de la traducción está situado en el exón 2³¹. En la región 5' del gen, situada antes del punto de inicio de transcripción se localizaron las cajas TATA y la caja CAAT en la posición -86 a -80 y -205 a -200, así como algunos dominios de unión para factores de transcripción relacionados con el desarrollo del cristalino y la formación de la región cráneo-facial, entre ellos el de las proteínas AP-2 y Maf. Aunque en la región 5' del gen Pitx3 ya se han identificado secuencias propias de un promotor, la región promotora del mismo aún no ha sido delimitada. El gen Pitx3 es flanqueado por dos genes. En su región 5' UTR se localiza la región promotora del gen Gbfl, situado a 4.2 kb del sitio de inicio de la transcripción del gen Pitx3. Ambos genes posiblemente tienen en común parte de sus secuencias promotoras. En la región 3' del gen Pitx3 se localiza el gen Cig30 de quien al menos 10 nucleótidos de la región 3' UTR se traslapan con la secuencia del gen Pitx3³².

1.4.2 Deleción en la región 5' del gen Pitx3

El locus del gen Pitx3 se encontró en el cromosoma 19 del ratón, cerca de una región previamente identificada, cuya mutación provoca alteraciones morfológicas en ratones. El fenotipo de esos ratones conocidos como “aphakia” se caracteriza por alteraciones oculares durante el desarrollo embrionario. Posterior al nacimiento los ratones presentan ojos pequeños con ausencia del cristalino y párpados unidos³¹. En ese momento aún no se había determinado que gen o genes producían tales alteraciones, por lo que al identificar el locus del gen Pitx3 cercano a esa región se pensó que el gen podría estar involucrado en el fenotipo de los ratones aphakia. Cuando se analizó la secuencia codificante del gen Pitx3 en el genoma de los ratones aphakia no se encontró ninguna alteración. Sin embargo al analizar la región 5' UTR se encontró una deleción de 652 pb situada a -2.5 kb del punto de inicio de la transcripción^{33,34}. Posteriormente se encontró que los ratones aphakia también presentaban la pérdida del exón 1³³. En los ratones pudieron observar que las alteraciones no estaban restringidas al ojo sino que también había una disminución considerable del número de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del mesencéfalo³⁵⁻³⁸. Mostrando con ello que el gen Pitx3 y su región 5' UTR son esenciales en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas a nivel mesencefálico.

Por lo tanto la región 5' del gen Pitx3, es un candidato ideal para dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. De tal forma que mediante técnicas de ingeniería genética, hemos obtenido un cassette

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

de expresión de la enzima Cre recombinasa bajo la regulación de la región promotora del gen Pitx3. Con la construcción obtenida, se realizaron ensayos *in vitro* para determinar la actividad promotora de la región 5' del gen Pitx3 y la actividad de la enzima Cre recombinasa. Posteriormente la construcción será utilizada para desarrollar un ratón transgénico que exprese la enzima Cre recombinasa en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. La expresión iniciará a los 11 días del desarrollo embrionario y su expresión se mantendrá en el ratón adulto. Con el transgénico que se obtenga podrán inactivarse en las células donde se exprese la enzima Cre recombinasa, cualquier gen o secuencia flanqueada por sitios LoxP del genoma de cualquier ratón transgénico.

Es importante mencionar que este trabajo forma parte de un proyecto mayor que tiene como meta determinar el efecto de la inactivación condicional del gen Nurr1 específicamente en la región ventral del mesencéfalo, sin alterar la expresión del gen Nurr1 en otras regiones del sistema nervioso central. Con ello podremos relacionar, si la muerte de los ratones KO Nurr1 es provocada por la falta de expresión del gen Nurr1 únicamente en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

1.4 Justificación

El gen *Nurr1* se expresa en diversas regiones del SNC. Su inactivación en ratones provocó la muerte de los knockout *Nurr1* durante el primer día de vida. En ellos, se encontraron alteraciones morfológicas en la región ventral mesencefálica, caracterizadas por la falta de neuronas dopaminérgicas y muerte neuronal, sin alterar los demás sitios donde también se expresa el gen *Nurr1*.

Debido a que solo la región ventral mesencefálica fue afectada, es de gran interés obtener un modelo animal condicional donde únicamente se elimine la expresión del gen *Nurr1* en la región afectada. Sin embargo para obtenerlo, es indispensable desarrollar dos ratones transgénicos: uno de ellos, que porten la secuencia del gen *Nurr1* flanqueada por sitios *LoxP* y otro ratón que exprese la enzima Cre recombinasa específicamente en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por ello este trabajo consintió en construir un vector de expresión que contiene la secuencia codificante de la enzima Cre recombinasa bajo la regulación de un promotor específico del mesencéfalo y demostrar su actividad *in vitro*.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*.

1.5.2 Objetivo específicos

1. Obtener un vector para la expresión de la Cre recombinasa bajo la regulación de la posible región promotora del gen *pitx3*.
2. Demostrar la funcionalidad como promotor de la región 5' del gen *pitx3*.
3. Evaluar la actividad de la enzima Cre recombinasa del vector de expresión construido.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.6 Estrategia experimental

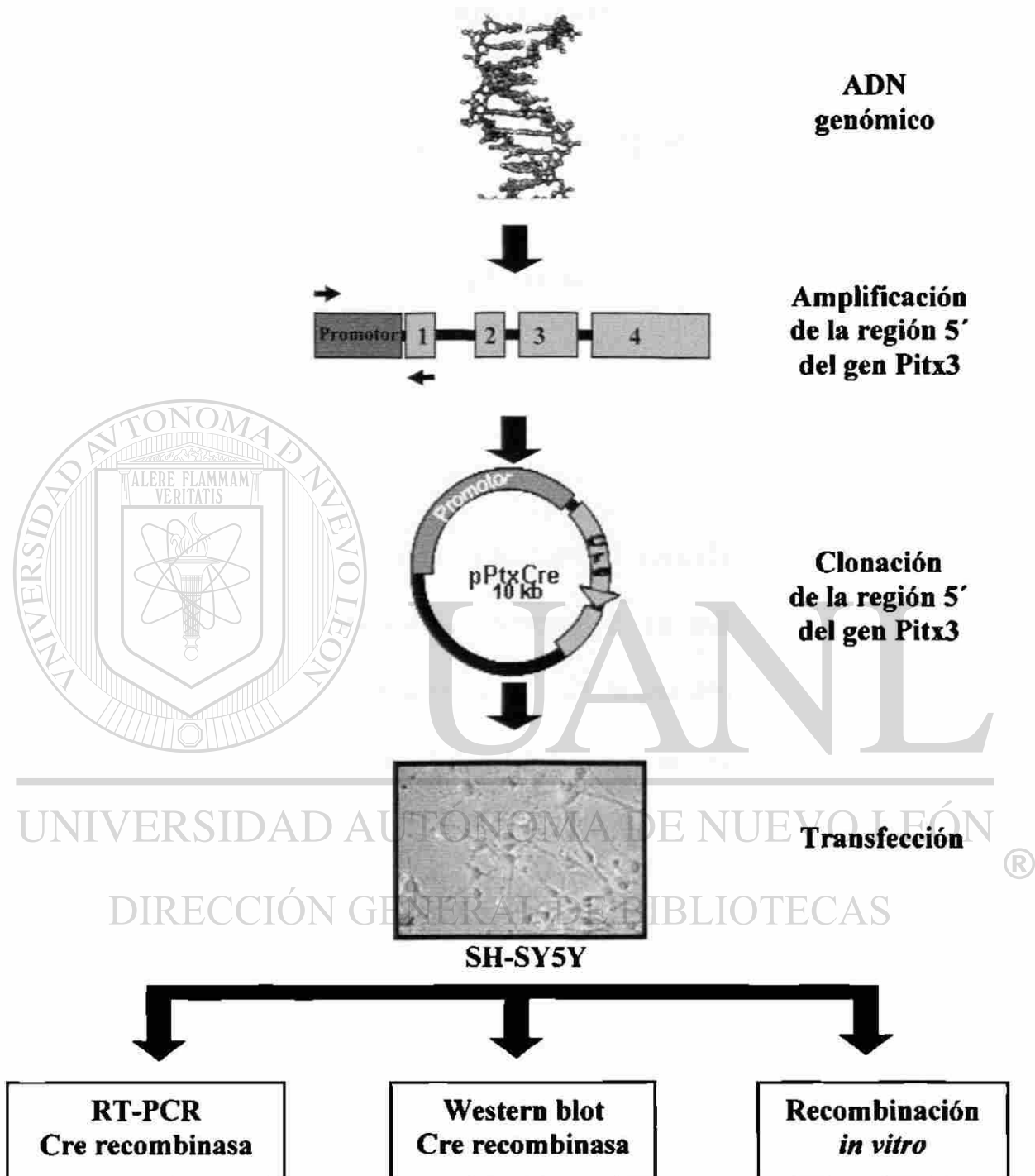


Figura 4. Estrategia experimental. Se muestran las etapas involucradas en el desarrollo de la investigación, las cuales consistieron en: a) Amplificación y clonación de la región 5' del gen Pitx3 a partir de ADN genómico de ratón. b) Transfección de la línea celular SH-SY5Y con la construcción obtenida. c) Detección de la enzima Cre recombinasa a nivel de ARNm y proteína, por RT-PCR y western blot respectivamente. d) Determinación de la funcionalidad de la enzima Cre recombinasa mediante recombinación *in vitro* por PCR.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

2.1 Material

2.1.1 Origen de los reactivos

Las enzimas de restricción utilizadas, fueron adquiridas de las casas comerciales Roche Molecular Biochemicals, Gibco y Promega. El kit utilizado para la transcripción inversa-PCR fue comprado a la casa comercial Roche Molecular Biochemicals. El reactivo utilizado para proteger el ARN, RNAsa zap se compró a la casa comercial Ambion.

La transfección se realizó con el reactivo lipofectamina-2000 de la casa comercial Invitrogen. Los reactivos y medios para el cultivo de células, fueron: DMEM, Opti-MEM, Tripsina-EDTA, Ampicilina/Estreptomicina 1X, suero fetal bovino y buffer de fosfatos 1X, adquiridos de la casa comercial Gibco.

El anticuerpo anti-Cre recombinasa de ratón fue adquirido de Chemicon. El anticuerpo anti- β -actina fue adquirido de la casa comercial MP Biomedicals. Para realizar el western blot se utilizó el kit de Promega.

Los reactivos empleados para la preparación de geles como: agarosa, bromuro de etidio, azul de bromofenol se adquirieron de las casas comerciales DIFCO Laboratories, Sigma Chemical y Merk, respectivamente.

Los reactivos utilizados en la obtención de ADN genómico y plasmídico, como el acetato de sodio, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, trizma, fenol, cloroformo todos ellos de Sigma-Aldrich. Así como cloruro de magnesio, β -mercaptoetanol, alcohol etílico absoluto, metanol y cloroformo fueron adquiridos de CTR distribuidores.

2.1.2 Material biológico

Las células SH-SY5Y utilizadas en este trabajo, fueron proporcionados por el Dr. Weidong Lee del Departamento de Neurología del Baylor College of Medicine de Houston, Texas, E.U.A. Las células MCF-7, fueron proporcionadas por el Dr. Arturo Chávez Reyes del departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los ratones de la cepa 129Sv fueron adquiridos del laboratorio Jackson por la Dra. Odila Saucedo Cárdenas.

Los plásmidos utilizados así como la cepa de bacterias de *Escherichia coli* DH5 α pertenecen al departamento de Genética molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste IMSS.

2.2 Equipo

Para la realización de este trabajo se utilizaron: placa de calentamiento con agitador magnético TROEMNER, horno de temperatura con rango de 30 a 100°C, potenciómetro Thermo Orion 410A, balanza analítica AND GR120, transiluminador UV/luz Bio-vision Spectroline, espectrofotómetro, centrifugas refrigeradas Sorvall y Damon, termociclador (Minicycler Beckman), vortex marca Lab-line, incubadora Caisa, Microcentrífuga Hermle, fuente de poder EC 105, mini cámara para electroforesis horizontal, juego de pipetas calibradas Gilson de 20, 200 y 1000 μ L, balanza analítica OHAUS, baños de agua con control de temperatura, incubadora con agitación mecánica marca New Brunswick Scientific.

El equipo utilizado para el análisis de datos esta formado por computadoras Compaq Presario M2000 y Toshiba. Los procesadores de texto utilizados fueron: Microsoft word 2000, procesadores gráficos Microsoft Power Point, Microsoft Photo Editor y Scanner Visioner.

2.3 Métodos

2.3.1 Construcción de un vector de expresión de la enzima Cre recombinasa

2.3.1.1 Subclonación del gen de la enzima Cre recombinasa.

2.3.1.1.1 Digestión con enzimas de restricción.

Las digestiones se realizaron bajo condiciones óptimas sugeridas por las casas comerciales. Se utilizaron 10 μg del vector pBS185 (CMV-cre) conteniendo la secuencia codificante de la enzima Cre recombinasa, así como 10 μg del vector pBSKS, ambos fueron digeridos con las enzimas *HindIII* y *XhoI* utilizando una unidad de enzima por cada μg de ADN plasmídico y 5 μL de buffer multicorte en un volumen total de 50 μL . Los tiempos de incubación fueron de 2 a 12 horas a 37°C.

2.3.1.1.2 Purificación de fragmentos

Los fragmentos obtenidos a partir del ADN digerido, se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. La migración se efectuó a 40 volts, durante 3 horas. Las bandas de ADN de interés se cortaron del gel y se recuperaron mediante el kit de purificación de ADN por columna de la marca Qiagen, de la siguiente manera: el fragmento de gel es transferido a un tubo eppendorff de 2 mL e incubado a 50°C por 10

minutos con tres volúmenes de la solución QG. Posteriormente se adicionó un volumen de isopropanol para precipitar el ADN y la muestra fue eluída a través de una columna de intercambio aniónico del mismo kit. La columna se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto. Se eliminó el eluído y se añadieron a la columna 750 μ L de buffer de lavado. Nuevamente se centrifugó la columna por 1 minuto a 12,000 rpm. La columna fue colocada en un tubo nuevo y se añadieron a la columna 50 μ L de buffer de elusión PE. Se centrifugó 1 minuto a 12 000 rpm y los fragmentos purificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8%.

2.3.1.1.3 Ligación

Una vez purificado el fragmento de 2.7 kb que corresponde al gen de la enzima Cre recombinasa y el vector pBSKS, se ligaron empleando para ello 100 ng de DNA totales en una relación 1:3, una unidad de la enzima ADN ligasa y 4 μ L de Buffer de ligación 5X en un volumen total de 20 μ L. La ligación se incubó a 15°C durante toda la noche.

2.3.1.1.4 Transformación

La transformación se realizó añadiendo 2 μ L de ligación a 100 μ L de células calcio competentes de la cepa DH5 α . Las células se incubaron en hielo durante 1 hora. Inmediatamente después se sometieron a choque térmico al incubarlas un minuto a 42°C, seguido de una incubación en hielo de 2 minutos. Posteriormente se añadieron

400 μ L de medio de cultivo LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C en agitación mecánica a 250 rpm durante 1 hora. Se inocularon 100 μ L del cultivo en placas de agar LB con ampicilina. Las placas se incubaron invertidas durante toda la noche a 37°C. Las colonias obtenidas fueron procesadas para la obtención del ADN plasmídico.

2.3.1.1.5 Extracción de DNA plasmídico (Mini-preparación de plásmidos).

Las clonas recombinantes obtenidas de las ligaciones fueron procesadas para la obtención de ADN plasmídico utilizando el método de lisis alcalina.

Se inoculó una colonia bacteriana en 3 mL de caldo LB (bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L, pH 6.5-7.0) con 3 μ L de ampicilina y se incubó a 37°C toda la noche a 150 rpm. El cultivo se centrifugó 3 minutos a 14,000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla se incubó a -20°C por 5 minutos. Se añadieron 100 μ L de solución de lisis I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, pH 8), se resuspendió la pastilla por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 200 μ L de solución de lisis II (0.2 mL de NaOH 10N, 1.0 mL de SDS 10% y 8.8 mL de agua), nuevamente se incubó en hielo 5 minutos y se añadieron 150 μ L de solución de lisis III (acetato de sodio 3M) incubando 10 minutos en hielo. Enseguida se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorff de 2 mL, se añadieron 450 μ L de isopropanol, se mezcló e incubó a -20°C durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos, se desechó el sobrenadante, se agregaron 500

μL de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 r.p.m. por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 50 μL de TE IX.

Con el ADN obtenido se realizó la caracterización de las clonas con enzimas de restricción y su patrón de corte fue analizado en geles de agarosa.

2.3.1.1.6 Linearización del vector pBS-Cre con enzimas de restricción.

La construcción obtenida se linearizó con la enzima de restricción *ApaI*. Para ello se utilizaron 10 μg del vector pBS-Cre conteniendo la secuencia codificante de la enzima Cre recombinasa y una unidad de enzima *ApaI* por cada μg de ADN plasmídico. Las condiciones de reacción y tiempos de incubación son los mismos que anteriormente se mencionaron.

2.3.1.1.7 Conversión de los extremos cohesivos en extremos romos.

La enzima *ApaI* produce extremos cohesivos, por lo que fue necesario convertirlos en extremos romos. Para ello se utilizaron 5 μg del plásmido pBS-Cre linearizado y 1 unidad del fragmento Klenow, 2.5 μL de dNTP's, 2 μL de Buffer de reacción 10X y agua en un volumen final de 20 μL . La reacción se llevó a cabo a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se detuvo la reacción calentando a 75°C durante 10 minutos.

2.3.1.2 Amplificación y clonación de la región 5' del gen Pitx3

2.3.1.2.1 Extracción de ADN genómico

Para la amplificación de la región 5' del gen Pitx3 fue necesario obtener ADN genómico de la cepa de ratones 129Sv. La extracción de ADN genómico se realizó a partir de un fragmento de tejido, proveniente de la cola de los ratones 129Sv como se describe: la muestra de tejido se colocó en un tubo eppendorff de 1.5 mL y se le agregaron 750 μ l de buffer de lisis conteniendo proteinasa K a 200 ng/mL. Se incubó durante toda la noche a 55°C en baño maría. Al día siguiente se añadieron 350 μ l de fenol y 350 μ l de sebage y se agitó en vortex. Posteriormente se centrifugó a 12000 r.p.m. en una microcentrífuga durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo eppendorf, se le adicionó 1/10 de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se agitó suavemente por inversión. El ADN flotante se recogió con una pipeta Pasteur previamente sellada y curvada de la punta. Se lavó dos veces con etanol al 70% frío, sumergiendo y sacando la pipeta con el ADN, se dejó secar el ADN a temperatura ambiente en la varilla, antes de resuspenderlo en TE 1X. El ADN genómico íntegro se almacenó a 4°C. La calidad de las preparaciones del ADN se determinó mediante la medición de la densidad óptica (O.D.) a 260 nm y 280 nm.

2.3.1.2.2 PCR

Para la amplificación de la región 5' del gen *Pitx3*, se utilizó el ADN genómico previamente extraído. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 1. Amplificación de la región 5' del gen *Pitx3*: condiciones de reacción.

Componentes del PCR	Concentración final
Buffer 10 X	IX
Mg(AcO) ₂ 25 mM	1.5 mM
dNTPs 25mM	2.5 nM
Iniciador Pitf 5' (GGCACTCCTGTGTCTAGCTGCC)	4 ng/μL
Iniciador Pitr 3' (CAGCCCTCACAAGTGCGAACAC)	4 ng/μL
ADN polimerasa rTth	0.05 U/μL
ADN 1 μg/μL	10 ng/μL
H ₂ O mQ estéril	8.5 μL

Tabla2. Programa utilizado en la amplificación de la región 5' del gen Pitx3.

El programa de amplificación que se utilizó, consiste en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización previa	80°C por 5 minutos (Hot start)
2. Desnaturalización inicial	92°C por 2 minutos
3. 35 ciclos:	
Desnaturalización	92°C por 30 segundos
Alineamiento	60°C por 30 segundos
Elongación	68°C por 4 minutos
4. Extensión prolongada	72°C por 10 minutos

Los productos de PCR obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 1.0%.

2.3.1.2.3 Clonación de la región 5' del gen Pitx3.

El producto de PCR previamente obtenido se clonó en el vector pBS-Cre en el sitio *Apal*. Para ello se utilizaron 50 ng de ADN del vector linearizado y 150 ng del producto de PCR amplificado, 1 unidad de la enzima ADN ligasa y 3 μ L de Buffer de ligación 5X en un volumen total de 15 μ L. La ligación se incubó a 15°C durante toda la noche. Posteriormente la ligación fue transformada en la cepa de bacterias DH5 α , se purificó el ADN plasmídico y se caracterizaron las clonas recombinantes de la forma anteriormente descrita.

2.3.1.2.4 Extracción de ADN plasmídico a gran escala (Maxi-preparación)

La clona recombinante obtenida fue procesada para la obtención de ADN plasmídico a gran escala utilizando el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y cols. Se inoculó una colonia bacteriana en 5 ml de caldo de cultivo LB con 5 μ L de ampicilina (400 μ g), se incubó a 37°C y a 150 rpm durante toda la noche. El cultivo se inoculó en 25 ml de caldo LB con 25 μ L de ampicilina y se incubó a 150 rpm y a 37°C durante toda la noche. Posteriormente los 30 mL de cultivo se inocularon en 500 mL de caldo LB con 500 μ L de ampicilina (50 μ g/mL) en las condiciones ya descritas. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Se desechó el sobrenadante y el botón de bacterias se resuspendió en 10 mL de solución de lisis I.

Posteriormente se añadieron 10 mL de solución de lisis II (0.2 mL de NaOH 10M, 1.0 mL de SDS 10% y 8.8. mL de agua), se mezcló por inversión y se incubó a TA durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 10 mL de solución de lisis III (acetato de Sodio 3M) y se incubó en hielo por 20 minutos. Nuevamente se centrifugó a 4°C por 30 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL y se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Al mismo tiempo, se equilibró una columna de intercambio iónico con 10 mL de buffer QBT. Enseguida se filtró el sobrenadante y se lavó dos veces la columna con 30 mL de buffer QC. El ADN se extrajo de la columna con 15 mL de buffer de elusión QF. El ADN en suspensión se precipitó con 10.5 mL de Isopropanol y centrifugación a 13,000 rpm a 4°C por 30 minutos. El sobrenadante se

desechó y la pastilla de ADN se lavó con 15 mL de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla de ADN y posteriormente se resuspendió en 500 μ L de TE 1X.

2.3.2 Análisis de la actividad promotora del gen Pitx3 *in vitro*

2.3.2.1 Cultivo celular

Se cultivó la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y y la línea celular MCF-7 en placas de 25cm² respectivamente. El medio de cultivo utilizado fue DMEM adicionado con SFB al 10% y ampicilina-estreptomicina al 1X. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C de temperatura, 5% de CO₂ y en 95% de humedad hasta el momento de realizar los ensayos.

2.3.2.2 Transfección de las líneas celulares.

Los ensayos de transfección se realizaron dentro de una campana de flujo laminar. En cada ensayo se utilizaron cajas de cultivo con un 80% de confluencia de líneas celulares, SH-SY5 y MCF-7, de la siguiente manera: se utilizaron 8 μ g totales de ADN plasmídico en 250 μ L de medio Opti-MEM, en tubos eppendorff de 1.5 mL. En otro tubo eppendorff de 1.5 ml, se mezclaron 20 μ L de lipofectamina 2000 con 230 μ L de medio de cultivo Opti-MEM. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se añadieron a los tubos que contienen el ADN plasmídico, 250

μ L de la lipofectamina incubada. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Por otro lado, a las líneas celulares cultivadas en cajas de 25cm, se les retiró todo el medio de cultivo DMEM (SFB 10% y ampicilina-estreptomicina). Se hizo un lavado con PBS IX, se desechó el buffer de fosfatos y se añadió al cultivo 4.5 mL de medio DMEM enriquecido con SFB al 10% pero sin antibióticos ni antimicóticos.

Posteriormente, se añadió a los cultivos 500 μ L del ADN plasmídico incubado con lipofectamina. Los cultivos se incubaron por 3 horas a 37°C en 5% de CO₂ y en un ambiente húmedo. A las 3 horas se retiró el medio de cultivo y se añadió medio DMEM enriquecido con SFB 10% y ampicilina-estreptomicina al 1X. Los cultivos permanecieron en incubación por 48 horas bajo las mismas condiciones de temperatura y CO₂.

2.3.2.2.1 Obtención de las células transfectadas con tripsina-EDTA

Para los ensayos posteriores de obtención de ARN, proteínas y ADN plasmídico de las células transfectadas, fue necesario separar las células de las cajas de cultivo y transferirlas a tubos de 1.5 ml. El proceso fue el siguiente: se removió el medio de cultivo de las células transfectadas y se lavaron con 2.5 mL de PBS 1X. Posteriormente se añadió 1 mL de tripsina-EDTA 1X a cada caja de cultivo y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. La tripsina se inactivó añadiendo 3 mL de medio de cultivo DMEM con SFB al 10%. Las células desprendidas se transfirieron a un tubo falcón de 15 mL. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 3 minutos. Se desechó el

sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 ml de PBS 1X. Posteriormente se transfirió a un tubo eppendorff de 1.5 mL. Se hizo una segunda centrifugación desechando nuevamente el sobrenadante.

2.3.2.3 Obtención del ARN total de las líneas celulares transfectadas.

El botón celular se resuspendió en 600 μ L de buffer de lisis adicionando 6 μ L de β -mercaptoetanol, agitándose en vortex a máxima velocidad durante 2 minutos. Posteriormente al lisado celular se le adicionó 1 ml de etanol al 70% y se mezcló suavemente con pipeta. El lisado se pasó a través de una columna QIAmp y se centrifugó 1 minuto a 10,000 rpm. Se recuperó el eluido y se filtró a través de una segunda columna, esta vez se eliminó el eluido. La columna se lavó con 700 μ L de buffer de lisis y el ARN se recuperó añadiendo 50 μ L de agua libre de RNAsas. El ARN se visualizó en un gel de agarosa al 0.8 %.

2.3.2.3.1 RT-PCR

El ARN obtenido se utilizó para sintetizar ADN complementario de los mensajeros, utilizando oligo de T, la reacción fue la siguiente:

Tabla 3. RT-PCR: condiciones de reacción.

Componentes del RT-PCR	Concentración final
dNTPs 25mM	2.5 nM
DTT	5 mM
RNase Inhibitor	5U
Oligo de T	4 ng/ μ L
ARN	1 μ g
Buffer RT-PCR 5x	1X
AMV transcriptasa reversa	1U
Agua libre de RNAsas	12.5 μ L

La reacción se incubó 30 minutos a 37°C y se almacenó a -20°C. El ADNc se utilizó posteriormente para amplificar algunos genes.

2.3.2.3.2 Amplificación por PCR de diversos genes a partir del ADNc de las células transfectadas

Los genes que se amplificaron del ADNc obtenido anteriormente fueron: el gen de la enzima Cre recombinasa, Pitx3 y β -actina. El PCR se realizó de la forma previamente descrita, pero utilizando ADNc en lugar de ADN genómico. Los iniciadores utilizados se describen a continuación.

Iniciador Cre recombinasa 5':	gcgttcgaacgcactgattc
Iniciador Cre recombinasa 3':	ccatcttccagcaggcgac
Iniciador Pitx3 5':	cacagccaccaccggagtc
Iniciador Pitx3 3':	ctcatgtcagggtagcgattc

El programa de amplificación que se utilizó, consiste en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial 92°C por 2 minutos
2. 35 ciclos:

Desnaturalización	92°C por 30 segundos
Alineamiento	55°C por 30 segundos
Elongación	68°C por 1 minutos
3. Extensión prolongada 68°C por 10 minutos

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 0.8%.

2.3.2.4 Obtención de proteínas de las líneas celulares transfectadas.

Las células previamente transfectadas y cosechadas, se lisaron con 200 μ L de buffer de lisis (Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, Tris pH 7.6 y 6.7 μ L de inhibidor de proteasas) y agitación en vortex por 30 minutos. Posteriormente las células se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorff de 1.5 mL. Las proteínas obtenidas se cuantificaron por el método de Bradford.

2.3.2.4.1 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes.

Las proteínas obtenidas se visualizaron en gels de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Para ello se utilizó un gel concentrador al 5% y un separador al 12.5 %, utilizando las siguientes concentraciones finales:

Gel separador al 12.5 %:	Gel concentrador al 5%:
Acrilamida/ bis-acrilamida al 40%	Acrilamida/ bis-acrilamida al 40%,
Tris-HCl 15 mM pH 8.8	Tris-HCl 0.5 mM pH 6.8
SDS 10%	SDS 10%
Agua destilada	Agua destilada
Persulfato de amonio 10%	Persulfato de amonio 10%
TEMED	TEMED

La electroforesis se realizó en buffer de corrimiento 1X a 60 volts en el gel concentrador y a 100 volts en el gel separador.

2.3.2.4.2 Western blot.

Con las proteínas obtenidas a partir de las células transfectadas, se realizó un western blot para la detección de las proteínas Cre recombinasa y β -actina, utilizando anticuerpos monoclonales de ratón. Las proteínas se corrieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Las condiciones de corrimiento se describieron en la sección 2.3.2.4.1. En cada pocillo se cargaron 60 μ g de proteínas totales. Una vez terminada la electroforesis, se transfirió el gel a una cámara en buffer de transferencia 1X durante 15 minutos. Simultáneamente se humedecieron en buffer de transferencia la membrana de nitrocelulosa y el papel filtro. La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó en el equipo Trans-blot SD a 100 mA durante 1 hora. Posteriormente la membrana se bloqueó con TBS-tween 20 y leche al 5%, durante 1 hora en agitación suave. Después se realizaron 3 lavados en TBS-tween 20 por 10 minutos. El primer anticuerpo anti-Cre recombinasa diluido 1:2000, se añadió a la membrana en Buffer TBS-tween 20 y leche al 2.5%. La reacción se incubó toda la noche en agitación a 4°C de temperatura. Al siguiente día se hicieron tres lavados de 10 minutos a la membrana en TBS-tween 20. El anticuerpo primario anti β -actina se diluyó 1:10000 en buffer TBS-tween 20 y leche al 2.5% y se incubó con la membrana durante 1 hora. Nuevamente se lavó la membrana tres veces en buffer TBS-tween 20. EL anticuerpo secundario anti-Fc de ratón se añadió a la membrana a una concentración de

1:3000 en TBS-tween 20 y leche al 2.5%. Se incubó por dos horas en agitación suave, a 4°C. Nuevamente se lavó la membrana 3 veces en TBS-tween 20. Finalmente se reveló la membrana con el reactivo ECL durante 1 minuto. La membrana se expuso a un film autorradiográfico por aposición durante 1 minuto a temperatura ambiente.

2.3.2.4.3 Revelado y fijación de la película aurtorradiográfica

Después del período de exposición en la emulsión, la película fue revelada, sumergiéndola en el revelador Kodak, posteriormente, se enjuagaron con agua destilada a temperatura ambiente y sumergida en fijador de Kodak. El tiempo utilizado en cada proceso fue de 1 minuto.

2.3.3 Análisis de la actividad recombinante de la Cre recombinasa *in vitro*

2.3.3.1 Obtención de ADN plasmídico de las líneas celulares transfectadas.

Para la obtención del ADN plasmídico, las células transfectadas fueron desprendidas de las cajas de cultivo con tripsina-EDTA de la forma antes mencionada. El botón celular obtenido se resuspendió en 300 μ L de buffer de lisis (Tris 10 mM pH 7.5, EDTA 5 mM, SDS 1% y 200ug/mL de proteínasa K) y se incubó a 50°C durante 3 horas, agitando en vortex cada 15 minutos. Posteriormente se añadió un volumen de fenol y un volumen cloroformo y se agitó en vortex por 1 minuto. Se recuperó el sobrenadante conteniendo el ADN y se adicionó 0.5 volúmenes de NaCl 5M y dos

volúmenes de etanol absoluto. Se agitó suavemente por inversión. El ADN genómico se transfirió a otro tubo y el resto de sobrenadante se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 20 μ L de agua MQ estéril.

2.3.3.2 Determinación del evento de recombinación por PCR.

A partir del ADN plasmídico recuperado, se realizó un PCR para amplificar una secuencia flanqueada por los sitios loxP. El PCR se realizó utilizando los iniciadores M13 5' y 3' con las condiciones de reacción antes mencionadas. El programa utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial	92°C por 2 minutos
------------------------------	--------------------

2. 35 ciclos:

Desnaturalización	92°C por 30 segundos
-------------------	----------------------

Alineamiento	60°C por 1 minuto
--------------	-------------------

Elongación	72°C por 2 minutos
------------	--------------------

3. Extensión prolongada	72°C por 10 minutos
-------------------------	---------------------

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 0.8%.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Subclonación del gen de la enzima Cre recombinasa.

El gen de la enzima Cre recombinasa se obtuvo a partir del vector pBS185, el cual contiene el gen de la enzima Cre recombinasa, bajo la regulación del promotor del citomegalovirus humano (hCMV). El vector pBS185 (pCMV-Cre) fue digerido con las enzimas de restricción *Xho*I y *Hind*III. El fragmento obtenido de 2.7 kb, se subclonó en el vector pBSKS previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. La figura 5 muestra los productos de la digestión de los plásmidos respectivamente.

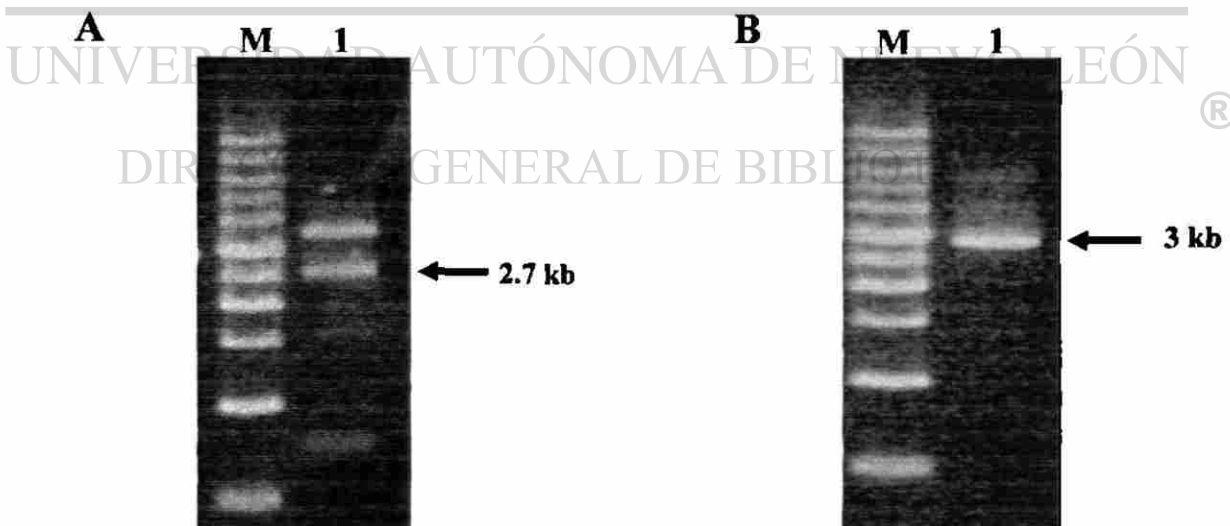


Figura 5. Digestión enzimática de los vectores pCMV-Cre y pBSKS. En A, se muestra el producto de la digestión del plásmido pCMV-Cre. La flecha indica el fragmento de 2.7 kb que corresponde al gen de la enzima Cre recombinasa. En B, la flecha señala, un fragmento de 3.0 kb que corresponde al vector pBSKS linearizado. El marcador (M) de peso molecular utilizado fue de 1 kb. Los productos fueron resueltos en geles de agarosa al 1%.

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

El nuevo plásmido recombinante obtenido (pBS-Cre) se caracterizó con diferentes enzimas de restricción para determinar si el gen de la enzima Cre recombinasa había sido subclonado en la dirección correcta. El patrón de restricción se observa en la figura 6 y nos muestra que el patrón de restricción es el esperado para esta construcción.

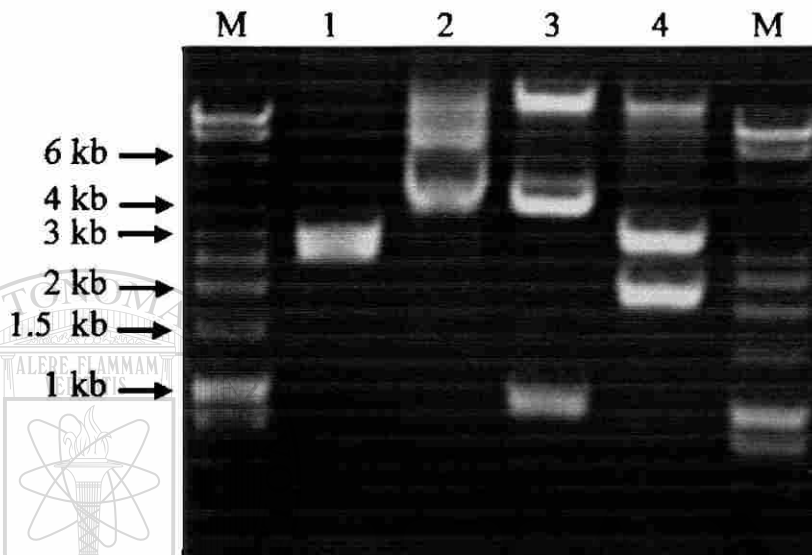


Figura 6. Caracterización enzimática del plásmido recombinante pBS-Cre. El carril 2 corresponde al ADN plasmídico sin digerir. En el carril 1, se muestra la digestión con las enzimas *XhoI* y *HindIII* que liberan un fragmento de 2.7 kb correspondiente al gen de la Cre recombinasa y un fragmento de 3 kb que corresponde al vector. En el carril 3, los fragmentos de 0.9 y 4.8 kb son producto de la digestión con la enzima *XbaI*. En el carril 4, el plásmido fue digerido con *BamHI*, liberando un fragmento de 2.2 y 3.5 kb. El marcador (M) de peso molecular utilizado fue de 1 kb. Los productos fueron resueltos en un gel de agarosa al 1%.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Posteriormente el ADN del plásmido pBS-Cre fue digerido río arriba del gen de la enzima Cre recombinasa, con la enzima *ApalI*. El vector linearizado sería utilizado para la clonación del promotor que dirija la expresión de la enzima Cre recombinasa. Por lo que fue necesario convertir los extremos cohesivos producidos por la enzima *ApalI* en extremos romos. El resultado de la digestión y conversión de los extremos se muestra en la figura 7.

3.2 Amplificación y clonación de la región 5' del gen Pitx3

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y utilizando iniciadores específicos, se amplificaron 4.3 kb del gen Pitx3 (Figura 7). El producto amplificado corresponde a 4154 pb de la región 5' y 146 pb corresponde al primer intrón. Los 4.3 kb se clonaron en el plásmido pBS-Cre, en el sitio *Apal*.

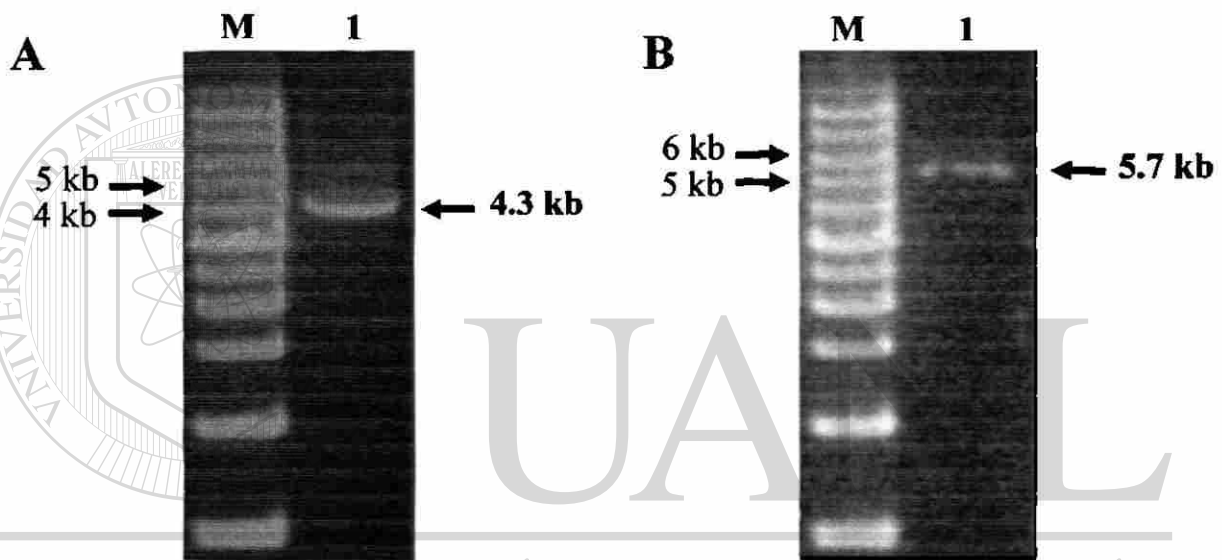


Figura 7. Amplificación de la región 5' del gen Pitx3 y linearización del vector pBS-Cre. En A, se muestra en el carril número 1, el producto amplificado del gen Pitx3 indicado por la flecha. A la izquierda, el marcador de peso molecular de 1 kb. Las flechas señalan bandas del marcador de peso molecular, entre las que se sitúa el producto de PCR. En B se muestra la digestión del plásmido pBS-Cre con la enzima *Apal* (carril 1) en donde se observa una banda de 5.7 kb que es del tamaño esperado para el vector pBS-Cre linearizado. En el carril de la izquierda se muestra el marcador de peso molecular de 1 kb. Las flechas señalan las bandas de 6 y 5 kb del marcador.

Una vez obtenido el nuevo plásmido recombinante que porta el gen de la enzima Cre recombinasa regulada por la región 5' del gen Pitx3, se caracterizó con diferentes enzimas de restricción (figura 8). El patrón de restricción, evidenció la dirección del promotor dentro de la construcción. Este nuevo vector lo llamamos pPit-Cre, su tamaño

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

es de aproximadamente 10 kb, de los que 2.7 kb corresponden al gen de la enzima Cre recombinasa, 4.3 kb de la región 5' del gen Pitx3 y 3 kb corresponden al esqueleto del vector inicial.

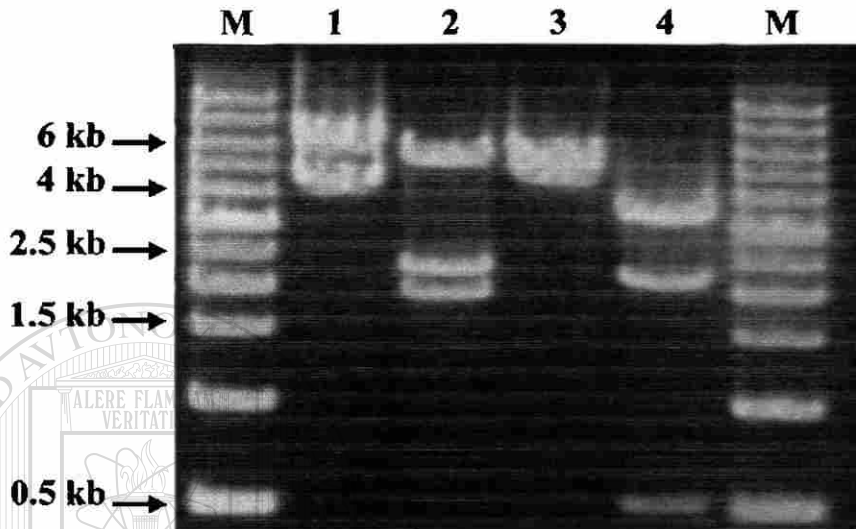


Figura 8. Caracterización enzimática del plásmido recombinante pPit-Cre. En el carril 1, se muestran los productos de 4 y 5.8 kb de la digestión del vector pPit-Cre con la enzima *HindIII*. El carril número 2 muestra la digestión que se realizó con la enzima *EcoRV* produciendo fragmentos de 2.1, 2.3 y 5.4 kb. En el carril 3 se observan dos fragmentos de 4.5 y 5.4 kb, del vector digerido con *EcoRI*, sin embargo por la escasa diferencia en tamaño no se resolvieron completamente. El carril 4 corresponde a la digestión con la enzima *BamHI*, los fragmentos obtenidos son de 0.5, 2.3, 3.5 y 3.8 respectivamente. El marcador (M) de peso molecular utilizado fue de 1 kb. Los fragmentos se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8%.

3.3 Expresión específica del gen pitx3 en la línea celular SH-SY5Y

Para poder determinar la actividad promotora de la región 5' del gen Pitx3, se realizaron ensayos *in vitro* en la línea celular SH-SY5Y (SH). Mediante RT-PCR se comprobó que la línea celular SH tiene la capacidad de reconocer la región promotora del gen Pitx3 endógeno, al amplificar 300 pb del ARN mensajero del gen Pitx3. Los

iniciadores utilizados se sintetizaron a partir del exón 1 y 2 del gen Pitx3. De la misma forma, como un control negativo, se realizó un RT-PCR utilizando ARN aislado de la línea celular de cáncer de mama MCF-7. El resultado de la amplificación del gen Pitx3 se muestra en la figura 9.

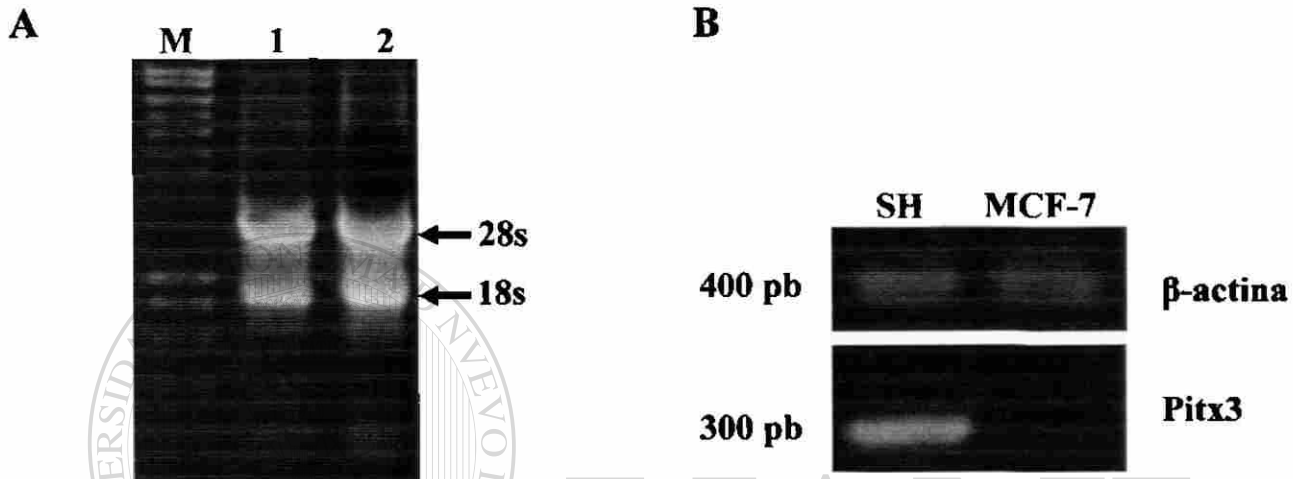


Figura 9. Expresión del gen Pitx3 en la línea celular SH. En A, se muestra el ARN obtenido de las líneas celulares SH (1) y MCF-7 (2). Las flechas indican las bandas de ARN 28s y 18s. B, Amplificación por RT-PCR del gen Pitx3 en la línea celular SH. En el carril inferior izquierdo se muestra la amplificación de Pitx3. En el carril inferior derecho la ausencia del mensajero en la línea celular MCF-7. Los carriles superiores corresponden a la amplificación por RT-PCR del gen β -actina.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.4 Análisis funcional del promotor Pitx3 clonado en el vector pPit-Cre.

Una vez comprobada que la línea celular tiene la capacidad de reconocer la región promotora del gen Pitx3 endógeno. Se realizaron ensayos *in vitro* para determinar la actividad promotora de la región 5' del gen Pitx3, contenido en el vector pPit-Cre. Las líneas celulares SH-SY5Y y MCF-7 fueron transfectadas con los vectores pPit-Cre y pCMV-Cre. Con el ARN obtenido de las líneas celulares transfectadas, se realizó un RT-

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

PCR para el gen de la enzima Cre recombinasa. Los resultados obtenidos demostraron que la región 5' del gen Pitx3 en la construcción pPit-Cre, es funcional y tiene actividad promotora, al transcribir el gen de la enzima Cre recombinasa situado río abajo de la secuencia promotora. La actividad del promotor fue restringida a la línea celular SH-SY5Y mientras que en la línea celular MCF-7 resultó negativo. Demostrando con ello que el promotor es específico de células con características de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. En el caso de las transfecciones realizadas con el vector pCMV-Cre, ambas líneas mostraron expresión del gen de la enzima Cre recombinasa como resultado de la actividad constitutiva del promotor de citomegalovirus. Los resultados se muestran en la figura 10.

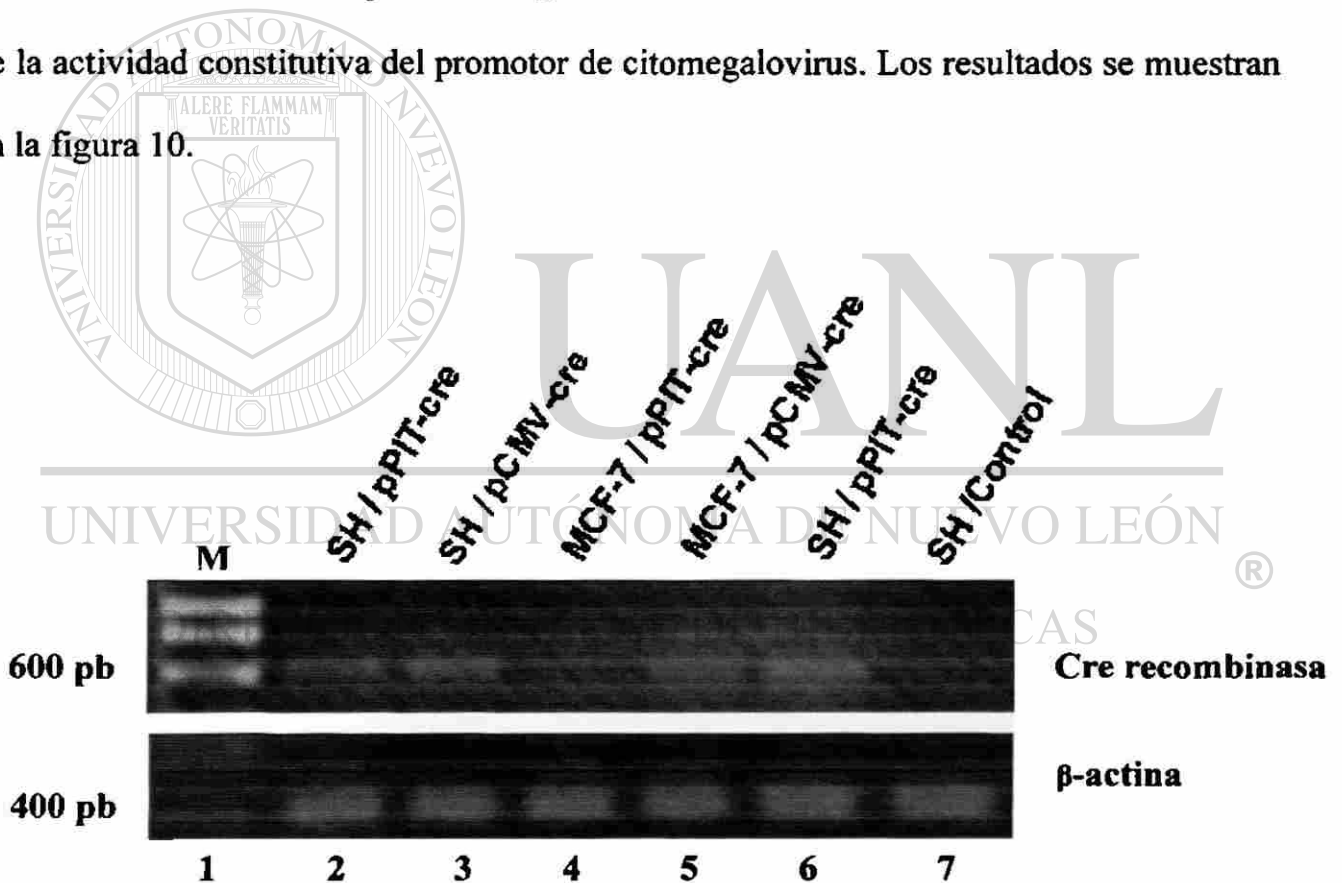


Figura 10. Expresión del gen de la Cre recombinasa. En los carriles superiores del 2 al 6 se muestra el resultado de la amplificación de un fragmento de 600 pb del gen de la Cre recombinasa mediante análisis de RT-PCR. En los carriles 2, 3, 6, y 7 se utilizó la línea celular SH. En los carriles 4 y 5 se utilizó la línea MCF-7. En el carril 2, 4 y 6 se transfectó con el plásmido pPit-Cre. Los carriles 3 y 5 son el resultado de la transfección con el plásmido pCMV-Cre. El carril 7, corresponde a células sin transfectar. En el carril 1, el marcador de peso molecular. Los carriles inferiores corresponden a la amplificación de un fragmento de 400 pb del gen β-actina mediante RT-PCR.

3.5 Identificación de la enzima Cre recombinasa por Western blot.

Para confirmar los resultados obtenidos de la actividad promotora del gen *Pitx3* clonada en el plásmido pPit-Cre, se utilizó la técnica de Western Blot para detectar la enzima Cre recombinasa en las líneas celulares SH-SY5Y y MCF-7 transfectadas con los vectores pPit-Cre y pCMV-Cre. Los resultados obtenidos, confirmaron la presencia de la proteína Cre recombinasa en las células SH-SY5Y transfectadas con el vector pPit-Cre, mientras que en las células MCF-7 no se detectó la proteína. Estos datos coincidieron con los obtenidos mediante la técnica de RT-PCR. En el caso de las transfecciones realizadas con el plásmido pCMV-Cre, se detectó la proteína en ambas líneas celulares como se esperaba. Los resultados se muestran en la figura 11.

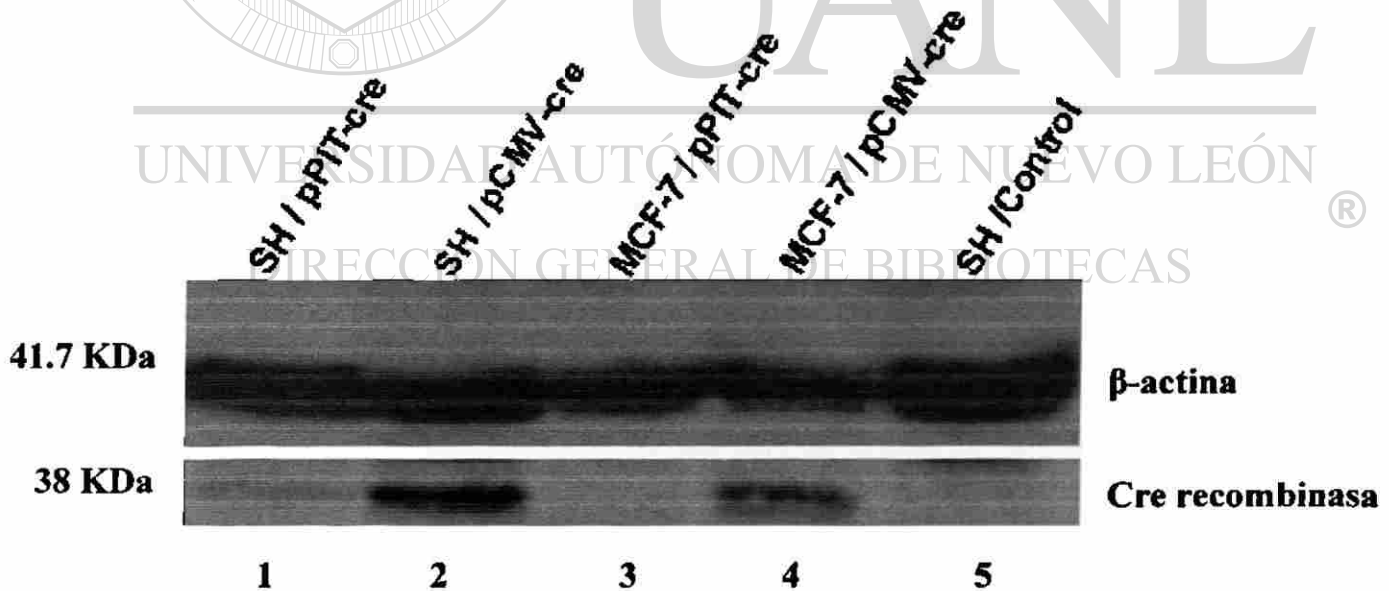


Figura 11. Identificación de la proteína Cre recombinasa mediante análisis de Western Blot. En los carriles superiores se muestra como control de carga, la detección de la proteína β -actina de 41.7 KDa. Los carriles inferiores corresponden a la detección por la técnica de Western Blot de la proteína Cre recombinasa de 38 KDa. Los carriles 1, 2 y 5 son resultados de la línea celular SH-SY5Y. En los carriles 3 y 4 son resultados de la línea MCF-7. En los carriles 1 y 3 se transfectó con el plásmido pPit-Cre. Los carriles 2 y 4 son el resultado de la transfección con el plásmido pCMV-Cre.

3.6 Determinación de la actividad de la enzima Cre recombinasa *in vitro*

Una vez comprobada la actividad promotora de la secuencia 5' del gen Pitx3 previamente clonada en el vector pPit-Cre. Se determinó si la proteína Cre recombinasa expresada por la secuencia promotora del gen Pitx3 era funcional, es decir, si era capaz de reconocer las secuencias LoxP y llevar a cabo el proceso de recombinación. Para ello, se realizaron transfecciones y cotransfecciones en la línea celular SH-SY5Y con los vectores que portan el gen de la enzima Cre-recombinasa: pPit-Cre, pCMV-Cre y un vector que porta secuencias LoxP (pLoxA).

3.6.1. Confirmación de la presencia de los vectores que portan el gen de la Cre-recombinasa (pPit-Cre y pCMV-Cre) en la línea celular SH-SY5Y.

Para confirmar la presencia de los vectores que portan el gen de la enzima Cre recombinasa se aisló el ADN plasmídico de las células SH-SY5Y transfectadas. Mediante la técnica de PCR se comprobó la presencia de los vectores pPit-Cre y pCMV-Cre, al amplificar un fragmento de 600 pb del gen de la enzima Cre recombinasa. Los resultados se muestran en la figura 12.

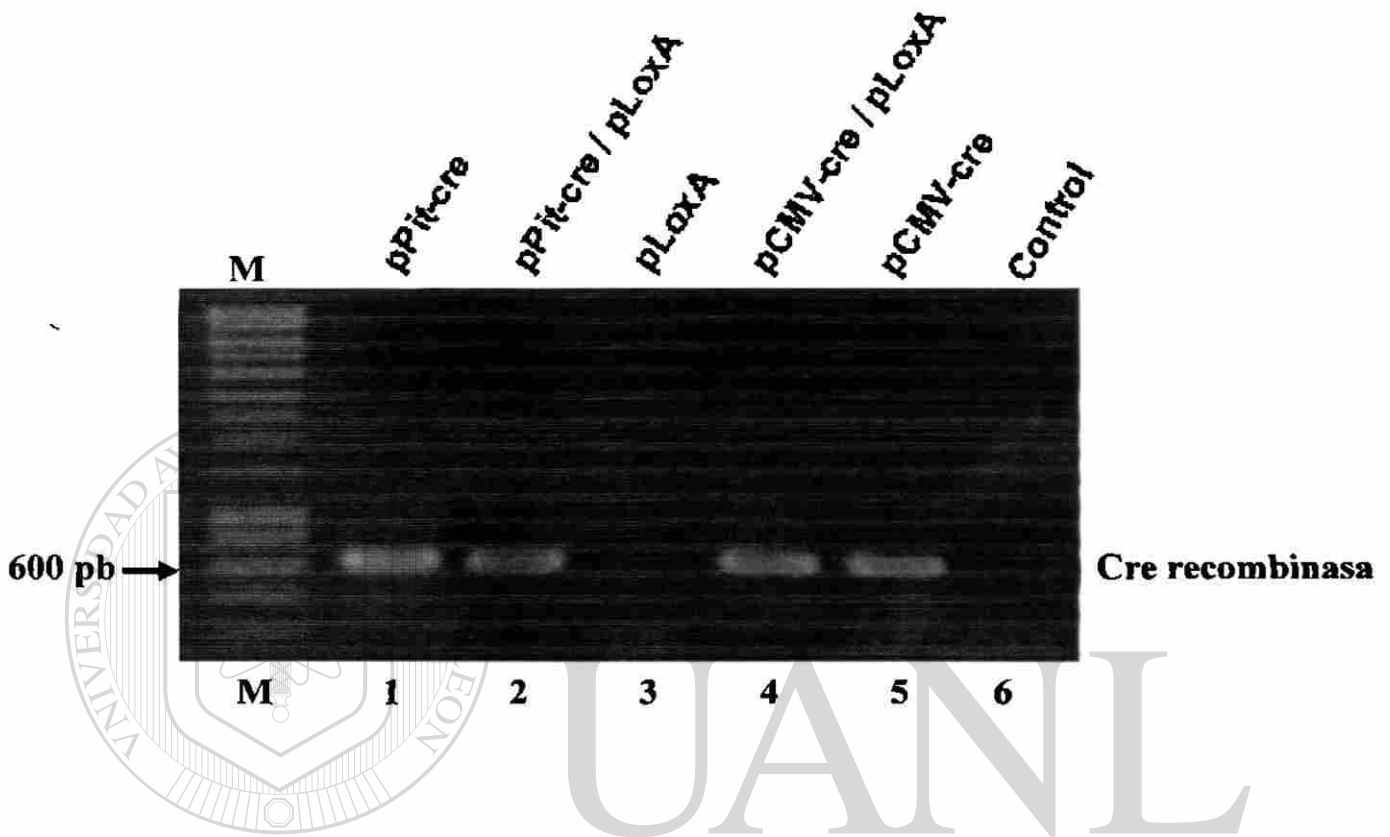


Figura 12. Amplificación del gen de la Cre recombinasa por PCR, a partir del ADN plasmídico recuperado de la transfección de la línea celular SH-SY5Y. En el carril 1, se transfectó con el plásmido pPit-Cre. En el carril 2 se hizo una co-transfección con los plásmidos pPit-Cre/pLoxA. En el carril 3 se transfectó con el plásmido pLoxA. En el carril 4 se co-transfectó con los vectores pCMV-Cre y pLoxA. En el carril 5 se transfectó con el vector pCMV-Cre. El carril 6 es un control negativo sin transfectar. En los carriles 1, 2, 4 y 5 se muestra la amplificación de un fragmento de 600 pb correspondiente al gen de la Cre recombinasa. En el carril 3 el plásmido transfectado no porta el gen de la enzima Cre recombinasa por lo que el resultado fue negativo. El primer carril (M), corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb.

3.6.2 Recombinación *in vitro* de los sitios LoxP del plásmido pLoxA por la enzima Cre recombinasa dirigida por la región promotora del gen Pitx3.

Para determinar la actividad de la enzima Cre recombinasa *in vitro*, se utilizó el ADN plasmídico recuperado de las células transfectadas con los plásmidos pPit-Cre, pCMV-Cre y pLoxA del experimento anterior. El evento de recombinación se comprobó mediante la amplificación por PCR del plásmido pLoxA. Este último, contiene el gen de resistencia a neomicina (Neo), flanqueado por secuencias loxP que reconoce la enzima Cre-recombinasa. Los iniciadores que se utilizaron para la amplificación del pLoxA, reconocen secuencias de ADN situados por fuera de los sitios loxP. Los productos obtenidos mediante la técnica de PCR fueron un fragmento de aproximadamente 1.9 kb, que provenía del plásmido no recombinado y uno de 300 pb que provenía del plásmido recombinado (Figura 13 A). Los resultados mostraron que la enzima Cre recombinasa dirigida por la secuencia promotora del gen Pitx3 es funcional, al recombinar los sitios loxP del plásmido pLoxA. Sin embargo, la cantidad de plásmido recombinado fue menor que el obtenido con la enzima Cre recombinasa dirigida por el promotor del citomegalovirus. Los resultados se muestran en la figura 13 B.

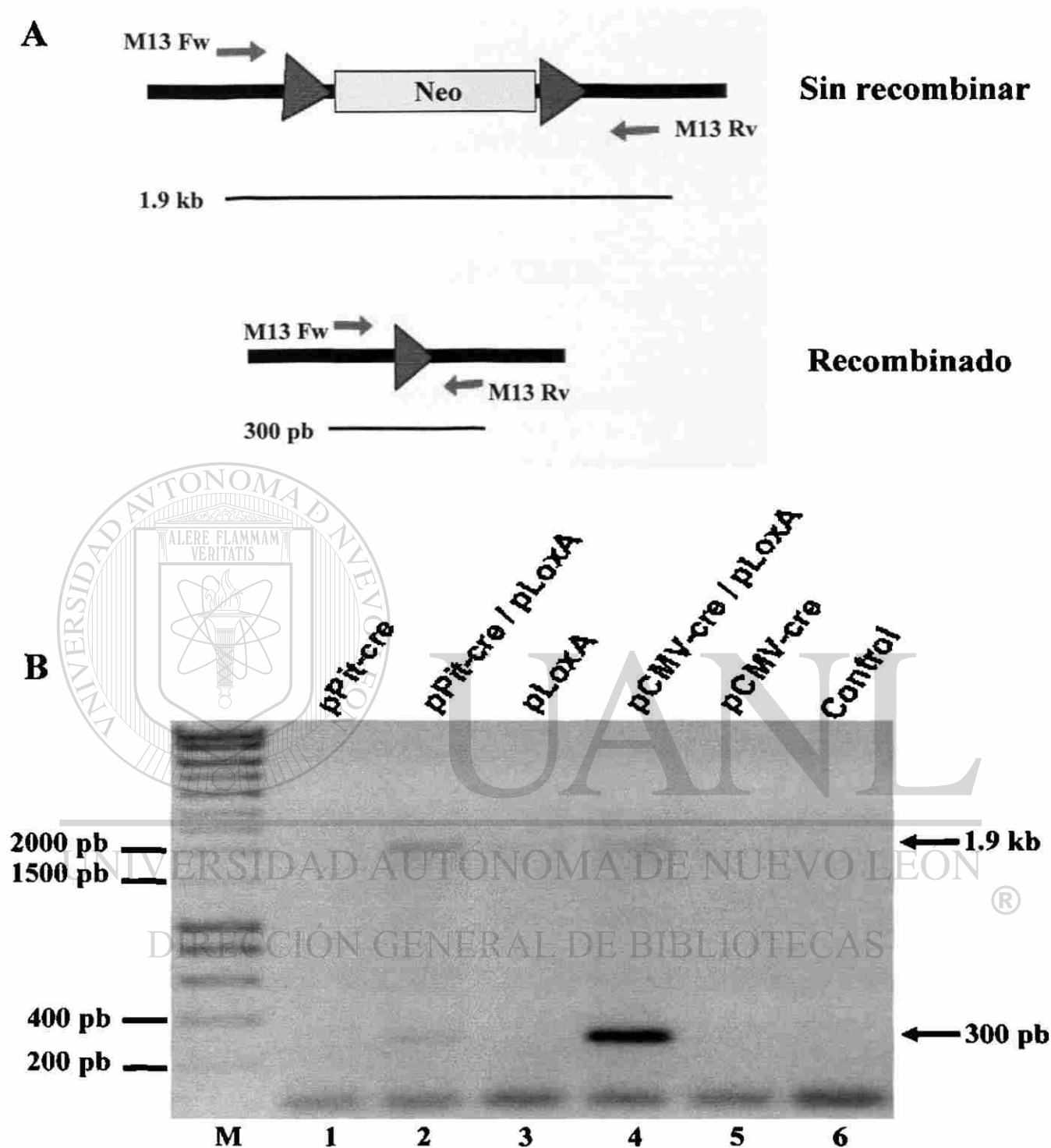
Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

Figura 13 B. Actividad de la enzima Cre-recombinasa *in vitro*. En el carril 1 y 4 se transfectaron células de la línea SH-SY5Y con los plásmidos que expresan la enzima Cre recombinasa pPit-Cre y pCMV-Cre respectivamente. En los carriles 2 y 4 se co-transfectó con los plásmidos pPit-Cre/ pLoxA y pCMV-Cre/ pLoxA respectivamente. En el carril 3 se transfectó el plásmido pLoxA. En los carriles 2, 3 y 4 la flecha indica la amplificación de 1.9 kb del plásmido pLoxA sin recombinar. En el carril 2 y 4 la flecha inferior señala la banda de 300 pb que corresponde al plásmido pLoxA recombinado. El carril 6 es un control negativo sin transfectar.

CAPITULO IV

DISCUSION

En la región ventral mesencefálica se expresan diversos genes involucrados en la diferenciación y mantenimiento de neuronas dopaminérgicas. Uno de ellos, el gen *Nurr1*, es un factor de transcripción importante en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas. La inactivación del gen *Nurr1* en ratones, provocó muerte neuronal y falta de expresión de genes necesarios para que las células adquirieran un fenotipo dopaminérgico. En los ratones knockout *Nurr1*, solo la región ventral del mesencéfalo resultó afectada, mientras que otras regiones donde también se eliminó la expresión del gen *Nurr1*, no se observaron alteraciones. La especificidad mostrada sugiere que la expresión del gen *Nurr1* es importante únicamente en la región afectada, sin embargo no se puede descartar que la inactivación del gen en otras regiones, pudiera inducir de forma indirecta la muerte neuronal en el mesencéfalo.

Para poder determinar el efecto de la inactivación del gen *Nurr1* específicamente en el mesencéfalo, es necesario desarrollar un modelo animal donde solamente se elimine la expresión del gen *Nurr1* en neuronas dopaminérgicas de la región ventral mesencefálica. El tipo de modelo animal donde se puede eliminar la expresión de un gen en una región específica y en un momento determinado, se le conoce como condicional.

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

En ellos, el gen blanco es flanqueado por secuencias de ADN llamadas LoxP. La enzima que se encarga de reconocer y recombinar esas secuencias eliminando el gen blanco situado entre los LoxP, se conoce como Cre recombinasa.

Para obtener un modelo animal de inactivación condicional del gen *Nurr1* en el mesencéfalo, es necesario desarrollar dos ratones transgénicos, uno de ellos que porte la secuencia del gen *Nurr1* flanqueada por los sitios LoxP y otro ratón transgénico que exprese la enzima Cre recombinasa específicamente en el mesencéfalo. Una vez obtenidos los ratones transgénicos, en la progenie producto de la cruce de los transgénicos, ocurrirá la eliminación del gen *Nurr1* en el sitio donde se exprese la enzima Cre recombinasa. Por ello, es importante utilizar la región promotora de un gen que se exprese en el sitio donde se desea ocurra la recombinación de las secuencias LoxP y por lo tanto la eliminación del gen *Nurr1*. Actualmente el único gen que se expresa de forma específica en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y en ninguna otra región del sistema nervioso central, es el gen *Pitx3*.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Pitx3 es un factor de transcripción que se expresa en las neuronas dopaminérgicas de la región ventral del mesencéfalo y en el cristalino del ratón. El gen mide 12.6 kb, esta formado por 4 exones, 3 intrones y la región promotora aún no ha sido totalmente delimitada. Una delección de 654 pb a -2.5 kb del punto de inicio de la transcripción y la pérdida del primer exón del gen *Pitx3* en ratones provoca alteraciones caracterizadas por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la región ventral del

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

mesencéfalo, la ausencia del cristalino y párpados cerrados. El fenotipo de esos ratones recibió el nombre de “aphakia”.

Aunque las alteraciones mostradas tanto en los ratones aphakia como en el knockout *Nurr1* son similares en cuanto a la pérdida de neuronas dopaminérgicas, no se sabe si ambos genes están involucrados en una misma cascada regulatoria. Se sabe que se expresan en el mesencéfalo de embriones de ratón a diferentes tiempos. *Nurr1* comienza a expresarse a los 10.5 días, mientras que la expresión del gen *Pitx3* inicia a los 11 días en la misma región cerebral. En hibridaciones *in situ* realizadas en cortes de cerebro de ratones knockout *Nurr1*, se detectó la expresión del gen *Pitx3*, sugiriendo que en knockout *Nurr1*, la expresión del gen *Pitx3* es independiente del gen *Nurr1*. Por otro lado, las neuronas en el cerebro de los knockout *Nurr1*, están presentes pero no se diferencian al fenotipo dopaminérgico.

Publicaciones recientes han demostrado que ambos genes tienen la capacidad de transcribir al gen de la tirosina hidroxilasa (TH)^{5,6}. La enzima TH interviene en la síntesis del neurotransmisor dopamina, al hidroxilar el aminoácido tirosina convirtiéndolo en el precursor de la dopamina, la L-Dopa.

Recientemente, se ha propuesto que en la sustancia negra de la región ventral mesencefálica, existen dos poblaciones de neuronas dopaminérgicas donde los genes *Pitx3* y *Nurr1* regulan al gen TH de forma independiente en cada población celular³⁹. Aunque algunos resultados aparentemente demostraban lo anterior, poco después se

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

comprobó que se trataba de una sola línea celular. Sin embargo aún no se ha determinado de que forma interactúan ambos genes. Sugiriendo con ello, que si se elimina de forma específica la expresión del gen *Nurr1* en el mesencéfalo, los ratones condicionales que se obtengan podrían sobrevivir ya que probablemente el gen *Pitx3* pueda suplir la función del gen *Nurr1* al transcribir al gen de la TH continuando con ello la diferenciación de las neuronas al fenotipo dopaminérgico.

Aunque la región promotora del gen *Pitx3* aún no ha sido totalmente delimitada, se conoce el punto de inicio de la transcripción y algunas secuencias que identifican la región 5' del gen *Pitx3* como región promotora. También, se ha establecido que a 4.2 kb del sitio de inicio de la transcripción inicia la región promotora del gen *Gbfl* cuya orientación es contraria a la del gen *Pitx3*.

En el 2002, se desarrolló un ratón knockout, en el que la secuencia codificante del gen *Pitx3* fue sustituida por el gen de la proteína verde fluorescente, mediante recombinación homóloga⁴⁰. En ese ratón no se modificó la región promotora del gen *Pitx3* endógeno. Por lo que hasta el momento no se ha establecido a que distancia del punto de inicio de la transcripción se localiza la región promotora del gen *Pitx3*, ni se ha utilizado para dirigir la expresión de algún gen blanco en ensayos *in vitro*.

En este trabajo, se amplificaron 4.3 kb de la región 5' del gen *Pitx3*, 4.1 kb corresponden a la posible región promotora del gen *Pitx3* y 145 pb corresponden al primer exón del gen. La región 5' amplificada del gen *Pitx3* se utilizó para dirigir la

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

expresión del gen de la enzima Cre recombinasa *in vitro*. Nuestros resultados mostraron que los 4.1 kb amplificados son suficientes para actuar como promotor y transcribir el gen de la enzima Cre recombinasa.

Mediante RT-PCR encontramos que la región promotora del gen Pitx3 es funcional en la línea celular SH-SY5Y. Esta línea celular derivada de neuroblastoma, posee características propias de neuronas dopaminérgicas derivadas de la región ventral del mesencéfalo, entre ellas, producir dopamina, expresar el gen de la TH y al gen Nurr1. Aunque la región promotora del gen Pitx3 proviene del genoma del ratón, fue funcional en la línea celular SH-SY5Y de origen humano.

En transfecciones realizadas con el plásmido pPit-Cre, el cual porta el gen de la enzima Cre recombinasa bajo la regulación de la región promotora del gen Pitx3, pudimos detectar los transcritos del gen de la enzima Cre recombinasa en la línea celular SH-SY5Y no así en la línea celular MCF-7 cuyo origen proviene de células de cáncer de mama. Demostrando con ello que la actividad promotora de los 4.1 kb amplificados del gen Pitx3 muestra especificidad en células con características neuronales.

Cuando se realizó la detección de la proteína Cre recombinasa mediante la técnica de Western blot, pudimos observar que la cantidad de proteína Cre recombinasa, fue mucho menor en células transfectadas con el plásmido pPit-Cre, a diferencia del plásmido pCMV-Cre el cual posee el promotor de citomegalovirus. Esto era esperado ya que el promotor de citomegalovirus es constitutivo, mientras que el promotor del gen

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

Pitx3 es reconocido por la maquinaria transcripcional, en respuesta a la necesidad de las células SH-SY5Y para transcribir el gen Pitx3 endógeno. Sin olvidar que la línea celular utilizada era de origen humano, mientras que el promotor se amplificó a partir del genoma del ratón, por lo que la diferencia entre especies pudo afectar los niveles de expresión de la enzima Cre recombinasa.

Como el objetivo de este trabajo, era obtener un cassette de expresión de la enzima Cre recombinasa bajo la regulación de la región promotora del gen Pitx3 y probar su eficiencia *in vitro*, se determinó si la enzima Cre recombinasa regulada por la región promotora del gen Pitx3 era funcional. Para ello, se realizaron varias co-transfecciones con los vectores pPit-Cre, pCMV-Cre y el plásmido pLoxA. Este último contiene el gen de resistencia a neomicina (Neo), flanqueado por secuencias LoxP. Los resultados demostraron la eficiencia de la enzima Cre recombinasa para recombinar las secuencias LoxP. En este ensayo, pudimos observar nuevamente que la actividad de recombinación fue menor en las transfecciones realizadas con el plásmido pPit-Cre a diferencia del plásmido pCMV-Cre. Sin embargo este resultado es favorable, ya que existen algunos reportes donde se ha visto que cuando la enzima Cre recombinasa es regulada por un promotor fuerte, aparecen alteraciones en las células donde se expresa la enzima Cre recombinasa, tales como re-arreglos cromosómicos y recombinación al azar del genoma⁵⁸⁻⁶⁰.

Probablemente esto se deba a que bajo la regulación de un promotor fuerte la cantidad de enzima producida sea mayor que la cantidad de enzima que se degrada.

Hasta la fecha no existe ningún reporte donde se indique el tiempo de vida de la enzima ni la vía de degradación.

Por otro lado, la enzima Cre recombinasa es una topoisomerasa tipo III, estas enzimas realizan cortes en cadenas sencillas de ADN, permitiendo que la hélice de la doble hebra de ADN se mantenga relajada, por lo que tal vez la acumulación de la Cre recombinasa pueda provocar que la enzima corte sin sentido el DNA genómico algo semejante a la actividad estrella que muestran las enzimas de restricción.

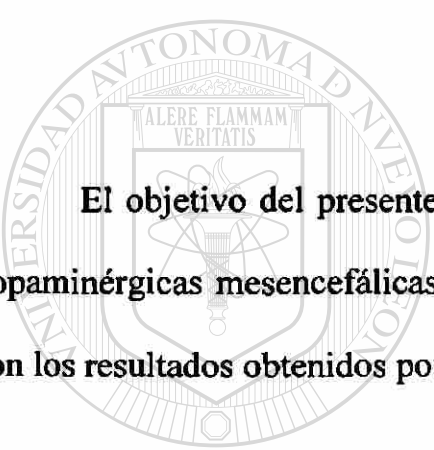
Por último, es importante mencionar el potencial que tiene el vector recombinante obtenido en el presente trabajo. Este vector permitirá desarrollar una línea de ratones transgénicos que exprese la enzima Cre recombinasa exclusivamente en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

La línea de transgénicos que se obtenga, podrá ser cruzada con una línea de ratones que porte en su genoma el gen *Nurr1* flanqueado por secuencias LoxP. En la progenie, la enzima Cre-recombinasa reconocerá los sitios LoxP y los recombinará, eliminando el gen *Nurr1* flanqueado por los sitios LoxP específicamente en el mesencéfalo. Obteniendo con ello un modelo de inactivación condicional para el factor de transcripción *Nurr1*, gen esencial para la diferenciación y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIONES

5.1 CONCLUSIONES



El objetivo del presente trabajo fue, clonar un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y determinar su análisis funcional *in vitro*. De acuerdo con los resultados obtenidos podemos decir que:

- (1) Se clonó 4.3 kb de la región 5' del gen Pitx3 y se demostró su funcionalidad como promotor.
- (2) Este promotor mostró especificidad de expresión en células neuronales.
- (3) Se obtuvo un cassette de expresión de la enzima Cre recombinasa bajo la regulación del promotor del gen Pitx3.
- (4) La enzima Cre recombinasa regulada por la región 5' del gen Pitx3 fue funcional.

5.2 CONTRIBUCIONES

Obtención por primera vez de una secuencia que puede ser utilizada como promotor para dirigir la expresión de genes en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. La construcción obtenida en este trabajo, podrá utilizarse para desarrollar un ratón transgénico que exprese la enzima Cre recombinasa en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas desde los 11 días del desarrollo embrionario hasta etapa adulta. Este ratón transgénico se podrá utilizar en modelos knockout de inactivación condicional en la región dopaminérgica mesencefálica.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFÍA

1. **Burbach, J. P.**, Smits, S. & Smidt, M. P. Transcription factors in the development of midbrain dopamine neurons. *Ann N Y Acad Sci* 991, 61-8 (2003).
2. **Simon, H. H.**, Bhatt, L., Gherbassi, D., Sgado, P. & Alberi, L. Midbrain dopaminergic neurons: determination of their developmental fate by transcription factors. *Ann N Y Acad Sci* 991, 36-47 (2003).
3. **Smidt, M. P.**, Smits, S. M. & Burbach, J. P. Molecular mechanisms underlying midbrain dopamine neuron development and function. *Eur J Pharmacol* 480, 75-88 (2003).
4. **Blanchard, V.** et al. Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. *Brain Res Mol Brain Res* 22, 29-38 (1994).
5. **Lebel, M.**, Gauthier, Y., Moreau, A. & Drouin, J. Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high-affinity binding site. *J Neurochem* 77, 558-67 (2001).
6. **Cazorla, P.**, Smidt, M. P., O'Malley, K. L. & Burbach, J. P. A response element for the homeodomain transcription factor Ptx3 in the tyrosine hydroxylase gene promoter. *J Neurochem* 74, 1829-37 (2000).
7. **Smidt, M. P.** et al. A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13305-10 (1997).
8. **Saucedo-Cardenas, O.** & Conneely, O. M. Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *J Mol Neurosci* 7, 51-63 (1996).

9. **Zetterstrom, R. H.**, Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L. & Perlmann, T. Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol* 10, 1656-66 (1996).
10. **Saucedo-Cardenas, O.** et al. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4013-8 (1998).
11. **Castillo, S. O.** et al. Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. *Mol Cell Neurosci* 11, 36-46 (1998).
12. **Zetterstrom, R. H.** et al. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276, 248-50 (1997).
13. **Lakso, M.** et al. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6232-6 (1992).
14. **Orban, P. C.**, Chui, D. & Marth, J. D. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6861-5 (1992).
15. **Abremski, K.** & Hoess, R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* 259, 1509-14 (1984).
16. **Hoess, R.**, Abremski, K. & Sternberg, N. The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 49, 761-8 (1984).
17. **Hoess, R. H.** & Abremski, K. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1026-9 (1984).
18. **Sauer, B.** & Henderson, N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-70 (1988).
19. **Sauer, B.** Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. *Methods Enzymol* 225, 890-900 (1993).
20. **Hoess, R.**, Abremski, K., Irwin, S., Kendall, M. & Mack, A. DNA specificity of the Cre recombinase resides in the 25 kDa carboxyl domain of the protein. *J Mol Biol* 216, 873-82 (1990).

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

21. **Mack, A., Sauer, B., Abremski, K. & Hoess, R.** Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site. *Nucleic Acids Res* 20, 4451-5 (1992).
22. **Lee, L. & Sadowski, P. D.** Sequence of the loxP site determines the order of strand exchange by the Cre recombinase. *J Mol Biol* 326, 397-412 (2003).
23. **Wierzbicki, A., Kendall, M., Abremski, K. & Hoess, R.** A mutational analysis of the bacteriophage P1 recombinase Cre. *J Mol Biol* 195, 785-94 (1987).
24. **Guo, F., Gopaul, D. N. & van Duyne, G. D.** Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 389, 40-6 (1997).
25. **Li, Z. W. et al.** Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6158-62 (1996).
26. **Nagy, A.** Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109 (2000).
27. **Wagner, J. et al.** Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in *Nurr1*-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol* 17, 653-9 (1999).
28. **Wang, X. et al.** Forskolin cooperating with growth factor on generation of dopaminergic neurons from human fetal mesencephalic neural progenitor cells. *Neurosci Lett* 362, 117-21 (2004).
29. **Zetterstrom, R. H., Williams, R., Perlmann, T. & Olson, L.** Cellular expression of the immediate early transcription factors *Nurr1* and *NGFI-B* suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res Mol Brain Res* 41, 111-20 (1996).
30. **Gage, P. J., Suh, H. & Camper, S. A.** The bicoid-related *Pitx* gene family in development. *Mamm Genome* 10, 197-200 (1999).
31. **Semina, E. V., Reiter, R. S. & Murray, J. C.** Isolation of a new homeobox gene belonging to the *Pitx/Rieg* family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum Mol Genet* 6, 2109-16 (1997).
32. **Tvrđik, P. et al.** *Cig30* and *Pitx3* genes are arranged in a partially overlapping tail-to-tail array resulting in complementary transcripts. *J Biol Chem* 274, 26387-92 (1999).

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro*

33. **Rieger, D. K.**, Reichenberger, E., McLean, W., Sidow, A. & Olsen, B. R. A double-deletion mutation in the Pitx3 gene causes arrested lens development in aphakia mice. *Genomics* 72, 61-72 (2001).
34. **Semina, E. V.**, Murray, J. C., Reiter, R., Hrstka, R. F. & Graw, J. Deletion in the promoter region and altered expression of Pitx3 homeobox gene in aphakia mice. *Hum Mol Genet* 9, 1575-85 (2000).
35. **van den Munckhof, P.** et al. Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development* 130, 2535-42 (2003).
36. **Smidt, M. P.** et al. Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. *Development* 131, 1145-55 (2004).
37. **Smidt, M. P.**, Smits, S. M. & Burbach, J. P. Homeobox gene Pitx3 and its role in the development of dopamine neurons of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 318, 35-43 (2004).
38. **Smits, S. M.**, Mathon, D. S., Burbach, J. P., Ramakers, G. M. & Smidt, M. P. Molecular and cellular alterations in the Pitx3-deficient midbrain dopaminergic system. *Mol Cell Neurosci* 30, 352-63 (2005).
39. **Maxwell, S. L.**, Ho, H. Y., Kuehner, E., Zhao, S. & Li, M. Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. *Dev Biol* 282, 467-79 (2005).
40. **Zhao, S.** et al. Generation of embryonic stem cells and transgenic mice expressing green fluorescence protein in midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 19, 1133-40 (2004).
41. **Adams, D. J.** & van der Weyden, L. Are we creating problems? Negative effects of Cre recombinase. *Genesis* 29, 115 (2001).
42. **Hadjantonakis, A. K.**, Pirity, M. & Nagy, A. Cre recombinase mediated alterations of the mouse genome using embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 97, 101-22 (1999).
43. **Loonstra, A.** et al. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9209-14 (2001).

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Diana Laura Castillo Carranza

Campo de Estudio: Morfología

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Reynosa, Tamaulipas, el 20 de Marzo de 1976, hija del Sr. Santos Castillo Campos y la Sra. María Lucila Carranza Contreras.

Escolaridad: Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT), Febrero de 1998.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

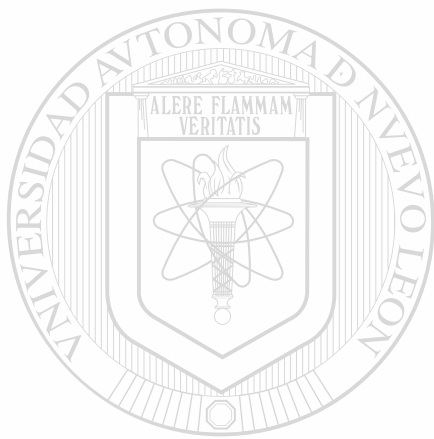


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Maestría con orientación en Morfología. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Febrero del 2002. Graduada con mención Honorífica.

Experiencia profesional:

2004-2006 Docente del Depto. de Histología en pregrado de la Facultad de Medicina de la UANL.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



