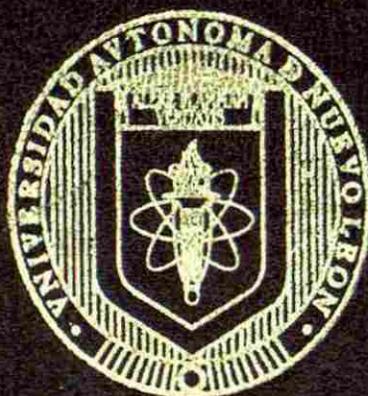


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**GENERACION DE UN VECTOR DE RECOMBINACION  
HOMOLOGA PARA LA INACTIVACION CONDICIONAL  
DEL GEN NURR 1**

**POR:**

**BIOL. HUMBERTO RODRIGUEZ ROCHA**

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

**AGOSTO 2006**

TD

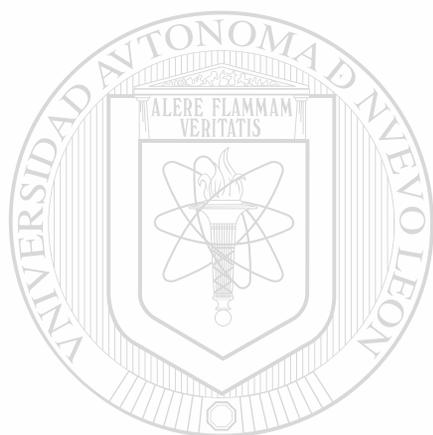
QP563

.D66

R64

2006

c.1



# UANL

---

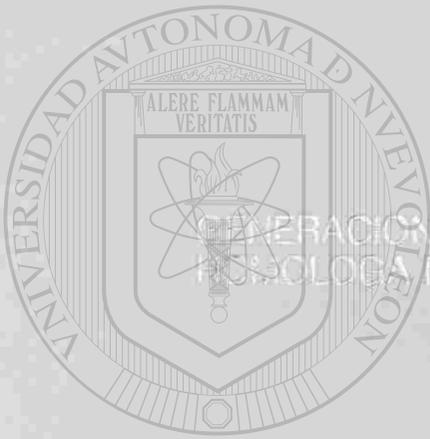
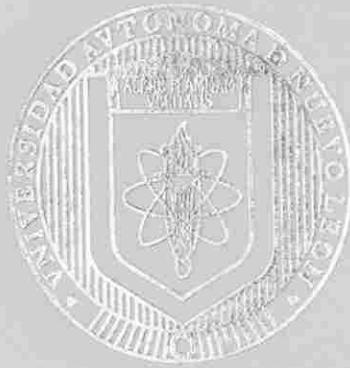
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



GENERACIÓN DE UN VECTOR DE RECOMBINACIÓN  
MOLÉCULA PARA LA INACTIVACIÓN CONDICIONAL  
DEL GEN NURR1

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

BIOL. HUMBERTO RODRIGUEZ ROCHA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

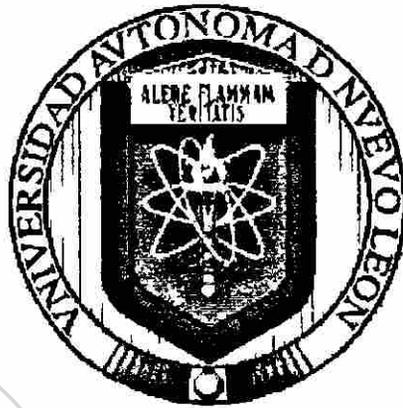
®

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

AGOSTO 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**GENERACIÓN DE UN VECTOR DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA PARA LA  
INACTIVACIÓN CONDICIONAL DEL GEN NURR1**

**Por**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

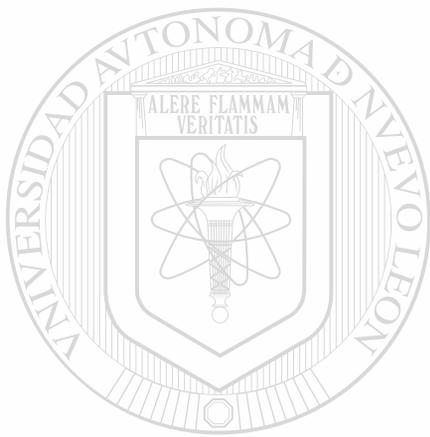
**Biol. Humberto Rodríguez Rocha**

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

®

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

**Agosto 2006**



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**GENERACIÓN DE UN VECTOR DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA PARA LA  
INACTIVACIÓN CONDICIONAL DEL GEN NURR1**

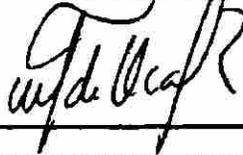
**Comité de Tesis**



---

**DRA. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS**

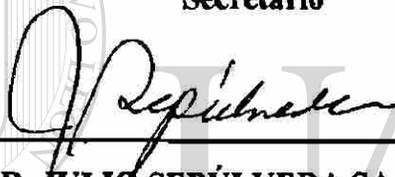
**Presidenta**



---

**DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA**

**Secretario**



---

**DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA**

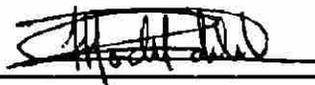
**1er. Vocal**



---

**DR. NORBERTO LÓPEZ SERNA**

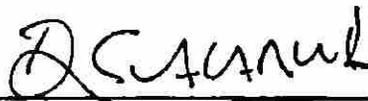
**2do. Vocal**



---

**DRA. MARÍA DEL ROBLE VELASCO CAMPOS**

**3er. Vocal**



---

**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**

**Subdirector de Investigación y Estudios de Postgrado**

## *Dedicatoria*

*A mis padres: María Rocha Ramírez y Humberto Rodríguez Mota*

*A mis hermanos: Martín, Jesús, Martha, Laura, la Negrita, Brenda, José y Argenis, por su apoyo incondicional siempre...*

*Este trabajo esta dedicado muy especialmente a una gran mujer, la cual me ha dado su apoyo y cariño de forma incondicional.*

*Gracias mil. Para tí Aracely*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## *Agradecimientos*

*A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas por aceptarme en su equipo de trabajo y dirigir la presente tesis, por darme la confianza de ser uno de sus estudiantes, por sus consejos y enseñanzas, así como por su acertada dirección...*

*Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por darme la oportunidad de ingresar en el campo de la Biología Molecular, y realizar parte de este trabajo en su laboratorio, por sus acertados comentarios, por la formación que adquirí en su laboratorio, y por el apoyo que me ha brindado...*

*Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por su apoyo y disposición para la realización de este trabajo...*

*Al Dr. Norberto López Serna y a la Dra. María Del Roble Velasco Campos por aceptar formar parte del comité de tesis, así como por su disposición para su revisión y acertados comentarios...*

*Al Dr. Arturo Chávez Reyes por sus acertados comentarios, y por darme hospedaje en las visitas relámpago a Houston, aún sin conocerme...*

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

*A todos los compañeros y amigos del Departamento de Histología: Cecilia, Arnulfo, Lalo, Blanca, Cristián...*

*A mis amigos de la UMG: Laura, Marichu, Deya y Beto, por su disposición, colaboración, compañerismo y sobre todo por su amistad...*

## **CRÉDITOS**

**A la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)  
por aceptarme dentro de su programa de posgrado.**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de  
la beca de doctorado.**

**Al Centro de Investigaciones Biomédicas del IMSS por apoyarme como becario en  
investigaciones durante la realización de este trabajo.**



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

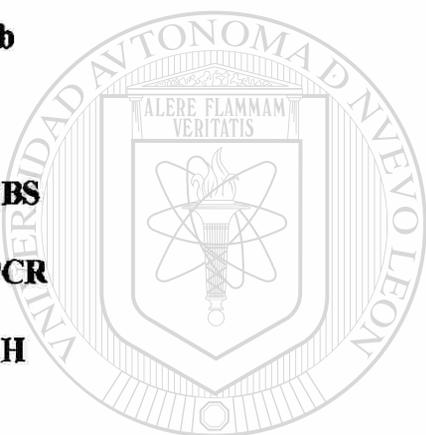


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenina
<b>AFs</b>	Activation Functions
<b>amp</b>	Ampicilina
<b>BrdU</b>	Bromo desoxiuridina
<b>C</b>	Citocina o Cisteína
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Calcio
<b>CME</b>	Células madre embrionarias
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>°C</b>	Grados Centígrados
<b>DBD</b>	Dominio de unión al DNA
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Trifosfato de Desoxinucleósidos
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetra-acético
<b>G</b>	Guanina
<b>hr</b>	Hora
<b>IPTG</b>	Isopropil-thio-beta D-galactopiranosido
<b>Kb</b>	Kilobase = Mil pares de bases
<b>KO</b>	Knock out
<b>L</b>	Leucina
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LBD</b>	Dominio de unión al ligando
<b>M</b>	Concentración Molar

<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Concentración Milimolar
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>NEO<sup>R</sup></b>	Resistencia a neomicina
<b>pb</b>	Pares de Bases
<b>P</b>	Prolina
<b>PBS</b>	Solución de buffer de fosfato
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la <i>Polimerasa</i>
<b>pH</b>	Medida estándar de la acidez relativa, matemáticamente igual a $-\log [H^+]$
<b>PTX-3</b>	Pituitary homeobox 3
<b>Q</b>	Glutamina
<b>R</b>	Arginina
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b><i>RNAse</i></b>	Ribonucleasa
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>RXR</b>	Receptor del ácido retinóico 9-cis
<b>S</b>	Serina
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>seg</b>	Segundos

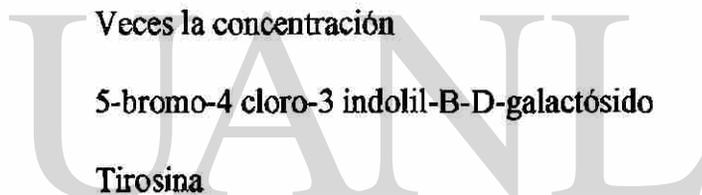
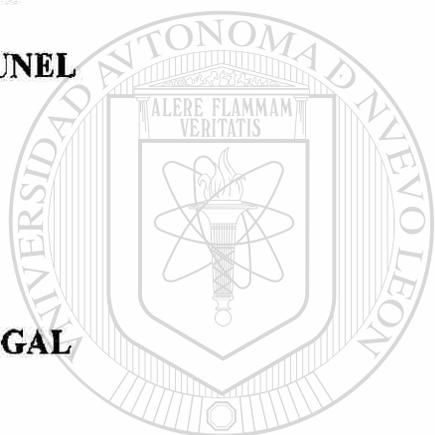


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

<b>T</b>	<b>Timina</b>
<b>Taq Polimerasa</b>	<i>DNA polimerasa</i> obtenida de <i>Thermus aquaticus</i> . Enzima encargada de construir nuevas cadenas de DNA.
<b>TE</b>	Regulador Tris-EDTA
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa
<b>TK</b>	Timidin Cinasa
<b>Tris</b>	Tris-hidroxi-metil-aminometano
<b>TUNEL</b>	Terminal transferase dUTP nick end labeling
<b>U</b>	Unidades
<b>X</b>	Veces la concentración
<b>X-GAL</b>	5-bromo-4 cloro-3 indolil-B-D-galactósido
<b>Y</b>	Tirosina
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro
<b>%</b>	Porcentaje



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

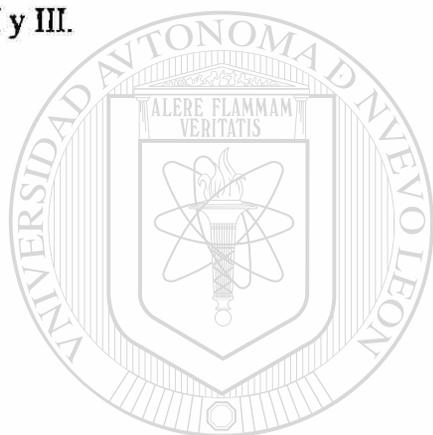
## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Activación de un receptor nuclear.	5
Figura 2. Organización estructural de los receptores nucleares.	6
Figura 3. El receptor Nuclear huérfano Nurr1.	7
Figura 4. Esquema de recombinación homóloga del gen NURR1.	30
Figura 5. Estrategia utilizada para el diseño del vector de recombinación homóloga del gen NURR1.	35
Figura 6. DNA genómico.	37
Figura 7. Amplificación del gen NURR1.	40
Figura 8. Vector de clonación pCR2.1 TOPO.	41
Figura 9. Identificación de las clonas del exón 3 del gen NURR1 de ratón en el vector pCR2.1 mediante enzimas de restricción.	42
Figura 10. Identificación de las clonas del exón 2 del gen NURR1 de ratón en el vector pCR2.1 mediante enzimas de restricción.	43
Figura 11. Identificación de las clonas del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 de ratón en el vector pCR2.1 mediante enzimas de restricción.	44
Figura 12. Digestión con enzimas de restricción del plásmido pLG I y ploxA.	45
Figura 13. Caracterización del plásmido pTKloxP con la enzima de restricción Pst I.	46
Figura 14. Purificación del plásmido pTKloxP y del exón 3 del gen NURR1.	47
Figura 15. Identificación de las clonas positivas de la ligación del exón 3 en el vector pTKloxP con la enzima de restricción PstI.	48
Figura 16. Purificación del plásmido pTKloxPE3 y del gen Neo <sup>R</sup> .	49
Figura 17. Identificación de las clonas positivas de la ligación del gen Neo <sup>R</sup> en el vector pTKloxPE3 con la enzima de restricción Pst I.	50

Figura 18. Purificación del plásmido pTKE3Neo y del exón 2 del gen NURR1.	51
Figura 19. Identificación de las clonas positivas de la ligación del exón 2 del gen NURR1 en el vector pTKE3Neo con la enzima de restricción Hind III.	52
Figura 20. Purificación del plásmido pTKE3NeoE2 y de la región del exón 4 al exón 8 del gen NURR1.	53
Figura 21. Identificación de las clonas positivas de la ligación del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 en el vector pTKE3NeoE2 con la enzima de restricción Hind III.	54
Figura 22. Caracterización de 3 clonas pNURR1 <sup>E3loxP</sup> con la enzima de restricción Hind III.	55
Figura 23. Secuenciación de las clonas pNurr1 <sup>E3LoxP</sup> I, II y III.	56
Figura 24. Digestión con enzimas de restricción de los vectores pNURR1 <sup>E3loxP</sup> I, pTKE3Neo y 053575pPCR-Script.	58
Figura 25. Secuenciación del vector rembinante pNURR1 <sup>E3loxP</sup> .	59
Figura 26. Co-transfección de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano con el vector pNURR1 <sup>E3loxP</sup> y el vector de expresión CMV-Cre.	61
Figura 27. Esquema del vector pCR/E3	85
Figura 28. Esquema del vector pCR/E2	88
Figura 29. Esquema del vector pCR/E48	92

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Programa de amplificación del exón 3 de NURR1.	39
Tabla 2. Programa de amplificación de la región de los exones 4-8 de NURR1.	39
Tabla 3. Programa de amplificación del exón 2 de NURR1.	39
Tabla 4. Mutaciones de las clonas de los vectores recombinantes pNurr1 <sup>E3LoxP</sup> I, II y III.	56



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

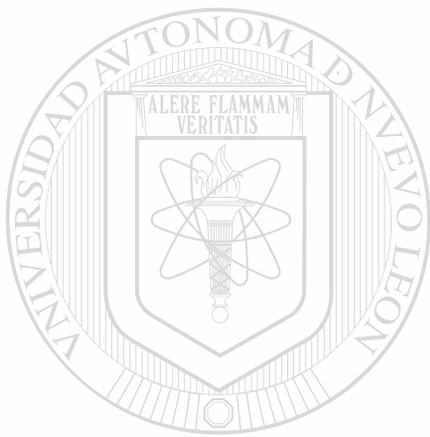
## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
Abstract	1
Resumen	2
Capítulo 1	3
1.1. Introducción	3
1.2. Antecedentes	5
1.2.1. Superfamilia de receptores nucleares	5
1.2.2. Subfamilia Nur	6
1.2.3. Nurr1	7
1.2.4. Inactivación del gen NURR1 en ratones	8
1.2.5. Recombinación Homóloga en Células Madre Embrionarias (CME)	11
1.2.6. La inactivación dirigida de genes	12
1.2.7. Inactivación condicional de genes	13
1.3. Justificación	16
1.4. Objetivo General	17
1.4.1. Objetivos Específicos	18
Capítulo 2	19
2.1. Material y Equipo	19
2.2. Metodología	24
2.2.1. Diseño del vector de recombinación homóloga que porta un alelo condicional del gen NURR1 de ratón	24
2.2.2. Obtención de las secuencias de homología del gen NURR1 de la cepa 129Sv de ratón	24

2.2.2.1. Diseño de oligonucleótidos específicos del gen NURR1	25
2.2.2.2. Amplificación de las secuencias de homología del gen NURR1 de la cepa 129Sv de ratón	25
2.2.2.3. Clonación de las secuencias homólogas del gen NURR1 amplificadas a partir del genoma de la cepa 129Sv de ratón	26
A. Ligación	26
B. Preparación de Células Ca <sup>++</sup> competentes de la cepa DH5α de <i>E. coli</i>	27
C. Transformación	27
D. Extracción de DNA plasmídico	28
E. Caracterización con enzimas de restricción	29
2.2.3. Obtención del vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1	29
2.2.4. Caracterización del vector de Recombinación Homóloga condicional del gen NURR1	31
2.2.4.1. Caracterización del Vector Recombinante con enzimas de restricción	31
2.2.4.2. Caracterización del Vector Recombinante por Secuenciación	31
2.2.5. Ensayo de recombinación de sitios loxP <i>in vitro</i>	32
Capítulo 3	33
3.1. Resultados	33
3.1.1. Diseño de un alelo condicional del gen NURR1 de ratón	33
3.1.2. Obtención de las secuencias de homología del gen NURR1 de la cepa 129Sv de ratón.	36
3.1.2.1 Aislamiento de DNA de la cepa 129Sv	36
3.1.2.2. Diseño de oligonucleótidos específicos del gen NURR1 de ratón	37

3.1.2.3. Secuencias NURR1 amplificadas a partir del genoma de ratón	38
3.1.2.4. Clonación de las secuencias homólogas del gen NURR1 de ratón de la cepa 129Sv	40
3.1.2.5. Clonación de las regiones del gen NURR1 de ratón en el vector pCR2.1 TOPO	40
3.1.3. Obtención del vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1	44
3.1.3.1. Subclonación del sitio loxP en el plásmido pLG I	45
3.1.3.2. Subclonación del exón 3 del gen NURR1 en el plásmido pTKloxP	46
3.1.3.3. Subclonación del gen de selección positiva Neo <sup>R</sup> en células de mamífero en el plásmido pTKloxPE3	48
3.1.3.4. Subclonación del exón 2 del gen NURR1 en el plásmido pTKE3Neo	50
3.1.3.5. Subclonación del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 en el plásmido pTKE3NeoE2	52
3.1.4. Caracterización del vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1	54
3.1.5. Análisis de la funcionalidad del alelo condicional del gen NURR1	60
Capítulo 4	62
4.1. Discusiones y Conclusiones	62
Capítulo 5	67
5.1. Literatura Citada	67
Anexo I	76
Anexo II	80

Anexo III	82
Anexo IV	86
Anexo V	89
Anexo VI	93
Resumen Curricular	98



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**ABSTRACT****Humberto Rodríguez Rocha****Date: August, 2006****Universidad Autónoma de Nuevo León****Medicine School****Title:****Generation of a homologous recombination vector for the conditional inactivation of the NURR1 gene****Number of pages: 98****Candidate to degree of Doctor in Sciences with major in Morphology****Study area: Morphology**

**Purpose and Method of study:** Nurr1 transcription factor inactivation is lethal, because it causes a specific loss of mesencephalic dopaminergic neurons and mice die during their first day of life. These neurons degenerate in Parkinson disease. The present project represents a strategy to rescue the lethal phenotype that allows the spatial and temporal analysis of Nurr1 function. Homologous recombination vector was designed carrying exon 3 of Nurr1 gene flanked by loxP sites. Specific oligonucleotides were designed to amplify by PCR the regions of Nurr1 gene: exon 2, exon 3, and finally a region from exon 4 to exon 8. Amplified exons were cloned and characterized by restriction maps. They were subcloned in a plasmid containing the loxP sites, generating a vector with loxP sites in introns 2 and 3, and the Neo cassette in intron 2. This vector was sequenced and four mutations were detected. The mutated fragment was replaced by one without mutations. LoxP sequences are recognized by Cre recombinase, which allows deletion of the DNA between two loxP sites. Functionality of the introduced loxP sites was determined in the vector of conditional homologous recombination. SH-SY5Y neuroblastoma cells were cotransfected with conditional homologous recombination vector and Cre recombinase expressing plasmid. Neo cassette elimination was detected by PCR demonstrating loxP sites functionality.

**Contributions and Conclusions:** In the present work the generation of a functional homologous recombination vector for the conditional inactivation of the Nurr1 gene. In addition, this work opens the possibility for the generation of a murine model for conditional inactivation of Nurr1 gene to determine its function in CNS areas where it is expressed.

**ADVISER SIGNATURE**

---

Dra. Odila Saucedo Cárdenas

**RESUMEN****Humberto Rodríguez Rocha****Fecha: Agosto de 2006****Universidad Autónoma de Nuevo León****Facultad de Medicina****Título de Estudio:****Generación de un vector de recombinación homóloga para la inactivación condicional del gen NURR1****Número de Páginas: 98****Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología****Área de Estudio: Morfología**

**Propósito y Método del estudio:** La inactivación del factor de transcripción Nurr1 es letal, puesto que provoca una pérdida específica de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y los ratones recién nacidos mueren durante su primer día de vida. Estas neuronas son las que degeneran en la enfermedad de Parkinson. Este trabajo presenta una estrategia de rescate del fenotipo letal para analizar la función en tiempo y espacio específico en las diferentes regiones donde se expresa Nurr1. Para ello se diseñó un vector de recombinación homóloga que porta el exón 3 del gen Nurr1 flanqueado por sitios loxP. Mediante oligonucleótidos específicos se amplificaron por PCR las regiones de interés del gen Nurr1: el exón 2, el exón 3 y finalmente una región del exón 4 al exón 8. Los exones amplificados se clonaron y caracterizaron por mapas de restricción. Posteriormente se subclonaron en un plásmido que contenía los sitios loxP, obteniendo un vector con los sitios loxP en los intrones 2 y 3; y el gen Neo en el intrón 2. Este vector fue secuenciado encontrándose cuatro mutaciones, que se eliminaron sustituyendo el fragmento mutado por uno sin mutaciones. Las secuencias loxP son reconocidas por la enzima Cre recombinasa, lo que permite la eliminación del DNA entre dos sitios loxP. Para determinar la funcionalidad de los sitios loxP, en un ensayo se cotransfectaron células de neuroblastoma (SH-SY5Y) con un plásmido de expresión de la Cre recombinasa y el vector de recombinación homóloga condicional. Se detectó la eliminación del gen Neo mediante PCR, con lo cual se demostró la funcionalidad de los sitios loxP del vector.

**Contribuciones y Conclusiones:** Mediante el desarrollo del presente trabajo fue posible la obtención de un vector de recombinación homóloga para la inactivación condicional para el gen Nurr1 con secuencias loxP funcionales. Además, este trabajo abre la posibilidad de generar un modelo murino de inactivación condicional del gen Nurr1 para determinar su función en las diferentes áreas del SNC donde se expresa.

**FIRMA DEL ASESOR**

---

**Dra. Odila Saucedo Cárdenas**

## CAPÍTULO 1

### 1.1. INTRODUCCIÓN

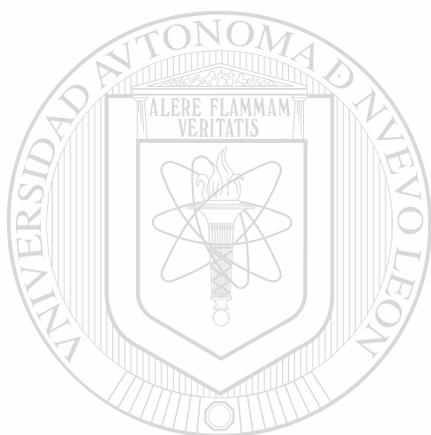
El sistema nervioso es uno de los más complejos en cuanto a función y composición tisular. Mientras que otros sistemas están constituidos por diferentes tipos celulares, el sistema nervioso está constituido por billones de neuronas conectadas entre sí, formando una compleja red, que es sustentada metabólicamente por las células gliales. Gracias a la red de conexiones entre neurona y neurona, así como su relación con cada uno de los órganos que constituyen a un individuo, el sistema nervioso, tiene la capacidad de recibir, transmitir, elaborar y almacenar una gran cantidad de información. Cuando existe alguna alteración metabólica o física que interrumpa dicha comunicación, se pueden producir alteraciones muy severas.

En la actualidad, existe un considerable número de enfermedades del sistema nervioso que afectan al ser humano y aún se desconoce la etiología de la mayoría de ellas. Entre ellas podemos encontrar desórdenes neurodegenerativos, por ejemplo la enfermedad de Parkinson, de Alzheimer y Huntington. Actualmente, en la enfermedad de Parkinson no se conoce el mecanismo molecular que induce la degeneración de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

Sin embargo, debido al desarrollo de nuevas herramientas tecnológicas, ha sido posible desarrollar modelos animales que reproduzcan la sintomatología de una determinada enfermedad neurológica, de modo que nos permitan entender los mecanismos moleculares de estos padecimientos, y encontrar una posible solución de estas enfermedades en un futuro. En

los modelos animales se investigan una serie de proteínas relacionadas con el desarrollo y mantenimiento de las neuronas, por ejemplo: factores de crecimiento, de diferenciación, de migración, de transcripción, de proliferación, etc.

En el presente trabajo nos enfocamos en el factor de transcripción *Nurr1*, cuya inactivación<sup>1-6</sup> en un modelo animal murino, provocó la pérdida de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, mismas que degeneran en la enfermedad de Parkinson.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

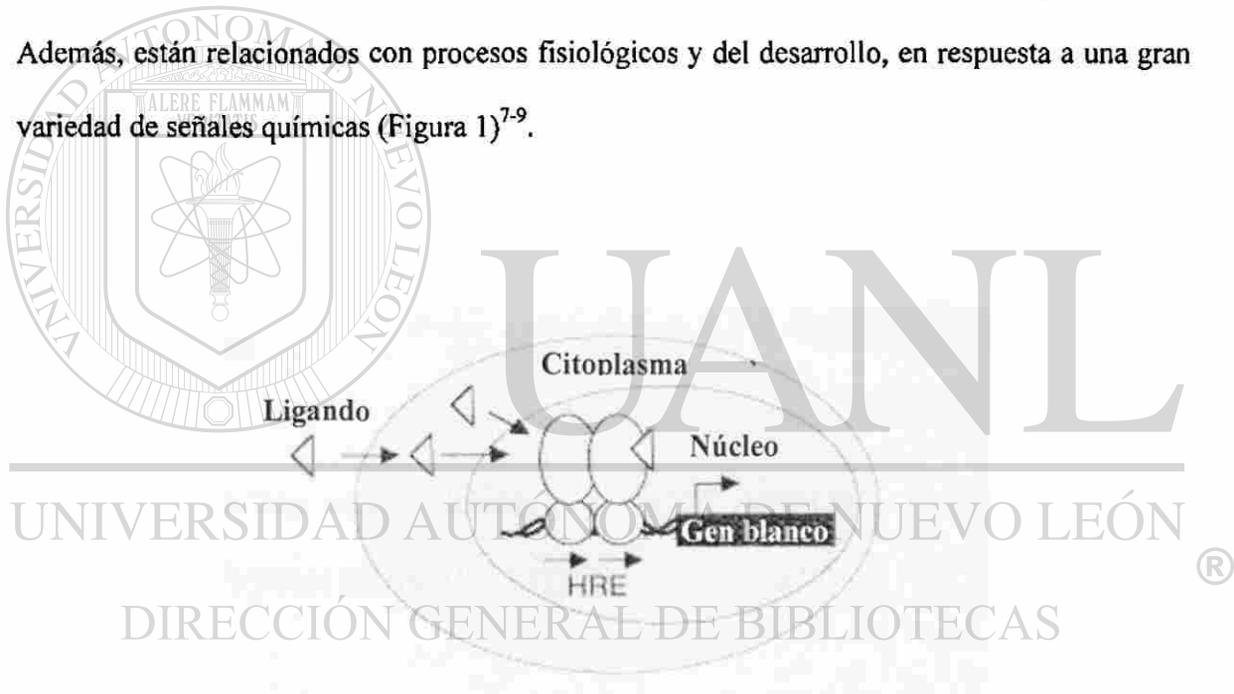
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 1.2. ANTECEDENTES

### 1.2.1. Superfamilia de receptores nucleares

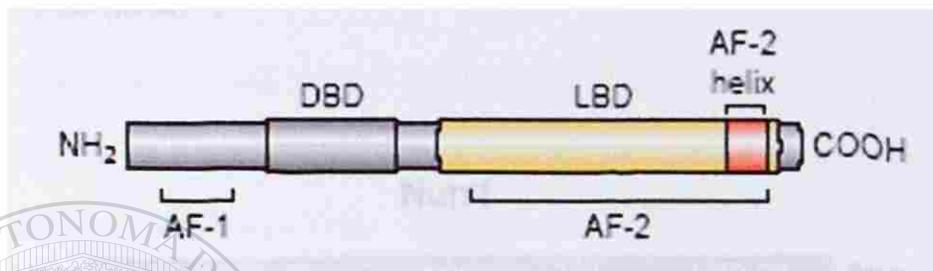
Los receptores nucleares constituyen una gran familia de factores de transcripción inducidos por ligando, entre los que se incluyen: receptores para hormonas esteroideas (estrógenos, progesterona, glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos), tiroideas y ciertas vitaminas liposolubles (vitamina D, ácido retinoico, 9-cis ácido retinoico y ecdisona). Además, están relacionados con procesos fisiológicos y del desarrollo, en respuesta a una gran variedad de señales químicas (Figura 1)<sup>7-9</sup>.



**Figura 1. Activación de un receptor nuclear.** El ligando que es una pequeña molécula lipofílica atraviesa la membrana plasmática y se une a su receptor en el citoplasma o en el núcleo activándolo.

Estos receptores nucleares han sido agrupados en subfamilias de genes hermanos en base a su homología estructural por el alto grado de conservación dentro del dominio de unión al DNA (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD) localizado en la región carboxilo terminal

de los receptores nucleares. Los receptores nucleares también contienen dominios menos conservados, los cuales son regiones importantes para su activación transcripcional por sus siglas en inglés AFs (“Activation Functions”) y se localizan en las regiones del LBD y amino Terminal (Figura 2). En la actualidad se han identificado más de 30 subfamilias<sup>10,11</sup>.



**Figura 2. Organización estructural de los receptores nucleares.**

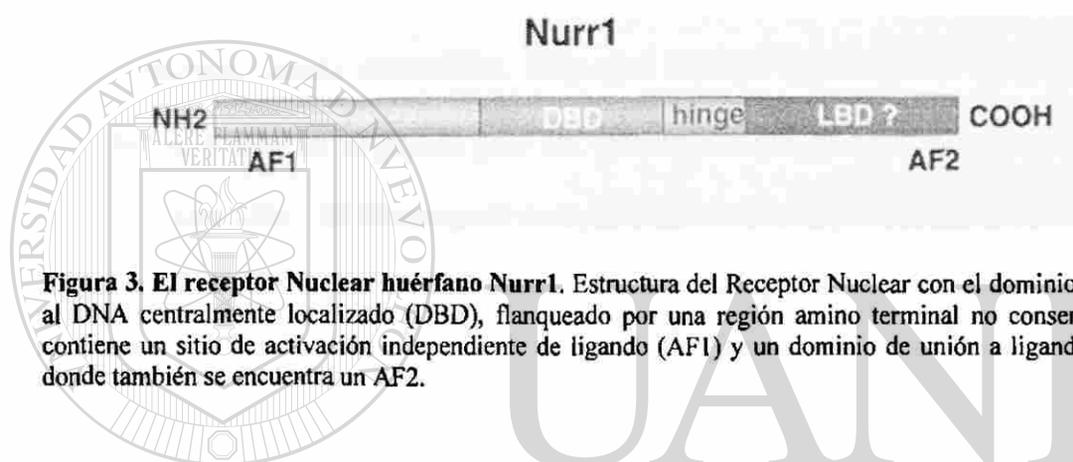
### 1.2.2. Subfamilia Nur

La subfamilia Nur está constituida por Nur77<sup>12</sup> (NGFI-B y NAK-1<sup>13-15</sup>), NOR1 (MINOR y TEC<sup>16-118</sup>) y Nurr1 (RNR-1<sup>19</sup> y NOT<sup>20</sup>).

Si bien, a la mayoría de los receptores nucleares se les ha identificado un ligando, hay algunos otros cuyo ligando aún se desconoce. A estos receptores nucleares se les ha designado “receptores nucleares huérfanos”<sup>21</sup>. La familia Nur pertenece a esta clase de receptores nucleares.

Actualmente no se conoce una señal química o ligando que module la actividad transcripcional de los miembros de la familia Nur (Figura 3), por lo cual se piensa que al igual que otros receptores nucleares, son activados por un ligando hidrofóbico que atraviesa la

membrana celular hacia el interior de la célula. Estudios recientes indican que Nurr1 pertenece a una clase de receptores nucleares independientes de ligando y que son incapaces de unirse a ligandos conocidos<sup>22</sup>. Estos factores pueden iniciar la transcripción en forma de monómeros<sup>21, 22</sup>, o bien, como dímeros<sup>25-27</sup>. Nurr1 y Nurr77 forman heterodímeros con un receptor del ácido retinóico, el *9-cis* (RXR)<sup>28</sup>.



**Figura 3. El receptor Nuclear huérfano Nurr1.** Estructura del Receptor Nuclear con el dominio de unión al DNA centralmente localizado (DBD), flanqueado por una región amino terminal no conservada que contiene un sitio de activación independiente de ligando (AF1) y un dominio de unión a ligando (LBD), donde también se encuentra un AF2.

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### 1.2.3. Nurr1

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Nurr1 es un gen que se expresa de manera específica en el Sistema Nervioso Central (cerebro, médula espinal y bulbo olfatorio), y en los labios durante el desarrollo embrionario. Aparte de unas pocas células esparcidas en el desarrollo de las extremidades, Nurr1 también se expresa en el adulto en los testículos, glándula adrenal y timo<sup>1, 4, 6, 29</sup>. También se ha detectado expresión de Nurr1 en hígado en regeneración<sup>19</sup>, y en la corteza suprarrenal, en respuesta a la estimulación por adrenocorticotropina<sup>20</sup>. Recientemente se ha demostrado la expresión de Nurr1 en cultivos primarios de osteoblastos<sup>30</sup>, mediante la estimulación con la hormona paratifoidea; también se demostró en otro estudio, que el inhibidor de cinasas dependientes de Ciclina p57<sup>Kip2</sup>

al ser inactivado en un modelo animal mostró un fenotipo muy similar al KO-Nurr1 en las neuronas dopaminérgicas, demostrando que  $p57^{Kip2}$  es requerido para el desarrollo normal de estas neuronas por lo tanto  $p57^{Kip2}$  actúa como cofactor de NURR1 en la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas <sup>31</sup>.

La expresión de Nurr1 inicia a partir del día 10.5 del desarrollo embrionario en el cerebro del ratón. Se expresa en las principales áreas del cerebro, tanto en poblaciones de neuronas motoras, como sensoriales. Hay una intensa expresión en la región ventral mesencefálica, donde es requerido para la generación del fenotipo dopaminérgico de las neuronas de este sitio. Si bien, no es esencial para el fenotipo neuronal, sí lo es en etapas posteriores de diferenciación para tipos específicos de neuronas. Esto se demostró mediante una prueba inmunohistoquímica con los marcadores de proliferación celular BrdU y Nestina. La expresión de Nurr1 se localizó en la zona intermedia del tubo neural, fuera de la región ventricular o de proliferación, lo cual indica que Nurr1 se expresa en células postmitóticas (neuroblastos) <sup>32</sup>. Por lo tanto, se concluye que estas células adquirieron el linaje neuronal pero no han alcanzado la diferenciación.

#### 1.2.4. Inactivación del gen NURR1 en ratones

Saucedo-Cardenas y colaboradores generaron ratones carentes de la función de Nurr1 al introducir una mutación en este gen, específicamente en la línea germinal, mediante la tecnología de recombinación homóloga en células madre embrionarias. Los ratones homocigotos mutantes (-/-) recién nacidos, también llamados "knock-out", se caracterizan fisiológicamente por ser hipoactivos, además, carecen de la capacidad de succión, no se observa

leche en su estómago, además presentan deficiencias respiratorias y una respuesta inadecuada a la hipoxia<sup>33</sup> y mueren durante su primer día de vida.

En estos ratones “knock-out” para *Nurr1* (KO-*Nurr1*), se detectó la presencia de cuerpos apoptóticos en la sustancia negra y en el área ventral tegmentaria del mesencéfalo (regiones ricas en neuronas dopaminérgicas), mientras que otras poblaciones de neuronas dopaminérgicas donde también se expresa *Nurr1*, no se vieron alteradas<sup>4,6</sup>. Al realizar análisis de apoptosis a nivel de desarrollo embrionario mediante el ensayo de TUNEL, se encontró muerte neuronal en la zona intermedia del tubo neural en el día 18.5 del desarrollo embrionario. Por lo tanto, se sugiere que las células neuronales no tuvieron la capacidad de migrar hacia la zona marginal del tubo neural, y por ello no pudieron recibir el soporte neurotrófico necesario para su supervivencia y mantenimiento<sup>32</sup>.

En base al efecto de la inactivación del gen NURR1 en la parte ventral del mesencéfalo, se realizó un análisis de expresión de marcadores genéticos específicos de esta región. Para ello se utilizaron los marcadores TH (tirosina hidroxilasa) y PTX-3 (Pituitary homeobox 3).

La TH es una enzima que interviene en el metabolismo del neurotransmisor dopamina, en donde la tirosina es convertida a DOPA por la TH, y la DOPA a dopamina por una descarboxilasa. La TH comienza a expresarse en el día 11.5 del desarrollo embrionario del ratón, es decir, después de la expresión del gen NURR1. El marcador PTX-3, producto de un gen homeótico, es fuertemente expresado en células dopaminérgicas en diferenciación de la parte ventral del cerebro medio, lo que sugiere que puede estar relacionado con la determinación

del linaje dopaminérgico mesencefálico<sup>34</sup>, cuya expresión inicia el día 11.5 del desarrollo embrionario del ratón.

En el embrión KO-Nurr1 se observó expresión de PTX-3 a los 11.5 días del desarrollo embrionario. Esto significa que en la etapa de diferenciación temprana, estas neuronas no son afectadas por la inactivación de Nurr1. Sin embargo, no se encontró expresión de TH, lo que sugiere que las células de la región ventral del mesencéfalo no lograron adquirir el fenotipo dopaminérgico.

En contraste, en el ratón KO-Nurr1 recién nacido, no se detectó expresión de PTX-3 y TH en el mesencéfalo ventral, lo que indica que hay células neuronales pero carentes del fenotipo dopaminérgico.

Las neuronas del mesencéfalo ventral son las principales productoras de dopamina. Estas neuronas intervienen en el control de movimientos voluntarios, participan en actividades cognitivas y emocionales, y su degeneración ha sido asociada con la enfermedad de Parkinson. En esta enfermedad degenera el mismo tipo de neuronas que en el ratón KO-Nurr1. Actualmente, el tratamiento de los pacientes con enfermedad de Parkinson, implica la administración de la droga L-Dopa. Este fármaco es transformado en el tejido cerebral en el neurotransmisor Dopamina. Sin embargo, este tratamiento sólo es efectivo por un tiempo limitado, ya que los pacientes con la enfermedad de Parkinson, requieren cada vez una dosis más alta y experimentan efectos motores adversos<sup>35</sup>. Otra estrategia terapéutica que se ha empleado, es el trasplante de células progenitoras neurales multipotenciales. La desventaja de

este tratamiento radica en que las células no logran adquirir completamente el fenotipo dopaminérgico.

En estudios recientes se demostró que células progenitoras neuronales multipotenciales, con sobre-expresión de Nurr1, no fueron capaces de inducir la expresión de TH aún y cuando fueron tratadas con diferentes factores de crecimiento y supervivencia. Sin embargo, cuando estas células se co-cultivaron con astrocitos de la región ventral mesencefálica, se logró que las células neuronales adquirieran el fenotipo dopaminérgico. Este efecto fue dependiente de la expresión de Nurr1, lo que sugiere que los astrocitos producen alguna proteína, que actúa sobre el receptor nuclear Nurr1 para que realice la transcripción de TH<sup>36</sup>. Lo anterior demuestra la relevancia del factor de transcripción Nurr1, el cual ha adquirido una gran importancia como posible fuente de terapia para la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, aún falta comprender cómo es que la inactivación de este factor de transcripción conduce a la muerte neuronal del tipo dopaminérgico. Dentro de las diferentes estrategias para dilucidar este mecanismo, se encuentra la identificación de genes blancos que sean encendidos por el factor de transcripción Nurr1, y cuya función a nivel celular ayude a comprender esta vía.

### 1.2.5. Recombinación Homóloga en Células Madre Embrionarias (CME)

En la actualidad, los animales transgénicos son una herramienta muy valiosa para el estudio de la función de genes, y para crear modelos animales para el estudio de enfermedades humanas (para evaluar nuevos tratamientos). Existen varios métodos para generar animales transgénicos y su uso depende de la especie animal con que se trabaje. Asimismo, existen numerosas técnicas para controlar la expresión génica. Una de ellas es el sistema Cre-Lox P<sup>37, 38</sup>,

que se utiliza para eliminar una secuencia determinada del genoma o para integrar un fragmento de DNA exógeno. Otros sistemas de inhibición génica funcionan ya sea mediante la formación de una triple hélice<sup>39</sup>, RNA antisentido, RNA de interferencia o mediante la sobreexpresión de proteínas con un efecto negativo transdominante.

### 1.2.6. La inactivación dirigida de genes

La inactivación dirigida de genes consiste en la introducción de mutaciones específicamente en un gen, así como en la transmisión estable de las mismas, en la línea germinal de las generaciones subsecuentes. De esta manera la función del gen se correlaciona con el fenotipo observado *in vivo*, ya sea a nivel estructural o fisiológico<sup>40, 41</sup>. Los eventos trascendentales que dieron origen a esta tecnología de inactivación de genes en mamíferos comprende: (1) el desarrollo de líneas celulares pluripotenciales a partir de células madre embrionarias (CME)<sup>42, 43</sup>, (2) el desarrollo de organismos quiméricos utilizando estas células de los cultivos celulares<sup>41, 44</sup> y (3) la recombinación homóloga del DNA en células de mamífero<sup>45</sup>.

<sup>46</sup>

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para inactivar un gen *in vivo* es necesario diseñar un vector que incluya la secuencia genómica del gen de interés y una alteración que inactive la función del mismo. El diseño consiste en tres partes<sup>46, 47</sup>. Primero, se introduce mediante manipulación genética *in vitro*, una mutación que inactive al gen, ya sea la inserción de una secuencia en un exón, la adición de un codón de paro al inicio del gen, o la delección de uno o más exones del gen. En segundo lugar, se incorpora un gen marcador para seleccionar las células, por ejemplo el cassette de resistencia a

la neomicina (Neo<sup>R</sup>), el cual permite la identificación de las CME transfectadas en el cultivo celular. Por último, la secuencia del gen de interés, la cual debe proporcionar la homología adecuada en las regiones flanqueantes para permitir la recombinación homóloga. Las CME pueden ser transfectadas por varios métodos con el vector diseñado, el más común es la electroporación. La secuencia del vector se puede incorporar en el genoma aleatoriamente, o por el reemplazo de la secuencia homóloga endógena. Las CME con la integración deseada son seleccionadas por su capacidad de crecer en medios selectivos que contienen la droga neomicina. Posteriormente, la recombinación homóloga es identificada por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), así como mediante una sonda marcada en un ensayo de Southern blotting. Las clonas de las CME positivas son microinyectadas en el blastocisto de 3.5 días y reimplantadas en una madre adoptiva pseudopreñada. Los blastocistos y las CME son extraídas de ratones de diferente cepa (diferente color) que permite la identificación de la progenie (quimera). Estos ratones quiméricos se cruzan con la cepa de la cual provienen las CME para mantener la pureza de la cepa. Los ratones heterocigotos son identificados por PCR o Southern blotting, después se entrecruzan para obtener ratones homocigotos mutantes (si estos últimos no nacen, significa que la falta del gen es letal durante el desarrollo embrionario) en donde se analiza el fenotipo para determinar la función del gen.

### 1.2.7. Inactivación condicional de genes

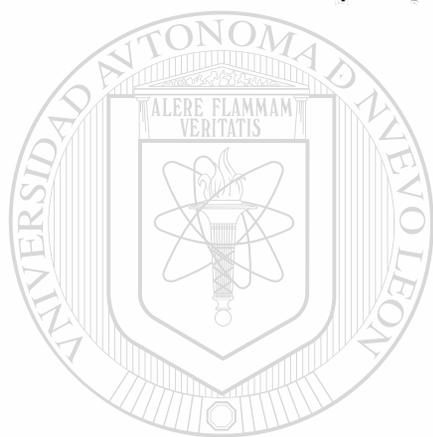
La recombinación homóloga es una excelente forma de suprimir la expresión de un gen en un animal. La recombinación homóloga condicional es la inactivación de un gen específicamente en uno de los tejidos del organismo. Esta estrategia se utiliza principalmente cuando la inactivación del gen es letal durante el desarrollo embrionario o al nacer (como el

ratón KO-Nurr1). Para evitar el efecto letal y obtener ratones adultos para el análisis de un fenotipo en esta etapa, se induce la eliminación específica del gen en un tejido.

Esta estrategia es una modificación de los KO clásicos y se basa en el uso de secuencias loxP que son reconocidas únicamente por la enzima Cre-Recombinasa, que es una proteína sitio específica de las secuencias loxP. El gen de interés o parte del mismo se flanquea con los sitios loxP para que sea eliminado por recombinación mediada por la enzima Cre<sup>48</sup>. Esta estrategia la podemos resumir en tres etapas. Primero, la modificación *in vitro* del gen de interés al cual se le introduce en dos intrones una secuencia reconocida por la enzima Cre-Recombinasa (secuencias loxP), y el gen marcador para resistencia a neomicina (también en un intrón) flanqueado por secuencias loxP. Segundo, se realiza la recombinación homóloga en CME de la misma manera para obtener un KO clásico. Posteriormente, mediante el uso de la enzima Cre-Recombinasa, ya sea en las CME o en el organismo adulto, se elimina el marcador de resistencia a neomicina, dejando el gen original funcional únicamente con los sitios loxP en los dos intrones. Tercero, se induce la expresión de la enzima Cre-Recombinasa en un tejido específico, para inducir la recombinación de los dos sitios loxP presentes en los intrones, con la consecuente delección de los exones y pérdida de la función del gen. Generalmente, se desarrollan ratones transgénicos que expresan Cre-Recombinasa en un tejido específico, aquel en donde se desea eliminar la función del gen. En el caso del presente trabajo con el gen NURR1, la expresión de la Cre-Recombinasa debe estar bajo la regulación de un promotor específico de la región ventral mesencefálica.

Otras estrategias utilizan vectores adenovirales que portan el gen de la Cre-Recombinasa, los cuales se inyectan en un tejido determinado para inducir la recombinación

local de los sitios loxP. Por otro lado, se han generado transgénicos con la fusión de la enzima Cre-tamoxifen, así como con las secuencias del receptor RU 486<sup>49</sup>; en estos vectores la actividad de la enzima Cre-Recombinasa de estas proteínas fusionadas es inducida por la administración de tamoxifen o RU 486 respectivamente. Estos sistemas ofrecen un control adicional de la recombinación de los sitios loxP. Los sistemas para el control de la expresión del transgen basados en el uso de inductores como la tetraciclina se pueden usar también para regular la expresión del gen de la Cre-Recombinasa<sup>50</sup>. Además, se han desarrollado cierto número de líneas de ratón que expresan el gen de la Cre-Recombinasa en tejidos específicos.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

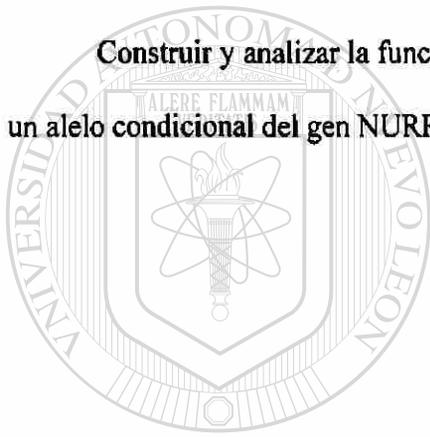
### 1.3. Justificación

Es importante desarrollar un vector de recombinación homóloga que porte un alelo condicional del gen NURR1 para generar un modelo animal murino, en el que se pueda inactivar el gen NURR1 de forma espacio-temporal para inactivarlo mediante el sistema Cre/loxP. Y de esta manera, determinar si la ausencia de la función de este gen en una o la combinación de las regiones del Sistema Nervioso Central (mesencéfalo, corteza cerebral, médula espinal, bulbo olfatorio e hipotálamo) donde se expresa, es la responsable del fenotipo letal postnatal observado en los ratones KO Nurr1.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### 1.4. OBJETIVO GENERAL

Construir y analizar la funcionalidad de un vector de recombinación homóloga que porte un alelo condicional del gen NURR1 murino.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 1.4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Diseñar un vector de recombinación homóloga que porte un alelo condicional del gen NURR1 de ratón.

2. Obtener las secuencias de homología del gen NURR1 de la cepa murina 129Sv.

3. Obtener el vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1.

4. Caracterizar el vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1.

5. Analizar la funcionalidad del alelo condicional del gen NURR1.

## CAPÍTULO 2

### 2.1. MATERIAL Y EQUIPO

#### Plásmidos:

Plásmido	Compañía
pCR2.1 TOPO	Invitrogen

#### Cepas biológicas:

Cepa	Microorganismo	Genotipo
DH5 $\alpha$ F'	<i>Escherichia coli</i>	F'/endA1 hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal <sup>r</sup> ) relA1 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 deoR ( $\emptyset$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15)

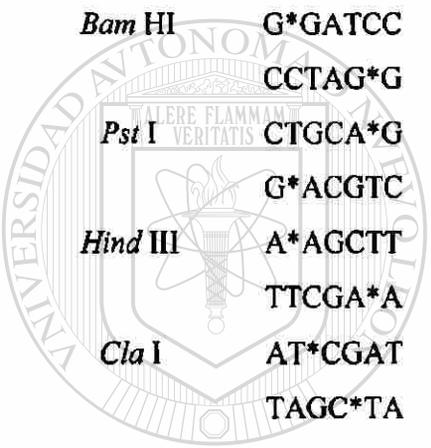
#### Línea celular

Línea celular	Tipo celular
SH-SY5Y	Neuroblastoma

#### Enzimas de restricción:

Enzima	Sitio de reconocimiento	Compañía
<i>Nhe</i> I	AT*CG AT TA GC*TA	New England Biolabs
<i>Sal</i> I	G*AATT C C TTAA*G	New England Biolabs

<i>Xho</i> I	C*TCGAG GAGCT*C	New England Biolabs
<i>Xba</i> I	T*CTAGA GAGCT*C	New England Biolabs
<i>Kpn</i> I	GGTAC*C C*CATGG	New England Biolabs
<i>Not</i> I	GC*GGCCGC CGCCGG*GC	New England Biolabs
<i>Bgl</i> II	A*GATCT TCTAG*A	New England Biolabs
<i>Bam</i> HI	G*GATCC CCTAG*G	New England Biolabs
<i>Pst</i> I	CTGCA*G G*ACGTC	New England Biolabs
<i>Hind</i> III	A*AGCTT TTCGA*A	New England Biolabs
<i>Cla</i> I	AT*CGAT TAGC*TA	New England Biolabs
<i>Age</i> I	A*CCGGT TGGCC*A	New England Biolabs



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



**Enzimas:**

<b>Enzima</b>	<b>Compañía</b>
<i>RNasa</i>	Sigma-Aldrich
<i>Taq Platinum DNA Polimerasa</i>	Invitrogen

**Reactivos:**

<b>Reactivo</b>	<b>Compañía/Marca</b>
Acetato de potasio	Research Organics
Ácido acético glacial	Merck
Agar	Research Organics
Agarosa	Bioline
Ampicilina	USBiological
Azul de bromofenol	Research Organics
Bromuro de etidio (2 µg/µl)	Amersham Bioscience
CaCl <sub>2</sub>	Research Organics
Cloroformo	EM Science
dNTP	Amersham Bioscience
EDTA	Research Organics
Etanol	Sigma-Aldrich
Fenol	Sigma-Aldrich
Filme radiográfico Kodak T-Mat G/RA	Kodak
Fosfato de sodio	Research Organics
Fosfato de potasio	Fermont Inc.
Glicerol	Sigma-Aldrich
Glucosa	Research Organics
IPTG	BIO 101, Inc.
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Medio LB Broth	USBiological

Medio LB agar Miller	USBiological
Medio RPMI 1640	Gibco
NaCl	USBiological
NaOH	J.T. Baker
SDS	USBiological
Tris Base	USBiological
TRIzol	Sigma-Aldrich
X-GAL	USBiological
Xilencianol	Research Organics

**Equipos:**

Cámara de electroforesis horizontal	Owl Separation System, Inc.
Centrífuga Hermle Z400 K	Labnet
Dual Action Shaker	Lab-Line

Fuente de poder EC 4000 P	E-C Apparatus Corp.
Epi-Chemi Darkroom	UVP Laboratory Products

Eppendorf Biophotometer 5140	Eppendorf
------------------------------	-----------

Fuente de poder EC500-90	Thermo EC
--------------------------	-----------

Horno de Hibridación	Hybaid
----------------------	--------

Incubadora	Binkmann Orbimix 1010
------------	-----------------------

Incubadora Environ	Lab-Line
--------------------	----------

Microcentrífuga 5415 C	Eppendorf
------------------------	-----------

Microcentrífuga refrigerada Mikro 22R	Hettich Zentrifugen
---------------------------------------	---------------------

Robocycler Gradient 40

Stratagene

Termociclador PTC-100™

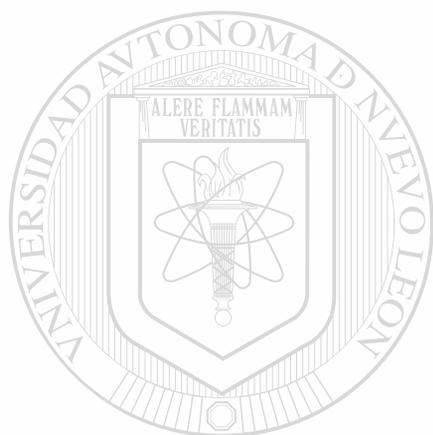
MJ Research, Inc.

Thermomixer R

Eppendorf

Vórtex Maxi Mix II Type 376000 Mixer

Termolyne



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 2.2. METODOLOGÍA

### 2.2.1. Diseño del vector de recombinación homóloga que porta un alelo condicional del gen NURR1 de ratón

El exón 3 del gen NURR1 tiene un tamaño de 866 pb de largo, constituye aproximadamente el 50% de la secuencia codificante para la proteína Nurr1 donde se incluyen las regiones del dominio AF1 y parte del dominio de unión al DNA. La delección del exón 3 ocasionaría que no se sintetizara la proteína Nurr1 debido a la ausencia del codón de iniciación presente en este exón. Por lo anterior se decidió generar un alelo condicional NURR1 flanqueando el exón 3 con los sitios loxP e introduciendo el marcador de selección positiva (Neo<sup>R</sup>) flanqueado por sitios loxP dentro del intrón 2 del gen NURR1.

### 2.2.2. Obtención de las secuencias de homología del gen NURR1 de la cepa 129Sv de ratón

Para obtener las secuencias de interés según el diseño del punto anterior, se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos específicos las regiones del exón 2, exón 3, y del exón 4 al 8 del gen NURR1 de ratón, y fueron clonadas en el vector pCR2.1 (Invitrogen).

### 2.2.2.1. Diseño de oligonucleótidos específicos del gen NURR1

Se realizó una búsqueda en la base de datos de la empresa Celera Discovery Systems™ (Celera Genomics, 45 W. Gudd Drive, Rockville, MD 20850, USA and 1850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94044, USA) para obtener la secuencia completa del factor de transcripción huérfano NURR1 (Nr4a2=Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2) de la cepa 129Sv de ratón (Anexo I).

A partir de la secuencia obtenida se diseñaron tres oligonucleótidos del extremo 5': NF2B (5' AAGCGGCCGCACGGTTATGAAACTGTGACATAGC 3'), SF3A (5' CAACCCTGTGCCTTATAGTCACAGAGG 3') y BAF48A (5' CCAGATCTACATGTCAGAAAGACTGGTAGAGTCAGGG 3') y tres oligonucleótidos del extremo 3': KR2A (5' TTGGTACCGATGAGCTTCTTCTTTGAAGCTCAGG 3'), XR3A (5' CTCTCCACAGCCTGTGAGTAGCTG 3') y BR48A (5' CCAGATCTATT CAGATGTCCTGTAAGTGACCTCC 3'), para amplificar diferentes regiones del gen NURR1.

### 2.2.2.2. Amplificación de las secuencias de homología del gen NURR1 de la cepa 129Sv de ratón

A partir de DNA genómico de la cepa 129Sv (color agoutí) reportada por la empresa Celera Discovery Systems, se amplificaron diferentes regiones del gen NURR1 mediante reacciones de PCR, para la construcción de un vector que porta las secuencias loxP dentro del gen NURR1.

Se amplificó la región del exón 3 con los oligonucleótidos específicos previamente descritos XR3A y SF3A, el exón 2 con los oligonucleótidos KR2A y NF2A y del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 con los oligonucleótidos específicos BAF48A y BR48A.

### **2.2.2.3. Clonación de las secuencias homólogas del gen NURR1 amplificadas a partir del genoma de la cepa 129Sv de ratón**

Inicialmente las secuencias que se amplificaron del gen NURR1 fueron clonadas en el vector pCR2.1 TOPO para disponer de una cantidad apropiada de DNA para las subclonaciones requeridas en la construcción del vector de recombinación NURR1. Las siguientes técnicas se utilizaron durante el desarrollo de este proyecto.

#### **A. Ligación**

La ligación de fragmentos de DNA se llevó a cabo manteniendo una relación 1:3<sup>®</sup> (vector:inserto) y empleando la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (Invitrogen). Las reacciones se incubaron a 16°C durante 16 horas aproximadamente.

Los productos de PCR del gen Nurr1 se clonaron en el vector pCR2.1 TOPO. Cada reacción de ligación se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen).

## B. Preparación de Células $\text{Ca}^{++}$ competentes de la cepa DH5 $\alpha$ de *E. coli*

Se reactivó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) en medio LB agar Miller y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  a 150 rpm durante 12 hrs. Posteriormente se tomó una colonia y se inoculó en 5 ml de medio LB Broth, incubándose toda la noche a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  a 150 rpm. Se utilizó 1 ml de este cultivo para inocular 100 ml de medio LB Broth, y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  a 150 rpm hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 0.6, después se colocó en hielo por 10 min para detener el crecimiento celular. Se utilizaron frascos para centrifuga pre-enfriados y estériles para centrifugar a 7,000 rpm por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se decantó el sobrenadante, la pastilla celular se resuspendió en 10 ml de una solución fría de  $\text{CaCl}_2$  100 mM, y se incubó durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se centrifugó y se decantó el sobrenadante, se repitió el lavado con la solución de  $\text{CaCl}_2$  100 mM. Finalmente la pastilla se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  100 mM y 500  $\mu\text{l}$  de glicerol al 50%, ambas soluciones frías y estériles. Se hicieron alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  de bacterias e inmediatamente se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
C. Transformación  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Posteriormente se agregaron 2  $\mu\text{l}$  del producto de ligación a 50  $\mu\text{l}$  de células  $\text{Ca}^{++}$  competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* y se incubaron en hielo por 20 min. Se aplicó un choque térmico a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 1 min. Después se agregaron 450  $\mu\text{l}$  de medio LB Broth y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hr a 200 rpm. Posteriormente se centrifugó por 10 seg en una microcentrífuga spectrafuge 24D (Labnet) para concentrar las células en aproximadamente 100  $\mu\text{l}$ . Después se sembraron 50  $\mu\text{l}$  en placas LB-agar-amp (100 mg/ml) con 40  $\mu\text{l}$  de IPTG (23

mg/ml) y 40  $\mu$ l de X-GAL (40 mg/ml) para la selección de colonias blancas/azules, y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las colonias blancas resultantes, capaces de crecer en presencia del antibiótico, se inocularon en 3 ml de medio LB-amp (100 mg/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

#### D. Extracción de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se realizó a partir de 1.5 ml de cultivo de cada una de las colonias blancas seleccionadas. El cultivo fue centrifugado por 1 min a 14000 rpm, el sobrenadante fue eliminado y las células resuspendidas en 150  $\mu$ l de la solución I (50 mM Glucosa, 10 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris-HCl pH 8.0). Se agregaron 300  $\mu$ l de la solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se mezcló por inversión. Después se añadieron 250  $\mu$ l de la solución III (Acetato de Potasio 5 M, Ácido Acético Glacial) y se mezcló en un vórtex. Se centrifugó por 8 min a 14,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente se agregó un volumen de isopropanol y se mezcló en un vórtex. Se centrifugó por 7 min a 14,000 rpm<sup>®</sup> decantándose el sobrenadante, se lavó la pastilla con 800  $\mu$ l de etanol al 70%, y se dejó secar a temperatura ambiente. Después de esto, la pastilla se resuspendió en 50  $\mu$ l de buffer TE1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) con 1  $\mu$ l de *RNasa* (10 mg/ml), y se incubó a 55°C por 10 min.

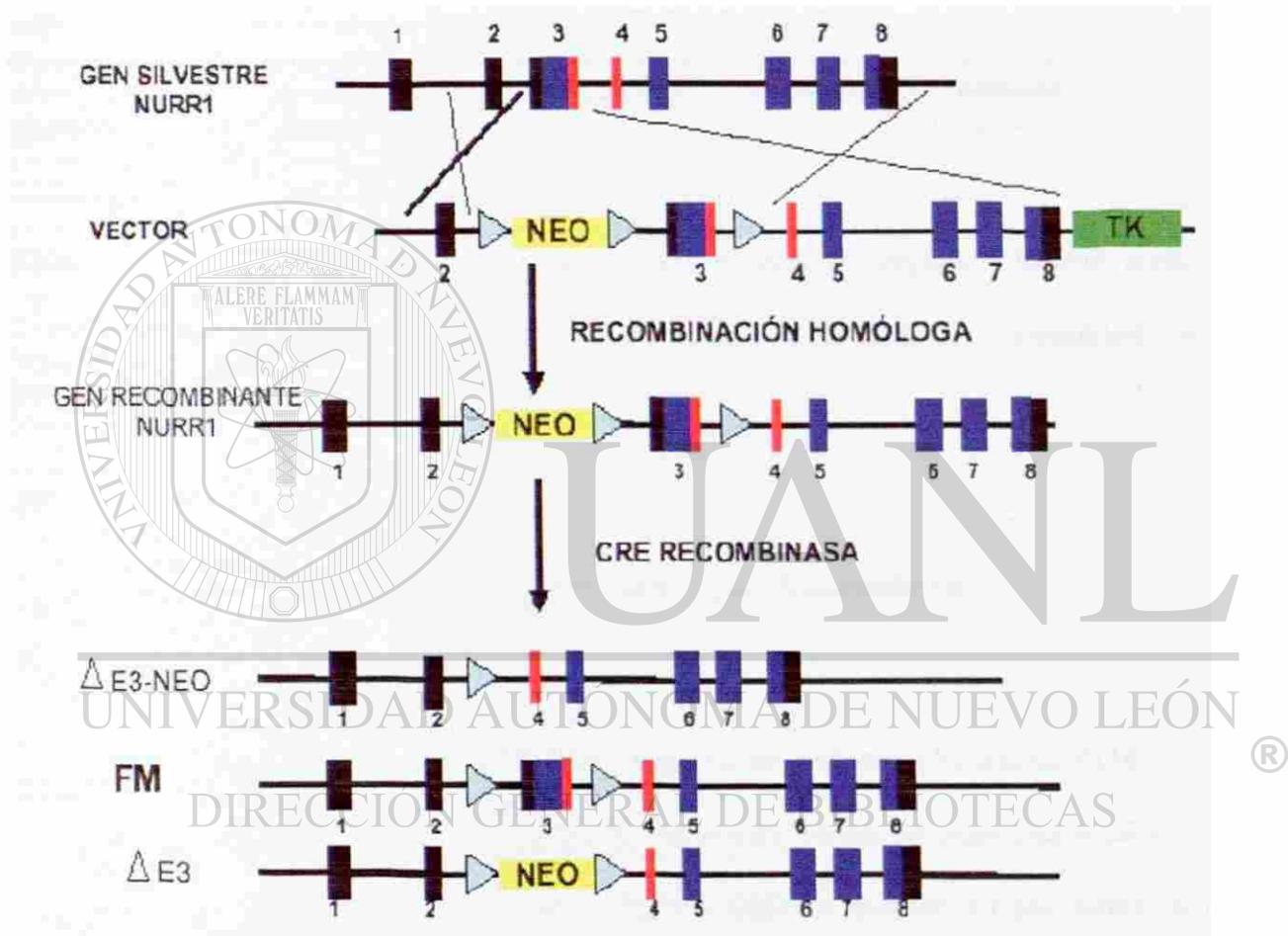
## E. Caracterización con enzimas de restricción

A partir del DNA plasmídico de cada una de las colonias seleccionadas, se realizaron digestiones con enzimas de restricción para confirmar la clonación de los fragmentos de interés. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20  $\mu$ l, conteniendo 12  $\mu$ l de agua estéril, 5  $\mu$ l de DNA plasmídico, 2  $\mu$ l del buffer 10X correspondiente a la enzima, y 5 U de la enzima. Se incubaron a 37°C toda la noche y se analizaron en un gel de agarosa al 0.8%.

### 2.2.3. Obtención del vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1

En base al mapa de restricción de la secuencia del gen NURR 1, se optó por colocar el gen Neo dentro del segundo intrón, el cual se encuentra flanqueado por sitios loxP (triángulos), y el tercer sitio loxP se encuentra en el tercer intrón. En la Figura 1 se encuentra el diseño que se siguió para la introducción de los sitios loxP. Esta construcción tiene las secuencias loxP para que se lleve a cabo la recombinación homóloga y así obtener el exón 3 del gen NURR1 flanqueado con secuencias loxP (FM, Figura 4). De tal manera que para inactivar al gen NURR1 en un tejido determinado, solo sea necesario activar el promotor específico de tejido que controle al gen de la enzima Cre-recombinasa.

El cassette de la neomicina flanqueado por sitios loxP se introdujo en el intrón 2. El gen NURR1 condicional tiene un sitio loxP en los intrones 2 y 3, es decir, que los sitios loxP flanquean al exón 3 que es la secuencia que contiene el codón de inicio de la traducción.



**Figura 4. Esquema de recombinación homóloga del gen NURR1.** Las cajas de color negro, indica exones no codificantes; las cajas de color azul, indica las regiones codificantes; las cajas rojas, el dominio de unión a DNA; el número, indica el exón, (TK) Timidina Cinasa; (NEO) Neomicina; (Δ E3), delección del exón 3; (Δ E3-NEO), delección del exón 3 del gen de resistencia a neomicina.

## 2.2.4. Caracterización del vector de Recombinación Homóloga condicional del gen NURR1

El vector de recombinación para el alelo condicional del gen *Nurr1* (Figura 1) se caracterizó con enzimas de restricción y por secuenciación.

### 2.2.4.1. Caracterización del Vector Recombinante con enzimas de restricción

Se digirió el vector recombinante con la enzima de restricción *HindIII*, según las condiciones de la casa comercial, utilizando 1 U de enzima por  $\mu\text{g}$  de DNA, e incubando por un lapso de 1-12 horas.

### 2.2.4.2. Caracterización del Vector Recombinante por Secuenciación

Se purificó el vector recombinante a gran escala mediante columnas de QIAGEN<sup>®</sup> para obtener la concentración y calidad adecuadas para secuenciación, así como para la transfección de células madre embrionarias de ratón (siguiente etapa del proyecto del cual forma parte la presente tesis de doctorado).

El vector recombinante de doble cadena se secuenció mediante el método de Sanger. La muestra de DNA plasmídica se desnaturalizó y apareó con oligonucleótidos específicos de diferentes regiones del gen NURR1, los cuales fueron diseñados y ordenados para su síntesis

química. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo empleando el kit BigDye v3.1 y analizando las reacciones en un equipo de secuenciación estándar 3100- Avant™ Genetic Analyzers (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

### 2.2.5. Ensayo de recombinación de sitios loxP *in vitro*

En la secuencia del intrón 2 del gen NURR1 fue insertado en sitios *Sal* I un fragmento de 1.8 Kb correspondiente al gen Neo<sup>R</sup> flanqueado por las secuencias loxP, y otro sitio loxP fue insertado en la secuencia del intrón 3 flanqueando todo el exón 3 del gen NURR1 de ratón. Los oligonucleótidos E3N2 (5' GGCTTGACGTCGTAGCCTGTGC 3') y IF2 (5' CTTTCCCTCTGCAGTTGACCC 3') en el vector no recombinado amplificaron una banda de 3.4 Kb, mientras que en el recombinado el tamaño del producto de PCR fue de aproximadamente 1.6 Kb debido a la delección de 1.8 Kb del gen Neo<sup>R</sup> por recombinación de los sitios loxP.

El vector de expresión CMV-Cre y el vector de recombinación homóloga del gen NURR1 fueron mezclados y transfectados en células de neuroblastoma SH-SY5Y con Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. Después de 48 horas las células fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en 1.0 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA, 1% SDS, y 200 mg/ml de proteinasa K. Posteriormente se incubaron por 2 horas a 50°C, las proteínas fueron removidas por extracción fenol/cloroformo y el DNA fue precipitado con 0.5 volúmenes de una solución de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto, finalmente el DNA fue resuspendido en TE 1X para su análisis por PCR.

## CAPÍTULO 3

### 3.1. RESULTADOS

#### 3.1.1. Diseño de un alelo condicional del gen NURR1 de ratón

Antes de comenzar con la inserción de los sitios loxP en el gen NURR1, fue necesario realizar un análisis virtual del gen NURR1 para identificar sitios de restricción útiles para la manipulación de este gen *in vitro*, así como para la identificación de la recombinación en el locus genómico de NURR1, el cual está localizado en el cromosoma 2.

Básicamente hay dos tipos de genes Neo<sup>R</sup>, los cuales rutinariamente son utilizados en construcciones de genes recombinantes. Estos son :

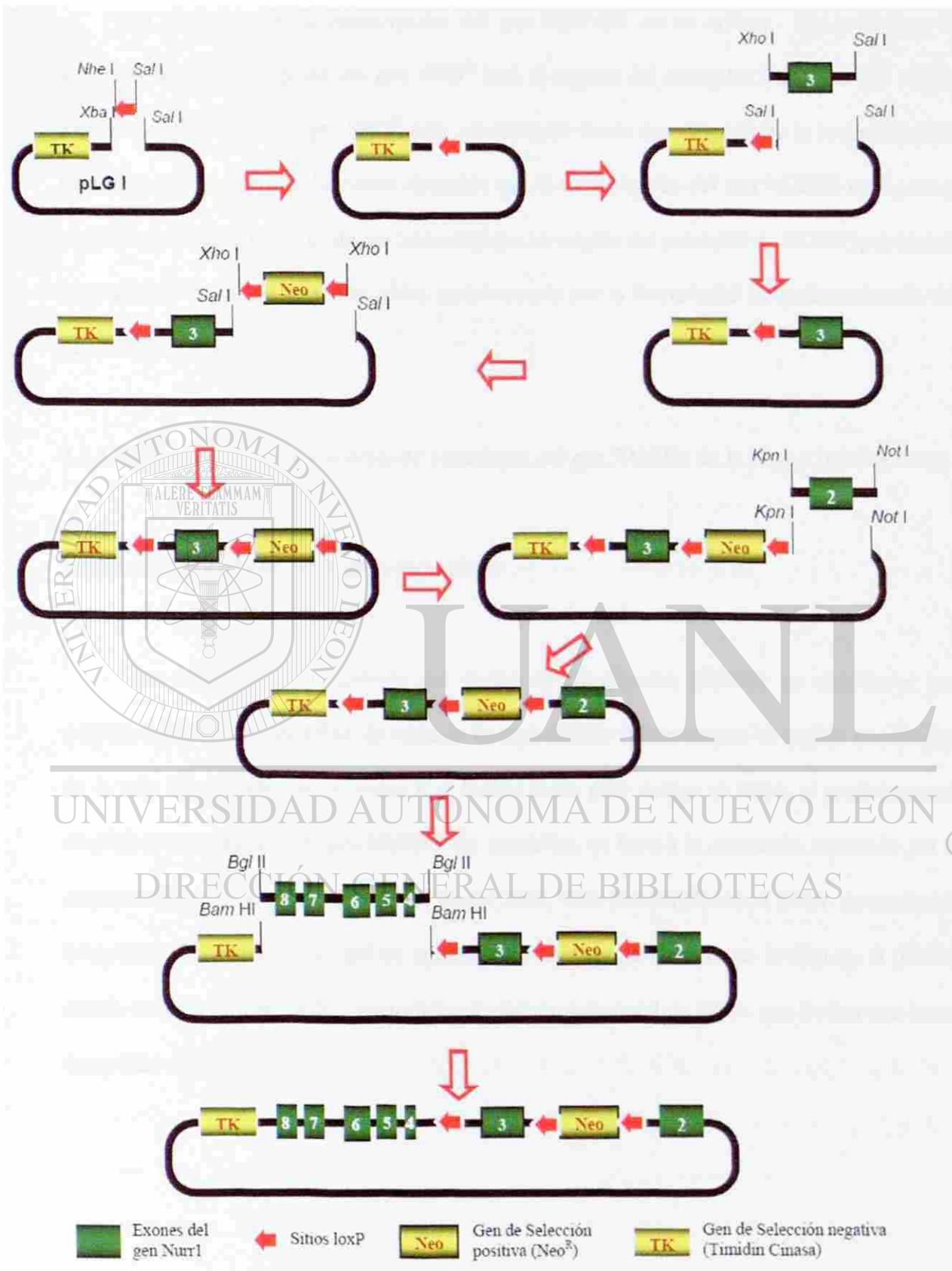
- a) Un gen Neo<sup>R</sup> que contiene un promotor y una señal de poliadenilación, y
- b) Un gen Neo<sup>R</sup> que carece ya sea del promotor y/o de la señal de poliadenilación.

Para los genes que no se expresan en CME de ratón, el primer tipo de gen Neo<sup>R</sup> se utiliza para generar un vector recombinante. En el caso de los genes que son activos transcripcionalmente en CME, el uso del segundo tipo de gen Neo<sup>R</sup> puede bajar significativamente el fondo proveniente de los eventos de recombinación ilegítima<sup>81-83</sup>. En el caso de un gen Neo<sup>R</sup> sin promotor, la expresión de este gen, y por lo tanto el crecimiento de colonias G418<sup>R</sup>, puede solamente ocurrir si está localizado enseguida de un promotor de algún gen que sea transcripcionalmente activo en CME. Para un gen Neo<sup>R</sup> que carece de señal de

poliadenilación, la expresión solamente ocurre si es insertado antes de la señal de poliadenilación de un gen.

La actividad transcripcional del gen NURR1 en CME de ratón determina el tipo de gen Neo<sup>R</sup> para ser utilizado en la construcción del vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1, este gen no se expresa en CME, por lo que en este caso se utilizó un gen PGKNeo<sup>R</sup> que contiene un promotor y una señal de poliadenilación en la construcción del vector recombinante condicional del gen NURR1. Este cassette contiene el promotor del gen fosfoglicerato cinasa de ratón, el cual es un promotor constitutivo. La señal de poliadenilación es del gen de la hormona de crecimiento bovina y es una secuencia de terminación reconocida por la maquinaria de terminación de la transcripción del ratón.

Una vez analizada la estructura del gen NURR1 se decidió introducir el gen de selección positiva (PGKNeo<sup>R</sup>) flanqueado por los sitios loxP en el intrón 2, y el tercer sitio loxP en el intrón 3, para así eliminar el exón 3 del gen NURR1 cuando se active el sistema Cre/loxP (Figura 5).



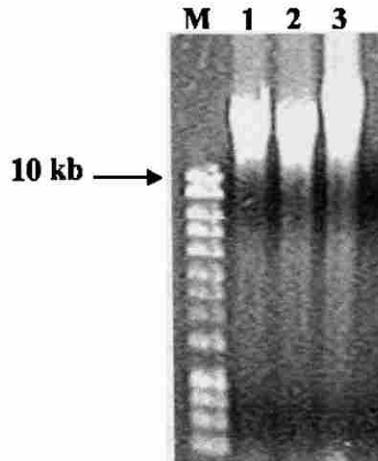
**Figura 5. Estrategia utilizada para el diseño del vector de recombinación homóloga del gen NURR1.** Las flechas rojas sin relleno indican el orden de los pasos de la estrategia, para generar el vector de recombinación homóloga del gen NURR1 y las enzimas de restricción que se utilizaron en cada paso.

La dirección de la transcripción del gen HSV-TK no es crítica . Sin embargo, la dirección de la transcripción del gen NEO<sup>R</sup> bajo el control del promotor fosfoglicerato cinasa murino es importante. El gen NEO<sup>R</sup> está orientado de modo que después de la recombinación homóloga se encuentre en la misma dirección que la transcripción del gen NURR1 endógeno y su promotor. Por lo tanto, cualquier transcrito que se origine del promotor de NURR1, si no está truncado por un codón de terminación, será truncado por la fuerte señal de poliadenilación del gen NEO<sup>R</sup>.

### **3.1.2. Obtención de las secuencias de homología del gen NURR1 de la cepa 129Sv de ratón**

#### **3.1.2.1 Aislamiento de DNA de la cepa 129Sv**

Las regiones de homología del factor de transcripción NURR1 se obtuvieron por amplificación a partir de DNA de ratón de la cepa 129Sv. Primeramente se digirió una biopsia de la cola de un ratón con Proteína K y Buffer Jacks para extraer el DNA, y posteriormente amplificar las regiones del gen NURR1 sin mutación, en base a la secuencia reportada por la empresa Celera Discovery Systems en el año 2002. Una vez purificado el DNA se analizó la integridad del mismo en un gel de agarosa. El resultado se muestra en la Figura 6 (DNA), donde se observa una banda característica de una muestra total de DNA que indica una buena integridad del mismo.



**Figura 6. DNA genómico.** El DNA genómico se aisló de una biopsia de ratón de la cepa 129Sv para amplificar las diferentes regiones del gen NURR1. El carril M es el marcador de peso molecular, los carriles 1, 2 y 3 muestran la banda de DNA genómico, teñida con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 0.8%.

### 3.1.2.2. Diseño de oligonucleótidos específicos del gen NURR1 de ratón

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR de las diferentes regiones del gen NURR1 de ratón a partir del DNA de la cepa 129Sv.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Los oligonucleótidos específicos del gen NURR1 de ratón se diseñaron a partir de la secuencia del cromosoma 2 de la base 55,867,857 a la base 55,874,963 reportada por la empresa Celera Discovery Systems en el 2002 con el número de acceso mCG19702 (Anexo I).

Para amplificar la región del exón 3 se diseñaron los oligonucleótidos específicos XR3A (5' CTCTCCACAGCCTGTGAGTAGCTG 3') y SF3A (5' CAACCCTGTGCCT TATAGTCACAGAGG 3'), para el exón 2 los oligonucleótidos KR2A (5' TTGGTACCG ATGAGCTTCTTCTTTGAAGCTCAGG 3'), al cual se le adicionó el sitio de corte específico reconocido por la enzima de restricción *Kpn I*, y NF2A (5' AAGCGGCCGCTA GCGAAGTTGCCTGAAATGACTGG 3'), al cual se le adicionó el sitio de corte específico

reconocido por la enzima de restricción *Not I*, ambos sitios de corte en el extremo 5' de cada oligonucleótido.

Posteriormente se diseñaron los oligonucleótidos específicos BAF48A (5' CCAGATCTACATGTCAGAAAGACTGGTAGAGTCAGGG 3') y BR48A (5' CCAGATCTATTTCAGATGTCCTGTAAGTGACCTCC 3') para amplificar la región del gen NURR1 del exón 4 al exón 8 y se les adicionó el sitio de corte reconocido por la enzima de restricción *Bgl II* en el extremo 5'.

### 3.1.2.3. Secuencias NURR1 amplificadas a partir del genoma de ratón

Para la amplificación de las regiones del gen NURR1 de ratón por PCR, primeramente se determinó la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos específicos, utilizando diferentes temperaturas o estableciendo un gradiente de temperatura desde 50°C hasta 60°C. Para la amplificación de la región del exón 3 la temperatura de alineamiento determinada fue de 59°C (Tabla 1), para la región del exón 2 la temperatura fue de 51°C (Tabla 3), y por último, para la región del exón 4 al exón 8 fue de 54°C (Tabla 2). Tomando como base estas temperaturas se diseñaron los diferentes programas de PCR para cada uno de los fragmentos del gen NURR1 con el fin de evitar inespecificidades en la amplificación.

**Tabla 1. Programa de amplificación del exón 3 de NURR1.**

No. De ciclos	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°	4 min	Desnaturalización
	94°	1 min	Desnaturalización
35	59°	1 min	Alineamiento
	68°	4 min	Extensión
1	68°	7 min	Extensión final

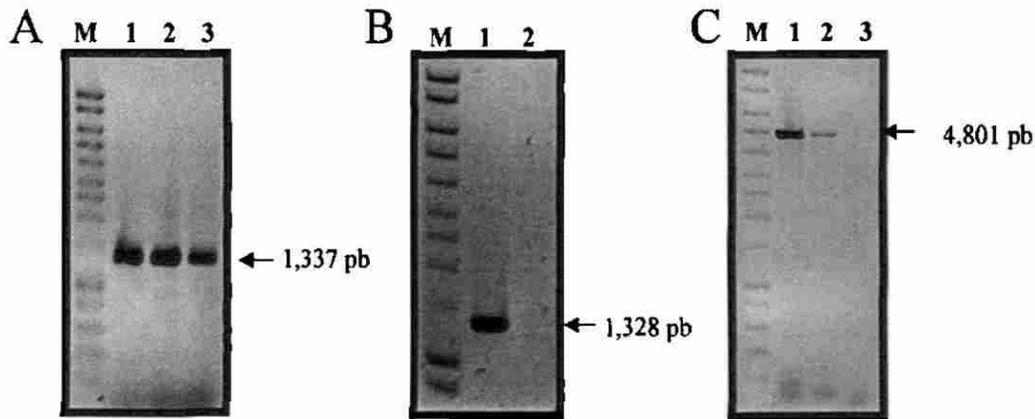
**Tabla 2. Programa de amplificación de la región de los exones 4-8 de NURR1.**

No. De ciclos	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°	4 min	Desnaturalización
	94°	1 min	Desnaturalización
35	54°	1 min	Alineamiento
	68°	4 min	Extensión
1	68°	7 min	Extensión final

**Tabla 3. Programa de amplificación del exón 2 de NURR1.**

No. De ciclos	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°	4 min	Desnaturalización
	94°	1 min	Desnaturalización
35	51°	1 min	Alineamiento
	68°	4 min	Extensión
1	68°	7 min	Extensión Final

Posteriormente con estos programas de PCR, se obtuvieron los siguientes resultados. La amplificación de exón 3 con los oligonucleótidos específicos XR3A y SF3A mostró el tamaño esperado de 1,328 pb (Figura 7B). En la amplificación del exón 2 con los oligonucleótidos KR2A y NF2A se obtuvo el tamaño esperado de 1,337 pb (Figura 7A). Y la amplificación de la región de los exones del 4 al 8 con los oligonucleótidos BAF48A y BR48A mostró el tamaño esperado de 4,801 pb aproximadamente (Figura 7C).



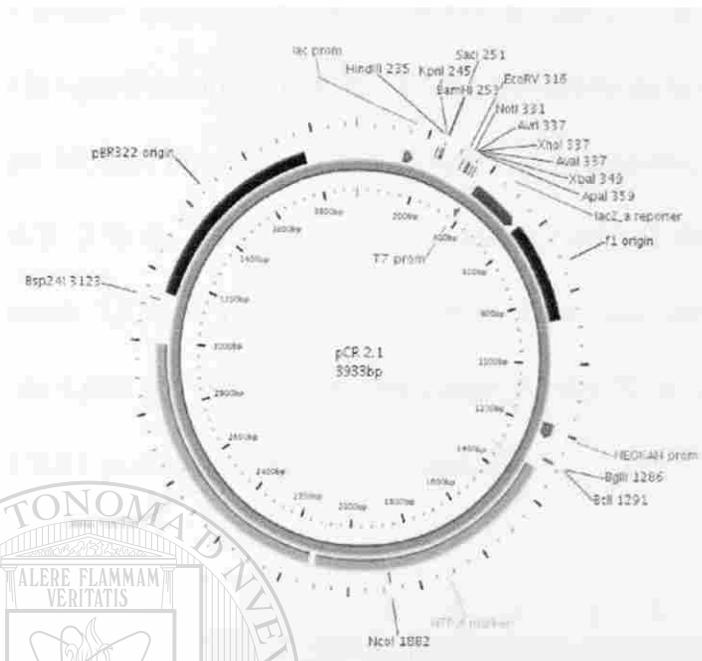
**Figura 7. Amplificación del gen NURR1.** El marcador de peso molecular (M) es 200 pb; **A)** En los carriles 1, 2 y 3 se muestran los productos de PCR esperados (1,337 pb) para la región del exón 2; **B)** En el carril 1 se observa el producto amplificado (1,328 pb) para la región del exón 3, y en el carril 2 el control negativo; **C)** En los carriles 1 y 2 se observa una banda de 4,801 pb que corresponde a la región amplificada del exón 4 al 8 del gen Nurr1, y en el carril 3 el control negativo.

#### 3.1.2.4. Clonación de las secuencias homólogas del gen NURR1 de ratón de la cepa 129Sv

Una vez que se amplificaron por separado las regiones del exón 3, del exón 2 y del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 se procedió a su clonación en el vector pCR2.1 TOPO (Anexo II).

#### 3.1.2.5. Clonación de las regiones del gen NURR1 de ratón en el vector pCR2.1 TOPO

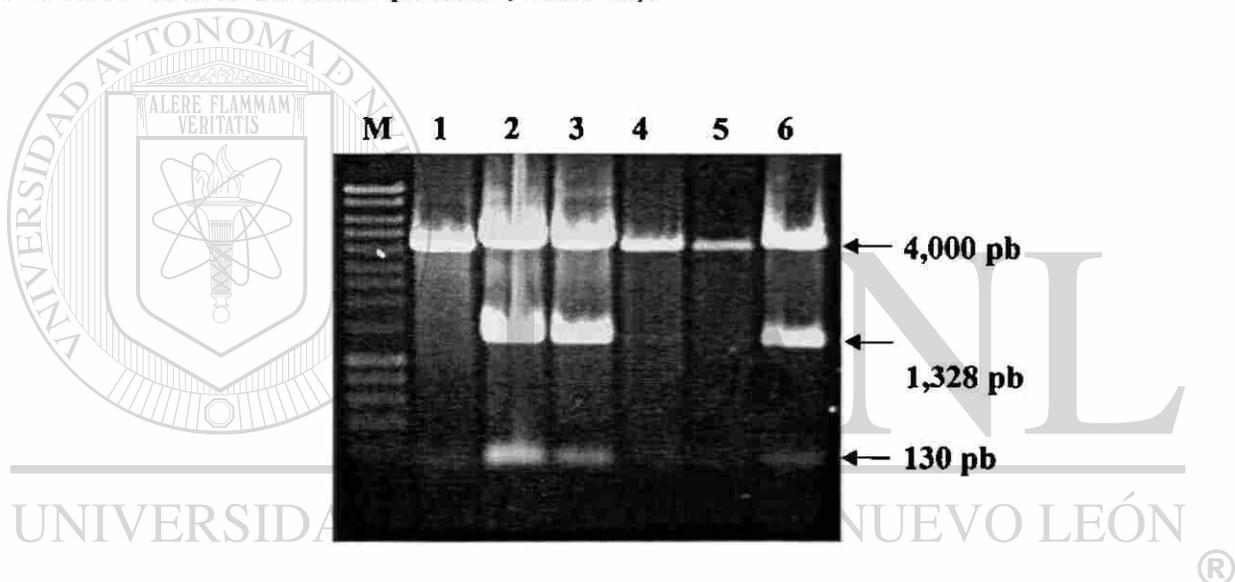
Las regiones del gen NURR1 previamente amplificadas se clonaron en el vector pCR2.1 (Figura 8), para obtener una gran cantidad de DNA plasmídico, lo cual es requerido para la subclonación de los fragmentos del gen NURR1 y la generación del vector de recombinación homóloga de dicho gen.



**Figura 8. Vector de clonación pCR2.1 TOPO.**

Para ello, se llevó a cabo una reacción de ligación de los productos amplificados del gen NURR1 (exón 2 de 1,337 pb, exón 3 de 1,328 pb, y del exón 4 al exón 8 de 4,801 pb) con el vector de clonación pCR 2.1 (Invitrogen), y después se transformaron células  $Ca^{++}$  competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. Se seleccionaron las colonias blancas que crecieron en presencia del antibiótico ampicilina, con el tamizaje de colonias blancas y azules, y se inocularon en medio de cultivo LB. Posteriormente se aisló el DNA plasmídico y después se seleccionaron las cepas positivas para la clonación de los fragmentos del gen Nurr1 de ratón por medio de análisis con diferentes enzimas de restricción (*Eco* RI, *Xho* I y *Sal* I) ver Figura 9, 10 y 11.

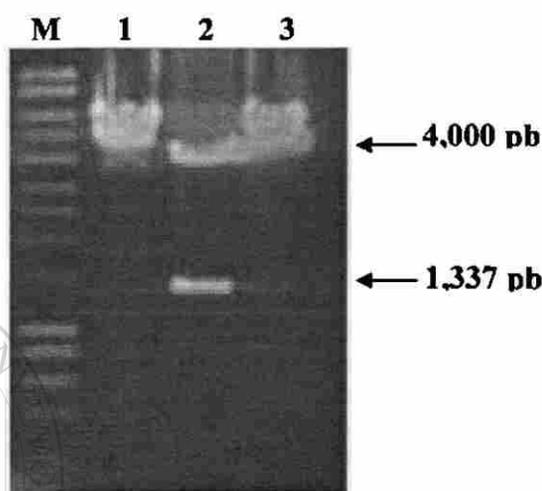
En el análisis con las enzimas de restricción *Xho* I y *Sal* I, se seleccionaron las clonas obtenidas de la ligación del vector pCR 2.1 con el producto de la amplificación de la región del exón 3 del gen NURR1 de ratón, que presentaron tres fragmentos, correspondientes al vector de clonación (pCR 2.1) de 4,000 pb, y a la región del exón 3 dividida en dos fragmentos de aproximadamente 1,328 pb y 130 pb. También se observaron clonas que únicamente contenían el plásmido de 4,000 pb; éstas fueron eliminadas (Figura 9). El vector plasmídico portando el exón 3 de NURR1 se denominó pCR/E3 (Anexo III).



**Figura 9. Identificación de las clonas del exón 3 del gen NURR1 de ratón en el vector pCR2.1 mediante enzimas de restricción.** El producto de amplificación del exón 3 del gen NURR1 fue clonado en el vector pCR 2.1 con el que se transformó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. Se aisló el DNA plasmídico y se caracterizó con las enzimas de restricción *Xho* I y *Sal* I. Carril M, marcador de peso molecular 200 pb. Los carriles 2, 3 y 6 corresponden a clonas positivas para el exón 3 del gen NURR1 de ratón, y los carriles 1, 4 y 5 corresponden a clonas negativas (sin inserto). Gel de agarosal al 0.8%.

Las clonas obtenidas de la reacción de ligación del vector pCR 2.1 con el producto amplificado de la región del exón 2 del gen NURR1 se sometieron a un análisis de restricción, en el cual se empleó la enzima *Eco* RI, misma que flanquea el sitio de inserción en el vector de clonación pCR2.1, y por lo tanto genera un fragmento aproximado de 1,337 pb y la banda correspondiente al vector pCR2.1 de un tamaño de 4,000 pb. Las clonas que sólo mostraron la

banda de 4,000 pb fueron eliminadas (Figura 10). El vector obtenido de esta ligación se denominó pCR/E2 (Anexo IV).



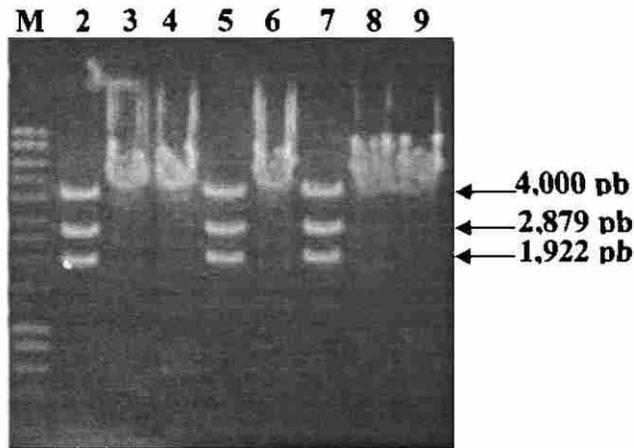
**Figura 10. Identificación de las clonas del exón 2 del gen NURR1 de ratón en el vector pCR2.1 mediante enzimas de restricción.** El producto de amplificación del exón 2 del gen NURR1 fue clonado en el vector pCR 2.1 con el que se transformó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. Se aisló el DNA plasmídico y se caracterizó con la enzima de restricción *EcoRI*. El marcador de peso molecular (M) es 200 pb en un gel de agarosa al 0.8%. El carril 2 corresponde a una clona positiva para el exón 2 del gen NURR1 de ratón, y los carriles 1 y 3 corresponden a clonas negativas (sin inserto).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por último, se caracterizaron las clonas obtenidas de la ligación del vector de clonación pCR2.1 con el fragmento amplificado de la región del exón 4 al exón 8 del gen NURR1. Se digirió el plásmido de las diferentes clonas con la enzima de restricción *EcoRI* y se obtuvo una banda de 4,000 pb correspondiente al vector de clonación pCR2.1, y debido a que en el fragmento se tiene un sitio *EcoRI* interno se puede ver en la Figura una banda de 2,879 y otra de 1,922 pb correspondientes al fragmento liberado del vector de clonación del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 (Figura 11). Se eliminaron las clonas que únicamente presentaron el plásmido linearizado de un tamaño de 4,000 pb. Al nuevo plásmido conteniendo estos exones se le denominó pCR/E48 (Anexo V).



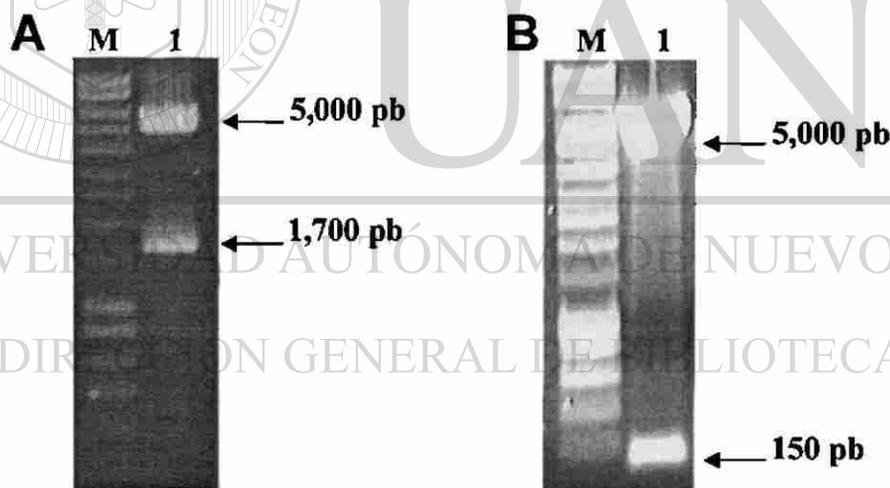
**Figura 11. Identificación de las clonas del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 de ratón en el vector pCR2.1 mediante enzimas de restricción.** El producto de amplificación del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 fue clonado en el vector pCR2.1 con el que se transformó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. Se aisló el DNA plasmídico y se caracterizó con la enzima de restricción *Eco* RI. El marcador de peso molecular (M) es 200 pb. Los carriles 2, 5 y 7 corresponden a clonas positivas para el exón 3 del gen NURR1 de ratón, y los carriles 3, 4, 6, 8 y 9 corresponden a clonas negativas (sin inserto). en un gel de agarosa al 0.8%

### 3.1.3. Obtención del vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1

Una vez que se generaron los plásmidos pCR/E2, pCR/E3 y pCR/E48 que portan las regiones del gen NURR1, dichas regiones fueron subclonadas en el vector pLG I. También fueron subclonados los sitios loxP y el gen de selección positiva Neo<sup>R</sup>, flanqueado por los sitio loxP, estos últimos fueron obtenidos del plásmido ploxA, de esta manera se generó el vector de recombinación homóloga del gen NURR1.

### 3.1.3.1. Subclonación del sitio loxP en el plásmido pLG I

Primeramente se digirió el vector pLG I con las enzimas de restricción *Xba* I y *Sal* I obteniéndose un fragmento de 1,700 pb correspondiente al gen de resistencia Neo<sup>R</sup> y otro fragmento de 5,000 pb correspondiente al esqueleto del plásmido pBS SK II (+) y al gen Timidin Cinasa para la selección negativa en células de mamíferos (Figura 12A). El segundo plásmido ploxA fue digerido con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Sal* I y se obtuvo un fragmento de 150 pb correspondiente a un sitio loxP y otro de aproximadamente 5,000 pb del esqueleto del plásmido (Figura 12B).



**Figura 12. Digestión con enzimas de restricción del plásmido pLG I y ploxA.** El marcador de peso molecular (M) es 200 pb; **A)** En el carril 1 se muestran los fragmentos del plásmido pLG I digerido con las enzimas de restricción *Xba* I y *Sal* I, los tamaños esperados son de 1,700 pb y 5,000 pb; **B)** En el carril 1 se observan un fragmentos de 150 pb y otro de 5,000 pb correspondientes a la digestión del plásmido ploxA digerido con las enzimas de restricción *Sal* I y *Nhe* I. Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio

El fragmento de 5,000 pb del plásmido pLG I (*Xba* I y *Sal* I) y el fragmento de 150 pb del plásmido ploxA (*Nhe* I y *Sal* I) se purificaron y se ligaron. Cada una de las colonias obtenidas fue caracterizada con la enzima de restricción *Pst* I. Esta enzima generó un patrón que

permitió distinguir las clonas positivas para la integración del sitio loxP en el plásmido pLG I (Figura 13). Se observó un fragmento de 3,500 pb (esqueleto del plásmido pBS SK II), un fragmento de 1,100 pb como parte de la secuencia del gen Timidin Cinasa y el sitio loxP introducido, y un fragmento de 840 pb correspondiente a la secuencia del gen Timidin Cinasa (Figura 13). A este plásmido se le denominó pTKloxP.

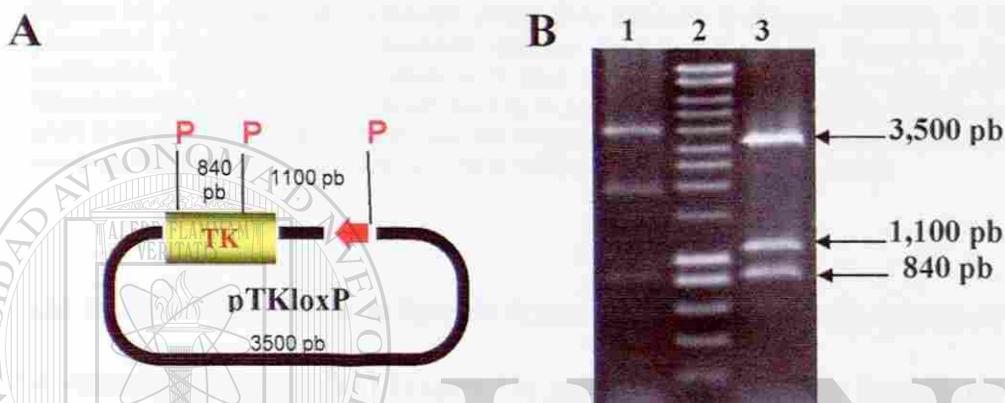
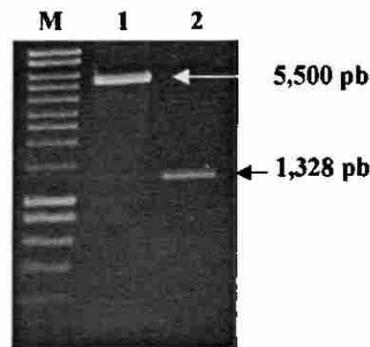


Figura 13. Caracterización del plásmido pTKloxP con la enzima de restricción *Pst* I. A) Esquema del plásmido pTKloxP. (P) sitio para la enzima de restricción *Pst* I, (TK) Timidin Cinasa, y ( ) sitio loxP. B) En el carril 1 se observa el plásmido pLG I y en el carril 3 el plásmido pTKloxP después de ser digeridos con la enzima *Pst* I, en el carril 2 se observa el marcador de peso molecular de 200 pb, en un gel de agarosa al 0.8%.

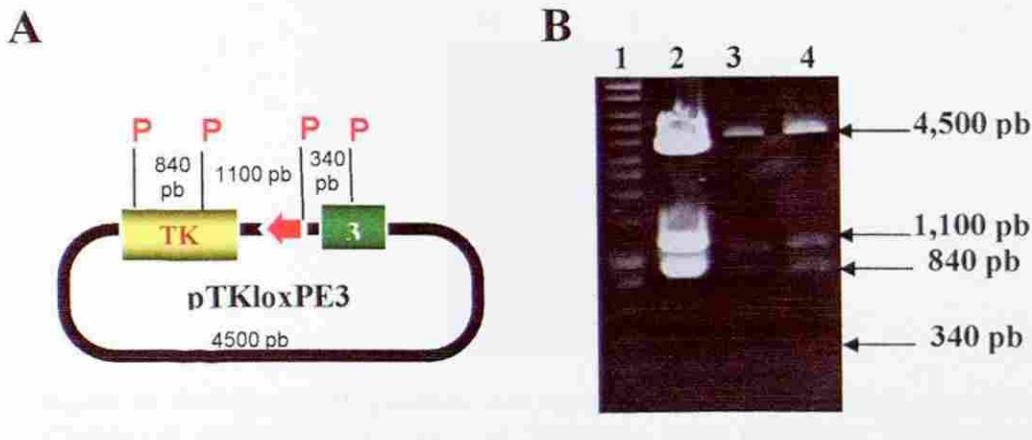
### 3.1.3.2. Subclonación del exón 3 del gen NURR1 en el plásmido pTKloxP

A partir del vector pCR/E3 se subclonó el fragmento de la región del exón 3 del gen NURR1 en el vector pTKloxP. El vector pCR/E3 fue digerido con las enzimas de restricción *Xho* I y *Sal* I generando un fragmento de 1,328 pb, mientras que el vector pTKloxP fue digerido con la enzima de restricción *Sal* I, lo cual generó un fragmento de 5,500 pb. Ambos fragmentos fueron purificados (ver Figura 14) y se utilizaron en una reacción de ligación. Se llevó a cabo la transformación y el análisis de clonas como previamente se describe, y se generó la construcción denominada pTKloxPE3.



**Figura 14. Purificación del plásmido pTKloxP y del exón 3 del gen NURR1.** El DNA plasmídico fue digerido con diferentes enzimas de restricción y los fragmentos fueron purificados. M corresponde al marcador de peso molecular de 200 pb, (1) vector pTKloxP linearizado con la enzima de restricción *Sal* I de un tamaño esperado de 5,500 pb, y (2) banda del exón 3 del gen NURR1 de 1,328 pb, que fue liberada de la digestión del vector pCR/E3 con las enzimas *Xho* I y *Sal* I, en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

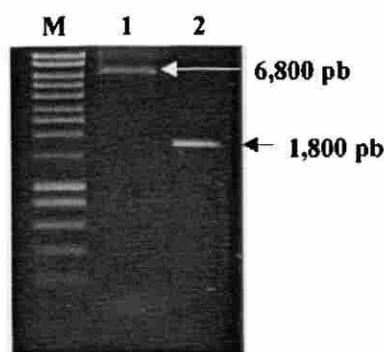
Las colonias obtenidas de la ligación fueron caracterizadas con la enzima de restricción *Pst* I. La caracterización con *Pst* I (Figura 15) generó dos patrones de bandas, un patrón que permite distinguir las clonas que fueron negativas para la ligación, las cuales mostraron un fragmento de 3,500 pb (esqueleto del plásmido pBS SK II), un fragmento de 1,100 pb como parte de la secuencia del gen Timidin Cinasa y el sitio loxP, y un fragmento de 840 pb correspondiente a parte de la secuencia del gen Timidin Cinasa como se muestra en la Figura 15A. El patrón que permite distinguir las clonas positivas para la integración de la región del exón 3 del gen NURR1 en el plásmido pTKloxP, muestra un fragmento de 4,500 pb (esqueleto del plásmido pBS SK II) y parte de la región del exón 3 del gen NURR1, un fragmento de 1,100 pb como parte de la secuencia del gen Timidin Cinasa y el sitio loxP, un fragmento de 840 pb correspondiente a la secuencia del gen Timidin Cinasa, y un fragmento de 340 pb correspondiente al exón 3 del gen NURR1 (Figura 15A). A este plásmido se le denominó pTKloxPE3 (Figura 15).



**Figura 15. Identificación de las clonas positivas de la ligación del exón 3 en el vector pTKloxP con la enzima de restricción *Pst* I.** A) Esquema del plásmido pTKloxPE3 (P) sitios de corte de la enzima de restricción *Pst* I, (TK) Timidin Cinasa, (◀) sitio loxP y el número 3 indica el exón de NURR1 subclonado en el vector pTKloxP. B) En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 200 pb, en el carril 2 se observa una clona sin la región del exón 3 del gen NURR1, y en los carriles 3 y 4 se observan las clonas que contienen el exón 3 del gen NURR1 después de ser digeridas con la enzima *Pst* I, en un gel de agarosa al 0.8%.

### 3.1.3.3. Subclonación del gen de selección positiva Neo<sup>R</sup> en células de mamífero en el plásmido pTKloxPE3

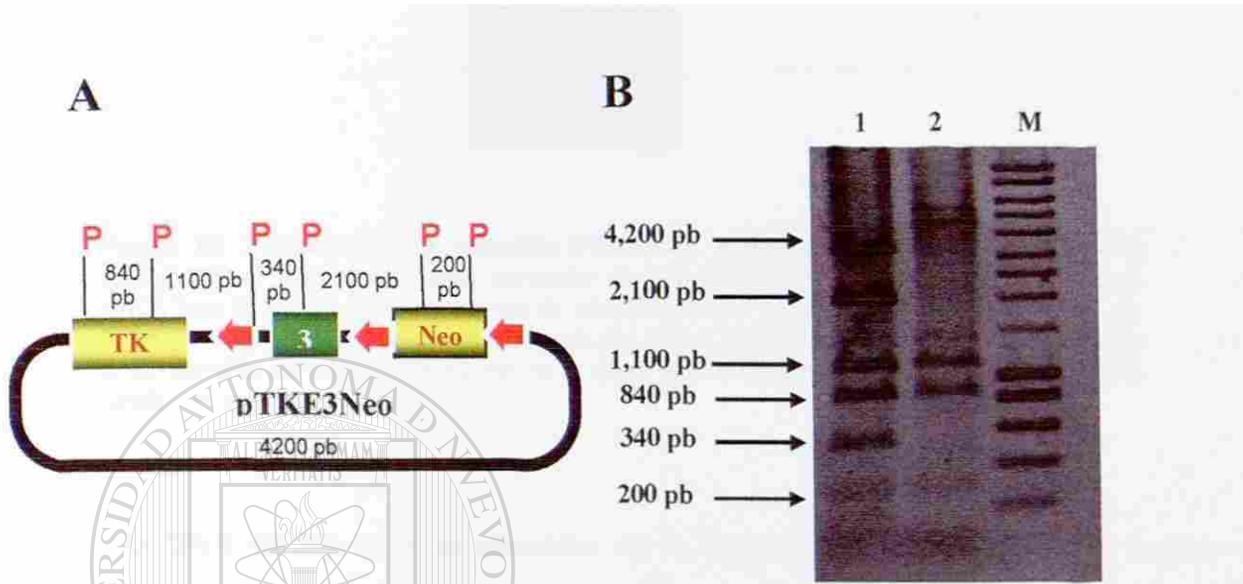
Del vector ploxP A se obtuvo el fragmento del gen Neo<sup>R</sup> flanqueado por los sitios loxP, éste fue subclonado en el vector pTKloxPE3. El vector ploxP A fue digerido con la enzima de restricción *Xho* I liberando un fragmento de 1,800 pb, mientras que el vector pTKloxPE3 fue linearizado con la enzima de restricción *Sal* I, la cual liberó un fragmento de 6,800 pb, ambos fragmentos fueron purificados ( Figura 16) y se utilizaron en una reacción de ligación. Se llevó a cabo la transformación y el análisis de clonas como previamente se describió, generándose la construcción denominada pTKNeo.



**Figura 16. Purificación del plásmido pTKloxPE3 y del gen Neo<sup>R</sup>.** El DNA plasmídico fue digerido con enzimas de restricción y los fragmentos fueron purificados. M corresponde al marcador de peso molecular de 200 pb, en el carril 1 se muestra el vector pTKloxPE3 linearizado con la enzima de restricción *Sal* I de un tamaño esperado de 6,800 pb, y en el carril 2 se muestra el fragmento del gen Neo<sup>R</sup> flanqueado por los sitios loxP de un tamaño esperado de 1,800 pb, obtenido de la digestión del vector ploxP A con la enzima de restricción *Xho* I, en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

El DNA de las colonias obtenidas de la ligación fue digerido con la enzima de restricción *Pst* I y se observaron dos patrones de bandas. Un patrón correspondiente al esperado en las clonas con ligación positiva, y el correspondiente a clonas sin fragmento ligado. El patrón negativo a la ligación mostró un fragmento de 4,500 pb del esqueleto del plásmido pBS SK II y parte de la región del exón 3 del gen NURR1, un fragmento de 1,100 pb como parte de la secuencia del gen Timidin Cínasa y el sitio loxP, un fragmento de 840 pb correspondiente a parte de la secuencia del gen Timidin Cínasa, y un fragmento de 340 pb correspondiente al exón 3 del gen NURR1. Mientras que el patrón positivo para la ligación de gen Neo<sup>R</sup> flanqueado por los sitios loxP, mostró los fragmentos esperados de: 4,100 pb del esqueleto del plásmido pBS SK II y parte del gen Neo<sup>R</sup>, de 1,100 pb como parte de la secuencia del gen Timidin Cínasa y el sitio loxP, de 840 pb correspondiente a parte de la secuencia del gen Timidin Cínasa, un fragmento de 340 pb correspondiente a una pequeña parte del exón 3 del gen NURR1, otro fragmento de 2,000 pb correspondiente a parte del exón 3 del gen NURR1 y parte del gen

Neo<sup>R</sup>, y otra banda de 200 pb proveniente del gen Neo<sup>R</sup> ( Figura 17). A este plásmido se le denominó pTKE3Neo.

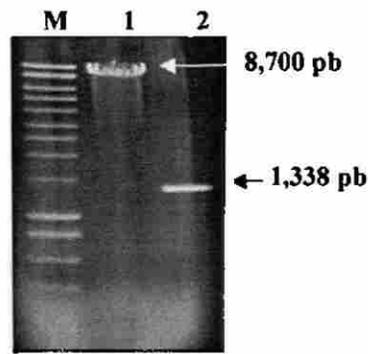


**Figura 17. Identificación de las clonas positivas de la ligación del gen Neo<sup>R</sup> en el vector pTKloxPE3 con la enzima de restricción *Pst* I. A) Esquema del plásmido pTKloxPE3. (P) sitios de corte de la enzima de restricción *Pst* I, (TK) Timidin Cinasa, (◀) sitio loxP y el número 3 indica el exón de NURR1, (Neo) indica al gen Neo<sup>R</sup> subclonado en el vector pTKloxPE3. B) En el carril 1 se observa una clona positiva de la ligación del gen Neo<sup>R</sup> en el vector pTKloxPE3, el carril 2 muestra una clona negativa de la ligación. M corresponde al marcador de peso molecular de 200 p, Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

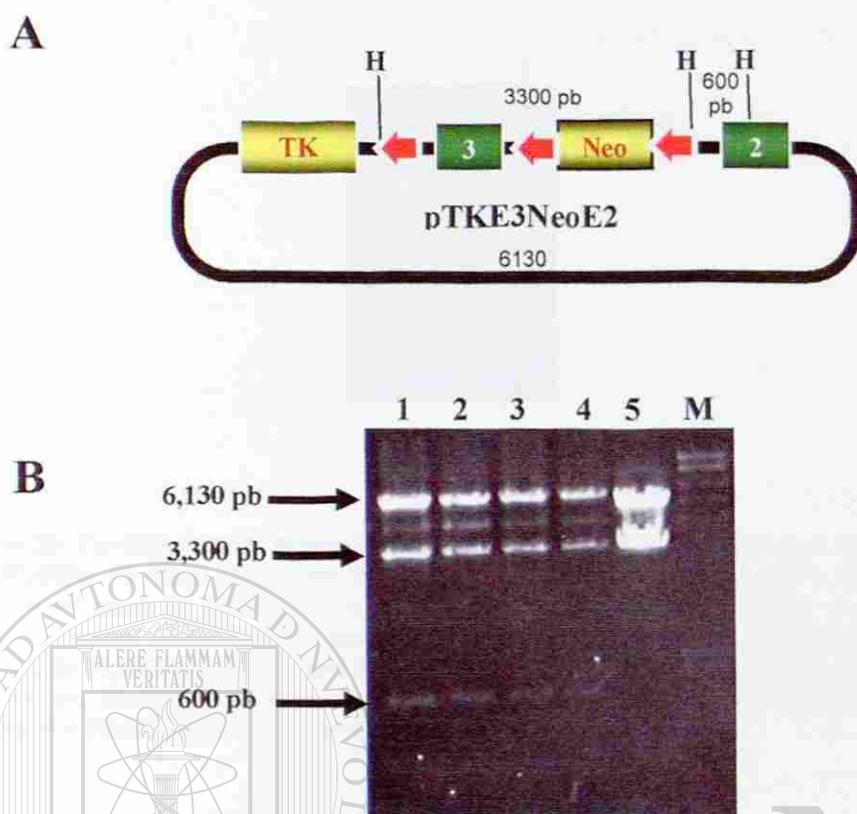
#### 3.1.3.4. Subclonación del exón 2 del gen NURR1 en el plásmido pTKE3Neo

A partir del vector pCR/E2 se subclonó el fragmento de la región del exón 2 del gen NURR1 en el vector pTKE3Neo. El vector pCR/E2 fue digerido con las enzimas de restricción *Not* I y *Kpn* I liberando un fragmento de 1,338 pb, mientras que el vector pTKE3Neo fue digerido con las mismas enzimas de restricción *Not* I y *Kpn* I, lo cual generó un fragmento de 8,700 pb. Ambos fragmentos fueron purificados ( Figura 18) y se utilizaron en una reacción de ligación. Se llevó a cabo la transformación y el análisis de clonas como previamente se describió, generándose la construcción denominada pTKE3NeoE2.



**Figura 18. Purificación del plásmido pTKE3Neo y del exón 2 del gen NURR1.** M corresponde al marcador de peso molecular de 200 pb, en el carril 1 se muestra el vector pTKE3Neo linearizado con las enzimas de restricción *Not* I y *Kpn* I de un tamaño esperado de 8,700 pb, y en el carril 2 se muestra la banda del exón 2 del gen NURR1 de 1,338 pb, liberada de la digestión del vector pCR/E2 con las enzimas *Not* I y *Kpn* I, en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

El DNA de las colonias obtenidas de la ligación se caracterizó con la enzima de restricción *Hind* III. La digestión con *Hind* III (Figura 19) generó 2 diferentes patrones de bandas, un negativo no deseado y otro para las clonas positivas. Las clonas negativas mostraron un fragmento de 5,400 pb correspondiente al esqueleto del plásmido pBS SK II unido al gen Timidin Cinasa, y otro de 3,300 pb que corresponde al gen Neo<sup>R</sup> unido a la región del exón 3 del gen NURR1. Mientras que las clonas positivas generaron un fragmento de 3,300 pb que corresponde al gen Neo<sup>R</sup> unido a la región del exón 3 del gen NURR1, un fragmento de 6,130 pb correspondiente a la secuencia del gen Timidin Cinasa unido al esqueleto del plásmido pBS SK II y una parte del exón 2 del gen NURR1, y por último un fragmento de 600 pb que corresponden a una parte del exón 2 del gen NURR1 (Figura 19).

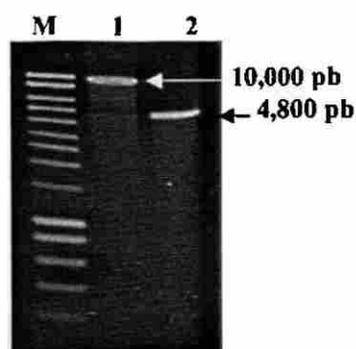


**Figura 19. Identificación de las clonas positivas de la ligación del exón 2 del gen NURR1 en el vector pTKE3Neo con la enzima de restricción *Hind* III. A) Esquema del plásmido pTKE3NeoE2 (H) sitios de corte de la enzima de restricción *Hind* III, (TK) Timidin Kinasa, el número indica el exón de NURR1 y ( ) sitio loxP, (Neo) indica al gen *Neo*<sup>R</sup>. B) En el carril 1, 2, 3 y 4 se observan clonas positiva de la ligación del fragmento del exón 2 del gen NURR1 y el vector pTKE3Neo, el carril 5 muestra una clona negativa de la ligación, y en el carril M se observa el marcador de peso molecular de 200 pb. Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio**

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### 3.1.3.5. Subclonación del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 en el plásmido pTKE3NeoE2

A partir del vector pCR/E48 se subclonó el fragmento de la región del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 en el vector pTKE3NeoE2. El vector pCR/E48 fue digerido con la enzima de restricción *Bgl* II, liberando un fragmento de 4,800 pb, mientras que el vector pTKE3NeoE2, fue digerido con la enzima de restricción *Bam* HI, lo cual generó un fragmento de 10,000 pb. Ambos fragmentos fueron purificados (ver Figura 20A) y se utilizaron en una reacción de ligación. Se llevó a cabo la transformación de *E. coli* y el análisis de clonas como previamente se describió, generándose la construcción denominada pNurr1<sup>E3LoxP</sup> (Figura 20).



**Figura 20. Purificación del plásmido pTKE3NeoE2 y de la región del exón 4 al exón 8 del gen NURR1.** El DNA plasmídico fue digerido con enzimas de restricción y los fragmentos fueron purificados. M corresponde al marcador de peso molecular de 200 pb, en el carril 1 se muestra el vector pTKE3NeoE2 linealizado con la enzima de restricción *Bam* HI con un tamaño esperado de 10,000 pb, y en el carril 2 se muestra la banda del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 de 4,800 pb, liberada de la digestión del vector pCR/E48 con la enzima *Bgl* II, en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

Las colonias obtenidas de la ligación fueron caracterizadas con la enzima de restricción *Hind* III. La digestión con *Hind* III (Figura 21) generó en las clonas negativas un patrón esperado de bandas, mostrando un fragmento de 3,300 pb que corresponde al gen Neo<sup>R</sup> unido a la región del exón 3 del gen NURR1, un fragmento de 6,100 pb correspondiente a la secuencia del gen Timidin Kinasa unido al esqueleto del plásmido pBS SK II y una parte del exón 2 del gen NURR1, y por último un fragmento de 600 pb que corresponden a una parte del exón 2 del gen NURR1 (Ver Figura 21). Mientras que las clonas positivas deseadas (Figura 21A) generaron un fragmento de 8,900 pb correspondiente a la región del exón 6 al exón 8 del gen NURR1 y la secuencia del gen Timidin Kinasa unido al esqueleto del plásmido pBS SK II y una parte del exón 2 del gen NURR1, un fragmento de 2,000 pb que corresponde a la región del

exón 4 al exón 5 del gen NURR1, y por último un fragmento de 600 pb que corresponde a una parte del exón 2 del gen NURR1 (Figura 21).

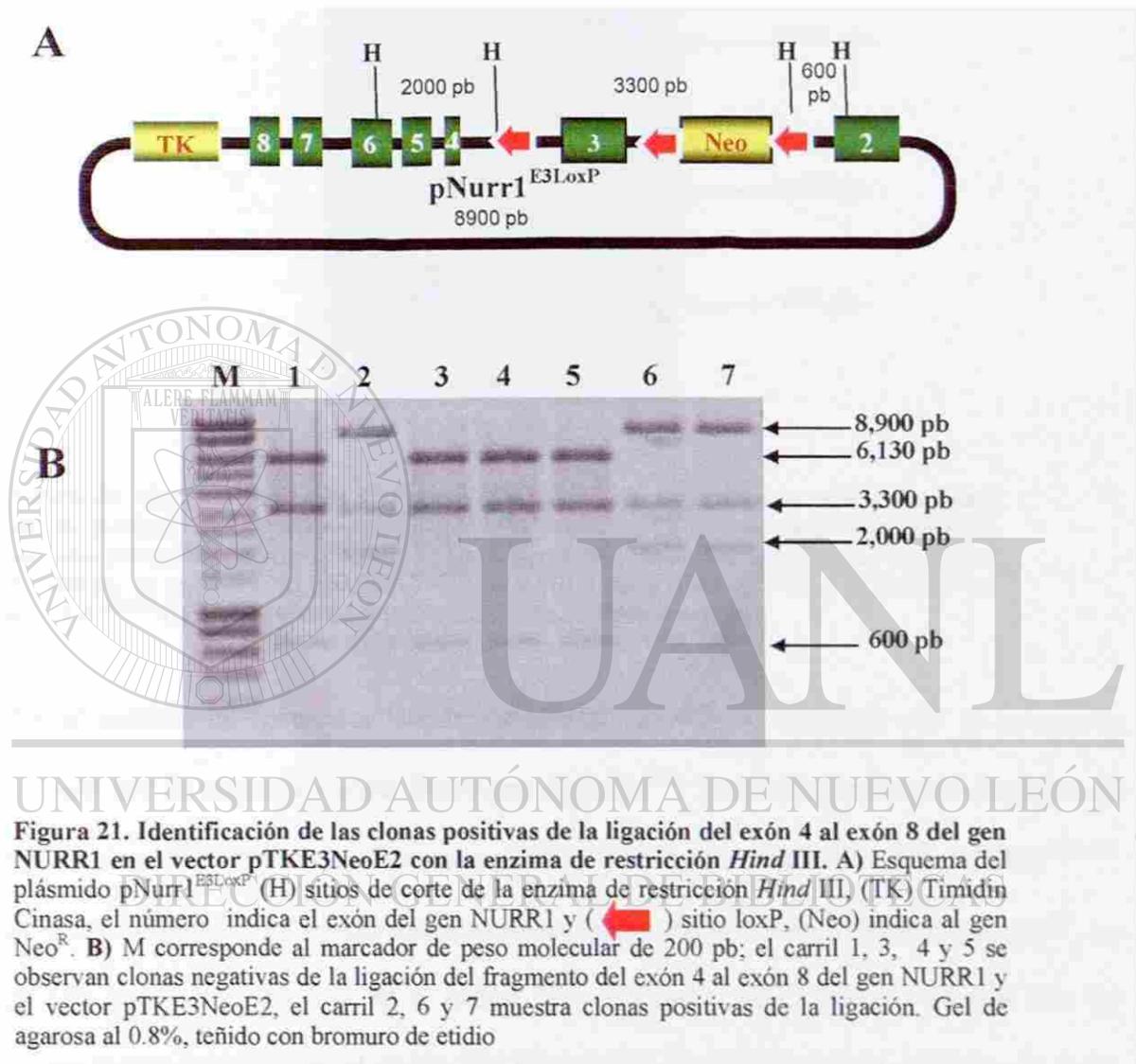
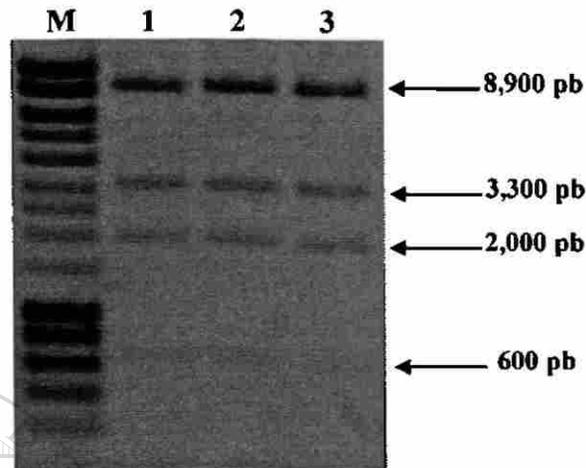


Figura 21. Identificación de las clonas positivas de la ligación del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 en el vector pTKE3NeoE2 con la enzima de restricción *Hind* III. A) Esquema del plásmido pNurr1<sup>E3LoxP</sup> (H) sitios de corte de la enzima de restricción *Hind* III, (TK) Timidín Cinasasa, el número indica el exón del gen NURR1 y ( ) sitio loxP, (Neo) indica al gen Neo<sup>R</sup>. B) M corresponde al marcador de peso molecular de 200 pb; el carril 1, 3, 4 y 5 se observan clonas negativas de la ligación del fragmento del exón 4 al exón 8 del gen NURR1 y el vector pTKE3NeoE2, el carril 2, 6 y 7 muestra clonas positivas de la ligación. Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio

### 3.1.4. Caracterización del vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1

Una vez generado el vector recombinante, se seleccionaron tres clonas positivas, las cuales se denominaron pNURR1<sup>E3LoxP</sup>I, II y III, y se les realizaron dos análisis por separado. En

el primero las clonas se digirieron con la enzima *Hind* III observando el patrón de bandas esperado (Figura 22), y en el segundo análisis las clonas fueron secuenciadas.



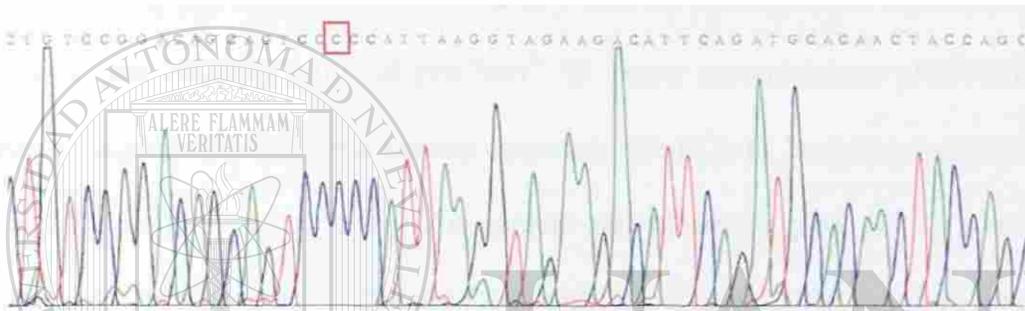
**Figura 22. Caracterización de 3 clonas pNURR1<sup>E3LoxP</sup> con la enzima de restricción *Hind* III.** Se purificó DNA de los vectores pNURR1<sup>E3LoxP</sup> I, II y III a gran escala para su posterior uso para secuenciación y transfección. El carril M corresponde al marcador de peso molecular de 200 pb, el carril 1 es el pNURR1<sup>E3LoxP</sup> I; el carril 2 el pNURR1<sup>E3LoxP</sup> II, y el carril 3 el pNURR1<sup>E3LoxP</sup> III. Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio.

En el análisis de secuenciación, la secuencia obtenida se comparó con la secuencia proporcionada por la empresa Celera Discovery Systems<sup>TM</sup>. Se detectaron cuatro cambios de nucleótido, de los cuales tres se localizaron en el exón 3 del vector recombinante pNURR1<sup>E3LoxP</sup> de las clonas denominadas I, II y III. Estos cambios fueron: en el codón 89 una C por una T, en el codón 250 una T por una C y en el codón 273 un cambio de G por A ( Figura 23). Se encontró una cuarta mutación en el codón 566 (un cambio de una G por una A) del exón 8 del gen NURR1 del vector recombinante pNURR1<sup>E3LoxP</sup> de las clonas I, II y III (Tabla 4).

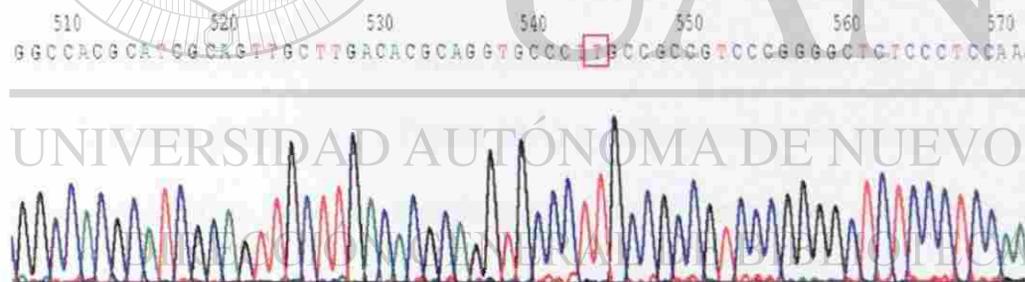
**Tabla 4. Mutaciones de las clonas de los vectores recombinantes pNURR1<sup>E3LoxP</sup>I, II y III.**

Posición	Codón	Aminoácido	Símbolo	Carga	Exón
89	TCC → CCC	Serina → Prolina	S → P	Polar → Hidrofóbico	3
250	TCG → TTG	Serina → Leucina	S → L	Polar → Hidrofóbico	3
273	CAG → CGG	Glutamina → Arginina	Q → R	Polar → Básico	3
566	TGC → TAC	Cisteína → Tirosina	C → Y	Polar → Polar	8

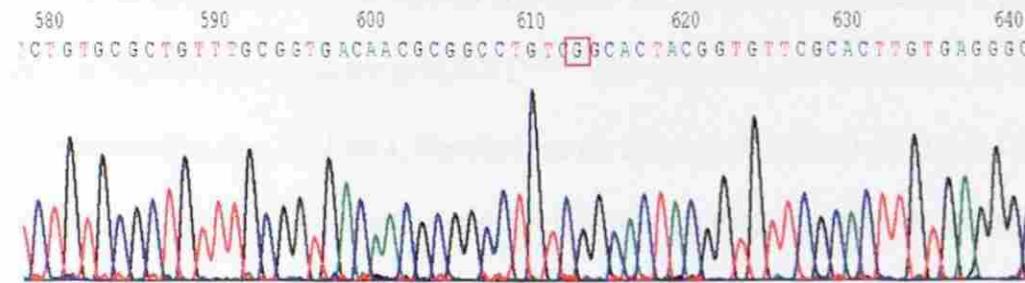
**A**



**B**

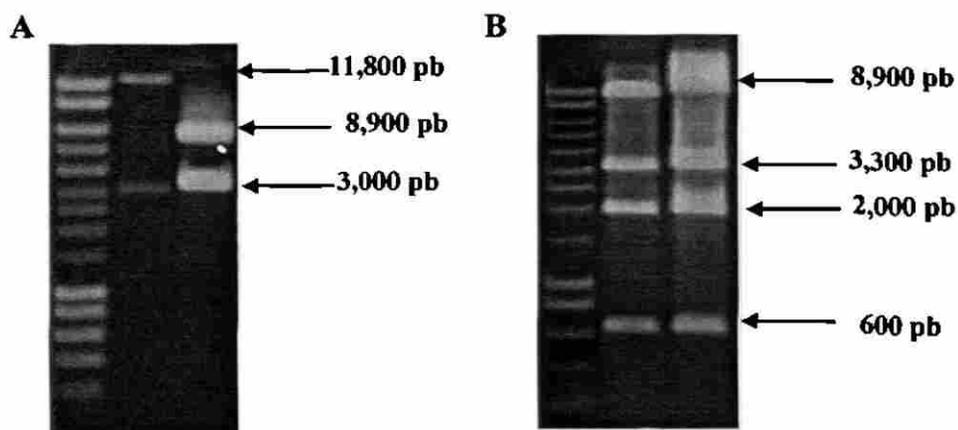


**C**



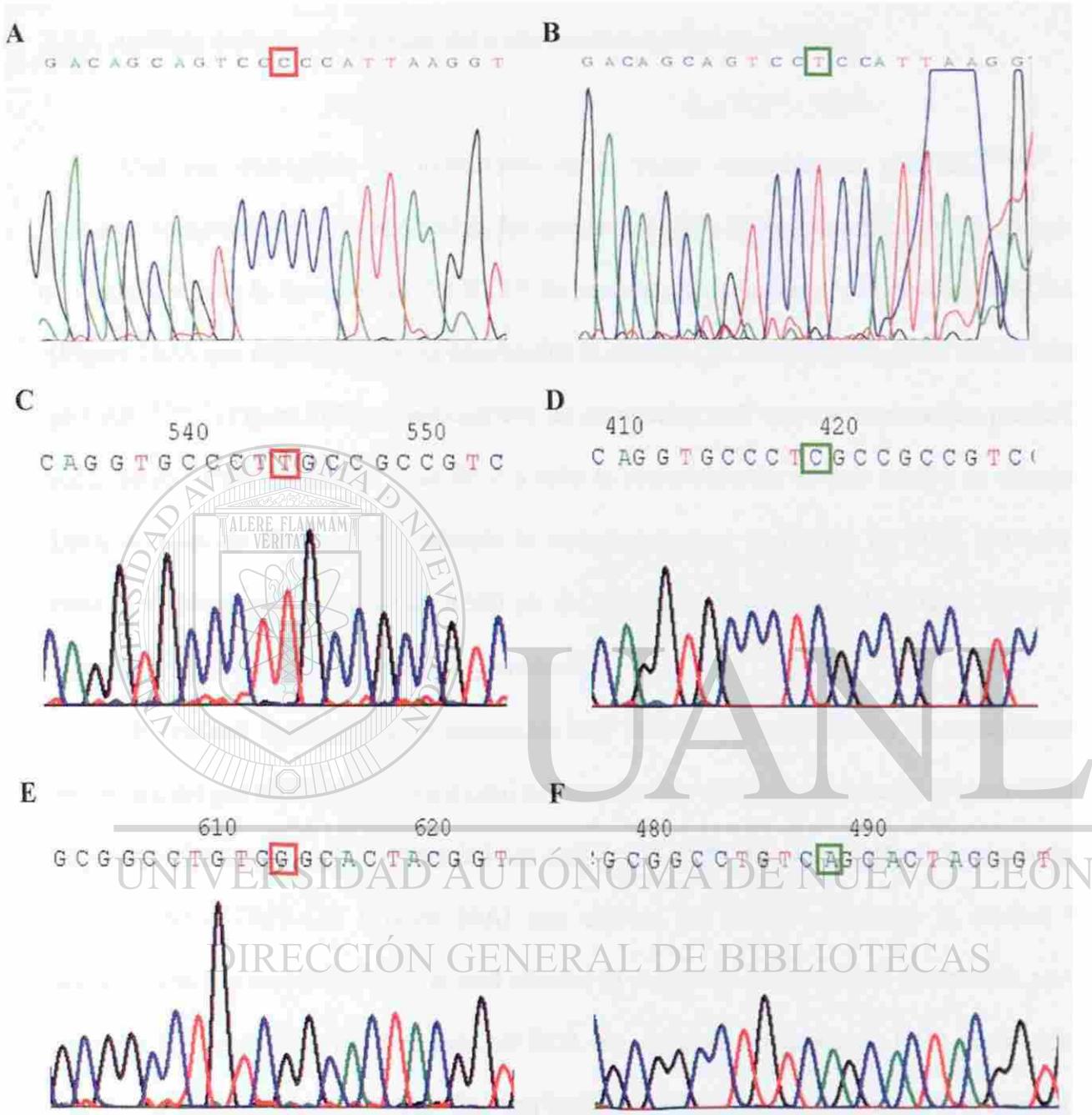
**Figura 23. Secuenciación de las clonas pNurr1<sup>E3LoxP</sup> I, II y III. El nucleótido en cuadro rojo indica el lugar de la mutación puntual en las clonas pNurr1<sup>E3LoxP</sup> I, II y III, del exón 3 del gen NURR1.**

Se procedió a reparar las mutaciones por sustitución del fragmento con mutaciones del exón 3, por uno previamente secuenciado sin mutaciones. Debido a la dificultad de encontrar sitios de restricción para liberar el fragmento del exón 3 con las mutaciones, a partir del vector pTKlox se subclonó un exón 3 sin las mutaciones antes mencionadas, y posteriormente se subclonó el gen Neo<sup>R</sup> para obtener un vector pTKE3Neo. Este vector se digirió con la enzima *Cla* I, generando un fragmento de aproximadamente 5,700 pb correspondiente al esqueleto del plásmido pBS SK (+) y el gen Timidin Kinasa, y otro de 3,000 pb correspondiente a la región del exón 3 del gen NURR1 unido al gen Neo<sup>R</sup>. El vector recombinante pNURR1<sup>E3loxP</sup> con las mutaciones se digirió con la misma enzima de restricción (*Cla* I), la cual generó dos fragmentos, uno de 11,800 pb que corresponde al esqueleto del plásmido pBS SK (+), al gen Timidin Kinasa, al exón 2, y al fragmento del exón 4 al exón 8 del gen NURR1; y otro de 3,000 pb que corresponde al exón 3 del gen NURR1 con las mutaciones antes mencionadas, unido al gen Neo<sup>R</sup>. El fragmento de 3,000 pb del vector pTKE3Neo y el fragmento de 11,800 pb del vector pNURR1<sup>E3loxP</sup>, fueron purificados ( Figura 24A) y utilizados en una reacción de ligación (ver Figura 24B). Se llevó a cabo la transformación de *E. coli* y el análisis de clonas como previamente se describió. Posteriormente se seleccionaron dos clonas pNURR1<sup>E3loxP</sup>, se secuenciaron y se corroboró que se habían corregido las mutaciones del exón 3 (Figura 25). El exón 8 del gen NURR1 en el vector pNURR1<sup>E3loxP</sup> que contenía una mutación, se digirió con las enzimas de restricción *Age* I y *Kpn* I, liberándose un fragmento de 300 pb. Dicho fragmento fue sustituido por un fragmento sin mutaciones del mismo tamaño, obtenido de la digestión con las enzimas de restricción *Age* I y *Kpn* I del vector 05375pPCR-Scripp, generado por la empresa GENEART.



**Figura 24. Digestión con enzimas de restricción de los vectores pNURR1<sup>E3loxP</sup> I, pTKE3Neo, y 053575pPCR-Script.** A) M corresponde al marcador de peso molecular de 200 pb, el carril 1 muestra el vector pNURR1<sup>E3loxP</sup> I digerido con las enzimas de restricción *Age* I y *Kpn* I, el carril 2 muestra el vector pTKE3Neo digerido con las enzimas de restricción *Age* I y *Kpn* I; B) M es el marcador de peso molecular de 200 pb, el carril 1 y 2 las clonas seleccionadas pNURR1<sup>E3loxP</sup> digeridas con la enzima de restricción *Hind* III, en un gel de agarosa al 0.8%.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

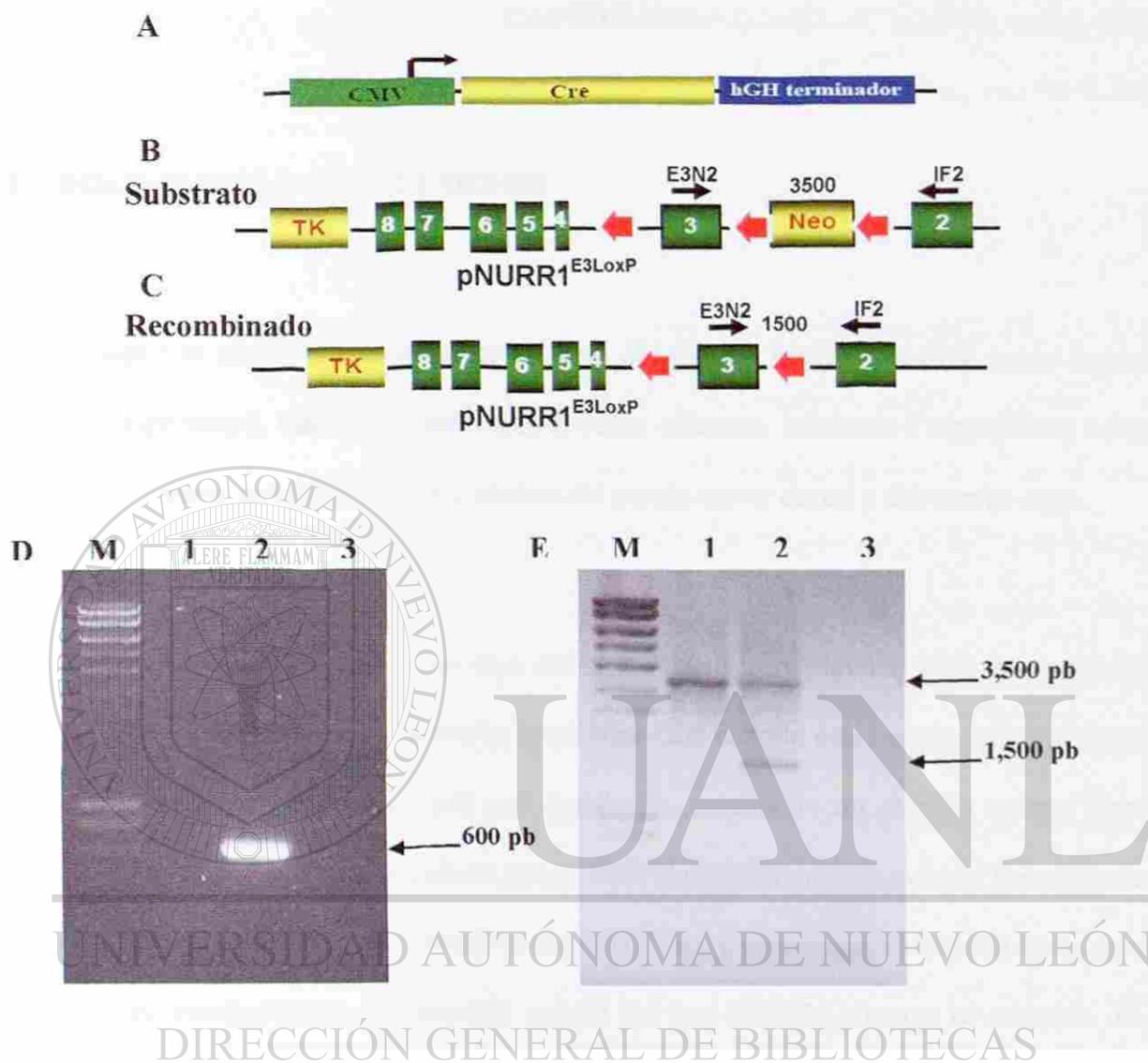


**Figura 25. Secuenciación del vector recombinante pNURR1<sup>E3loxP</sup>.** En A, C y E se muestran en un recuadro rojo las mutaciones puntuales del exón 3 del gen NURR1, en B, D y F se señalan en un recuadro verde las correcciones de las mutaciones del exón 3 del gen NURR1 en el vector recombinante pNURR1<sup>E3loxP</sup>.

### 3.1.5. Análisis de la funcionalidad del alelo condicional del gen NURR1

Una vez corregidas las mutaciones en el vector recombinante pNURR1<sup>E3LoxP</sup>, fue necesario comprobar la funcionalidad de las secuencias loxP, la cual se realizó en un ensayo de co-transfección en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, con el vector CMV-Cre (Figura 26A) que expresa de forma constitutiva la enzima Cre recombinasa, junto con el vector pNURR1<sup>E3LoxP</sup> (Figura 26B) el cual contiene las secuencias loxP que son reconocidas por la Cre recombinasa. Para determinar si se llevó a cabo la recombinación en este ensayo se extrajo el DNA después de 48 horas de realizada la co-transfección y se realizó un PCR, del cual se obtuvo un fragmento esperado de 3,500 pb del plásmido no recombinado (Figura 26C) y un fragmento de 1,500 pb del plásmido recombinado.

El análisis funcional de las secuencias loxP introducidas en el vector de recombinación homóloga del gen NURR1 se llevó a cabo empleando este vector como sustrato (Figura 26B) en un ensayo *in vitro*, al co-transfectar la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, junto con el vector CMV-Cre (Figura 26A) que expresa de manera constante la enzima Cre recombinasa. La recombinación, la cual eliminó la secuencia del gen Neo<sup>R</sup> flanqueada por los sitios loxP (Figura 26C) fue detectada por PCR. Se realizó la extracción de DNA de las células SH-SY5Y transfectadas, y se amplificó una banda de 600 pb correspondiente a la secuencia del gen de la Cre recombinasa (Figura 26D), lo cual indica que el vector de expresión CMV-Cre fue introducido en la línea celular y pudo llevar a cabo una expresión transitoria de la proteína Cre recombinasa y por lo tanto actuar sobre el sustrato, al que se le realizó un PCR y nos generó dos bandas de 3,500 pb que corresponde al vector pNURR1<sup>E3loxP</sup> sin recombinar, y una banda de 1,500 pb del vector pNURR1<sup>E3loxP</sup> recombinado (Figura 26E), lo que mostró la actividad de la proteína Cre recombinasa sobre el sustrato pNURR1<sup>E3loxP</sup>.



**Figura 26. Co-transfección de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano con el vector pNURR1<sup>E3loxP</sup> y el vector de expresión CMV-Cre.** En A) Esquema del vector de expresión CMV-Cre; B) Esquema del vector pNURR1<sup>E3loxP</sup> no recombinado (sustrato), la flecha de color negro indica el alineamiento y la dirección de los oligonucleótidos E3N1 e IF2, las cajas de color verde indican los exones del gen NURR1, las flechas rojas indican los sitios loxP, y las cajas amarillas indican los genes de selección, (TK) Timidin Cinasa, y (Neo<sup>R</sup>) indica el gen de resistencia a neomicina; C) Esquema del vector pNURR1<sup>E3loxP</sup> recombinado; D) PCR del gen Cre. M es el marcador de peso molecular; carril 1, células transfectadas solamente con el vector pNURR1<sup>E3loxP</sup>; carril 2, células transfectadas con el vector pNURR1<sup>E3loxP</sup> y el vector de expresión CMV-Cre; y carril 3, negativo; E) PCR para detectar la recombinación del vector pNURR1<sup>E3loxP</sup>; M es el marcador de peso molecular; carril 1, células transfectadas solamente con el vector pNURR1<sup>E3loxP</sup>; carril 2, células transfectadas con el vector pNURR1<sup>E3loxP</sup> y el vector de expresión CMV-Cre; y carril 3, negativo;

## CAPITULO 4

### 4.1. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Nurr1 se expresa principalmente en áreas del sistema nervioso central, como la corteza cerebral, hipocampo, tálamo, cordón espinal, bulbo olfatorio, habénula e hipotálamo; además, puede encontrarse en cerebelo, en los núcleos del nervio motor dorsal y del nervio vago.

Para entender la función *in vivo* del gen NURR1, se llevó a cabo su inactivación mediante la tecnología de recombinación homóloga. Este método está basado principalmente en el reemplazo de un gen normal por uno inactivado, generando un modelo animal llamado “Knock-out”, el cual tiene inactivado el gen en todo el organismo. Este método fue utilizado en 1997 por Zetterström et al<sup>3</sup>, para inactivar el gen NURR1 y determinar su función en un modelo *in vivo*. Los resultados en este modelo animal del gen NURR1, fueron la ausencia de los marcadores dopaminérgicos (TH, Ret, AHD2, y el receptor D2 de dopamina) en las neuronas dopaminérgicas de la región ventral del mesencéfalo. Se encontró que los ratones homocigotos mutantes del gen NURR1 morían en el transcurso de las primeras 24 horas posnatales. Estos datos fueron corroborados por otros dos estudios independientes<sup>4, 5</sup>, empleando el mismo método de inactivación del gen NURR1 en diferente región.

Debido a que este gen se expresa en diferentes regiones del sistema nervioso central, y a la muerte prematura de los ratones homocigotos mutantes, este modelo no permite resolver las

siguientes interrogantes: ¿Por qué mueren los ratones Knock-out NURR1?, ¿Qué función desempeña el gen NURR1 en las diferentes regiones del sistema nervioso central donde se expresa? y, ¿Cuál es su papel en la etapa adulta?

La finalidad de este trabajo fue obtener un vector de recombinación homóloga con un alelo condicional del gen NURR1, el cual no tuviera mutaciones y portara las secuencias de sitios loxP en las regiones intrónicas 2 y 3, para no afectar las regiones codificantes del gen NURR1. Posterior al aislamiento de las secuencias del gen, se dio inicio a la construcción para introducir los sitios loxP en el alelo condicional del gen NURR1. Al concluir con esta fase del trabajo se procedió a realizar dos análisis importantes en la generación del vector recombinante condicional del gen NURR1, que fueron la secuenciación y comparación de la secuencia obtenida con la base de datos de Celera Discovery Systems<sup>TM</sup>, y finalmente un análisis para comprobar que los sitios loxP introducidos en el alelo del gen NURR1 fueran funcionales.

La comparación de las secuencias del vector recombinante con la base de datos, mostró 4 cambios de nucleótido, por lo que se realizó una búsqueda en la base de datos del GenBank, para identificar si estos nucleótidos representaban algún polimorfismo del gen NURR1 en base a algún reporte. En este caso particular, los cambios nucleotídicos encontrados generarían una proteína Nurr1 con los cambios aminoácidos S89P, S250L, Q273R y C566Y. En el caso de los aminoácidos S89P, S250L y Q273R, el tipo de carga es opuesta al aminoácido de la proteína normal. En los aminoácidos S89P y S250L la carga normalmente es polar; sin embargo, con las mutaciones la carga sería hidrofóbica, lo cual podría alterar la estructura tridimensional de la proteína Nurr1. Y afectaría principalmente la capacidad de activación del factor de transcripción

independiente de ligando, ya que estos cambios se encuentran en la región AF1 que da origen a la vía de activación independiente del ligando.

En relación al cambio en el aminoácido Q273R que se encontró en la región del dominio de unión al DNA del factor de transcripción Nurr1, este cambio podría alterar su afinidad a secuencias en promotores y alterar la expresión de genes blanco, ya que el aminoácido normal tiene carga polar, y el sustituto tiene una carga básica.

El último cambio aminoacídico C566Y probablemente no afectaría la función de la proteína Nurr1, ya que se encuentra en la región del dominio de unión a ligando, el cual no es funcional en el factor de transcripción Nurr1. Además, el cambio de este aminoácido corresponde a uno de igual carga (polar / polar).

Tomando como base este análisis de los posibles efectos de los cambios aminoacídicos antes mencionados, se llevó a cabo la reparación del vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1. La reparación se logró de forma exitosa, ya que la secuencia obtenida del vector de recombinación reparado, presentó un 100% de identidad a la secuencia del gen Nurr1 proporcionada por la empresa Celera Discovery Systems™.

Una vez que confirmamos la correcta construcción de nuestro vector de recombinación condicional Nurr1, procedimos a determinar la funcionalidad de las secuencias loxP introducidas en las regiones intrónicas 2 y 3 del gen NURR1. Las secuencias loxP son

reconocidas por la enzima Cre recombinasa, la cual elimina la secuencia que se encuentra entre los sitios loxP.

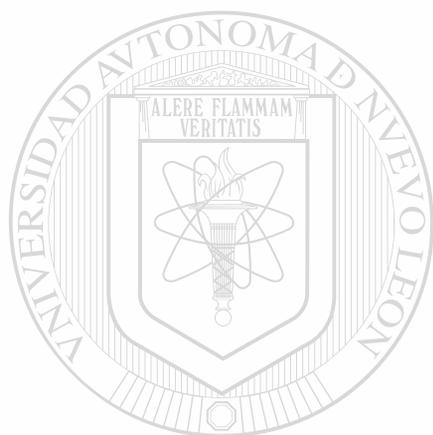
En un ensayo de cultivo de células se utilizó un vector de expresión para la enzima Cre recombinasa y nuestro vector de recombinación homóloga condicional (pNURR1<sup>E3loxP</sup>) para su transfección. El producto recombinado fue detectado mediante la técnica de PCR, la cual nos dio resultados positivos, al menos para los sitios loxP que se encuentran flanqueando el gen de selección positiva Neo<sup>R</sup>, ya que el oligonucleótido E3N1 corresponde al exón 3, y el oligonucleótido IF2 al intrón 2. En este experimento no se obtuvo amplificación del gen NURR1 endógeno, debido principalmente a que la línea SH-SY5H corresponde a células de neuroblastoma humano, y los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia del gen murino, aunque el oligonucleótido E3N1 se alineaba al 100% con el gen NURR1 humano, no fue así para el oligonucleótido IF2, por lo que sólo se detectaron los productos provenientes del vector recombinante pNURR1<sup>E3loxP</sup>, tanto del vector recombinado como del no recombinado.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Con los resultados obtenidos, podemos decir que se logró obtener un vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1, el cual no tiene mutaciones en su secuencia, y que los sitios loxP son funcionales.

Finalmente cabe mencionar que este vector construido será pieza importante para la generación de una línea de ratones, que al cruzarlos con ratones que expresen la enzima Cre-recombinasa bajo la regulación de un promotor específico de tejido, nos permita inactivar el

gen NURR1 en tiempo y espacio. De allí la importancia de contar con esta línea de ratones, ya que nos permitirá conocer más acerca de las funciones de este factor de transcripción Nurr1 que presenta una expresión constitutiva en el sistema nervioso central y que en los últimos años a despertado un gran interés como gen iducible en procesos de regeneración e inflamación en diversos órganos periféricos.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPÍTULO 5

### 5.1. LITERATURA CITADA

1. **Saucedo-Cárdenas O. and Conneely O. M.** Comparative distribution of Nurr1 and Nur77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *Mol. Neurosci.* 7: 51-63. (1996).
2. **Saucedo-Cárdenas O., Kardon, R., Ediger R. T., Lydon J.P., Conneely O. M.** Cloning and structural organization of the gene encoding the murine nuclear receptor transcription factor, Nurr1. *Gene* 187: 135-139. (1997).
3. **Zetterström R. H., Solomin L., Jansson L., Hoffer B. J., Olson L. and Perlmann T.** Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276: 248-250 (1997).
4. **Saucedo-Cárdenas O., Quintana-Hau J.D., Le W.D., Smidt, M.P., Cox, J.J., De Mayo F., Burbach J.P., and Conneely O.M.** Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 4013-4018. (1998).
5. **Castillo, S. O.; Baffi, J. S.; Palkovits, M.; Goldstein, D. S.; Kopin, I. J.; Witta, J.; Magnuson, M.A. and Nikodem, V. M.** 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).

6. **Zetterstrom, R. H.; Williams, T. Perlmann, L. Olson.** Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamina system. *Mol Brain Res* 41: 111-120. (1996).
7. **Evans, R.M.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895. (1988).
8. **Beato, M.** Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 56: 335-344. (1989).
9. **Tsai, M. J. And O'Malley B.W.** MBIU: Mechanism of steroid Hormone Regulation of gene Transcription. R.G. Landes Company. Austin. (1994).
10. **Conneely O. M. and O'Malley B.W.** Orphan receptors: Structure and Function relationships. M.-J. Tsai and B.W. O'Malley, editors R:G: Landes Company, Austin. 111-133. (1994).
11. **Auwerx, J.; Baulieu, E.; Beato, M.; Becker-Andre, M.; Burbach, P. H.; Camerino, G.; Chambon, P.; Cooney, A.; Dejean, A.; Dreyer, C.; Evans, R. M.; Gannon, F.; Giguere, V.; Gronemeyer, H.; Gustafsson, J. A.; Lazar, M.A.; Mangelsdorf, D.J.; Milbrandt, J.; Milgrom, E.; Moore, D. D.; O'Malley, B.; Parker, K.; Parker, M.; Perlmann, T.; Pfahl, M.; Rosenfeld, M. G.; Samuels, H.; Schütz, G.; Sladek, F. M.; Stunnenberg, H. G.; Spedding, M.; Thummel, C.; Tsai, M. J.; Umesono, K.; Vennstrom, B.; Wahli, W.;**

Weinberger, C.; Willson, T. M.; Yamamoto, K.; The Nuclear Nomenclature Committee, Cell 97, 161-163. (1999).

12. Hazel, T. G.; Nathans, D. And Lau, L.F. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8444-8448. (1988).

13. Arenander, A.T.; de Vellis, J. and Herschman H.R. Induction of c-fos and TIS gene in cultured rat astrocytes by neurotransmitters. J. Neurosci. 24: 107-114. (1989).

14. Ryseck, R.P.; MacDonald-Bravo, H.; Mattei, M.G.; Rupperts, S. And Bravo, R. Structure, mapping and expression of a growth factor inducible gene encoding a putative nuclear hormonal binding receptor. EMBO J. 8: 3327-3335. (1989).

15. Nakai, A.; Kartha, S.; Sakurai, A.; Toback, F.G. and DeGroot, L.J. A human early response gene homologous to murine Nur77 and rat NGFI-B, and related to the nuclear receptor superfamily. Mol. Endocrinol. 4: 1438-1443. (1990).

16. Maruyama, K., T.; Tsukada, S.; Bandoh, K.; Sasaki, N. Ohkura, and K. Yamaguchi. Expression of NOR-1 and its closely related members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily in human neuroblastoma cell lines. Cancer Letters 96: 117-122. (1995).

17. **Hedvat, C.V. and Irving, S.G.** The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen inducible nuclear orphan receptor. *Mol. Endocrinol.* 9: 1692-1700. (1995).
18. **Ohkura, N.; Hijikuro, M.; Yamamoto, A. And Miki, K.** Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:1959-1965. (1995).
19. **Scearce, L.M.; Laz, T.M.; Hazel, T.G.; Lau, L.F. and Taub, R.** RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in regenerating liver. *J. Biol. Chem.* 268: 8855-8861. (1993).
20. **Mages, H.W.; Rilke, O.; Bravo, R.; Senger, G. and Kroczeck, R.A.** NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol. Endocrinol.* 8: 1583: 1591. (1994).
21. **Wilson, T.T.; Paulsen, R.E.; Padgett, K.A. and Milbrandt, J.** Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science*, 256: 107-110. (1992).
22. **Wang, Z., Benoit, G.; Liu, J.; Prasad, S.; Aarnisalo, P.; Liu, X.; Xu, H.; Walker, N.P.; Perlmann, T.** Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423:555–560. (2003).

23. **Wilson, T.E.;** Fahrner, T.J. and Milbrandt, J. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol. Cell Biol.* 13: 5794-5804. (1993).
24. **Harding, H. P.** and Lazar, M.A. The orphan receptor Rev-Erba alpha activates transcription via a novel response element. *Mol. Cell Biol.* 13: 3113-3121. (1993)
25. **Hard, T.;** Kellenbach, E.; Boelens, R.; Maler, B.A.; Dahlman, K.; Freedman, L.P.; Carlstedt-Duke, J.; Yamamoto, K.R.; Gustafsson, J.A., and Kaptein, R. Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science.* 249: 157-160. (1990).
26. **Kliwer, S.A.;** Umesono, K.; Noonan, D.J.; Heyman, R.A.; and Evans, R.M. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* 358: 771-774. (1992).
27. **Perlmann, T.;** Rangarajan, P.N.; Umesono, K.; and Evans, R.M. Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev.* 7: 1411-1422. (1993).
28. **Perlmann, T.** and Jasson, L. A novel pathway for vitamin A signalling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and Nurr1. *Genes Dev.* 9:769-782. (1995).

29. **Law, S. W.;** Conneely, O. M.; DeMayo F. J.; O'Malley, B. W. Identification of a new brain-specific transcription factor NURR1. *Mol. Endocrinol.* 6:2119-2135. (1992)
30. **Sotirios, T.;** Bezouglia, O. and Tsingotjidou, A. Parathyroid hormone induces expresión of the nuclear orphan receptor Nurr1 in bone cells. *Endocrinology* Vol 142: 663-670, (2001).
31. **Bertrand, J.;** Wallen, A.; Benoit, G.; Murata, T.; Okret, S. and Perlmann, T. p57<sup>kip2</sup> cooperates with Nurr1 in developing dopamine cells. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 100(26): 15619-15624. (2003).
32. **Asa Wallén, Rolf H. Zetterröm, Ludmina Solomin, Mariette Arvidsson, Lars Olson, and Thomas Perlmann.** Fate of Mesencephalic AHD2-Expressing Dopamine Progenitor Cells in Nurr1 Mutante mice. *Cell Reserch* 253: 737-746 (1999).
33. **Nsegbe, E.;** Wallén-Mackenzie, Å.; Dauger, S.; Roux, J. C.; Shvarev, Y.; Lagercrantz, H.; Perlmann, T.; Herlenius, E. Congenital hypoventilation and impaired hypoxic response in Nurr1 mutant mice. *J Physiol (Lond)* 556:43–59 (2004).
34. **Smidt, M.P.;** van schaick, H.S.A.; Lanct, C.; Tremblay, J.J.; Cox, J.J.; vander Kleij, A.A.M.; Wolterink, G.; Drouin, J. And Burbach, J.P.H. A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.* 94:13305-13310. (1997).

35. **Marsden, C.** Problems with long term-levodopa therapy for Parkinson's disease. *Clinical Neuropharmacology*, 17: S32-S44. (1994).
36. **Wagner, J.** Akerud, P.; Castro, D. S.; Holm, P.C.; Canals, J. M.; Snyder, E. Y.; Perlmann, T and Arenas, E. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nature Biotechnology* 17:653-659. (1999).
37. **Lakso, M.; Sauer, B.; Mosinger, B. Jr.; Lee, E. J.; Manning, R. W.; Yu, S. H., Mulder, K. L.; Westphal, H.** Targeted oncogene activation by site specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:6232-6236. (1992).
38. **Orban, P. C.; Chui, D.; Marth, J. D.;** Tissue and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:6861-6865. (1992).
39. **Upegui-Gonzalez, L.C.; Francois, J.C.; Ly, A.; Trojan, J.** The approach of triple helix formation in control of gene expression and the treatment of tumors expressing IGF-I. *Adv.Exp.Med.Biol.* 465:319-332. (2000).
40. **Majzoub, J. and Muglia, L.** Knockout mice. *New Engl J Med*. 334: 904-907.(1996).
41. **Robertson, E.; Bradley, A.; Kuehn, M.; Evans, M.** Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*; 323: 445-448. (1986).

42. **Evans, M. and Kaufman, M.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292: 154–156. (1981).

43. **Martin, G.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in media conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78: 7634–7638. (1981).

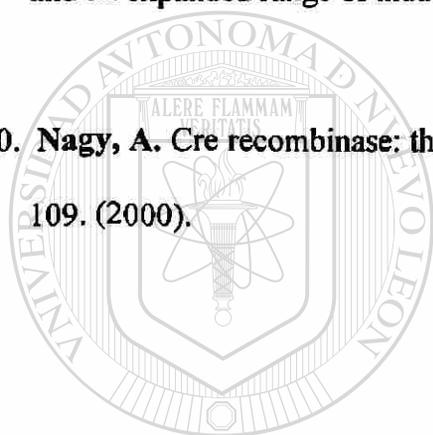
44. **Bradley, A.; Evans, M.; Kaufman, M. and Robertson, E.** Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 309: 255–256. (1984).

45. **Smithies, O.; Gregg, R. G.; Boggs, S. S.; Koralewski, M. A.; Kucherlapati, R. S.** Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 317: 230–234. (1985).

46. **Thomas, K. and Capecchi, M.** Site directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 51: 503–512. (1987).

47. **Galli-Taliadoros, L. A.; Wood, S. A.; Sedgwick, J. D. and Korner, H.** Gene knockout technology: a methodological overview for the interested novice. *J Immunol Methods*: 1811-1815. (1995).

48. **Araki, K.; Araki, M.; Yamamura, K.** Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 25, 868–872. (1997).
49. **Wunderlich, F.T.; Wildner, H.; Rajewsky, K.; Edenhofer, F.** New variants of inducible Cre recombinase: a novel mutant of Cre-PR fusion protein exhibits enhanced sensitivity and an expanded range of inducibility. *Nucleic Acids Res.* 29: e47. (2001).
50. **Nagy, A.** Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99–109. (2000).



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**ANEXO I**

**Mouse nurr1 genome in Chr 2**

```
>cmgd_gene|mCG19702.1 /gene_uid=100000115005921 /len=27106 /
ga_name=GA_x6K02T2Q125 /seq_alignment=(18780257-18753151) /g
ene_alignment=(18770257-18763151) /transcript_names=mCT21440
.l
```

```
AGTTACGAGCCACGGGACAACCTGTCTCCACTTCTGCTAAAGGGTGTGAGGAGGGTATGTT
GGGGAGCTGCAAGGCACACCTCTGCCCTCTCGGCCAGGTGCTAGCTACCTGGCCACGC
GAGTGTCTTTTCCGTTCAAGCTTTTGTTCACCCTCCCACGTGTGAGGACGCAAGGTC
TGGGGCGGGGAGGGGAGGGTGGAGCGTAGCATCACCACGGACTTCACGGACTGGGTTG
CAGAAGTCACACTTCTTTTCGGAAAAAATAATCCACCCAAGTGGGCTACCAAGGTGAAC
CGTTCCCACCTTAAATCAGCCCAGTTCGTGACGTGAGGTGCGAAATATACCAAAGCGAG
CGCGGGCCAGGAGTCCGGGGAGCGCGGGCTCGGCGATTGGACCGCGGGCCGCTGACGC
GGGCTGACGCGCGCAGACTTTAGGTGCATGTTGGCAGCAGCAGCTCGAGCCACATAACA
AAGGCACATTTGGCGGCCAGGGCCAGTCCGCCCCGCGGCTCCGCACAGCTCCGCGTCCCTC
TCTCCGGCCCCGCTGGCTGCCTCCCTCTCCTGCGGCCGGGCTGGCTGCCTGTGGCTCTCC
GCGCCCCGCTTCCGCGAGCGCTCCCGCGGACCCGGGCTCCTCTGCTCCCGGAGGGAACTGC
ACTTCGGCGGAGTTGAATGAATGAAGAGAGCGGACAAGTGAGTAGCTGCGCGGGGGCCGC
CCGCGTACGCGTCTCCCGGTCTCCGCGTACCAGGGAACGGGTTCTCTGCAAGTGGTC
GCCCGAGCCGCGGAGCGCGAAGGGGCTGGGGAAGGGGATGGCGAGTGGGCGCGCGCAGC
TCCCGGAGCCTCTGCTGGAACCTCCGGTCTAGCGTAAAGGGGGGGAGTTGGCTGCCGG
CAGAGTTTCCAGGCTTCTCATTGGTGGATGTGGCAAGGGGACTCCACAGTTTTAGGAG
AAGCGACTTGCCGGTGGAGATGTGCGCAAAGTTTGTCTTTGGTGTGAAATTGATTGTGG
CTTGAGGAGGCTCCATCTCGCGAACATGTGGGAACAGTCCGGGAGAGAAAGTTTACGTG
TTGCTTGGGAACAGTGTGCGTCCGGCTCGCCCGCTGGTGGAGGTTTCCCGGATATCGTCGA
GTAAGGGTAGTGTGCGGTAGAGGGTCTGTAGCGAAGTTGCCTGAAATGACTGGTTTTGAT
ATATGTTGTCCTTGGATAGTGTGTGCTGAGTGTGTCGCTGAGGTAAGAATACGGTTATGAAA
CTGTGACATAGCCACGGGTTAATATCCAGAACAGACATATTTTCAAGGGCGGGCGGGGAT
GGGGTGGGGAGATAAAGCAAAGTCTCTGGTTTGTCTTGTAAACCTTCTCCGCTCCTT
GAAGCAAAGCAAGATTGTGGAAGAAGTGGGGGGGGGGGGCGGAGAGGGGAGGGAGCAAAG
GAGAGGGTGTTCAGGTTTCTTTACTTTATCAACAAGATCGTCTATGCTCTAGAATGCCTT
GCAAGTGGGAACATCTGAAAAAATAAGTCTAGGACACAAGAATGCCTTGTCCCAGCAA
GTAGGCAGCCTGTGGAAAGCATTGTGGAGAAGGTGTCCAGTTTGTCTGTGCTGAGAAGTGC
TTCTAACTTTGGTGCCAATATCATATGCGTAATATTTCTTCCCTCTGCAGTTGACCCAA
GATACTCCTGGTAAAGTAGAGATCTCTCATCACCTCTGGGCCATTAAGATGTTGAAA
ATCCAGTTCTCTGGAGGAACACCAATTGCTTCCCTTAAGATCCTGTGTTGAACAAA
AGCAATTACTAAAGCTACACACTTGTCTCCACATGGCTGTTTGGTTGTCCAGGCCTTGC
TAACGTTTCTTAAGGGTGGATCTGTATTTTTTTTTTTTACCGGTTTACTCTCGAGTTCTT
TTAACTTTCTTCTCCTTCTAAGAGAAAAGTCCACTGGACTCTAAGAGAGATATTAAGAG
GAAGCTTTGATGCTGTGTTTTTCTTTACCCAGACTTCTTAGGTTTGACATAAAGTAGAA
TGACAAAGGCCCTCCATCTACAGCAAAGGGGCCAATTATTATATTGATCAGTATCTGG
TAGACTCATGGGATAAATTTCCCCACAGGATGCTTTCTCTGCAGGGATTTACACTGGGAGA
TGAGCGGCATTATCTGCTGTTTAGCCACCTTGTCTCTGCACATTTTCAATTTAAGATGCTG
TTGGGTAAGTCTTCAACTCATTTCCAAGGAAGCACTTGAAGGGCCTGCTGAGTGAGTC
TGCATCTGCCAGCCCAAGTCTCGGTGGGAAGACATCCTGAAACTTCTGTGTCTGTATT
TCAGGGAGATCTGACGGGCTGGATTCCCAATAGCTCTTTTTTAAATCTTGAAACTTTG
TCCTTCGC TGAATTACGACACTGTCCACCTTTAATTTCTCTGAAAACCTCCAATAACTCTG
CTGAAGGTCAGTGAGCTTTATCTTTTCACTTTTCTGAGTTCCCCCATACCTCAGAA
AAACAAAACAAAACAGGGCAACAGGATCTTTCCAGGCCAACCTGTGCCTTATAGTCACA
GAGGACAACCTTTCTTATTGTGCAATTCAACTTCATTTCTAGAGCATGGCTTCTAGAAATC
CTGTCGACCCTGAGCTTCAAAGAAGAAGCTCATCAGAGTGGGACTGTCTGCGGGAAGGGG
```



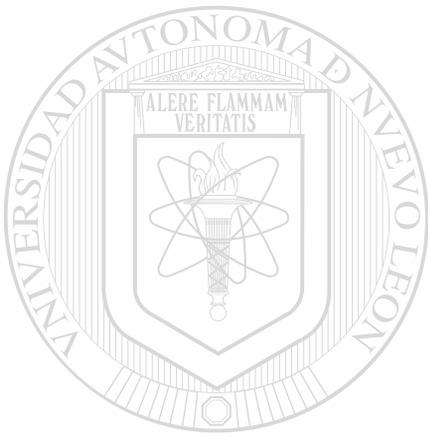
GTGGAGCGCGGGGGGGGGGGGGCGTTTGGAAATGAGTGTAGACCCTCAACAGCTTTCCAGC  
 TCTGGGTCTGCCGGGATCAGCCCTTCTCTTCTCATCGCTGTTCCACCTCTTTTGCCC  
 TTCCCCCTGCATCCCTAAACCCCCATCCTCTCCCCGCCTCCCTCCACCCCCAACCCCGAC  
 GCCGCGGGCTGCCGGTGTAGCCCCGGGTGTAGACCGAGCCCGGAAGAAAGTGTTCAGTTG  
 ACCAGGCTGAGTGTATATCACCTGTTCGTTTCCAGCCATGCCTTGTGTTCCAGGCGCAG  
 TATGGGTCCCTCGCCTCAAGGAGCCAGCCCGCTTCTCAGAGCTACAGTTACCCTCTTCG  
 GGAGAATACAGCTCCGATTTCTTAACCTCCAGAGTTTGTCAAGTTTAGCATGGACCTCACC  
 AACACTGAAATTAAGTCCACCCTTCTCTCCCCAGCTTCACTACCTTTATGGACAACCTAC  
 AGCACAGGCTACGACGTCAAGCCACCTTGTCTGTACCAAATGCCCTGTCCGGACAGCAG  
 TCCTCCATTAAGGTAGAAGACATTCAGATGCACAACCTACCAGCAACACAGCCACCTGCC  
 CCTCAGTCCGAGGAGATGATGCCACACAGCGGGTCCGGTTTACTACAAGCCCTCTTCGCC  
 CCGACACCAGCACCCCGAGCTTCCAGGTGCAGCATAGCCCGATGTGGGACGATCCGGGC  
 TCCCTTACAACTTCCACCAGAACTACGTGGCCACTACGCATATGATCGAGCAGAGGAAG  
 ACACCTGTCTCCCGCCTGTCACTCTTCTCCTTTAAGCAGTCCGCCCGGGCACTCCTGTG  
 TCTAGTGCAGATGCGCTTGCAGCGGCCTCTGCACGTCCCCATGAACCCGGAGCCCGCG  
 GGCAGCCACCACGTAGTGGATGGGCAGACCTTCCCGTGCACCAACCCATTGCAAGCCG  
 GCATCCATGGGCTTCCCGGGCCTGCAGATCGGCCACGCATCGCAGTTGCTTGACACGCAG  
 GTGCCCTCGCCCGCTCCCGGGGCTCTCCCTCCAATGAGGGTCTGTGCGCTGTTTCCGGT  
 GACAACCGCGCCTGTCAAGCACTACGGTGTTCGCACTTGTGAGGGCTGCAAGGTTTCTTT  
 AAGGTGAGCAAGACAGGGCGGAGGTGGCAGGTAGCGGTCTTATACCTGAGACCCAGCAG  
 TGTACCTCACCTTCCGGTCCGCAGCCCGCTCGAGTTCCCTGCAGCTACTCACAGGCTG  
 TGAAGAGGCTTTGGGGGTGTCTAAGGAAAGAAATCAGAAAGACTGGTAGAGTCAGGGTT  
 TCATCCCCCGCCCCCGCGCCCCACAGCAACCTGCGGCCCGGGGGCTCCAGCCCCGAA  
 ATTGCTGGAGCCAGAGTTGGAAGAGGGCTATTTGCATGTGTTAGGCGCTGTCTTCCCTGT  
 TCAGATTGAAATGGTTAGGACAGAGAACCCTGTCTGAGCTAACCAAGTGGAACAGAATT  
 CCCTATGGTCAAATTAAGTGATCTCTTTATTTCCGCATCCTGATTGAATAATCTTATCAT  
 TTTAAATAGAGAAGGTCTCCAAGGAATGTAAATAATATGAATGCCACGGATTTGTATTT  
 ACTGAGCGTCTCCTGCCCTTCTCCTGGCATATAAAACACAGCAAGGAGCGGTAAGGTTA  
 GCTCAAATGTTAACGCTATCAATTTTCTTCTGGTAAATGCCCTGGGGAGGAAAAGGAAAG  
 GAAATAGGAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAG  
 AAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAATTTGAAGGAGTAGTGTTTATGTTTGTAGGGAAAGGAATG  
 CAGATCCAAGCCATTTTTTAAAAAATGTGTCCAGTTTGTGACTTTGAGTGAAAAAAA  
 TAATCATTTTGGGGCCTACATTTCTCTCCCTCTACAGCGCACGGTGCAAAAAACCGGAAA  
 TATGTGTGTTTAGCAAATAAAACTGCCAGTGGACAAGCGCCCGGAAATCGTTGTGAG  
 TACTGTCCGTTTTCAGAAGTGCTAGCTGTTGGGATGGTTAAAGAAGGTAGGTGAGGCAA  
 GTTGTGACCTTCCATTTACGCCCCCTGAAAGTCCACCAGCTGCTTGTGGACTCCGGTCC  
 CTGCCTTACTCCCACGCCCTTGACTCCAGGATTCACCTGCTAAATGCCCTCCTCTAAAG  
 AAAGCCACCCGGCCTTCTTCTTTCTTAAGTATAGGACCCAGTTGGAGGAAGGTATAAAAT  
 AACCGCCATTTATTAATGCTTCTCTGTCAGTAAAGTCTTTAAATCAGAGGAGCCCTGGA  
 CCACCAGTTGGGCTTCTTCCACTGTTCCCTCGGGGAGGAGGCCGTGAGGCAGCTGAGTC  
 TGGGCTCAAGGGAACAGCGTTAACCCCTGAGTAATTCCTTTACAGTGGTTCCGACGGACA  
 GTTTAAAAGGCCGGAGAGGTGTTTACCCTCGAAGCCGAAGAGCCACAGGATCCCTCTC  
 CCCCCTCACCTCCGGTGAAGTCTGATCAGTGCCCTCGTCCAGAGCCACGTCGATTCCAATC  
 CGGCAATGACCAGCCTGGACTATTCCAGGGTAAGAAGCCGGTGGTGGGGGAATATCAATC  
 ATGTGGACAAGCCAACAATGGGCAGGACCTCTCCCTATACCCAGCTTTAGCACCCCCA  
 AACTCAAGGGTAAAGGAGGAACAGCAGAATACATACTTCAAACTTTGGGCAGGTTTTCA  
 GGAGACAGGTGGTGTCTCAAAGTACAGACCGGAGAACACACCCGGAGGGGTTGAATCTT  
 TGTGAACCATTATTGTCCGACAGTCCCTCCAGCTGCGGTCTGGAAGGCAAAACCTAGACA  
 GTCTAGCCTTCCCTCCCAAGTCTACTTTACGAAGTTACTAGAATACATTTCCCTCCCCCT  
 TGACTTGTCTGGGGCCAGGGAGTGAAAAGAGGGGTGGAAGGGATGGCAATGGGGGGGGGG  
 GTTGTCCCCGGGTGAGGATCAAGTGGTGCAATTTCTTTTACTCCAGCTGTGAAAAAT  
 GTGCAGGCTTTGGGCAGAGGGAGTGTGGCCAAACCTAGTAGCGACTGCAATATTATTAAG  
 CTTTGCAAAGGCGCCTCCGTGCAAGACCCACTCTGGGATTAGCATGAATACTACCGTGT  
 CAATTGTTTTGTGGCGATAAGACTGAACGTTTCCAGGGCTGGATGGCACTGTATTTAGT  
 CTGTATGGAAATGGTAATTTACATATTTAAAGCAGCGACCTCATAGCACCGTCCCTAATT  
 GAATTAATTGCCCGGAACATCTAATTTCTTACTGGTCCAGAGAGAGGTTTAATTGTTAT  
 AAAACCTGGCTCCCCTACTAGAAACGGGGTTAGCAATTTACGGGTTATATATTTTAGA



GAACCTCATTAAGTGCTTTTTAAAATGAAATTCAGTTCAGGCCAAACCCTGACTATCAG  
 ATGAGTGGAGATGATACCCAACATATCCAGCAGTTCACGATCTCCGACCGGCTCTATG  
 GAGATCATCAGAGGGTGGGCAGAGAAGATCCCTGGCTTTGCTGACCTGCCCAAAGCCGAC  
 CAGGACCTGCTTTTTGAATCAGCTTTCTTAGAATTAATTTGTTCTGCGCTTAGCATACAGG  
 TAATGAATGAGGCCTGGAGGAGGGATCAGAAGTAAAGGAAAGGAAGAGAAAAGGGTTGGG  
 GTTGGAGGCAAGATAAAAACAAAGCAAAGGTGAAGAAGGGAAGGAGTGAGCCAGAGCCT  
 TGGGTGACCGGAGTGGTGGTGGGATAGGGGAGTTCCTTGATTGTTATGAAATTAACCCTT  
 TCAAGGTCCACTGGTCTACATTTTATTAACCTTCAGTAATTAGGTGCCTCTTAAATCCC  
 TCATTTATTGCTCTTCAAGTAATTAGTTGTTTAGCTTCTCTCTCTCTCTTTTTCTCCCC  
 CTCTCTTTGGTATTAATTGCAGGTCCAACCAGTGGAGGGTAAATCATCTTTTGCAATG  
 GGGTGGTCTTGACAGGTTGCAATGCGTGGTGGCTTTGGGGAATGGATTGATTCCATG  
 TTGAATCTCTCCAACCTTGAGAATATGAACATCGACATTTCTGCCTTCTCTGCATTG  
 CTGCCCTGGCTATGGTCCAGGTGACTACTGCTGGTGCAGGACACTTCCCCCTCCGAAC  
 TCCCTGGTGGGACCGGTGATGGCTTTCCCTAATCGCAGATTCCTTCTGATTCCTGCCATC  
 TGACTAACTCCCCCTGCTATCTTTTTGTTCTGGTGCATTTTCTGCAGAGAGACACGGG  
 CTCAAGGAACCCAAGAGAGTGAAGAGCTACAAAACAAAATGTAAATGTCTTAAAGAC  
 CATGTGACTTCAATAATGGGGGTTTTGAACCGACCCAACACTACCTGTCTAAACTGTTGGGG  
 AAGCTGCCAGAATCCGCACCCTTTGCACACAGGGCCTCCAGCGCATTTTCTACCTGAAA  
 TTGGAAGACTTGGTACCACCACCAGCAATAATTGACAAACTTTTCTGGACACCTTACCT  
 TTCTAAGACCTTCTCCAAGCAGTCAAAGAAGTGGAAAGAAAAAAAAAATAACATCCAG  
 AGGGGGCTGGTACATGGGCAGAGAGCTGGTTGAAGTGTCCAGTTCACCTTATCTCCCTT  
 CTGTAGACCCCTAGCCCTCACCCCTTAAGTAAACAAACAAACAAACAAACCACAAATAAA  
 AACTGTGCTATTTCCCTAACCTGCAGGCAGAACCTGAAAGGGCATTTTGGCTCCGGGGCA  
 TCCTGGATTTAGAAAACGGACAGCACACAGTACAGTGGTATAAACTTTTTATTATCAGTT  
 CAAAATCAGTTTGTGTTTGAAGAAAGATTGCTAATGTATGATGGGAAATGTTGGCCA  
 TGCTTGCTTGTGTCAGTTAAGACAAATGTAACACACACACACACACACACACACACAC  
 ACACACACACACACCTTAATGGGACCCTCCTATTTTGGCCCTTAAACAAGACTTCAAAGTT  
 TTCTGCTGTAAGAAAGCTGTAATAATAGTAAACTAAATGTTGCGTGGGTGGCATGAA  
 TTGAAGGCAGAGGCTTGTAAATTTATCCAATGCAGTTTGGCTTTTTAAATTAATTTGTGC  
 CTATTTATGAATAAATATTACAAATTTCTAAAAGTAAGTGTGTTGCAAAAAAAAAAAAA  
 GAAAATAACTACATAAAAAGGGGACAAGCATGTGATTCTAGGTTGAAGATGTTATAGGCA  
 CTTGCTACTTCAGTAATGTCTATATTATATAAATAGTATTTTCCAGACTATGTAGTCTGT  
 TAGATTTTATAAAGATTGGTAGTTATCTGAGCTTAAACATTTTCTCAATGTATAAATAG  
 GTGGGCACAAGTATCAGTACATTTGAAAATCCTGACAAAAGGGACACATAGTGTTTGTAA  
 CACCGCCCAACATTCCTGTTGTTGTAAGTGTGTATGTACCGTTGATGTTGATAAAAAGAA  
 GTTTATATCTTGATTAATTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG  
 GACTGTTTCCAGAGTGCCTATAAATATACATAAATCCCTGGAAATTAAGTACGACTTTGAA  
 TTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTG  
 GTAAGAATTTTAAATTTGCCATATTCTGTAGTATTTTCTTTGATATTTCTAGTACGGCA  
 CATGAGATGAGTCACTGCCTTTTTTTCTATGGTGTACGACAGTTAGAGATGCTGATTTTT  
 TTTTCTGATAAATCTTTCTTTAAGAAAGACAATTTTAAATGTTTACAACAATAAACCAC  
 GTAAATGAACAGAATCTGTCTTATTTCTGGGCCAGGAAAATGATTACTAAACAACAGGT  
 ACAAGAAAGAGGGCAAAGTGGAGACTGATTTGGGGAGGTCACTTACAGGACATCTGAATT  
 TCAGACTGACAGCCTAGATCCATTGTGGCAAAGGGAAGGGTGTCACTAAACTAATTATCC  
 AGAGAATTCATGCAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTGTTGTTGTTTTTTTTTTTA  
 CTTTGCCTGAATTTTCCAGTCTGCTGACCTACATTTATCAGAATCAACTAGAAATATCTT  
 ACTCTGTAAAGTTTGTAGTTAAGTGCAGCTTAGGAGACCAACAATCTGAATTTTCCAAG  
 TTGGGAATCTTGTGAAGTTGGGGGGGGGGGAGGGGAACAGCATTCGAAGTTTGTGCTTG  
 GAGATTCAGAAAGGCAGATTTGAATCTCTTTTACTTTATCTTGTCTTTTTCAATTCCT  
 GTGCATGCTCTATGAGTGTGGACCGAGCACTCCAGGCCTTCTGCTGGAGTCTGAGTC  
 AGCCTTCCACTAGAGCTCTGGAGAGACATTTCTTTTTTCCCCCTCTGCTGGTGGGGAGTG  
 ATGAGGTGTGCTTTGAATTTTAGAACTTTCCACCTTCTAATTAATTCAGATTAAAAAA  
 AAGATCCTTGTCCAGTCTTGATCTAGTTTAAAGCAAATTTAACATGAGGCTCTCGTATT  
 CCATTCAGAAATCAACTTTCCGTGGAGGAAGGGGCCGAGTTCAGCTGATCTGGCTTTC  
 AACCAGGTATCCTTGGGCAGATGGTAGTCCAGTTCCTGCCTGGGGCTGAATTTAAGGAGAG  
 ATTTAAGATGGTTGATCCTGCTTCATGACCCTGGCTAATTACAGATAGTTTGGGGGTCA  
 CCGAAATTTACAACAAAGAAACAAACAAACAAAAAAGGTCTTCAATTAAAAAATGGCT



GTCAGAAGAGTATCCTGCCGCCAGTTTACCTGGTCTCACTCCTTACCCTGTCAAACAAT  
TGTTTTATGGTTGGCAAAAAGAGACAAGGAAAGTCCCCTGTGGTAGTTTAAAGCTATTTT  
TACTGAATGGGTTTCTCTCTGAGGGGTAAAGGGAATCGGTCATATAGGGTATCAAACAGG  
ACATGTCCAATTTTCTAGTGTATGTGTGCATTTTTAAGATCAGACCAGCGACTGCATTTT  
ATTTTCACATCTTATTTTGTAGTCAAACCACAACTCTTAAGTAGACAGAATGAGCTCTT  
CTCCCAGGTGTCTGCGCCCGGAGACAATTACATTTTACTGCAGAATCCCTTAGAGTTGAG  
CCCAGAAATGAACCCCAAGGCTGATTCTCCCAAAGGACTCCGCAGGCATCATCTGAGG  
CCAATGACGGCGTCAAGGGGAAAAGTGTCTCTGGAGACTTTAAGAGATCCATGCTTTCC  
TTGTCTCCGTACTGCATCTACTGGGCTGGATTGTGATTCCCTAGGTTGTCCCTGGTAAGGT



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



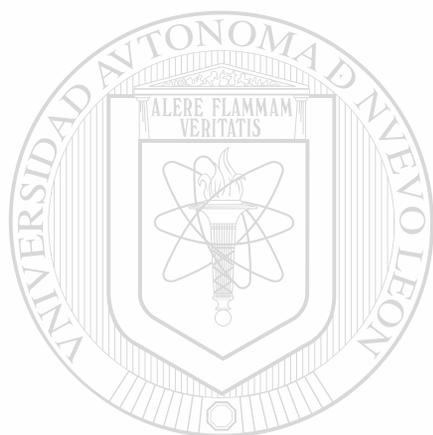
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ANEXO II

## Secuencia del vector pCR 2.1

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGGTT  
 TCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAG  
 GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAATTTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAA  
 ACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGC  
 TGGAAATTCGCCCTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAG  
 AGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGG  
 GAAAACCCGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG  
 AAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGC  
 GGCGCATTAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGC  
 CCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCAGCTTTCGCCGCTTTCGCCGTCAGCTCTAAATCG  
 GGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAATTTGATTAGGGTGAT  
 GGTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTA  
 ATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGG  
 GATTTTGCCGATTTCCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAAC  
 AAAATTCAGGGCGAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTG  
 ACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTA  
 GCTTGACAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCCGGAATTGC  
 CAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAG  
 GATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAA  
 GATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGA  
 CAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGCTGTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGAC  
 CGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGC  
 GTTCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCAGTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGC  
 CGGGGCAGGATCTCCTGTATCCCACTTGTCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCG  
 GCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCA  
 CGTACTCGGATGGAAGCCGCTTGTGCTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAG  
 CCGAATGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGC  
 CTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCACTGACTGTGGCCGGCTGGGTGTG  
 GCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCCGTGATATTGCTGAAGAGACTTGGCGGCGAATGGGCTG  
 ACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGA  
 CGAGTCTTCTGAATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATCAACATTTCCGTGTGCCCTTATTCCCTTTT  
 TTGGCGCATTTTGCTTCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCA  
 GTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCC  
 GAAGAAGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGAGC  
 CCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTAC  
 AGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAC  
 ACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG  
 GGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGA  
 CACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATTAATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT  
 TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCTTCTGCGCTCGGCCCTTC  
 CGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACT  
 GGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA  
 CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACT  
 CATATACTTTAGATTGATTTAAAATTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGA  
 TAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATC  
 AAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCAGCTAC  
 CAGCGGTGGTTTTGTTTGCCTGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGAGAGC  
 GCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAATCTGTAGCACCG  
 CCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG  
 GGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACA

GCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACG  
CTTCCCGAAGGGAGAAAGGCCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG  
AGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCG  
ATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGGCCTTTTTACGGTTC  
CTGGCCTTTGCTGGCCTTTTGTACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA  
TTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA  
GGAAGCGGAA



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANEXO III

```

LOCUS      dna                      5225 bp
FEATURES             Location/Qualifiers
     Promoter          143..172
                        /gene="lac prom"
     misc_binding      234..239
                        /dbxref="REBASE:HindIII"
     misc_binding      240..245
                        /dbxref="REBASE:KpnI"
     misc_binding      246..251
                        /dbxref="REBASE:SacI"
     misc_binding      252..257
                        /dbxref="REBASE:BamHI"
     misc_binding      293..299
                        /dbxref="REBASE:Sal I"
     other_gene        293..1594
                        /gene="Exón 3 del gen NURR1"
     misc_binding      1112..1117
                        /dbxref="REBASE:NdeI"
     misc_binding      1581..1587
                        /dbxref="REBASE:Xho I"
     misc_binding      1605..1610
                        /dbxref="REBASE:EcoRV"
     misc_binding      1621..1628
                        /dbxref="REBASE:NotI"
     misc_binding      1626..1632
                        /dbxref="REBASE:Xho I"
     misc_binding      1640..1645
                        /dbxref="REBASE:XbaI"
     misc_binding      1646..1651
                        /dbxref="REBASE:ApaI"
     Promoter          1659..1677
                        /gene="T7 prom"
     Reporter          1681..1840
                        /gene="lacZ_a reporter"
     Rep_Origin        1858..2164
                        /gene="f1 origin"
     Promoter          2475..2524
                        /gene="NEOKAN prom"
     misc_binding      2577..2582
                        /dbxref="REBASE:BglII"
     misc_binding      2582..2587
                        /dbxref="REBASE:BclI"
     Marker            2616..3404
                        /gene="NTP_II marker"
     Marker            3425..4285
                        /gene="amp marker"
     Rep_Origin        4440..5059
                        /gene="pBR322 origin"
BASE COUNT    1162 a    1456 c    1398 g    1209 t    0 others
ORIGIN
     1  agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcggtggcc gattcattaa tgcagctggc
    61  acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagtttagc
   121  tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa

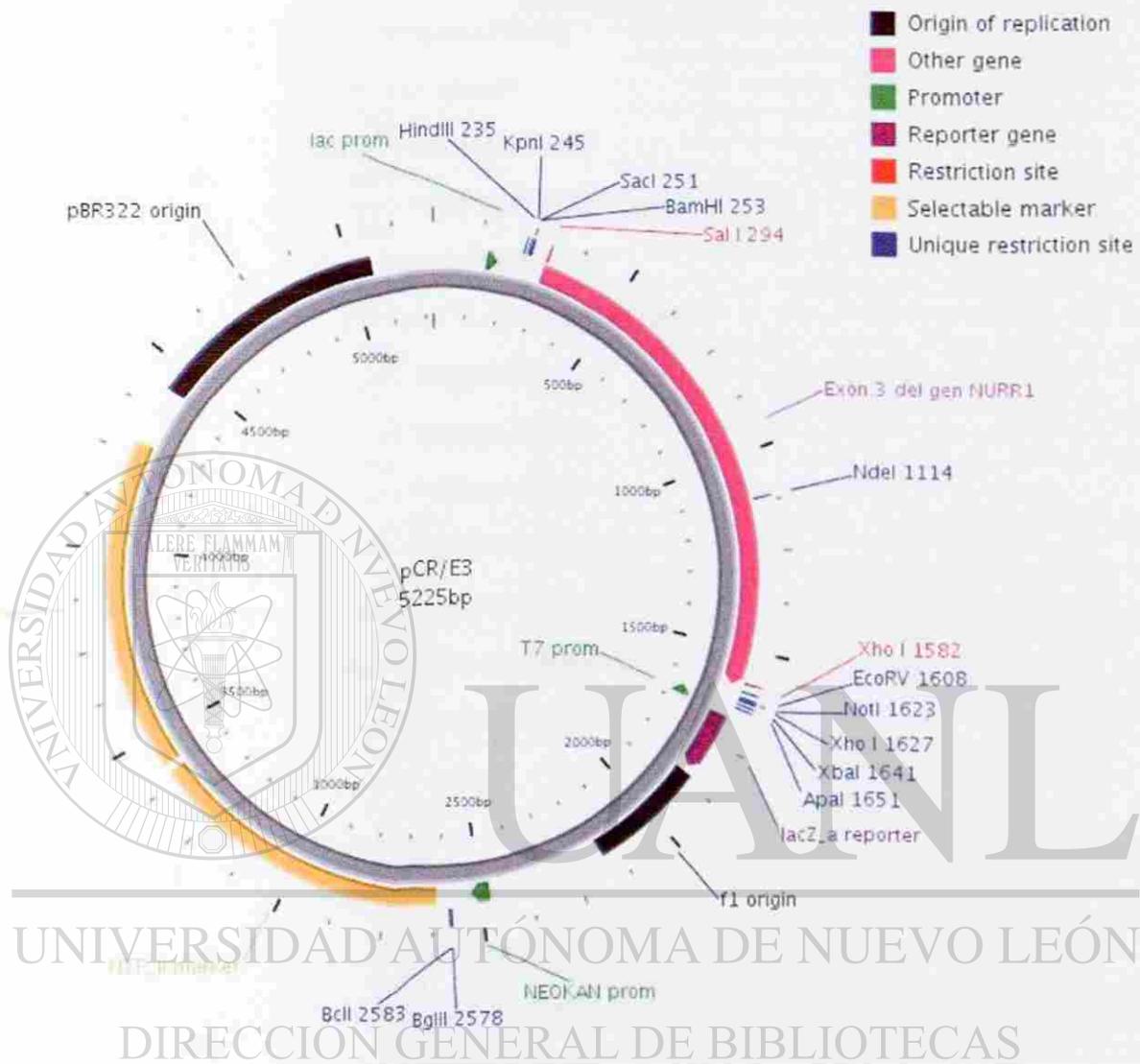
```

181 ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagcttg  
 241 gtaccgagct cggatccact agtaacggcc gccagtggtg tggaaattcgc ccttgctgac  
 301 cctgagcttc aaagaagaag ctcatcagag tgggactgtc tgcgggaagg ggggtggagcg  
 361 cggggggggg gggcgtttgg aatgagtggt agaccctcaa cagctttcca gctctgggtc  
 421 gtcccgggat cagcccttcc cttctctcat cgtgtttcca cctcttttgc ccttccccct  
 481 gcatccctaa acccccattc tctcccgcgc tccctccacc cccaaccocg acgcccgggg  
 541 ctgcccgggt agcccgggt gtagaccgag cccggaagaa agtgttcagt tgaccaggct  
 601 gagtgtatat caccctgttt cgtttccagc catgccttgt gttcaggcgc agtatgggtc  
 661 ctgcctcaa ggagccagcc ccgcttctca gagctacagt taccacttt cgggagaata  
 721 cagctccgat ttcttaactc cagagtttgt caagtttagc atggacctca ccaactga  
 781 aattactgcc accacttctc tcccagctt cagtacctt atggacaact acagcacagg  
 841 ctacgacgtc aagccacctt gcttgtacca aatgccctg tccggacagc agtccctcat  
 901 taaggtagaa gacattcaga tgcacaacta ccagcaacac agccacctgc cccctcagtc  
 961 cgaggagatg atgccacaca ggggtcgggt ttactacaag cctcttcgc ccccgacacc  
 1021 cagcaccocg agcttccagg tgcagcatag cccgatgtgg gacgatccgg gctcccttca  
 1081 caacttccac cagaactacg tggccactac gcatatgato gagcagagga agacacctgt  
 1141 ctcccgcctg tcaactottt cctttaagca gtcgccccg ggcactcctg tgtctagctg  
 1201 ccagatgctc ttogaagggc ctctgcacgt ccccatgaac cgggagcccg cgggcagcca  
 1261 ccacgtagtg gatgggcaga ccttggccgt gcccaacccc attogcaagc cggcatccat  
 1321 gggcttcccg ggcctgcaga tggccacgc atcgcagttg cttgacacgc aggtgccctc  
 1381 gccgcgctcc cggggctctc cctccaatga gggctctgtg gctgtttgog gtgacaacgc  
 1441 ggctgtcag cactacgggt ttctgacttg tgagggtgct aaaggtttct ttaaggtgag  
 1501 caagacaggg cggaggtggc aggtagcgggt ccttatacct gagaccacgc agtgtaccct  
 1561 caccttccgg tgggagccc cgcctcgaaa gggcgaattc tgcagatata catcacactg  
 1621 gcggccgctc gagcatgcat ctagagggcc caattcgcgc tatagttagt cgtattaca  
 1681 ttcactggcc gtcgttttac aacgtctgta ctgggaaaac cctggcgta cccaacttaa  
 1741 tcgccttgca gcacatcccc ctttggccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga  
 1801 tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg acgcgccctg tagcggcgca  
 1861 ttaagcggcg cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcctta  
 1921 gcgcccgcct ctttgcctt cttcccttcc tttctgcga cgttgcgcgg ctttccccgt  
 1981 caagctctaa atcggggggt ccttttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac  
 2041 ccaaaaaaac ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc catcgccttg atagcgggt  
 2101 tttogccctt tgacgttggg gtccacgttc tttaatagtg gactcttgtt ccaacttgg  
 2161 acaacttca accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcc  
 2221 gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaatt  
 2281 cagggcgcaa gggctgctaa aggaagcgga acacgtagaa agccagtcgc cagaaacggg  
 2341 gctgaccccg gatgaatgtc agctactggg ctatctggac aagggaaaac gcaagcga  
 2401 agagaaagca ggtagcttgc agtgggctta catggcgata gctagactgg cgggttttat  
 2461 ggacagcaag cgaaccggaa ttgcccagtc gggcgcctc tggtaaggtt ggggaagcct  
 2521 gcaaagtaaa ctggaatggt ttcttgcgc caagatctg atggcgcagg ggaatcaagat  
 2581 ctgatcaaga gcaggtatga ggaatgttcc gcatgattga acaagatgga ttgacagcag  
 2641 gttctccggc cgttgggtg gagaggctat tccgctatga ctgggcaca cagacaatcg  
 2701 gctgctctga tgcgcgcgtg ttccggctgt cagcgcaggg gcgcccgggt cttttgtca  
 2761 agaccgacct gtccggtgcc ctgaaatgaa tgcaggacga ggcagcgcgg ctatcgtggc  
 2821 tggccacgac gggcgttcc tgcgcagctg tgetcgactg tgcactgaa gcgggaaggg  
 2881 actggtgct atttggcgaa gtgcccgggc aggatctcct gtcateccac cttgctcctg  
 2941 ccgagaaagt atccatcatg gctgatgcaa tgcggcggt gcatacgtt gatccggcta  
 3001 cctgccatt cgaaccacaa gogaaacatc gcatcgagcg agcaogtact cggatggaag  
 3061 ccggtcttgt cgatcaggat gatctggacg aagagcatca ggggctcgcg ccagccgaac  
 3121 tgttccagcag gctcaaggcg cgcattgccc acggcgagga tctcgtcgtg acccatggcg  
 3181 atgctgctt gccgaaatc atgggtgaaa atggccgctt ttctggattc atcagctgtg  
 3241 gccggtggtg tgtggcggac cgcctatcagg acatagcgtt ggctaccctg gatattgctg  
 3301 aagagcttgg cggcgaatgg gctgaccgct tctcgtgct ttacggtatc gccgctcccg  
 3361 attcgcagcg catcgccttc tategccttc ttgacgagtt cttctgaatt gaaaaaggaa  
 3421 gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct  
 3481 tctgttttt gctcaccag aaacgctggt gaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg  
 3541 tgcacgagtg ggttaccatg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagtttccg

```

3601 cccggaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt
3661 atcccgattt gacgcgggyc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga
3721 cttgggtgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga
3781 attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcy gccaaactac ttctgacaac
3841 gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggagc atgtaactcg
3901 ccttgatcgt tgggaaccgy agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac
3961 gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcy caaactatta actggcgaac tacttactct
4021 agcttcccgy caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct
4081 gcgctcggcc ctcccgctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg
4141 gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat
4201 ctacacgagc gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg
4261 tgccctactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat
4321 tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaaag gatctaggty aagatccttt ttgataatct
4381 catgacaaa atccctaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa
4441 gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa
4501 aaaaccacgy ctaccagcy tggtttgty gccggatcaa gagctaccaa ctcttttcc
4561 gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttctctag tctaacctga
4621 gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcctc tgctaactct
4681 gttaccagty gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg
4741 atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaaacggg ggttcgtgca cacagcccag
4801 cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc
4861 cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggy tcggaacagg
4921 agagcgcagc agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt
4981 togccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg
5041 gaaaaacgcy agcaacgcgy cctttttacg gttcctggcc ttttgetgcy cttttgetca
5101 catgttcttt cctgcgttat cccctgatte tgtggataac cgtattaacc cctttgagty
5161 agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcage gagtcagty gcgaggaagc
5221 ggaag
    
```

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Figura 27. Vector pCR/E3**

ANEXO IV

LOCUS	dna	5283 bp			
FEATURES	Location/Qualifiers				
Promoter	143..172	/gene="lac prom"			
misc_binding	246..251	/dbxref="REBASE:SacI"			
misc_binding	252..257	/dbxref="REBASE:BamHI"			
misc_binding	293..301	/dbxref="REBASE:Not I"			
other_gene	293..1594	/gene="Exón 2 del gen NURR1"			
misc_binding	415..420	/dbxref="REBASE:HpaI"			
misc_binding	696..701	/dbxref="REBASE:NdeI"			
misc_binding	906..911	/dbxref="REBASE:StuI"			
misc_binding	1154..1159	/dbxref="REBASE:AccI"			
misc_binding	1633..1640	/dbxref="REBASE:Kpn I"			
misc_binding	1663..1668	/dbxref="REBASE:EcoRV"			
misc_binding	1704..1709	/dbxref="REBASE:ApaI"			
Promoter	1717..1735	/gene="T7 prom"			
Reporter	1739..1898	/gene="lacZ_a reporter"			
Rep_Origin	1916..2222	/gene="f1 origin"			
Promoter	2533..2582	/gene="NEOKAN prom"			
Marker	2674..3462	/gene="NTP_II marker"			
misc_binding	3231..3236	/dbxref="REBASE:NcoI"			
Marker	3483..4343	/gene="amp marker"			
Rep_Origin	4498..5117	/gene="pBR322 origin"			
<b>BASE COUNT</b>	<b>1261 a</b>	<b>1313 c</b>	<b>1378 g</b>	<b>1331 t</b>	<b>0 others</b>

ORIGIN

```

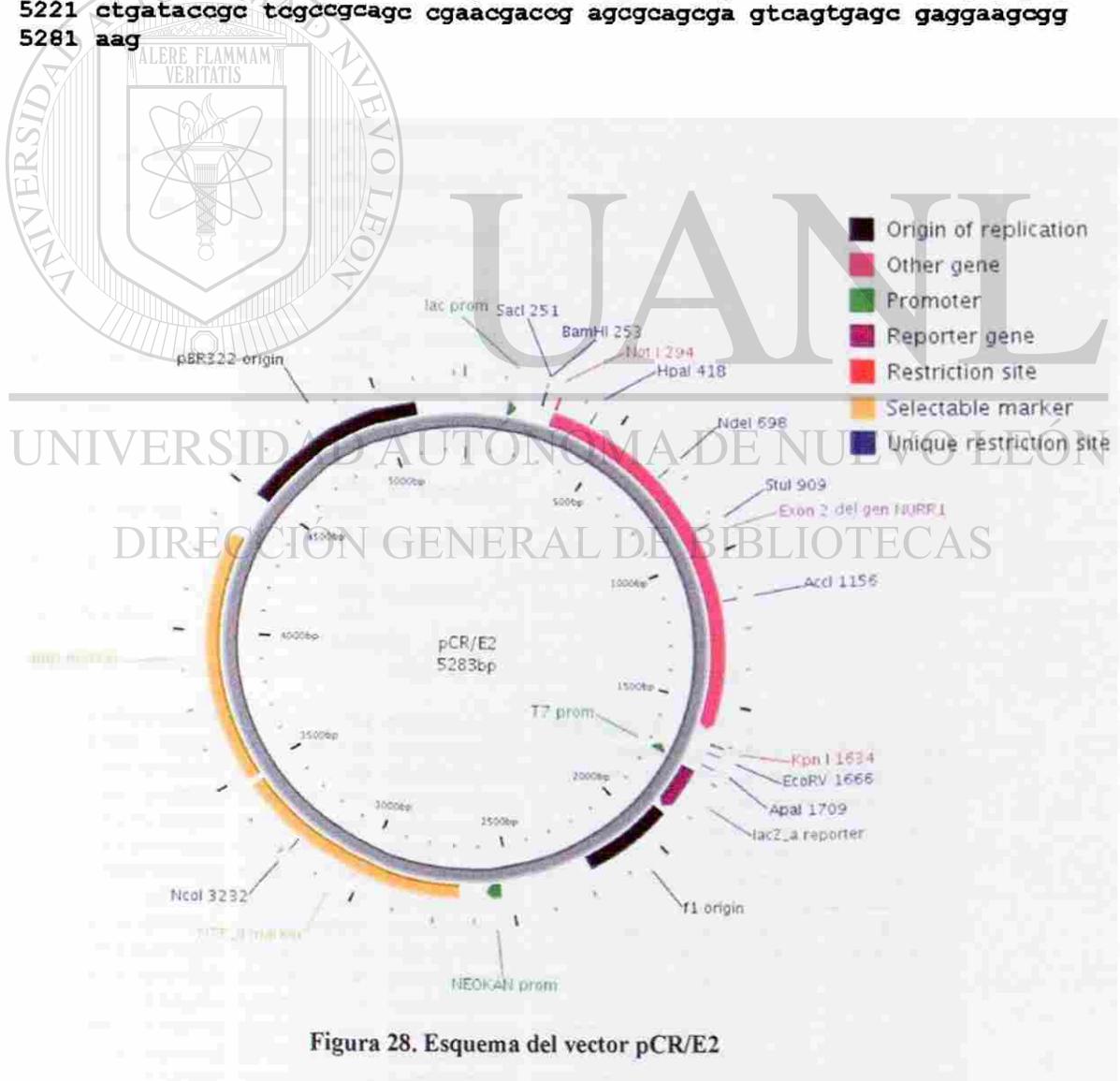
1 agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttgcc gattcattaa tgcagctggc
61 acgacagggt tocogactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc
121 tcaactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctogtatg ttgtgtggaa
181 ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagcttg
241 gtacogagct oggatccact agtaaocggc gccagtggtc tggaaatcgc ccttgoggcc
301 gcaoggttat gaaactgtga catagccaag ggtaaatatc cagaacagac atattttcaa
361 gggcgggggc ggtatggggg ggggagataa agcaaaaagc ctctggtttg tcttgttaac
421 cttctcogct ccttgaagca aagcaagatt gtggaagaag tggggggggg gggcggagag
481 gggaggggagc aaaggagagg gtgttcaggt ttctttactt tatcaacaag atogtctatg
541 ctctagaatg ccttgcaagt gggaacatct gaaaaaaaaa atagctagga cacaagaatg
601 ccttgtccca gcaagtaggc agcctgtgga aagcattgtg gagaaggtgt ccagtttgc
    
```

661 gtgctgagaa gtgcttctaa ctttggtgcc aatatcatat gogtaatatt ttttccctc  
 721 tgcagttgac ccaagatact cctggtaaag tagagatctc tctcatcac cctgggccat  
 781 taagatggt gaaaatccag ttctctggag gaacaccaat togettgtec ctttaagatcc  
 841 tgtgttgaac caaagcaat tactaaagct acacacttgc toccacattg gctglttggt  
 901 tgtccaggcc ttgctaacgt ttcttaaggg ttggatctgt attttttttt ttcaoggttt  
 961 actctogagt tcttttaact ttctttctcc ttctaagaga aaagtccact ggactctaag  
 1021 agagatatta agaggaagct ttgatgctgt gtttttcoct taaccagact tcttagggttt  
 1081 gacataaagt agaatgacaa aggcccttcc atctacagca aaggggccaa ttcatatat  
 1141 tgatcagtat ctggtagact catgggataa ttccccaca ggatgctttc tctgcagggga  
 1201 tttacactgg gagatgagcg gcattatctg ctgtttagcc acctgtctc tgcacatttc  
 1261 attttaagat gctgttgggt aaagcttca cactcatttc caaggaagca cttgaagggc  
 1321 ctgtctgagt agtctgcatc tgcccagccc aagtctoggt ggaagacat cctgaaactt  
 1381 cctgtgtctg ttttccaggg agatctgacg ggtggattc ccaatagctc ttttttaaaa  
 1441 tcttggaac tttgtccttc gctgaattac gacctgtcc accttaatt tctogaaaa  
 1501 ctccaataac tctgctgaag gtcagtgagc tttatctttc attacctttc ctgagttccc  
 1561 ccataccctc agaaaaacaa aacaaaacag ggcaacagga tctttccagc ccaacctgt  
 1621 gccttatagt cacaggtacc gaggacaagg gogaattctg cagatatcca tcacactgyc  
 1681 ggcogetoga gcattgcatct agagggccca attogcccta tagtgagtog tattacaatt  
 1741 cactggcogt cgttttaca cgtctgact gggaaaacce tggogttacc caacttaate  
 1801 gccttgacgc acatcccct ttogccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcacogate  
 1861 gcccttocca acagttgogc agcctgaatg gogaatggac gogccctgta gogogcatt  
 1921 aagcogggog ggtgtggtgg ttacgcgcag cgtgaccgct acacttgcga gogccctagc  
 1981 gccogctcct ttogctttct teecttccct tetogccacg ttogcogct tcccogtea  
 2041 agctctaaat cgggggctcc ctttaggggt cogatttagt gctttacggc acctogacc  
 2101 caaaaaactt gattaggggt atggttcacg tagtgggcca tgcacctgat agacoggttt  
 2161 togccctttg acgttggagt ccacgttct taatagtgga ctctgttcc aaactggaac  
 2221 aacactcaac cctatctogg tctattcttt tgatttataa gggattttgc cgaatttcggc  
 2281 ctattgggta aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac gogaatttta acaaaaattca  
 2341 gggogcaagg gctgctaaag gaagoggaac aogtagaaag ccagtcogca gaaacoggtgc  
 2401 tgaccocgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaaocg aagocgaaag  
 2461 agaaagcagg tagcttgacg tgggettaca tggogatagc tagactgggc ggttttatgg  
 2521 acagcaagcg aacoggaatt gccagctggg gogccctctg gtaaggttg gaagccctgc  
 2581 aaagtaaact ggatggottt cttgocgcca aggatctgat ggcgcagggg atcaagatct  
 2641 gatcaagaga caggatgagg atogtttgc atgattgaac aagatggatt gcaogcaggt  
 2701 tctcoggcog cttgggtgga gaggctatc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc  
 2761 tgctctgatg cgcogctgtt ccggctgtca ggcaggggc gccoggttct tttgtcaag  
 2821 accgacctgt cgggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagocoggt atogtggctg  
 2881 gccacgacgg gogttcoctt ggcagctgtg ctgcagcttg tcaactgaagc ggyaagggac  
 2941 tggetgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catccacct tgcctctgcc  
 3001 gagaaagtat ccacatggc tgatgcaatg cggoggtctg atacgcttga tccggctacc  
 3061 tgccattog accaccaagc gaaacatgc atogagogag cacgtactgc gatggaagcc  
 3121 ggtcttctog atcaggatga tctggaogaa gagcatcagg ggcogcgc ccogcagctg  
 3181 tteccagggc tcaaggecgc catgcccagc ggcgaggatc togtogtgc ccatggogt  
 3241 gcctgcttgc ogaatatcat ggtggaaaat ggcogctttt ctggattcat cgaactgtggc  
 3301 oggetgggtg tggogggacc ctatcaggac atagcgttgg ctaccogtga tattgctgaa  
 3361 gagcttggcg gogaatgggc tgaccgcttc ctogtcttt acoggtatgc ogctccogt  
 3421 tegcagcgca tgccttcta togccttctt gacgagttct tctgaattga aaaaggaaga  
 3481 gtatgagtat tcaacatttc ogtgtogccc ttattccctt ttttgoggca ttttgcttc  
 3541 ctgtttttgc tcaaccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg  
 3601 cacgagtggg ttacatogaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttogcc  
 3661 ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc goggtattat  
 3721 ccogtattga cgcogggcaa gagcaactcg gtcgcccgat acactattct cagaatgact  
 3781 tggttgagta ctcaaccagc acagaaaagc atcttaocgga tggcatgaca gtaagagaat  
 3841 tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acaactgoggc caacttactt ctgacaacga  
 3901 tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactogcc  
 3961 ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa ogacogagct gacaccaoga  
 4021 tgccctgtagc aatggcaaca acgttgogca aactattaac tggogaacta cttactctag

```

4081 cttcccgcca acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttotgc
4141 gctoggcctt tcoogctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggg gagcgtgggt
4201 ctccgggtat cattgcagca ctggggccag atggttaagc ctocogtate gtagttatct
4261 acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatogct gagataggtg
4321 cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg
4381 atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca
4441 tgaccaaact cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga
4501 tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgogtaat ctgctgcttg caaacaaaaa
4561 aaccaccgct accagcgggt gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttcoga
4621 aggtaactgg cttcagcaga ggcagatac caaatactgt tcttctagtg tagccgtagt
4681 taggccacca cttcaagaac tctgtagcac gcctacata cctcgtctcg ctaatcctgt
4741 taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagaagat
4801 agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaaocggggg ttogtgcaca cagcccagct
4861 tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagccca
4921 cgtctcccca agggagaaag gcggacaggt atcoggttaag cggcagggtc ggaacaggag
4981 agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtoct gtcgggtttc
5041 gccacctctg acttgagcgt cgatttttct gatgctcgtc agggggcggg agcctatgga
5101 aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcttgccctt ttgctgacct tttgctcaca
5161 tgttctttcc tgcgttatec cctgattctg tggataacog tattacogcc tttgagtgag
5221 ctgataccgc tcgcccagc cgaacgacog agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg
5281 aag
    
```

//



### Anexo V

LOCUS	dna	8654 bp
FEATURES	Location/Qualifiers	
Promoter	143..172	/gene="lac prom"
misc_binding	246..251	/dbxref="REBASE:SacI"
misc_binding	293..299	/dbxref="REBASE:Bgl II"
other_gene	293..5011	/gene="Exón 4 al exón 8 del gen NURRI"
misc_binding	2013..2018	/dbxref="REBASE:SmaI"
misc_binding	2013..2018	/dbxref="REBASE:XmaI"
misc_binding	2676..2681	/dbxref="REBASE:StuI"
misc_binding	5004..5011	/dbxref="REBASE:Bgl II"
misc_binding	5034..5039	/dbxref="REBASE:EcoRV"
misc_binding	5050..5057	/dbxref="REBASE:NotI"
misc_binding	5057..5062	/dbxref="REBASE:XhoI"
misc_binding	5069..5074	/dbxref="REBASE:XbaI"
misc_binding	5075..5080	/dbxref="REBASE:ApaI"
Promoter	5088..5106	/gene="T7 prom"
Reporter	5110..5269	/gene="lacZ_a reporter"
Rep_Origin	5287..5593	/gene="f1 origin"
Promoter	5904..5953	/gene="NEOKAN prom"
Marker	6045..6833	/gene="NTP_II marker"
misc_binding	6602..6607	/dbxref="REBASE:NcoI"
Marker	6854..7714	/gene="amp marker"
Rep_Origin	7869..8488	/gene="pBR322 origin"

BASE COUNT 2277 a 2006 c 2129 g 2242 t 0 others

ORIGIN

```

1  agcgcccaat acgcaaacgg cctctcccgg cgcggtggcc gattcattaa tgcagctggc
61  acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc
121 tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc gyctcgtatg ttgtgtggaa
181 ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagctt
241 gtaccgagct cggatccact agtaacggcc gccagtggtc tggaaatcgc ccttagatct
301 tcagaaagac tggtagagtc agggtttcat cccccgccc cccgcgcccc acagcaacct
361 ggggccccgg cgggctccag cccgaaattg ctggagccag agttggaaga gggctatttg
421 catgtgtagc gcgctgtcct ccttggtcag attgaaattg gttaggacag agaacogtgt
481 ctgagctaac caagtggaac agaattccct atggccaat taagtgatct ctttatttcg
541 ccatacctgat tgaataatct tatcatttta aatagagaag gtctccaagy aatgtaataa
601 atatgaatgc ccacgatttt gtatttactc agcgtctcct gcccttctc ctggcatata
661 aaacacagca aggagcggta aggttagctc aaatgttaac gctatcaatt ttcttctggt
721 aatgcccctg gggaggaaaa ggaaaggaaa taggaagaaa agaaaaagaa aaggaaagaa
781 agaaagaaag aaagaagaaa agaaagaaag aaagaagaaa agaaagaaat tgaaggagta
841 gtgtttatgt ttgtagggaa ggaatgcaga tccaagccat ttttataaaa aatgtgtcca
    
```

```

901 gtttgctgga ctttgagtga aaaaaataat cttttggggg cctacattct ctcctctac
961 agcgcaacggg gcaaaaaaac gcgaaatatg tgtgtttagc aaataaaaac tgcccagtg
1021 acaagcgccg ccgaaatcgt tgtcagtaet gtcggtttca gaagtgccta gctgtggga
1081 tggttaaaga aggtaggtcg aggcaagttg ttgacctcc atttcacgcc cctgaaagtc
1141 caccagctgc ttgtggactc cggccctgc ctactcccc acgcectga ctcaggatt
1201 ccactgctaa atgccctoct ctaaagaag ccaccggcc ctcctttct ttaagtatag
1261 gaccagttg gaggaaggta taaaataacc cgccattat taatgcttct cgtcagtaa
1321 gtcttataaa tcagaggagc cctggaccac caggttgggc ttcttccact gttccctcgg
1381 ggaggaggcc gtgaggcagc tgagtcggg ctcaaggaa cagcgttaac ccttgagtaa
1441 ttcctttaca gtggttcgca cggacagttt aaaagggcgg agaggtcgtt tacctcggaa
1501 gccgaagagc ccacaggatc cctctcccc ctcaectccg gtgagctga tcagtgcct
1561 cgtcagagcc caegtgcatt ccaatccggc aatgaccagc ctggactatt ccagggtta
1621 aagcctggtg tgggggaaat tcaatcatgt ggacaagcca acaaatgggc aggacctct
1681 ccctatcccc agctttagca cccccaaact caaggttaa ggaggaaacag cagaatacat
1741 acttcacaac tttgggcagg tttcaggag acaggtggtg ctgctcaaag tacagaccgg
1801 agaacacacc ggaggggttg aatctttgtg aaccattat gtcgcacagt cctccagct
1861 gcggtctgga aggcaaaacc tagacagtct agccttctct cccaagtcta ctttcgaag
1921 ttactagaat acattcccc ccccttgac ttgtctgggg ccaggagtg aaaagagggg
1981 tggaaagggat ggcaatgggg ggggggggtg tcccoggtc agggatcaag tgggtcaatt
2041 cttcttttac tccagctgtg aaaaatgttg aggctttggy cagagggagt gtggccaaac
2101 ctagtgcga ctgcaatatt attaaagctt gcaaaaggcg cctccgtgca agaccactc
2161 tgggattagc atgaatacta ccgtgtcaat tgttttggc cgataagact gaaccttcc
2221 cagggtcggg tggcactgta ttagtctgt atggaaatgy taattacat atttaagca
2281 ggcacctcat agcacctgcc cttaattgat taattgccc ggaacatcta atttccctac
2341 tggtcagaga gaggtttaat tgttataaaa acctggctcc cctactagaa accgggtag
2401 caatttcacg ggtatataat ttagagaaac ctcatlaagt gctttttaa atgaattcc
2461 agtccaggc aaacctgac tatcagatga gtggagatga taccacat atccagct
2521 tctacagctc cctgaccggc tctatggaga tcatcagagg gtgggcagag aagatccctg
2581 gctttgctga cctgcccaca gcgaccaggy acctgcttt tgaatcagct ttcttagaat
2641 tatttctct gcgcttagca tacaggtaat gaatgaggcc tggaggagg atcagaagta
2701 aaggaaagga agagaaaagg gttgggggtg gaggcaagat aaaaacaaag caaaggtgaa
2761 gaagggaagg agtgagccca gagccttggg tgaccgyagt ggtggtggga tagggaggt
2821 cttgattggt atgaaattaa accctttcaa ggtccactgy tctacatttt attactctt
2881 agtcaattag gtccctcta aatcccctct ttattgctt tcaagtaatt agtgtttag
2941 cttctctctc tctcttttcc tcccctctct ctttggatt aattgcaggt ccaaccagt
3001 ggagggtaaa ctcatctttt gcaatggggg ggtcttgca agyttgcaat gogtrogty
3061 ctttggggaa tggattgatt ccattgttga attctctcc aacttgca atatgaacat
3121 ogacatttct gccttctcct gcattgctgc cctggctatg gtcacagtc agtactgctg
3181 gtgcaggaca cttccccttc cgaacttct ctggtgggac cggtcatggc ttccctaat
3241 cgcagattct ttctgattct gccatctgac taactcccc ctgcatctt ttgttctgg
3301 ttgcatttcc tctcagagga cacgggctca aggaacccea gagagtgaa gagctacaa
3361 acaaaattgt aantctctt aaagaccatg tgactttcaa taatgggggt ttgaaccgac
3421 ccaactacct gtetaaactg ttggggaagc tgccagaact cgcaccctt tgcacacag
3481 gcctccagcg catttctac ctgaaaatgg aagacttgg accaccaca gcaataattg
3541 acaactttt cctggacacc ttaccttct aagacctct cccaagcag tcaagaact
3601 ggaagaaaa aaaaaataac atccagaggy ggtggtcac atgggcagag agctggttga
3661 agtgtccagt tcaccttacc tccctctgt agaccctag cctcaccct ttaagtaaac
3721 aaacaacaa acaaacaca aataaaaact gtogetatt cctaactgc aggcagaacc
3781 tgaaggggca ttttggctcc gggcatcct ggatttagaa aacggacagc acacagtaca
3841 gtggtataaa cttttatta tcagttcaaa atcagttgt tgttcagaag aaagattgct
3901 aatgatgat gggaaatgtt tggcoatgct tgcttgttc agttaagaca aatgtaaac
3961 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac cttaatggga cctcctatt
4021 ttgcccttta caagacttc aaagtttct gctgtaaga aagctgta atatagtaa
4081 actaaatggt gcgtgggtg catgaattga aggcagagc ttgtaattt tccaatgca
4141 gtttggcttt taaattatt ttgtgcctat ttatgaaata atattcaaa ttctaaag
4201 taagtgtgtt tgcaaaaaa aaaaagaa atactacat aaaaagggga caagcatgtg
4261 attctaggtt gaagatgta taggcacttg ctacttcagt aatgtctata ttataaat
4321 agtattcag acactatgta gtctgttaga tttataaag attgtagtt atctgagctt
4381 aaacattttt ctcaattgta taataggtg gcacaagat cagtacatt gaaaatcctg
4441 acaaaaggg caacatagtt ttgtaacacc gcccaacatt ccttgtttg aagtgttga
4501 tgtaccgtt atgttgata aagaagttt atatctgat tttttgtg tctaaagca
4561 acaaaaactt gcatgcagca gcttttgaet gtttcagag tcttataat atacaact
4621 ccctggaaat tactgagcac tttgaaattt tttgttttg tttttatgt ctaaaattgt
    
```

4681 cagttaatat attatTTTT gtttgagtaa gaatttfaat attgccatat tctgtagtat  
 4741 tttcttttga ttttctagT acggcacatg agatgagTca ctgccctttt ttctatggTg  
 4801 tacgacagTt agagatgctg attttttttt cctgataaat tcttttetta agaaagacaa  
 4861 ttttaagtTt tacaacaata aaccacgtaa atgaacagaa ctctgtctta ttcttgggccc  
 4921 aggaaaatga ttactaaaca acaggtacaa gaaagaggcg aaagtggaga ctgatttggg  
 4981 gaggtcactt acaggacatc tgaatagatc tgaggacaag ggcgaattct gcagatatcc  
 5041 atcacactgg cyggcgcTcg agcatgcacT tagagggccc aattcgccct atagtgagTc  
 5101 gtattacaat tcactggcgg tegtTttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgTtac  
 5161 ccaacttaat cgcctTgcag cacatcccc tttcgcacgc tggcgtata gcgaagaggc  
 5221 ccgcaaccgat cgccttccc aacagtTgog cagcctgaat ggcgaatgga cgcgcctgt  
 5281 agcggcgcat taaggcgggc ggtgtgtgtg gttacgcgca gogTgaccgc tacactTgccc  
 5341 agcgccttag ccgcctctcc ttctgccttc tccccttct tctcgcacc gttcgcggc  
 5401 tttcccgcTc aagctctaaa tgggggctc cctttagggt tccgatttag Tgctttacgg  
 5461 cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggT gatggTtcaC gtagTgggccc atcgcctga  
 5521 tagacggTtt ttgcctcttT gacgtTggag tccacgtTct ttaatagtgg actcttTgtc  
 5581 caaactggaa caaactcaa cccatctctg gtctattctt ttgattata agggattttg  
 5641 cogatttogg cctattggtT aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt  
 5701 aacaaaattc agggccagag ggtgtctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc  
 5761 agaaaacgtg ctgcccgg atgaatgtca gctactggyc tatctggaca agggaaaacg  
 5821 caagcggaaa gagaagcag gtagctTgca gTgggcttac atggogatag ctgactggg  
 5881 cgtttttatg gacagcaagc gaaccggaaT tgccagctgg ggcgcctct ggttaaggTt  
 5941 ggaagccctg caaagtaaac Tggatggctt tcttgcgcgc aaggatctga tggcgcaggg  
 6001 gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag gatcgtTtcc catgattgaa caagatggat  
 6061 Tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac  
 6121 agacaatcgg ctgctctgat gccgcctgtT tccggctgtc agcgcagggg cgcctggTtc  
 6181 tttttgcaa gaccgacctg tccgtgccc tgaatgaact gcaggacgag gcagocggc  
 6241 tatcgtggct gggcacgacg ggcgttccTt ggcagctgt gctcgcagTt gtcactgaag  
 6301 cyggaagggg ctgctgcta ttgggcgaag Tgcggggca ggtctctctg tcatccacc  
 6361 ttgctcctgc cgagaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg catacgtTg  
 6421 atccggctac ctgcccattc gaccaccaag cgaacaatc catcgcagcga gcaactTc  
 6481 gtagTgaagc cgtcttTgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcg  
 6541 cagccgaact gttcgcagg ctcaaggcgc gcatgcocga cggcagagat ctctcgtga  
 6601 cccatggcga Tgctgtgtg ccgaataca tggTgaaaa tggcgcctt tctggtTca  
 6661 Tcgaactgtg ccgctgggtg gtggcgacc gctatcagga catagcgtTg gctaccctg  
 6721 atattgctga agagctTggc ggcgaatggc ctgaccgctt cctcgtgctt tacggTatc  
 6781 ccgctcccga ttccgcagcgc atcgccttct atcgccttct TgacgagTt ttctgaattg  
 6841 aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgTgtcgc cttattccct tttttcggc  
 6901 attttgctt cctgtttttg ctcaaccaga aacgctggTg aaagTaaaag atgctgaaga  
 6961 TcagTtgggt gcaocagTgg gttacatcga actggatctc aacagcggta agatcctTga  
 7021 gagtTttcgc cccgaagaac gttttccaat gatgagcact tttaaagTc Tgctatgtg  
 7081 ccggttatta tcccgtattg acgcccggca agagcaactc ggtcgcgca tacactTc  
 7141 Tcagaatgac ttggtTgagT actcaccagT cacagaaaag catcttacgg atggcatgac  
 7201 agtaagagaa ttatgcagTg ctgccataac catgagTgat aacactTcgg ccaactTact  
 7261 tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aacocgtttt ttgcacaaca tgggggatca  
 7321 Tgtaactcgc ctTgatcgtt ggaaccggga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagc  
 7381 Tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgtTgocg aaactattaa ctggcgaact  
 7441 acttactcta gctcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata agTtgcagg  
 7501 accacttctg cgtcggccc ttccggctgg ctggTttatt gctgataaat ctggagcgg  
 7561 Tgagcgtggg tctcgggta Tcattgcagc actggggcca gatggtaaag cctcccgat  
 7621 cgtagTtatc tacacgacgg gtagTcaggc aactatggat gaacgaata gacagatgc  
 7681 Tgagataggt gctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagTt actcatat  
 7741 actttagatt gatttaaaac ttcaTTTTa atttaaaag atctagTga agatcctttt  
 7801 Tgataatctc atgacaaaa tcccttaacg TgagTtttcc ttccactgag cgtcagacc  
 7861 cgtagaaaag atcaaggat ctctttgaga tccTTTTt ctgcogTaa tctgctgtt  
 7921 gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggT ggtTgtTtTg coggatcaag agctaccaac  
 7981 tctttttcgg aaggtaaactg gcttcagcag agcgcagata ccaatactg ttctctagT  
 8041 gtagcogtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgcct  
 8101 gctaatcctg ttaccagTgg ctgctgccag tggcgaTaaT tegtgtctta ccgggtTgga  
 8161 ctcaagacga tagttaccgg ataaaggcga gcggTogggc Tgaacggggg gttcgtgac  
 8221 acagcccagc ttggagcga cyacctacac cgaactgaga tacctacag gtgagctatg  
 8281 agaaaagccc acgctcccg aaggagaaa ggcggacag TatccgTaa ggcgcaggt  
 8341 cggaaacgga gagcgcaga gggagcttcc agggggaac gcctggtatc tttactgTc  
 8401 Tgtcgggttt cgcaccctct gactTgagcT togattttTg Tgatgctcgt caggggggog



```

8461 gagcctatgg aaaaacgcc acaacgcggc ctttttacgg ttcttgccct tttgctggcc
8521 ttttgctcac atgttcttcc ctgcgttacc cctgattctc gtggataaac gtattaccgc
8581 ctttgagtga gctgataccg ctgcgcgcag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag
8641 cgaggaagcg gaag
    
```

//

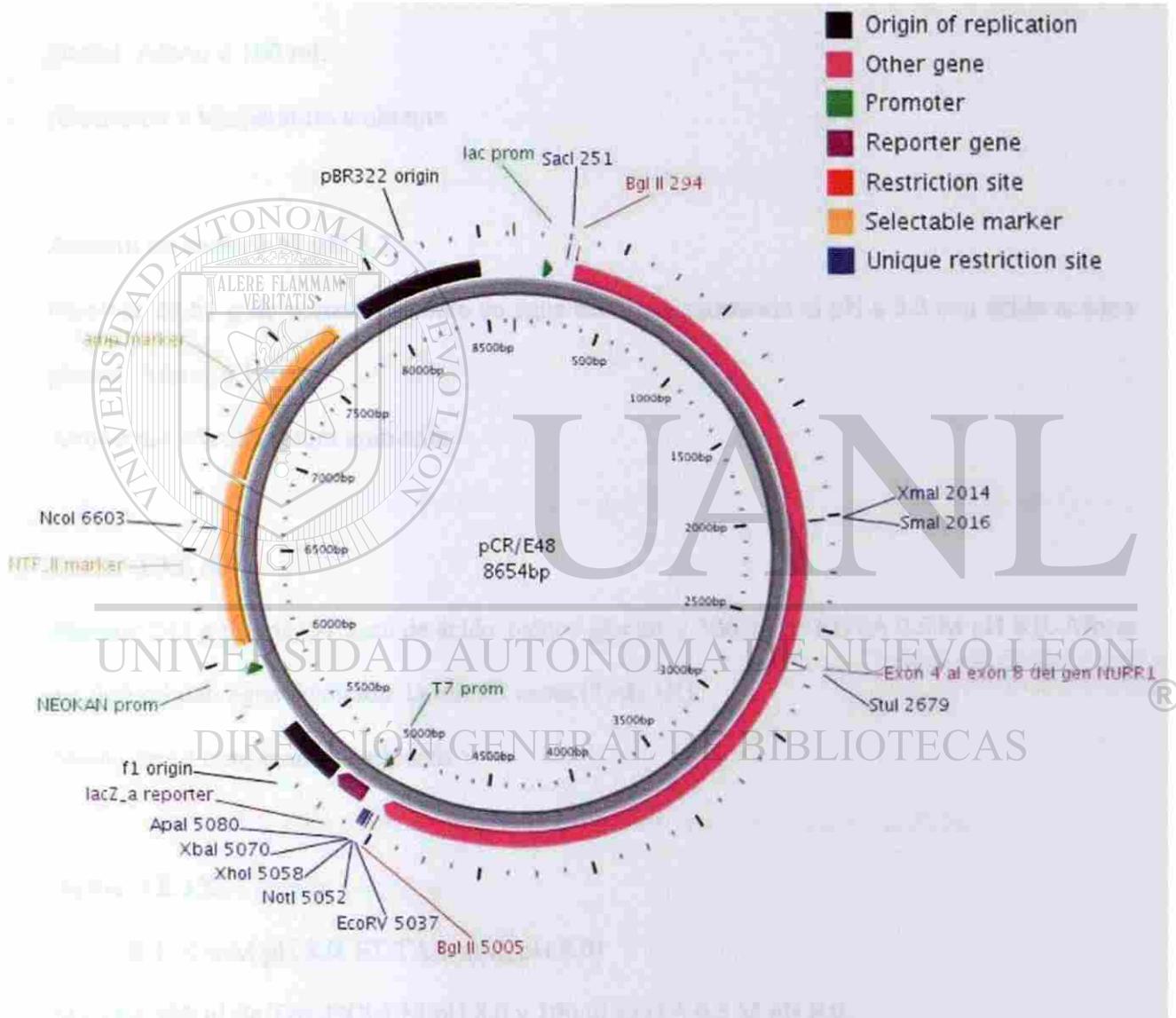


Figura 29. Esquema del vector pCR/E48

## Anexo VI

### Preparación de soluciones

#### Acetato de potasio 5 M pH 5.2

Disolver 49 g de acetato de potasio en agua destilada, ajustando el pH a 5.2 con ácido acético glacial. Aforar a 100 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

#### Acetato de sodio 3 M pH 5.2

Disolver 24.61 g de acetato de sodio en agua destilada, ajustando el pH a 5.2 con ácido acético glacial. Aforar a 100 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

#### Buffer TAE 50X

Mezclar 242 g de tris, 57.1 ml de ácido acético glacial, y 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0. Aforar a 1,000 ml con agua destilada. Diluir 50 veces (TAE 1X).

Almacenar a temperatura ambiente.

#### Buffer TE 1X

(Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, pH 8.0)

Mezclar 500  $\mu$ l de Tris-HCl 1 M pH 8.0 y 100  $\mu$ l EDTA 0.5 M pH 8.0.

Ajustar el pH a 8 y aforar a 50 ml con agua destilada.

Esterilizar por autoclave.

Almacenar a temperatura ambiente.

**Buffer Tris-HCl 1 M pH 6.8**

Disolver 7.2 g de tris en agua destilada, ajustando el pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 60 ml.

Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

**Buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.8**

Disolver 10.89 g de Tris en agua destilada, ajustando el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 60 ml.

Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

**EDTA 0.5 M pH 8.0**

Disolver 18.6 g de EDTA en agua destilada, y ajustar el pH a 8.0 con 2 g de perlas de NaOH. Aforar a 100 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

**Fosfato de potasio monobásico 1 M**

Disolver 135.5 g de fosfato de potasio monobásico en 1,000 ml de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

**Fosfato de potasio dibásico 1 M**

Disolver 173.5 g de fosfato de potasio dibásico en 1,000 ml de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

**Glucosa 2 M**

Disolver 18.02 g de glucosa en 50 ml de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

**IPTG (23 mg/ml)**

Disolver 238 mg de IPTG en 10 ml de agua destilada estéril.

Esterilizar por filtración (0.22  $\mu$ m) y almacenar a -20°C.

**Jugo azul 6X**

(Azul de bromofenol 0.25%, Xilencianol 0.25%, Glicerol 30%)

Mezclar 25 mg de azul de bromofenol y 25 mg de xilencianol con 3 ml de glicerol. Aforar con agua destilada a 10 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

**Medio LB Agar-Ampicilina**

Disolver 6.4 g de LB agar en 200 ml de agua destilada.

Esterilizar en autoclave.

Enfriar, agregar 200  $\mu$ l de ampicilina (100 mg/ml), homogenizar y vaciar en cajas de Petri.

Almacenar a 4°C.

Su vida media es de varios meses.

**Ribonucleasa A (*RNasa A*)**

(Ribonucleasa A 10 mg/ml, Acetato de sodio 0.01 M pH 5.2)

Disolver 10 mg de ribonucleasa A en agua destilada estéril. Agregar 3.33  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M pH 5.2. Calentar a 99°C por 15 min. Enfriar a temperatura ambiente, ajustar pH añadiendo 0.1 volúmenes (100  $\mu$ l) de Tris-HCl 1 M pH 7.4, y aforar a 1 ml. Almacenar a -20°C.

### **SDS 10%**

Disolver 10 g de SDS en 90 ml de agua destilada. Calentar a 68°C para facilitar su disolución.

Ajustar pH a 7.2 con HCl concentrado y aforar a 100 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

### **Solución I para Minipreparaciones de Plásmido**

(50 mM Glucosa, 10 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris-HCl pH 8.0)

Mezclar 1.25 ml de glucosa 2 M, 1 ml de EDTA 0.5 M pH 8, y 1.25 ml de Tris-HCl 1 M pH 8.

Aforar a 50 ml con agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

### **Solución II para Minipreparaciones de Plásmido**

(NaOH 0.2 N, SDS 1%)

Mezclar 300  $\mu$ l de NaOH 10 M, y 1.5 ml de SDS al 10%. Aforar a 15 ml con agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

### **Solución III para Minipreparaciones de Plásmido**

Mezclar 30 ml de acetato de potasio 5 M con 5.75 ml de ácido acético glacial, y aforar con agua destilada a 50 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

**Tris 1 M**

Disolver 121.1 g de tris base en 700 ml de agua destilada.

Ajustar pH con HCl concentrado como sigue:

pH	HCl
7.4	70 ml
7.6	60 ml
8.0	42 ml

Aforar a 1,000 ml con agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

**X-GAL (40 mg/ml)**

Disolver 400 mg de X-GAL en 10 ml de N-N-dimetil-formamida.

Almacenar a -20°C y proteger de la luz.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **RESUMEN CURRICULAR**

**Humberto Rodríguez Rocha**

**Candidato para el Grado de**

**Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología**

**Tesis:** Generación de un vector de recombinación homóloga para la inactivación condicional del gen NURR1

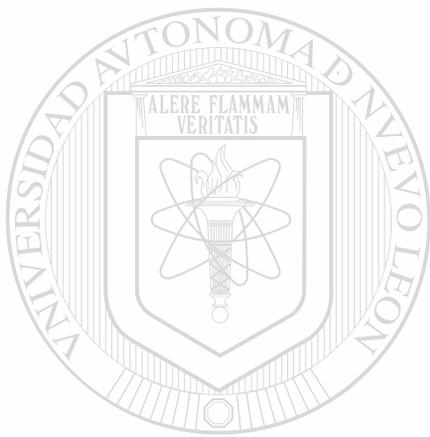
**Campo de Estudio:** Morfología

**Datos Personales:** Nacido en Vanegas, San Luis Potosí el 8 de Noviembre de 1972, hijo de Humberto Rodríguez Mota y María Rocha Ramírez.

**Educación:** Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el grado obtenido de Biólogo, en el 2001.

**Experiencia Profesional:** Becario del Laboratorio de Histología y Embriología, del Depto. de Zoología de Vertebrados, de la Facultad de Ciencias Biológicas, de 1999 al 2001. Profesionalista de apoyo de la Unidad de Manipulación Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, del 2002 al 2004. Becario en Investigación en el Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste-IMSS, de Marzo de 2005 a la Fecha.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

