UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

GENERACION DE UN VECTOR DE RECOMBINACION HOMOLOGA PARA LA INACTIVACION CONDICIONAL DEL GEN NURR1

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

1080130342

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

GENERACION DE UN VECTOR DE RECOMBINACION HOMOLOGA PARA LA INACTIVACION CONDICIONAL DEL GEN NURR1

POR:

BIOL. HUMBERTO RODRIGUEZ ROCHA

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

AGOSTO 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

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

Por

Biol. Humberto Rodríguez Rocha

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación Terminal en

Morfología

Agosto 2006

B U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS DOCTORADO

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

Comité de Tesis

DRA. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS

Presidente

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

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...

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.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AFs	Activation Functions
amp	Ampicilina
BrdU	Bromo desoxiuridina
C	Citocina o Cisteína
$CaCl_2$	Cloruro de Calcio
CME	Células madre embrionarias
CMV	Citomegalovirus
°C	Grados Centígrados
DBD	Dominio de unión al DNA
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Trifosfato de Desoxinucleósidos
EDTA	Ácido Etilendiaminotetra-acético
G	Guanina
hr	Hora
IPTG	Isopropil-thio-beta D-galactopiranósido
Kb	Kilobase = Mil pares de bases
KO	Knock out
L	Leucina
LB	Luria-Bertani
LBD	Dominio de unión al ligando
M	Concentración Molar

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
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^R.	49
Figura 17. Identificación de las clonas positivas de la ligación del gen Neo^R 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^{E3loxP}con la enzima de restricción Hind III. 55

Figura 23. Secuenciación de las clonas pNurr1^{E3LoxP} I, II y III. 56

Figura 24. Digestión con enzimas de restricción de los vectores pNURR1^{E3loxP} I, pTKE3Neo y 053575pPCR-Scipt. 58

Figura 25. Secuenciación del vector rembinante pNURR1^{E3loxP}. 59

Figura 26. Co-transfección de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano con el vector pNURR1^{E3loxP} 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^{E3LoxP}I, II y III.	56

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^{++} competentes de la cepa DH5α de *E. coli* 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 *in vitro* 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^R 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

ABSTRACT

Humberto Rodríguez Rocha

Universidad Autónoma de Nuevo León

Date: August, 2006

Medicine School

Title: **Generation of a homologus 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 dopaminegic 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 fenotype 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

Universidad Autónoma de Nuevo León

Fecha: Agosto de 2006

Facultad de Medicina

Titulo 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[1-6] en un modelo animal murino, provocó la pérdida de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, mismas que degeneran en la enfermedad de Parkinson.

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, glucocortocoides, 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)[7-9].

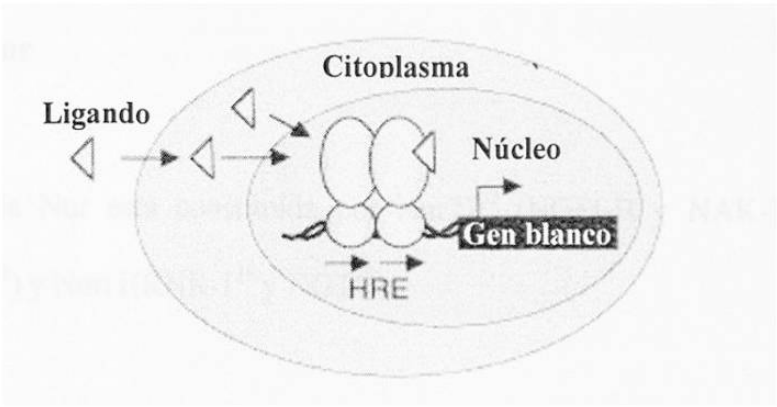

Figura 1. Activación de un receptor nuclear. El ligando que es una pequeña molécula lipofílica atraviesa la membrana plasmática y se une a su receptor en el citoplasma o en el núcleo activándolo.

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[10,11].

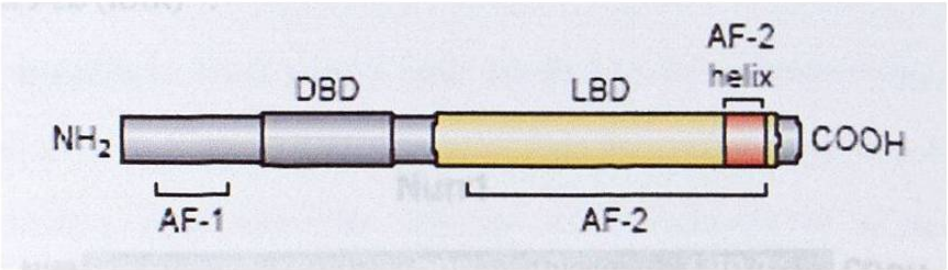

Figura 2. Organización estructural de los receptores nucleares.

1.2.2. Subfamilia Nur

La subfamilia Nur está constituída por Nur77[12] (NGFI-B y NAK-1[13-15]), NOR1 (MINOR y TEC[16-118]) y Nurr1(RNR-1[19] y NOT[20]) .

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"[21]. 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[22]. Estos factores pueden iniciar la transcripción en forma de monómeros[21, 22], o bien, como dímeros[25-27]. Nurr1 y Nurr77 forman heterodímeros con un receptor del ácido retinóico, el *9-cis* (RXR)[28].

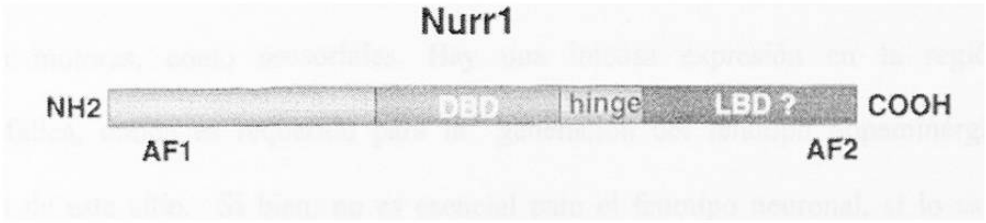

Figura 3. El receptor Nuclear huérfano Nurr1. Estructura del Receptor Nuclear con el dominio de unión al DNA centralmente localizado (DBD), flanqueado por una región amino terminal no conservada que contiene un sitio de activación independiente de ligando (AF1) y un dominio de unión a ligando (LBD),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

1.2.3. Nurr1

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[1, 4, 6, 29]. También se ha detectado expresión de Nurr1 en hígado en regeneración[19], y en la corteza suprarrenal, en respuesta a la estimulación por adrenocorticotropina[20]. Recientemente se ha demostrado la expresión de Nurr1 en cultivos primarios de osteoblastos[30], mediante la estimulación con la hormona paratifoidea; también se demostró en otro estudio, que el inhibidor de cinasas dependientes de Ciclina $p57^{Kip2}$

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

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) [32]. 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[33] 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[4,6]. 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[32].

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[34], 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[35]. Otra estrategia terapéutica que se ha empleado, es el transplante 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[36]. 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[37, 38],

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[39], 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[40, 41]. 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)[42, 43], (2) el desarrollo de organismos quiméricos utilizando estas células de los cultivos celulares[41, 44] y (3) la recombinación homóloga del DNA en células de mamífero[45, 46].

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[46, 47]. 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 deleción 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^R), 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[48]. 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 deleción 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[49]; 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[50]. Además, se han desarrollado cierto número de líneas de ratón que expresan el gen de la Cre-Recombinasa en tejidos específicos.

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.

1.4. OBJETIVO GENERAL

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

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
DH5αF'	*Escherichia coli*	F'/*endA1 hsdR17* ($r_k^- m_k^+$) *glnV44 thi-1 recA1 gyrA* (Nal^r) *relA1* Δ(*laclZYA-argF*)*U169 deoR* (Ø80*dlac* Δ(*lacZ*)*M15*)

Línea celular

Línea celular	Tipo celular
SH-SY5Y	Neuroblastoma

Enzimas de restricción:

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

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

Enzimas:

Enzima	**Compañía**
RNasa	Sigma-Aldrich
Taq Platinum DNA Polimerasa	Invitrogen

Reactivos:

Reactivo	Compañía/Marca
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
$CaCl_2$	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

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 deleción 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^R) 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′ CTCTTCCACAGCCTGTGAGTAGCTG 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 (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 Ca^{++} competentes de la cepa DH5α de *E. coli*

Se reactivó la cepa DH5α de *Escherichia coli* (almacenada a -80°C) en medio LB agar Miller y se incubó a 37°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°C a 150 rpm. Se utilizó 1 ml de este cultivo para inocular 100 ml de medio LB Broth, y se incubó a 37°C a 150 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0.6, después se colocó en hielo por 10 min para detener el crecimiento celular. Se utilizaron frascos para centrífuga pre-enfriados y estériles para centrifugar a 7,000 rpm por 5 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante, la pastilla celular se resuspendió en 10 ml de una solución fría de $CaCl_2$ 100 mM, y se incubó durante 10 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó y se decantó el sobrenadante, se repitió el lavado con la solución de $CaCl_2$ 100 mM. Finalmente la pastilla se resuspendió en 500 µl de $CaCl_2$ 100 mM y 500 µl de glicerol al 50%, ambas soluciones frías y estériles. Se hicieron alícuotas de 50 µl de bacterias e inmediatamente se almacenaron a -80°C.

C. Transformación

Posteriormente se agregaron 2 µl del producto de ligación a 50 µl de células Ca^{++} competentes de la cepa DH5α de *Escherichia coli* y se incubaron en hielo por 20 min. Se aplicó un choque térmico a 42°C durante 1 min. Después se agregaron 450 µl de medio LB Broth y se incubó a 37°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 µl. Después se sembraron 50 µl en placas LB-agar-amp (100 mg/ml) con 40 µl de IPTG (23

mg/ml) y 40 µl 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 µl de la solución I (50 mM Glucosa, 10 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris-HCl pH 8.0). Se agregaron 300 µl de la solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se mezcló por inversión. Después se añadieron 250 µl 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 decantándose el sobrenadante, se lavó la pastilla con 800 µl de etanol al 70%, y se dejó secar a temperatura ambiente. Después de esto, la pastilla se resuspendió en 50 µl de buffer TE1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) con 1 µl 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 µl, conteniendo 12 µl de agua estéril, 5 µl de DNA plasmídico, 2 µl 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.

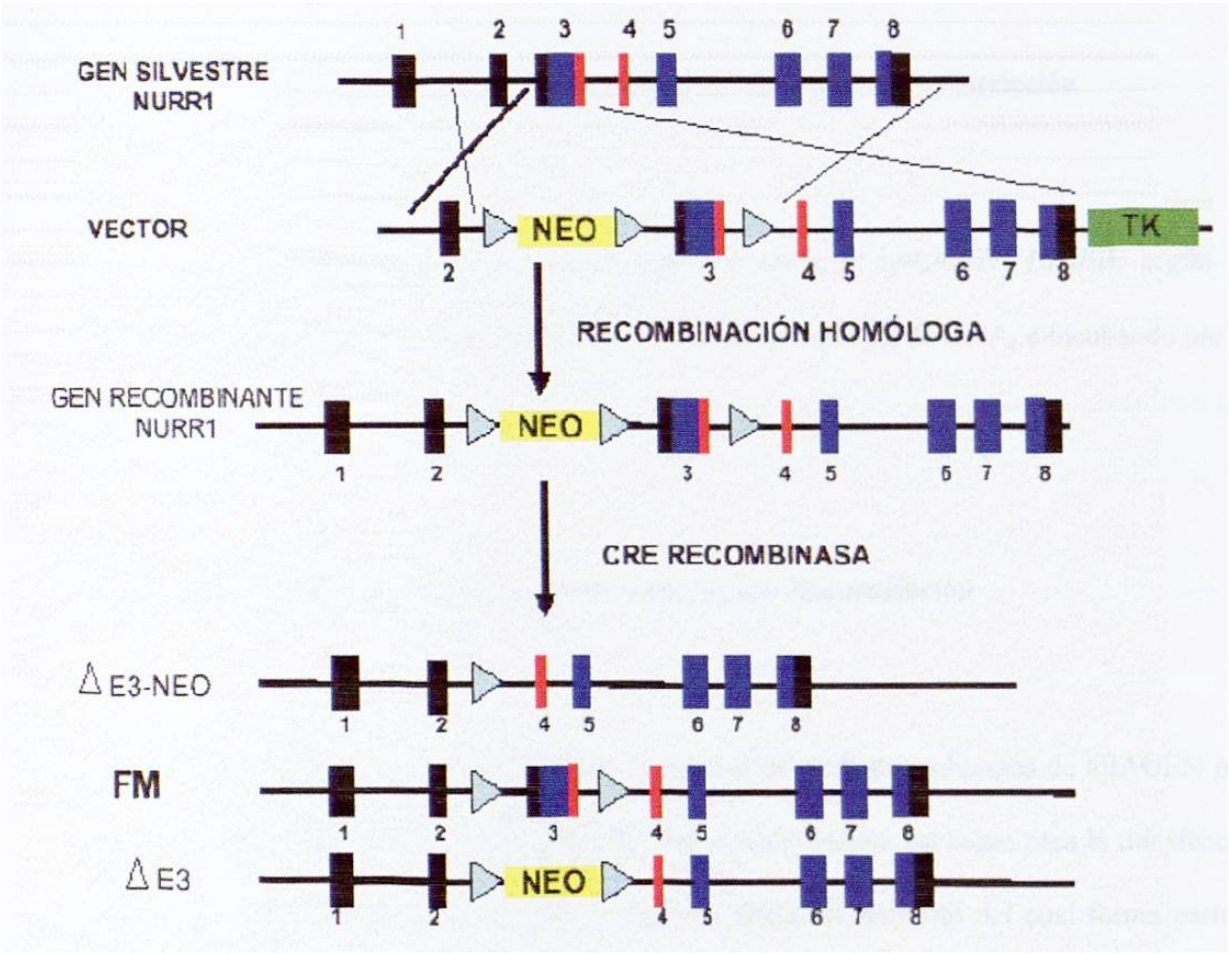

Figura 4. Esquema de recombinación homóloga del gen NURR1. Las cajas de color negro, indica exones no codificantes; las cajas de color azul, indica las regiones codificantes,; las cajas rojas, el dominio de unión a DNA,; el número, indica el exón , (TK) Timidin Cinasa; (NEO) Neomicina; (Δ E3), deleción del exón 3; (Δ E3-NEO), deleción del exón 3 del gen de resistenca 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 *Hind*III, según las condiciones de la casa comercial, utilizando 1 U de enzima por μg 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 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^R 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 deleción de 1.8 Kb del gen Neo^R 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 un 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^R, los cuales rutinariamente son utilizados en construcciones de genes recombinantes. Estos son :

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

Para los genes que no se expresan en CME de ratón, el primer tipo de gen Neo^R 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^R puede bajar significativamente el fondo proveniente de los eventos de recombinación ilegítima [81-83]. En el caso de un gen Neo^R sin promotor, la expresión de este gen, y por lo tanto el crecimiento de colonias $G418^R$, puede solamente ocurrir si está localizado enseguida de un promotor de algún gen que sea transcripcionalmente activo en CME. Para un gen Neo^R 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^R 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 $PGKNeo^R$ 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 ($PGKNeo^R$) 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).

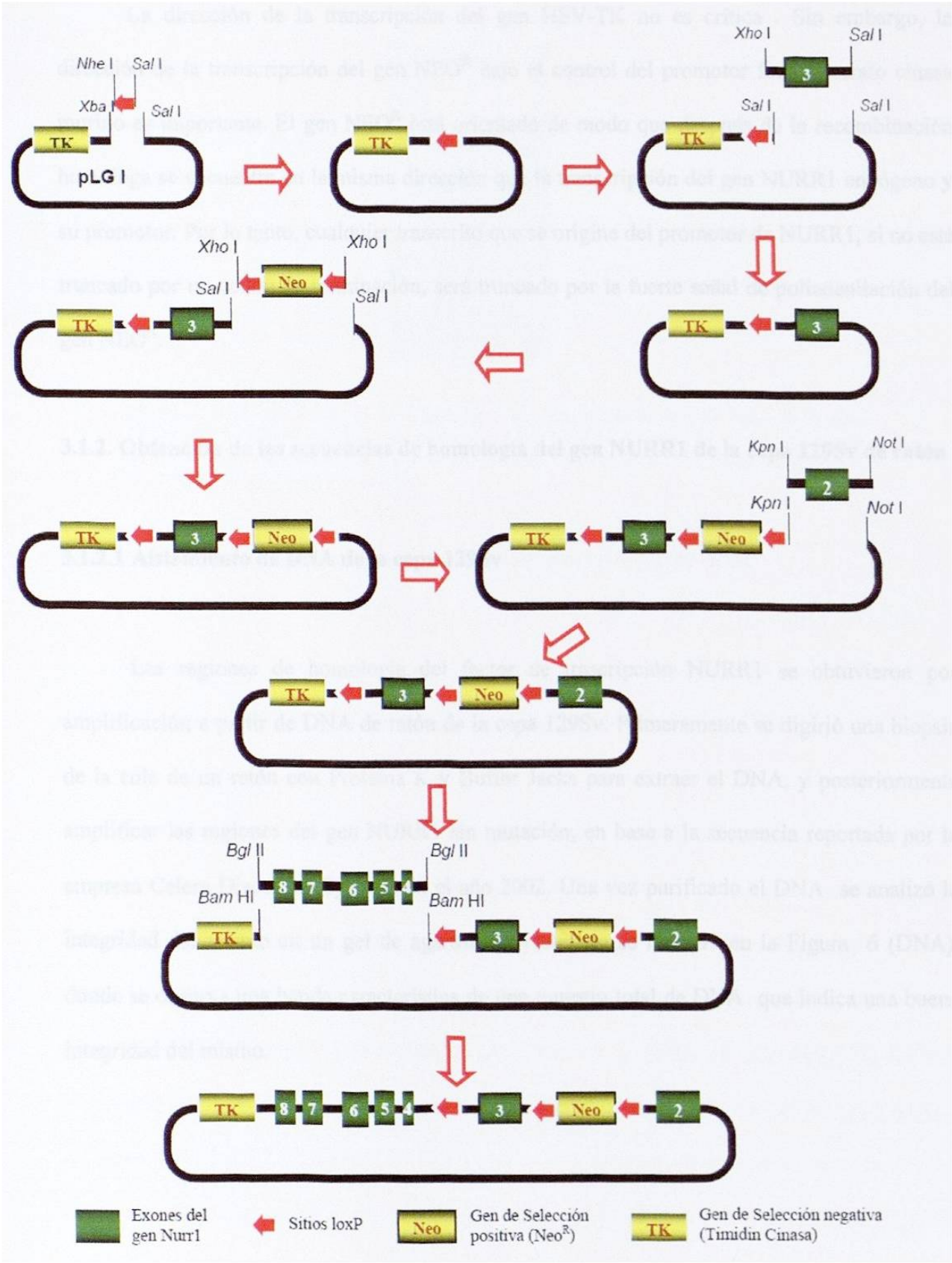

Figura 5. Estrategia utilizada para el diseño del vector de recombinación homóloga del gen NURR1. Las flechas rojas sin relleno indican el orden de los pasos de la estrategia, para generar el vector de recombinacion homóloga del gen NURR1 y las enzimas de restricción que se atizaron en cada paso.

La dirección de la transcripción del gen HSV-TK no es crítica . Sin embargo, la dirección de la transcripción del gen NEO^R bajo el control del promotor fosfoglicerato cinasa murino es importante. El gen NEO^R 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^R.

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 trascripción 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.

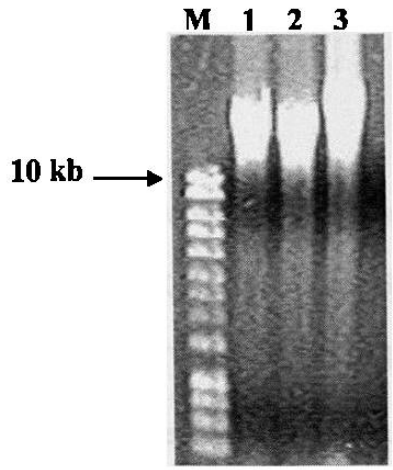

Figura 6. DNA genómico. El DNA genómico se aisló de una biopsia de ratón de la cepa 129Sv para amplificar las diferentes regiones del gen NURR1. El carril M es el marcador de peso molecular, los carriles 1, 2 y 3 muestran la banda de DNA genómico, teñida con bromuro de etidio en un gel de agarosa al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

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′ CTCTTCCACAGCCTGTGAGTAGCTG 3′) y SF3A (5′ CAACCCTGTGCCT TATAGTCACAGAGG 3′), para el exón 2 los oligonucleótidos KR2A (5′ TT<u>GGTACC</u>G ATGAGCTTCTTCTTTGAAGCTCAGG 3′), al cual se le adicionó el sitio de corte específico reconocido por la enzima de restricción *Kpn I*, y NF2A (5′ AA<u>GCGGCCGC</u>TA 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′ CC**AGATCT**ACATGTCAGAAAGACTGGTAGAGTCAGGG 3′) y BR48A (5′ CC**AGATCT**ATTCAGATGTCCTGTAAGTGACCTCC 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).

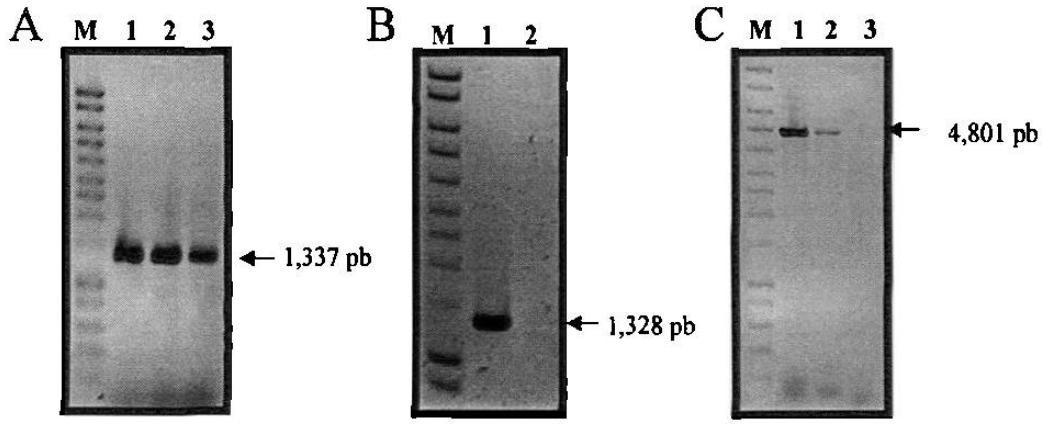

Figura 7. Amplificación del gen NURR1. El marcador de peso molecular (M) es 200 pb; **A)** En los carriles 1, 2 y 3 se muestran los productos de PCR esperados (1,337 pb) para la región del exón 2; **B)** En el carril 1 se observa el producto amplificado (1,328 pb) para la región del exón 3, y en el carril 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.