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

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

2.3.2.1 Cultivo celular

Se cultivó la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y y la línea celular MCF-7 en placas de 25cm respectivamente. El medio de cultivo utilizado fue DMEM adicionado con SFB al 10% y ampicilina-estreptomicina al 1X. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C de temperatura, 5% de CO_2 y en 95% de humedad hasta el momento de realizar los ensayos.

2.3.2.2 Transfección de las líneas celulares.

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

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

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

2.3.2.2.1 Obtención de las células transfectadas con tripsina-EDTA

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

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

2.3.2.3 Obtención del ARN total de las líneas celulares transfectadas.

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

2.3.2.3.1 RT-PCR

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

Tabla 3. RT-PCR: condiciones de reacción.

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

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

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

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

Iniciador Cre recombinasa 5′:	gcgttcgaacgcactgatttc
Iniciador Cre recombinasa 3′:	ccatcttccagcaggcgcac
Iniciador Pitx3 5′:	cacagccaccacccggagtc
Iniciador Pitx3 3′:	ctcatgtcagggtagcgattc

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

1. Desnaturalización inicial	92°C por 2 minutos
2. 35 ciclos:	
Desnaturalización	92°C por 30 segundos
Alineamiento	55°C por 30 segundos
Elongación	68°C por 1 minutos
3. Extensión prolongada	68°C por 10 minutos

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

2.3.2.4 Obtención de proteínas de las líneas celulares transfectadas.

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

2.3.2.4.1 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.

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

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

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

2.3.2.4.2 Western blot.

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

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

2.3.2.4.3 Revelado y fijación de la película aurtorradiográfica

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

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

2.3.3.1 Obtención de ADN plasmídico de las líneas celulares transfectadas.

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

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

2.3.3.2 Determinación del evento de recombinación por PCR.

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

1. Desnaturalización inicial	92°C por 2 minutos
2. 35 ciclos:	
Desnaturalización	92°C por 30 segundos
Alineamiento	60°C por 1 minuto
Elongación	72°C por 2 minutos
3. Extensión prolongada	72°C por 10 minutos

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

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Subclonación del gen de la enzima Cre recombinasa.

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

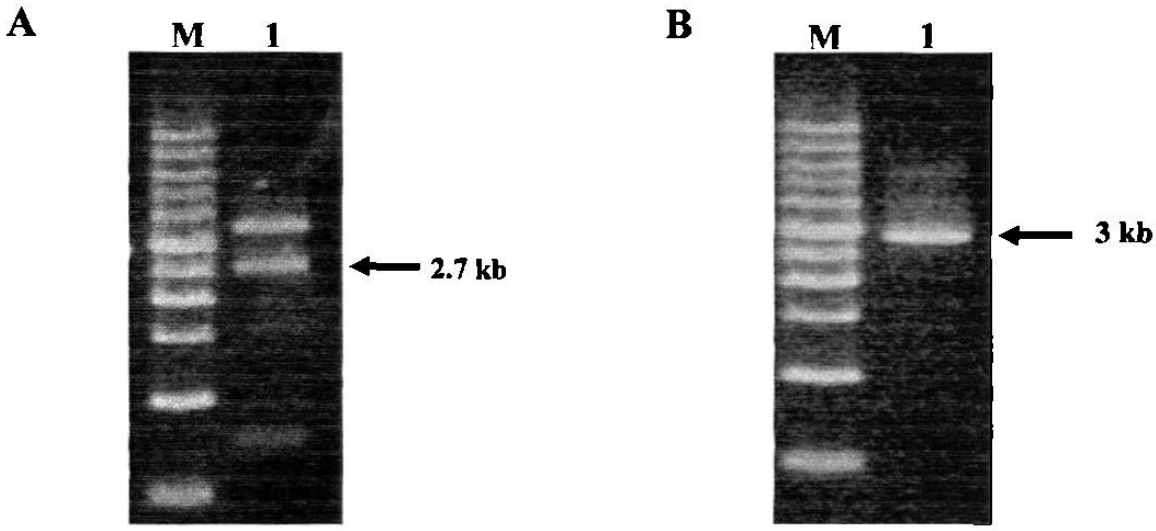

Figura 5. Digestión enzimática de los vectores pCMV-Cre y pBSKS. En A, se muestra el producto de la digestión del plásmido pCMV-Cre. La flecha indica el fragmento de 2.7 kb que corresponde al gen de la enzima Cre recombinasa. En B, la flecha señala, un fragmento de 3.0 kb que corresponde al vector pBSKS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

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

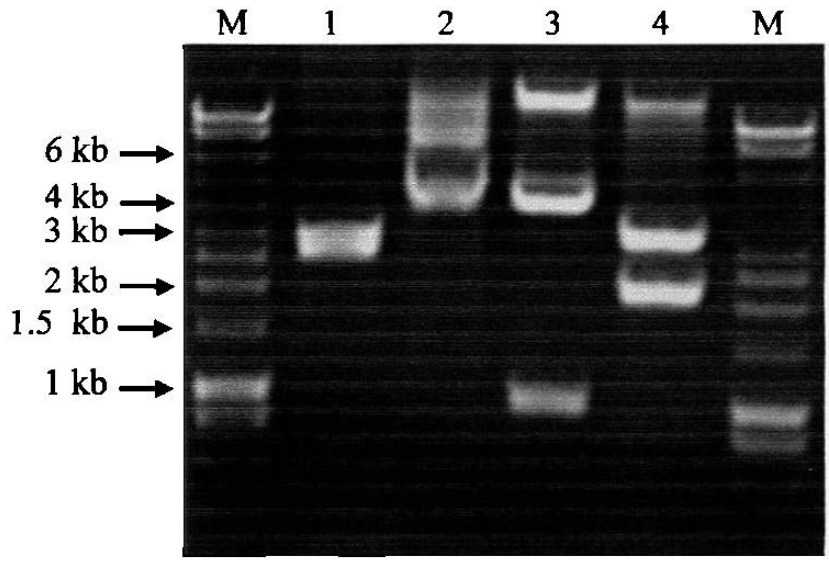

Figura 6. Caracterización enzimática del plásmido recombinante pBS-Cre. El carril 2 corresponde al ADN plasmídico sin digerir. En el carril 1, se muestra la digestión con las enzimas *Xho*I y *Hind*III que liberan un fragmento de 2.7 kb correspondiente al gen de la Cre recombinasa y un fragmento de 3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

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

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

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

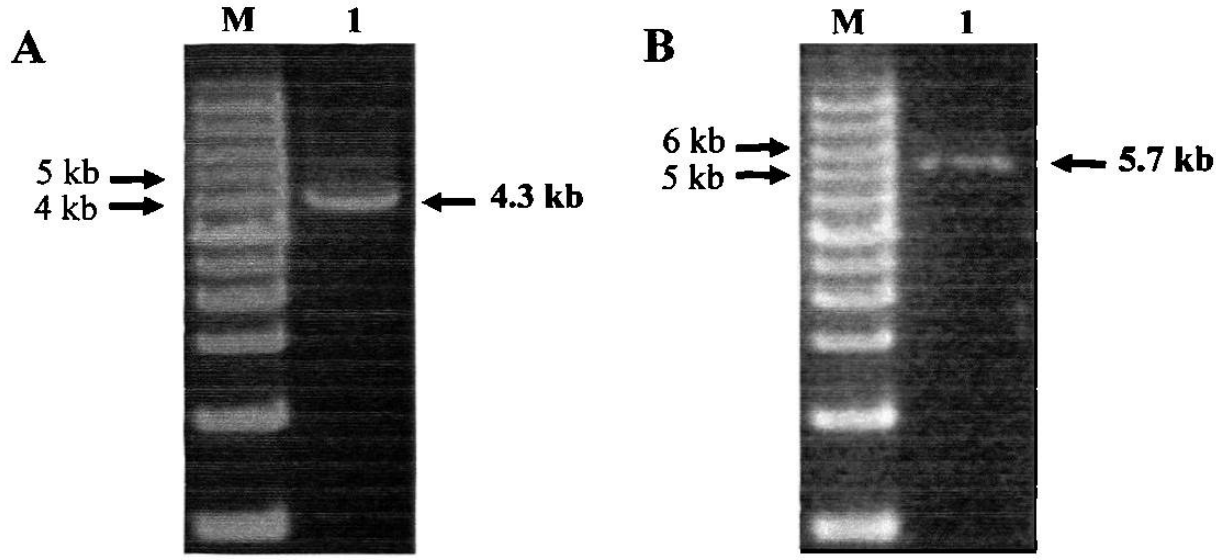

Figura 7. Amplificación de la región 5′ del gen Pitx3 y linearización del vector pBS-Cre. En **A**, se muestra en el carril número 1, el producto amplificado del gen Pitx3 indicado por la flecha. A la izquierda, el marcador de peso molecular de 1 kb. Las flechas señalan bandas del marcador de peso molecular,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

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

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

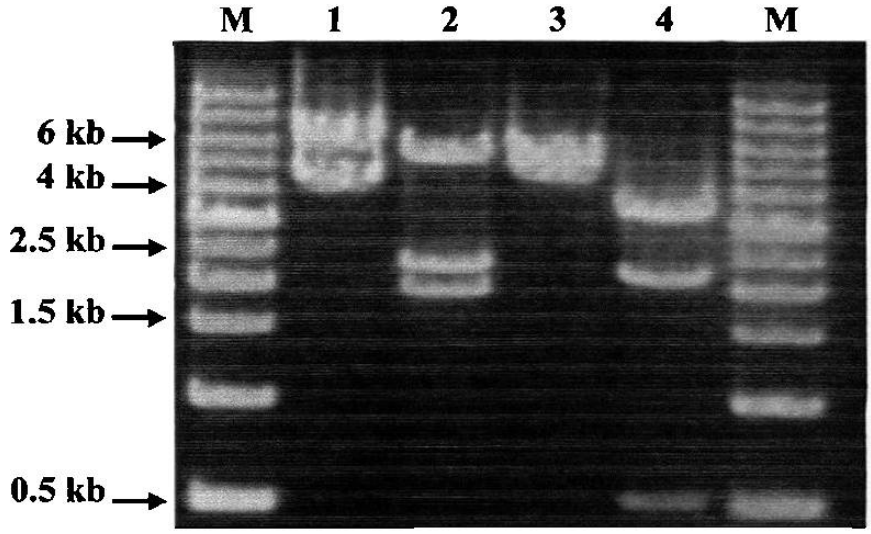

Figura 8. Caracterización enzimática del plásmido recombinante pPit-Cre. En el carril 1, se muestran los productos de 4 y 5.8 kb de la digestión del vector pPit-Cre con la enzima *Hind*III. El carril número 2 muestra la digestión que se realizó con la enzima *Eco*RV produciendo fragmentos de 2.1, 2.3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

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

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

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

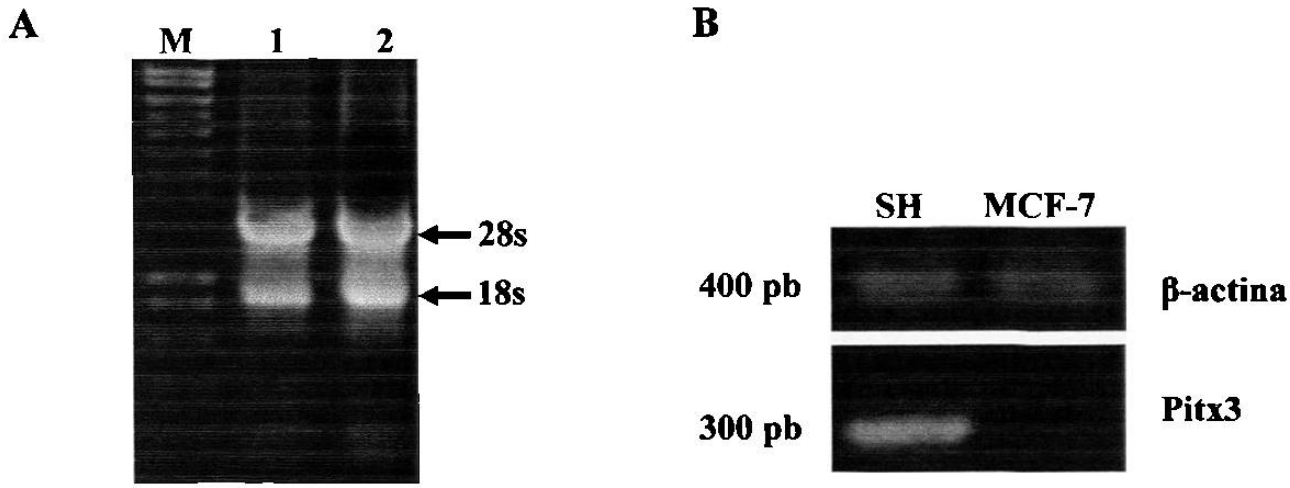

Figura 9. Expresión del gen Pitx3 en la línea celular SH. En **A,** se muestra el ARN obtenido de las líneas celulares SH (1) y MCF-7 (2). Las flechas indican las bandas de ARN 28s y 18s. **B,** Amplificación por RT-PCR del gen Pitx3 en la línea celular SH. En el carril inferior izquierdo se muestra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

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

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

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

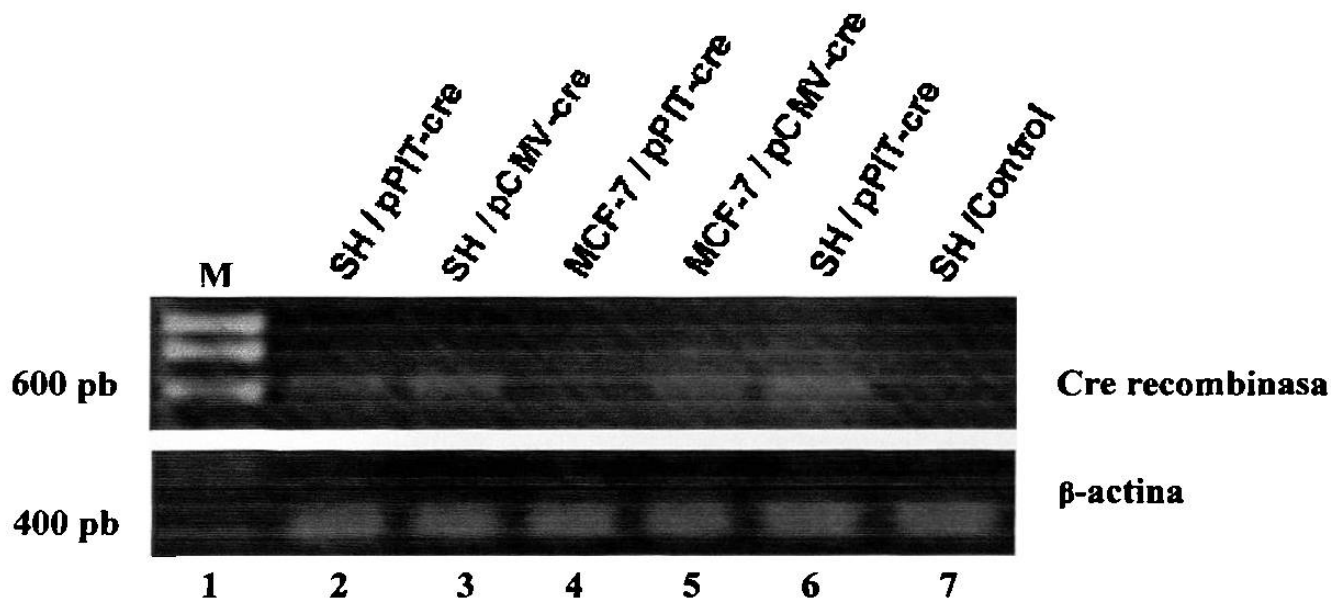

Figura 10. Expresión del gen de la Cre recombinasa. En los carriles superiores del 2 al 6 se muestra el resultado de la amplificación de un fragmento de 600 pb del gen de la Cre recombinasa mediante análisis de RT-PCR. En los carriles 2, 3, 6, y 7 se utilizó la línea celular SH. En los carriles 4 y 5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

3.5 Identificación de la enzima Cre recombinasa por Western blot.

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

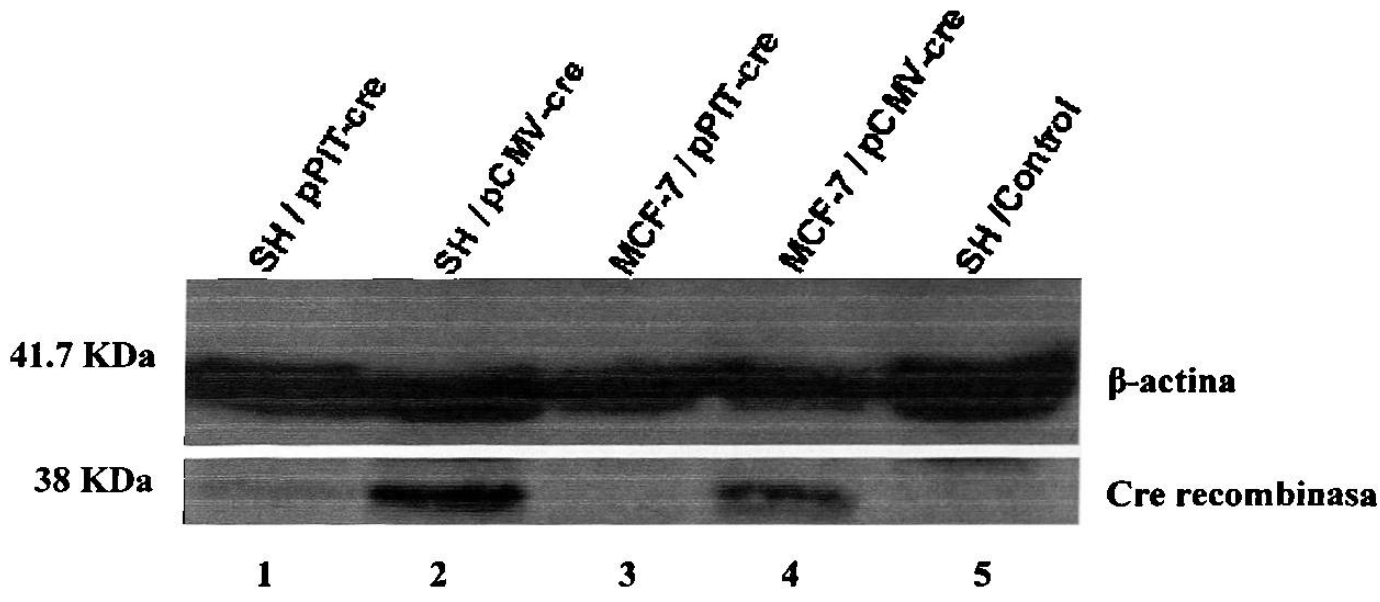

Figura 11. Identificación de la proteína Cre recombinasa mediante análisis de Western Blot. En los carriles superiores se muestra como control de carga, la detección de la proteína β-actina de 41.7 KDa. Los carriles inferiores corresponden a la detección por la técnica de Western Blot de la proteína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

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

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

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

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

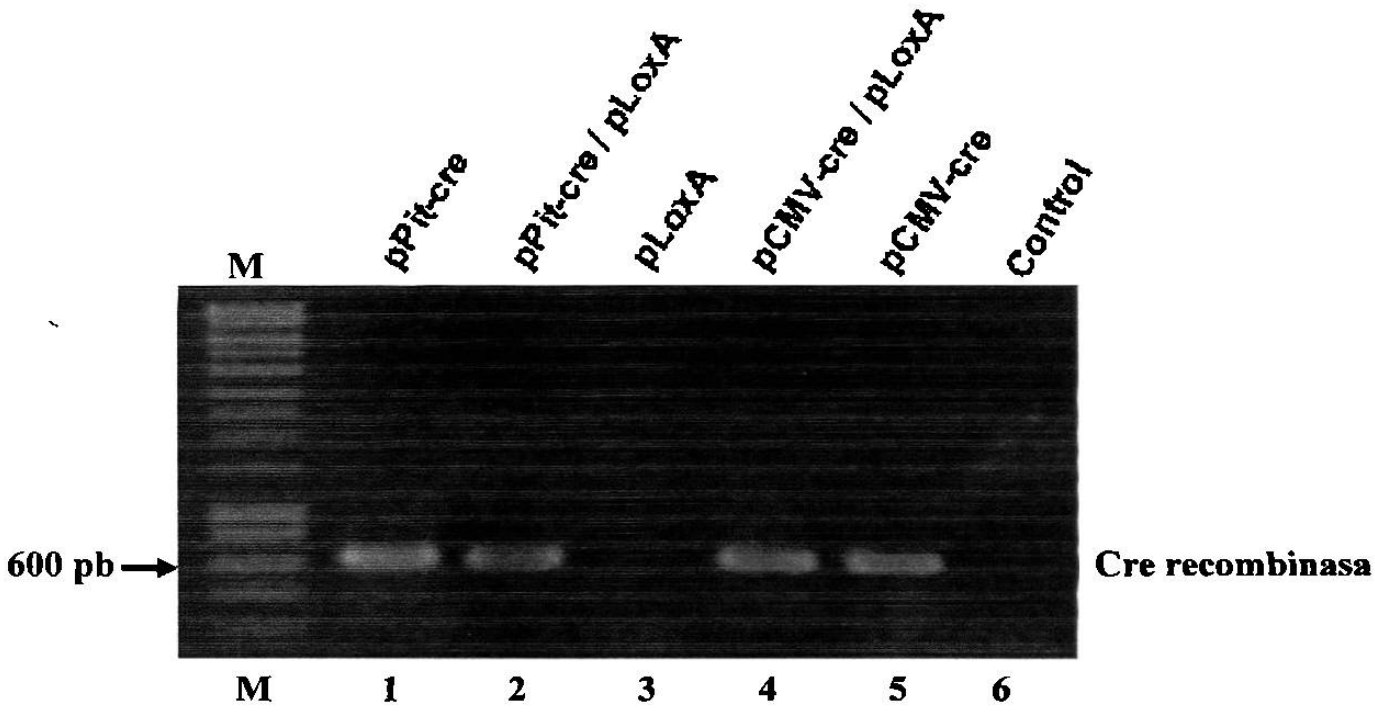

Figura 12. Amplificación del gen de la Cre recombinasa por PCR, a partir del ADN plasmídico recuperado de la transfección de la línea celular SH-SY5Y. En el carril 1, se transfectó con el plásmido pPit-Cre. En el carril 2 se hizo una co-transfección con los plásmidos pPit-Cre/pLoxA. En el carril 3 se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

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

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

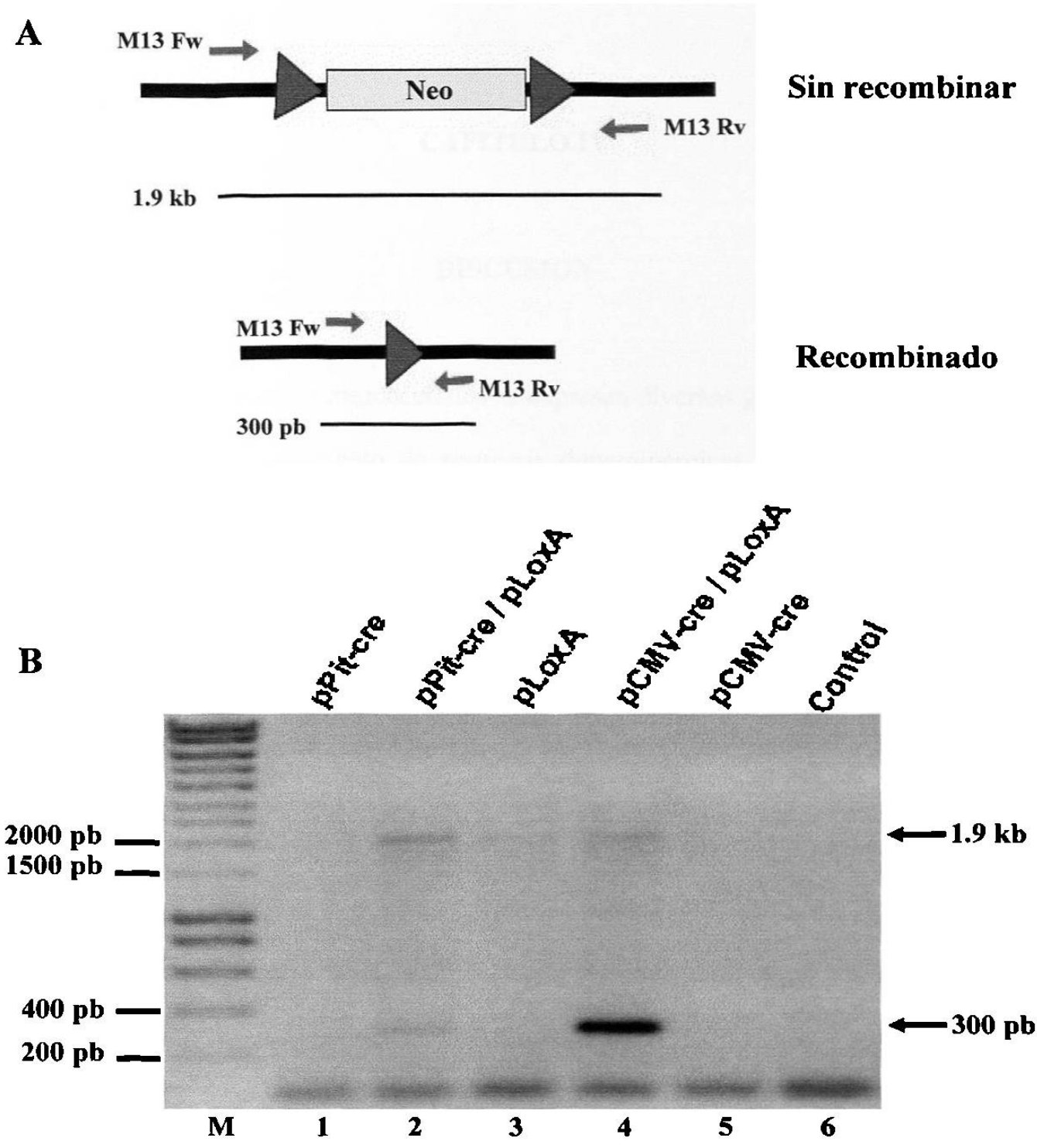

Figura 13 B. Actividad de la enzima Cre-recombinasa *in vitro*. En el carril 1 y 4 se transfectaron células de la línea SH-SY5Y con los plásmidos que expresan la enzima Cre recombinasa pPit-Cre y pCMV-Cre respectivamente. En los carriles 2 y 4 se co-transfectó con los plásmidos pPit-Cre/ pLoxA y pCMV-Cre/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

CAPITULO IV

DISCUSION

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

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

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

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

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

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

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

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

Recientemente, se ha propuesto que en la sustancia negra de la región ventral mesencefálica, existen dos poblaciones de neuronas dopaminérgicas donde los genes Pitx3 y Nurr1 regulan al gen TH de forma independiente en cada población celular [39]. Aunque algunos resultados aparentemente demostraban lo anterior, poco después se

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

Aunque la región promotora del gen Pitx3 aún no ha sido totalmente delimitada, se conoce el punto de inicio de la transcripción y algunas secuencias que identifican la región 5´ del gen Pitx3 como región promotora. También, se ha establecido que a 4.2 kb del sitio de inicio de la transcripción inicia la región promotora del gen Gbf1 cuya orientación es contraria a la del gen Pitx3.

En el 2002, se desarrolló un ratón knockout, en el que la secuencia codificante del gen Pitx3 fue sustituída por el gen de la proteína verde fluorescente, mediante recombinación homóloga[40]. En ese ratón no se modificó la región promotora del gen Pitx3 endógeno. Por lo que hasta el momento no se ha establecido a que distancia del punto de inicio de la transcripción se localiza la región promotora del gen Pitx3, ni se ha utilizado para dirigir la expresión de algún gen blanco en ensayos *in vitro.*

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

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

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

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

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

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

Como el objetivo de este trabajo, era obtener un cassette de expresión de la enzima Cre recombinasa bajo la regulación de la región promotora del gen Pitx3 y probar su eficiencia *in vitro*, se determinó si la enzima Cre recombinasa regulada por la región promotora del gen Pitx3 era funcional. Para ello, se realizaron varias co-transfecciones con los vectores pPit-Cre, pCMV-Cre y el plásmido pLoxA. Este último contiene el gen de resistencia a neomicina (Neo), flanqueado por secuencias LoxP. Los resultados demostraron la eficiencia de la enzima Cre recombinasa para recombinar las secuencias LoxP. En este ensayo, pudimos observar nuevamente que la actividad de recombinación fue menor en las transfecciones realizadas con el plásmido pPit-Cre a diferencia del plásmido pCMV-Cre. Sin embargo este resultado es favorable, ya que existen algunos reportes donde se ha visto que cuando la enzima Cre recombinasa es regulada por un promotor fuerte, aparecen alteraciones en las células donde se expresa la enzima Cre recombinasa, tales como re-arreglos cromosómicos y recombinación al azar del genoma [58-60].

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

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

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

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

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

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIONES

5.1 CONCLUSIONES

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

(1) Se clonó 4.3 kb de la región 5´ del gen Pitx3 y se demostró su funcionalidad como promotor.

(2) Este promotor mostró especificidad de expresión en células neuronales.

(3) Se obtuvo un cassette de expresión de la enzima Cre recombinasa bajo la regulación del promotor del gen Pitx3.

(4) La enzima Cre recombinasa regulada por la región 5´ del gen Pitx3 fue funcional.

5.2 CONTRIBUCIONES

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

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFÍA

1. **Burbach, J. P.**, Smits, S. & Smidt, M. P. Transcription factors in the development of midbrain dopamine neurons. Ann N Y Acad Sci 991, 61-8 (2003).

2. **Simon, H. H.**, Bhatt, L., Gherbassi, D., Sgado, P. & Alberi, L. Midbrain dopaminergic neurons: determination of their developmental fate by transcription factors. Ann N Y Acad Sci 991, 36-47 (2003).

3. **Smidt, M. P.**, Smits, S. M. & Burbach, J. P. Molecular mechanisms underlying midbrain dopamine neuron development and function. Eur J Pharmacol 480, 75-88 (2003).

4. **Blanchard, V.** et al. Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. Brain Res Mol Brain Res 22, 29-38 (1994).

5. **Lebel, M.**, Gauthier, Y., Moreau, A. & Drouin, J. Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high-affinity binding site. J Neurochem 77, 558-67 (2001).

6. **Cazorla, P.**, Smidt, M. P., O'Malley, K. L. & Burbach, J. P. A response element for the homeodomain transcription factor Ptx3 in the tyrosine hydroxylase gene promoter. J Neurochem 74, 1829-37 (2000).

7. **Smidt, M. P.** et al. A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 13305-10 (1997).

8. **Saucedo-Cardenas, O.** & Conneely, O. M. Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. J Mol Neurosci 7, 51-63 (1996).

9. **Zetterstrom, R. H.**, Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L. & Perlmann, T. Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. Mol Endocrinol 10, 1656-66 (1996).

10. **Saucedo-Cardenas, O.** et al. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 4013-8 (1998).

11. **Castillo, S. O.** et al. Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. Mol Cell Neurosci 11, 36-46 (1998).

12. **Zetterstrom, R. H.** et al. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. Science 276, 248-50 (1997).

13. **Lakso, M.** et al. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 6232-6 (1992).

14. **Orban, P. C.**, Chui, D. & Marth, J. D. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 6861-5 (1992).

15. **Abremski, K.** & Hoess, R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. J Biol Chem 259, 1509-14 (1984).

16. **Hoess, R.**, Abremski, K. & Sternberg, N. The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 49, 761-8 (1984).

17. **Hoess, R. H.** & Abremski, K. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. Proc Natl Acad Sci U S A 81, 1026-9 (1984).

18. **Sauer, B.** & Henderson, N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. Proc Natl Acad Sci U S A 85, 5166-70 (1988).

19. **Sauer, B.** Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. Methods Enzymol 225, 890-900 (1993).

20. **Hoess, R.**, Abremski, K., Irwin, S., Kendall, M. & Mack, A. DNA specificity of the Cre recombinase resides in the 25 kDa carboxyl domain of the protein. J Mol Biol 216, 873-82 (1990).

21. **Mack, A.**, Sauer, B., Abremski, K. & Hoess, R. Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site. Nucleic Acids Res 20, 4451-5 (1992).

22. **Lee, L.** & Sadowski, P. D. Sequence of the loxP site determines the order of strand exchange by the Cre recombinase. J Mol Biol 326, 397-412 (2003).

23. **Wierzbicki, A.**, Kendall, M., Abremski, K. & Hoess, R. A mutational analysis of the bacteriophage P1 recombinase Cre. J Mol Biol 195, 785-94 (1987).

24. **Guo, F.**, Gopaul, D. N. & van Duyne, G. D. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. Nature 389, 40-6 (1997).

25. **Li, Z. W.** et al. Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 6158-62 (1996).

26. **Nagy, A.** Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. Genesis 26, 99-109 (2000).

27. **Wagner, J.** et al. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. Nat Biotechnol 17, 653-9 (1999).

28. **Wang, X.** et al. Forskolin cooperating with growth factor on generation of dopaminergic neurons from human fetal mesencephalic neural progenitor cells. Neurosci Lett 362, 117-21 (2004).

29. **Zetterstrom, R. H.**, Williams, R., Perlmann, T. & Olson, L. Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. Brain Res Mol Brain Res 41, 111-20 (1996).

30. **Gage, P. J.**, Suh, H. & Camper, S. A. The bicoid-related Pitx gene family in development. Mamm Genome 10, 197-200 (1999).

31. **Semina, E. V.**, Reiter, R. S. & Murray, J. C. Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. Hum Mol Genet 6, 2109-16 (1997).

32. **Tvrdik, P.** et al. Cig30 and Pitx3 genes are arranged in a partially overlapping tail-to-tail array resulting in complementary transcripts. J Biol Chem 274, 26387-92 (1999).

33. **Rieger, D. K.**, Reichenberger, E., McLean, W., Sidow, A. & Olsen, B. R. A double-deletion mutation in the Pitx3 gene causes arrested lens development in aphakia mice. Genomics 72, 61-72 (2001).

34. **Semina, E. V.**, Murray, J. C., Reiter, R., Hrstka, R. F. & Graw, J. Deletion in the promoter region and altered expression of Pitx3 homeobox gene in aphakia mice. Hum Mol Genet 9, 1575-85 (2000).

35. **van den Munckhof, P.** et al. Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. Development 130, 2535-42 (2003).

36. **Smidt, M. P.** et al. Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. Development 131, 1145-55 (2004).

37. **Smidt, M. P.**, Smits, S. M. & Burbach, J. P. Homeobox gene Pitx3 and its role in the development of dopamine neurons of the substantia nigra. Cell Tissue Res 318, 35-43 (2004).

38. **Smits, S. M.**, Mathon, D. S., Burbach, J. P., Ramakers, G. M. & Smidt, M. P. Molecular and cellular alterations in the Pitx3-deficient midbrain dopaminergic system. Mol Cell Neurosci 30, 352-63 (2005).

39. **Maxwell, S. L.**, Ho, H. Y., Kuehner, E., Zhao, S. & Li, M. Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. Dev Biol 282, 467-79 (2005).

40. **Zhao, S.** et al. Generation of embryonic stem cells and transgenic mice expressing green fluorescence protein in midbrain dopaminergic neurons. Eur J Neurosci 19, 1133-40 (2004).

41. **Adams, D. J.** & van der Weyden, L. Are we creating problems? Negative effects of Cre recombinase. Genesis 29, 115 (2001).

42. **Hadjantonakis, A. K.**, Pirity, M. & Nagy, A. Cre recombinase mediated alterations of the mouse genome using embryonic stem cells. Methods Mol Biol 97, 101-22 (1999).

43. **Loonstra, A.** et al. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 9209-14 (2001).

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Diana Laura Castillo Carranza

Campo de Estudio: Morfología

Biografía:

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

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

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

Experiencia profesional:

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

TIPO DE ADQUISICION
DONATIVO