Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Marcelo Rubinstein
Centro de Estudios
Científicos, CECS

Profesor Copatrocinante
Dr. Federico Bátiz
Instituto de Anatomía,
Histología y Patología
Facultad de Medicina

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS COMO HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA DELECIONAR GENES EN FORMA CÉLULA-ESPECIFICA *IN VIVO*.

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de **Licenciado en Bioquímica** y al título profesional de **Bioquímico**.

HUGO ANDRÉS ROA ROJAS.

Valdivia - Chile

2008

A Rafael……

"Vive cada momento como si fuera el último de tu vida y planifica tu futuro como si fueras a vivir para siempre"

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco al Dr. Marcelo Rubinstein por permitir culminar mi formación profesional en su laboratorio y confiar a mí este proyecto el cual llego a bueno término. Quiero agradecer al equipo del laboratorio Rubinstein: Rodrigo López y Marisol Costa, y a la unidad del bioterio del CECS: Marta Treimun y David Jaime por su apoyo y buenos momentos en el laboratorio. También agradecer a los compañeros del laboratorio Young/Walz por sus consejos, sobre todo a Bredford (Bredo) Kerr y Paola Krall. Al Dr. Juan Young por facilitar la línea transgénica *Mecp2-flox*.

Quiero agradecer de forma muy especial a mí amigo y compañero de laboratorio Bredo por su gran amistad, sus muy buenas enseñanzas, y mostrarme de que la ciencia no es un trabajo ordinario más, sino un estilo de vida que se debe ser cultivado día a día.

Sobre todo quiero agradecer a mis padres Gricelda y Hugo por creer y confiar en mí, por su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida.

Quiero agradecer el amor de mi hijo, mi campeón. El espolón de mi vida, quien ha sido mi vela durante toda esta travesía, te doy las gracias por existir. Y a Constanza por estar conmigo apoyándome durante todos estos años.

A mis amigos René, Jorge y francisco por acompañarme durante todo este periodo de formación y cambios en mi vida.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. RESUMEN	1
1.1. SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Sistema de recombinación Cre-loxP	3
2.2 Sistema catecolaminérgico	8
2.3 Proopiomelanocortina	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Materiales	16
3.1.1 Reactivos	16
3.1.1.1 Reactivos de biología molecular	16
3.1.1.2 Reactivos para análisis de proteínas	16
3.1.1.3 Animales de experimentación	17
3.1.1.4 Herramientas bioinformáticas	18
3.2. Métodos	19
3.2.1 Partidores	19
3.2.2 Cuantificación de ácidos nucléicos	22
3.2.3 Purificación de BAC y DNA plasmídico, método de ebullición	23
3.2.4 Aislamiento de DNA plasmídico y BAC	23
3.2.5 Cultivo de bacterias en LB líquido y almacenamiento de clones	

bacterianos a -80ºC 24

3.2.6 Electroforesis de DNA en geles de agarosa 24

3.2.7 Extracción de DNA a partir de geles de agarosa 25

3.2.8 Ligación de fragmentos de DNA 26

3.2.9 Transformación en células competentes DH5α 27

3.2.10 Digestión de DNA con enzima de restricción 27

3.2.11 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford modificado 29

3.2.12 Análisis inmunotransferencia 29

3.2.13 Detección de la actividad de Cre por inmunohistofluorescencia 30

3.2.14 Preparación del transgén para microinyección 31

3.2.15 Técnica de micromanipulación de embriones y microinyección del transgén 32

3.2.16 Aislamiento de DNA genómico 33

3.2.17 Obtención y purificación de RNA total 34

3.2.18 Generación de cDNA a partir de RNA total (RT PCR) 34

3.2.19 Análisis de genotipificación de ratones mediante la técnica de PCR 35

3.2.20 Método de eutanasia 36

3.2.21 Perfusión cardíaca 36

3.2.22 Verificación del transgén TH-Cre 36

3.2.23 Identificación de las líneas transgénicas TH-Cre 37

3.2.24 Identificación de la actividad recombinasa de Cre por cruza

entre TH-Cre y *Mecp2-Flox* 37

3.2.25 Estudios *in silico* de secuencias conservadas para la construcción del transgén DAT-Cre 38

3.2.26 Estrategia para la construcción del transgén DAT-Cre 39

3.2.27 Purificación de transgén DAT-Cre 40

3.2.28 Identificación de las líneas transgénicas DAT-Cre 41

3.2.29 Construcción del transgén Pomc-Cre 41

3.2.30 Identificación de las líneas transgénicas Pomc-Cre 42

3.2.31 Identificación de las líneas transgénicas Rosa26 42

4 RESULTADOS 43

4.1 Recuperación del transgén TH-Cre 43

4.2 Identificación de las líneas transgénicas TH-Cre 45

4.3 Identificación de la actividad recombinasa de la proteína Cre 48

4.4 Construcción del transgén DAT-Cre 57

4.5 Purificación de transgén DAT-Cre 60

4.6 Identificación de las líneas transgénicas DAT-Cre 66

4.7 Identificación de la actividad recombinasa de la proteína Cre 68

4.8 Construcción del transgén Pomc-Cre 74

4.9 Identificación de las líneas transgénicas Pomc-Cre 79

4.10 Expresión de la proteína Cre en hipófisis y cerebro 81

5. DISCUSIÓN 86

6. BIBLIOGRAFIA 92

INDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1 5

Modelo simplificado de la interacción entre los monómeros de la proteína Cre con sitios loxP

Figura 2 7

Evento de recombinación catalizado por el sistema Cre-loxP

Figura 3 11

Representación esquemática del gen y procesos post transcripcionales de Pomc

Figura 4 44

Esquema, identificación y purificación del transgén TH-Cre

Figura 5 47

Esquema del transgén recombinante TH-Cre e identificación genotípica de las diferentes líneas transgénicas

Figura 6 49

Esquema del gen *Mecp2* y del transgén *Mecp2-Flox,* e identificación de las líneas *Mecp2-Flox* por análisis de PCR

Figura 7 50

Prueba de la actividad recombinasa de la proteína Cre en el alelo *Mecp2-flox* en líneas transgénicas TH-Cre.

Figura 8 52

Esquema del locus Rosa26 y genotipificación de los ratones

transgénicos Rosa26 por análisis de PCR

Figura 9 53

Detección de la actividad recombinante de Cre por inmunohistofluorescencia contra EGFP y TH endógeno

Figura 10 55

Inmunodetección de la proteína EGFP como reportera de la actividad recombinante de Cre

Figura 11 58

Análisis *in silico* de la secuencia promotora del gen Slc6a3

Figura 12 59

Identificación del BAC que contiene la región conservada del promotor de Slc6a3

Figura 13 62

Etapas del primer subclonamiento del transgén DAT-Cre

Figura 14 63

Etapas del segundo subclonamiento del transgén DAT-Cre

Figura 15 64

Término de la construcción del transgén DAT-Cre

Figura 16 65

Esquema, purificación y genotipificación del transgén DAT-Cre

Figura 17 69

Reporte de la actividad recombinasa de la proteína Cre en el alelo *Mecp2-flox*

Figura 18 70

Detección de la actividad recombinante de Cre por inmunohistofluorescencia

contra EGFP y DAT endógeno

Figura 19 72

Inmunodetección de la proteína EGFP como reportera de la actividad recombinante de Cre

Figura 20 75

Modelo del gen Pomc y del transgén Pomc-Cre, e identificación por PCR de las líneas Pomc-Cre

Figura 21 76

Primer subclonamiento del transgén Pomc-Cre

Figura 22 77

Término de la construcción del transgén Pomc-Cre

Figura 23 78

Purificación del transgén Pomc-Cre por actividad enzimática

Figura 24 83

Detección de la actividad recombinante de Cre por inmunohistofluorescencia contra EGFP y ACTH endógeno

Figura 25 84

Estudio de la expresión de Pomc-Cre

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1 46

Resumen del proceso de generación de las líneas transgénicas TH-Cre

Tabla 2 56

Resumen de las diferentes líneas obtenidas para el transgén TH-Cre

Tabla 3 61

Porcentaje de homología entre las regiones secuenciadas y el promotor del gen Slc6a3

Tabla 4 67

Resumen del proceso de generación de las líneas transgénicas DAT-Cre

Tabla 5 73

Resumen de las diferentes líneas obtenidas para el transgén DAT-Cre

Tabla 6 80

Resumen del proceso de generación de las líneas transgénicas Pomc-Cre

Tabla 7 85

Resumen de las diferentes líneas obtenidas para el transgén Pomc-Cre

LISTADO DE ABREVIATURAS.

ACTH: Hormona adenocorticotropina

amp: Ampicilina

BG: Ganglios Basales

BO: Bulbo Olfatorio

BSA: Albúmina sérica de bovino

BS: Tronco cerebral

CB: Cerebelo

CE: Cuerpo Estriado

Cre: Proteína causal de recombinación

CX: Corteza

DAT: Transportador de dopamina (Slc6a3)

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfatos

EDTA: Ácido etilendiaminotetra acético

EGFP: Proteína fluorescente verde incrementada

EM: Eminencia Media

EtBr: Bromuro de etidio

HJ: Estructura *holliday*

Hpc: Hipocampo

Htl: Hipotálamo

KPBS: Buffer fosfato salino de potasio

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani

Mecp2: Proteína de unión a CpG metilado 2

Mecp2-Flox: Proteína de unión CpG metilado 2, locus floxeado

NGS: Suero normal de cabra

nt: Nucleótido

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PD: Enfermedad de Parkinson

Pomc: Proopiomelanocortina

Prot. K: Proteinasa K

RBE: Elementos de unión a recombinación

RNA: Acido ribonucleico

Rosa26: Aceptor de empalme de orientación reversa 26

RT: Transcripción reversa

SN: Sustancia Nigra

SNC: Sistema nervioso central

SV40: Secuencia de poliadenilación del virus símico *vaculatum 40*

TAE: Buffer Tris-Acetato EDTA

TE: Buffer Tris-EDTA

TEL: Solución Tris-EDTA-Lisosina

Temed: NNN`, N`-tetrametilenetilendiamina

TH: Tirosina hidroxilasa

Tm: Temperatura de alineamiento

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

Tween 20: Detergente monolaurato de polioxietilen sorbitan

UI: Unidades enzimáticas internacionales

UV: Ultravioleta

α-MSH: Hormona estimulante de melanocitos α

1. RESUMEN

El sistema Cre-loxP se basa en la actividad recombinasa de la enzima Cre, permitiendo la deleción selectiva de genes cuya secuencia está flanqueada por sitios loxP. Utilizando promotores específicos la expresión de Cre puede ser dirigida a un determinado tipo celular, logrando la deleción de un gen de interés en forma célula-especifica *in vivo*. El objetivo de esta tesis es la generación de diferentes líneas de ratones transgénicos capaces de inducir en forma específica la deleción de genes en poblaciones neuronales catecolaminérgicas y en melanotropos y corticotropos hipofisiarios. Generamos tres modelos de ratones portadores de transgenes de fusión, entre promotores de genes que se expresan en neuronas catecolaminérgicas y células de la glándula hipofisiaria, con la secuencia codificante para la proteína Cre. Para la deleción de genes en neuronas catecolaminérgicas, se utilizó el promotor de tirosina hidroxilasa (TH) y el promotor del transportador de dopamina (DAT). Se obtuvieron 7 líneas transgénicas independientes de TH-Cre, mientras que la construcción DAT-Cre produjo 8 líneas. Para anular la expresión de alelos flanqueados por sitios loxP en melanotropos y corticotropos hipofisiarios se utilizó el promotor proximal del gen de proopiomelanocortina (Pomc). Se obtuvieron 14 líneas independientes de ratones transgénicos Pomc-Cre. La determinación de la especificidad celular de cada una de las líneas, se llevó a cabo a través de cruzas entre animales transgénicos TH-Cre, DAT-Cre y Pomc-Cre con animales reporteros que expresan EGFP, como consecuencia de la recombinación génica somática, sólo en aquellas células que expresan Cre (Rosa#26-stop-EGFP, Mao *et al.*, *Blood.,* 97: 324-326. 2001). En esta tesis describimos la expresión de EGFP en ratones dobles transgénicos y la selección de las líneas más útiles para estudios futuros relacionados con la deleción de genes en los tipos celulares anteriormente mencionados.

1.1. SUMMARY

The Cre-loxP system is based on the activity of the enzyme Cre recombinase that allows the gene deletion between two loxP sites. Using specific promoters, the Cre expression could be directed to specific cellular types, achieving the gene deletion in a cell-specific manner *in vivo*. The aim of this thesis is to generate different lines of transgenic mice able to induce a specific gene deletion in catecholaminergic neurons and pituitary corticotrophs and melanotrophs. Three animal models were generated carrying a transgenic fusion gene between gene promoters expressed in catecholaminergic neurons and pituitary cells, with the Cre encoding sequence. To delete genes in catecholaminergic neurons, the tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine transporter promoters were used. Seven and eight independent transgenic lines of TH-Cre and DAT-Cre were respectively obtained. To abolish the expression of floxed genes in pituitary corticotrophs and melanotrophs, the proximal promoter of proopiomelanocortin (Pomc) was used. Fourteen independent lines of Pomc-Cre transgenic mice were generated. To determine the cellular specificity of each produced transgenic line, the TH-Cre, DAT-Cre and Pomc-Cre mice were bred with a reporter mice expressing EGFP as result of somatic gene recombination only in those cells expressing Cre (Rosa#26-stop-EGFP, Mao *et al.*, *Blood.,* 97: 324-326. 2001). In this thesis we report EGFP expression in double transgenic mice and the selection of the most useful lines for further studies related with the gene expression deletion in the cellular types mentioned above.

2. INTRODUCCIÓN

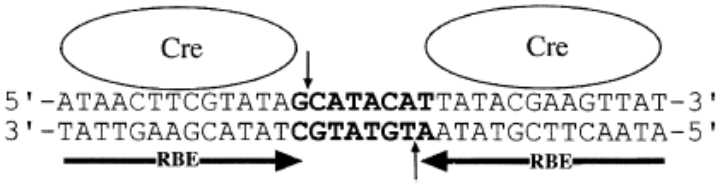
La deleción génica a través de la utilización de técnicas de genética molecular, ha permitido avanzar rápidamente en el conocimiento de la función fisiológica de una gran cantidad de genes. Sin embargo, en muchos casos la determinación de la función génica por pérdida de función requiere de la generación de alelos más complejos. Por ejemplo, no es posible estudiar la función post natal de un gen cuyo producto es esencial para el desarrollo embrionario, a menos que éste sea delecionado una vez finalizado el desarrollo o en tipos celulares específicos.

La generación de ratones mutantes condicionales mediante el uso del sistema Cre-loxP se ha convertido en una valiosa herramienta para la investigación de la función de genes en poblaciones celulares no restringidas y ampliando así el conocimiento de los mecanismos involucrados en la generación de distintas patologías.

2.1 Sistema de recombinación Cre-loxP

La enzima Cre pertenece a la familia tirosina recombinasa y su actividad enzimática es considerada como la menos compleja entre todas las enzimas pertenecientes a esta categoría. Fue aislada originalmente del bacteriófago P1 y caracterizada con un tamaño de 34 kilodaltons (kDa) (Abremski y Hoess, 1984). En el año 1985 Brian Sauer describió la implementación del sistema Cre-loxP en mecanismos de deleción molecular. Con el pasar de los años, esta tecnología ha sido implementada en la generación de ratones transgénicos y recombinantes. Su mecanismo de acción se basa en el reconocimiento de dos secuencias homologas denominadas loxP, las que son reconocidas por la enzima Cre como blanco de su actividad enzimática. Este sistema es considerado de muy baja complejidad por su viable implementación y manipulación, entre otras

características, y no requerir de proteínas accesorias a la topología específica del sustrato (Abremski y Hoess, 1985; Abremski *et al.,* 1986). Cada sitio loxP es un segmento de DNA de doble hebra con una longitud de 34 pares de bases (pb) en cuyos extremos se encuentran secuencias de 13 pb complementarias entre ellas denominadas elementos de unión de la recombinasa, RBE (del inglés *recombinase binding elements)* y flanqueantes a un segmento de 8 pb, también denominado región de cruzamiento (Ghosh y Van Duyne, 2002). La topología asimétrica de esta secuencia determina la direccionalidad del sitio loxP. Para que exista remodelamiento de la cromatina deben estar presente al menos cuatro unidades de enzima Cre, dos monómeros por cada sitio loxP (Sternberg y Hamilton, 1981), las que interactúan cooperativamente con cada una de las secuencias RBE flanqueantes a la región interna de 8 pb de loxP **(Figura 1)**. Estas unidades enzimáticas permanecen adheridas a la hebra digerida de DNA, hasta catalizar su unión con la hebra homologa producto del corte del otro sitio loxP (Hoess y Abremski, 1984).

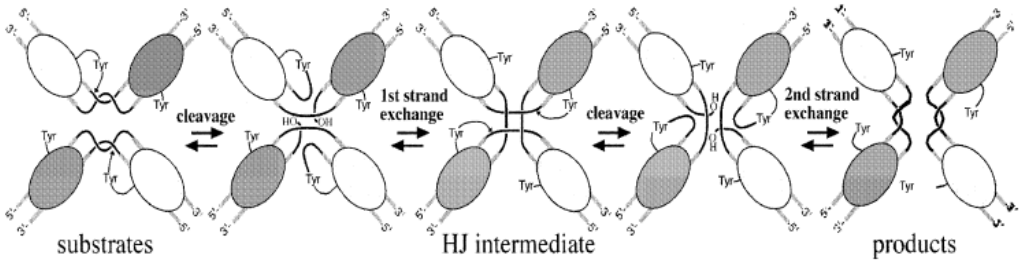


[Ghosh K. y Van Duyne G.D., 2002]

Figura 1: Modelo simplificado de la interacción entre los monómeros de la proteína Cre con sitios loxP. Cada monómero de la proteína Cre interactúa con uno de los sitios RBE, para luego catalizar la digestión sobre el primer nucleótido de la secuencia de 8 pb interna entre las secuencias RBE, señalada con flechas paralelas. Notar que las secuencias RBE son secuencias palíndromos. La secuencia interna de 8 pb se muestra en letras ennegrecidas.

El residuo aminoacídico tirosina 324 (Y324) de Cre es el responsable en la catálisis del fragmento de DNA a modificar, atacando con su grupo funcional al primer nucleótido de la secuencia de 8 pb, originando el corte de la hebra de DNA y dando como resultado un producto intermediario covalente 3'-fosfotirosina. El producto de esta reacción deja libre una unidad 5'-hidroxilo en cada hebra, las cuales atacan nucleofílicamente a su hebra complementaria formando una estructura intermediaria denominada unión *Holliday* (HJ) (del inglés *Holliday Junction*) **(figura 2)**. Después de ocurrida las uniones fosfodiéster de las hebras, las siguientes dos enzimas Cre continúan con el mismo principio de reacción enzimática terminado con la modificación de la secuencias de DNA. Esto ocurre en las dos hebras que se recombinarán o bien los dos sitios loxP de una misma hebra en donde se escinde un fragmento de DNA. El resultado de la reasociación de las diferentes hebras provoca una modificación de la secuencia de DNA (Gosh y Van Duyne, 2002). Dependiendo de la orientación que tengan las dos secuencias asimétricas de 8 pb, el fragmento de DNA de interés flanqueado por los dos sitios loxP puede escindirse o rotar (Abremski y Hoess, 1984).

Otras investigaciones desarrolladas en diferentes secuencias del DNA han identificado segmentos que pueden ser utilizados como sustratos para la enzima Cre. Estas presentan una estructura y secuencia similar a los sitios loxP. Estos segmentos han sido denominados loxR, loxB, loxL y loxA, entre otros (Sternberg *et al.*, 1981 y Hoess *et al.*, 1982). La simplicidad que caracteriza a la herramienta Cre-loxP ha favorecido su implementación y masificado su utilización en múltiples áreas de investigación, llegando a ser de gran utilidad para la generación de modelos murinos recombinantes como *knock-out* o *knock-in* derivados de células troncales, así también como para ratones transgénicos obtenidos por microinyección de construcciones moleculares en pronúcleos de cigotos murinos (Sauer, 1998).



[Ghosh K. y Van Duyne G. D., 2002]

Figura 2: Evento de recombinación catalizado por el sistema Cre-loxP. La recombinación de dos sitios loxP esta catalizada por 4 enzimas Cre. La primera reacción es catalizada por dos enzimas Cre (sin colorear), una en cada hebra y utilizando el residuo de Y324 cortan la secuencia de DNA flanqueada por los sitio RBE. Esto conforma la estructura HJ y es el producto intermedio de la catálisis de recombinación: El siguiente paso es catalizado por las otras dos enzimas Cre (ennegrecidas) las cuales están presentes en ambas hebras; éstas cortan y producen la liberación de las dos hebras de DNA dando como resultado un evento de recombinación molecular.

2.2 Sistema catecolaminérgico

El sistema nervioso central (SNC) y periférico de vertebrados se caracteriza por estar conformado por regiones compuestas de células altamente diferenciadas e individualizadas por sus funciones fisiológicas. Existen regiones del SNC que han sido blancos de extensos estudios, sin embargo sus funciones no han sido totalmente caracterizadas.

Tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima limitante en la biosíntesis de tres aminas biológicas: dopamina, norepinefrina y epinefrina, las cuales son sintetizadas a partir de L-tirosina. La actividad enzimática de TH requiere la presencia del cofactor pteridina reducido (Pt-2H), el cual es recuperado por acción de la enzima pteridina reductasa. Estas aminas actúan como neurotransmisores o neuromoduladores en variados procesos como funciones cognitivas y de la homeostasis del organismo. La expresión de TH ha sido descrita en diferentes áreas del SNC, se ha reportado en regiones catecolaminérgicas del cerebro medio como la sustancia nigra (SN) e hipotálamo (Htl) (Kelly *et al.*, 2006), en regiones del cerebro anterior como el cuerpo estriado (CE), en células dopaminérgicas periglomerulares del bulbo olfatorio (BO) anterior (Nagatsu *et al*, 1990), cerebelo (CB) (Fujii *et al*., 1994) y en otras áreas del SNC no dopaminérgicas como locus ceruleus y tronco cerebral (BS) (Kelly *et al.*, 2006). Se ha descrito la presencia de aminas biológicas en células fuera del cerebro, denominadas células catecolaminérgicas no dopaminérgicas. Estas células sintetizan norepinefrina y epinefrina desde dopamina. Estas regiones son: neuronas amacrinas de la retina, células del epitelio respiratorio y células cromafines de la médula adrenal (Kelly *et al.*, 2006).

El transportador de dopamina (DAT), codificado por el gen Slc6a3, corresponde a un tipo de transportador dependiente de Na^+ y Cl^- (Brüss *et al.*, 1999) y participa activamente en el término de la neurotransmisión dopaminérgica, recaptando dopamina al interior de los terminales

presinápticos de neuronas dopaminérgicas. Este activo transporte cumple la función de limitar la concentración del neurotransmisor en el espacio sináptico (Freed *et al*, 1995; Pardridge, 2005). La expresión de DAT ha sido reportada en rata a partir de los 14 días de desarrollo embrionario en el área tegmental ventral (VTA) del cerebro medio y los niveles de expresión aumentan a lo largo del desarrollo (Fujita *et al*, 1993). En el cerebro adulto DAT se expresa en regiones del cerebro anterior como el CE y núcleo accumbens (Acb) (Graybiel y Moratala, 1989), en regiones del cerebro medio como la SN (Freed *et al.*, 1995) y en baja cantidad en el VTA (Shimada *et al.*, 1992), núcleo arcuato (Arc) (Cerrutti *et al.*, 1993), BO y retina (Feed *et al.*, 1995). Alteraciones neurológicas son asociadas a deficiencias de la actividad de DAT, como el síndrome de Tourette, la enfermedad de Parkinson (PD) y el consumo de drogas de abuso.

Desórdenes neurodegenerativos son conocidos por sus manifestaciones crónicas y progresivas, caracterizados por una pérdida simétrica y selectiva del sistema neuronal motor, sensorial y cognitivo. Regiones del cerebro medio se relacionan a patologías neurodegenerativas producto de la pérdida de neuronas catecolaminérgicas y un anormal control de la conducta como consecuencia de la disminución de dopamina (Booij *et al.*, 2001). Se ha relacionado la función de neuronas dopaminérgicas de la SN con el desarrollo de variadas neuropatologías, entre ellas PD. Esta es una enfermedad neurodegenerativa asociada a la perdida de neuronas de la SN y como consecuencia de ésto una depleción de dopamina en el CE (Polymeropoulos *et al.*, 1996; Polymeropoulos *et al.*, 1997). La PD es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer, con una prevalencía del uno por ciento en adultos sobre los 65 años (Pardridge, 2005). Existen marcadores celulares para cada enfermedad neurodegenerativa, es así como la presencia de cuerpos de Lewy y depleción de dopamina son características de la PD (Edwards *et al*, 1998). Además, características sintomatológicas como

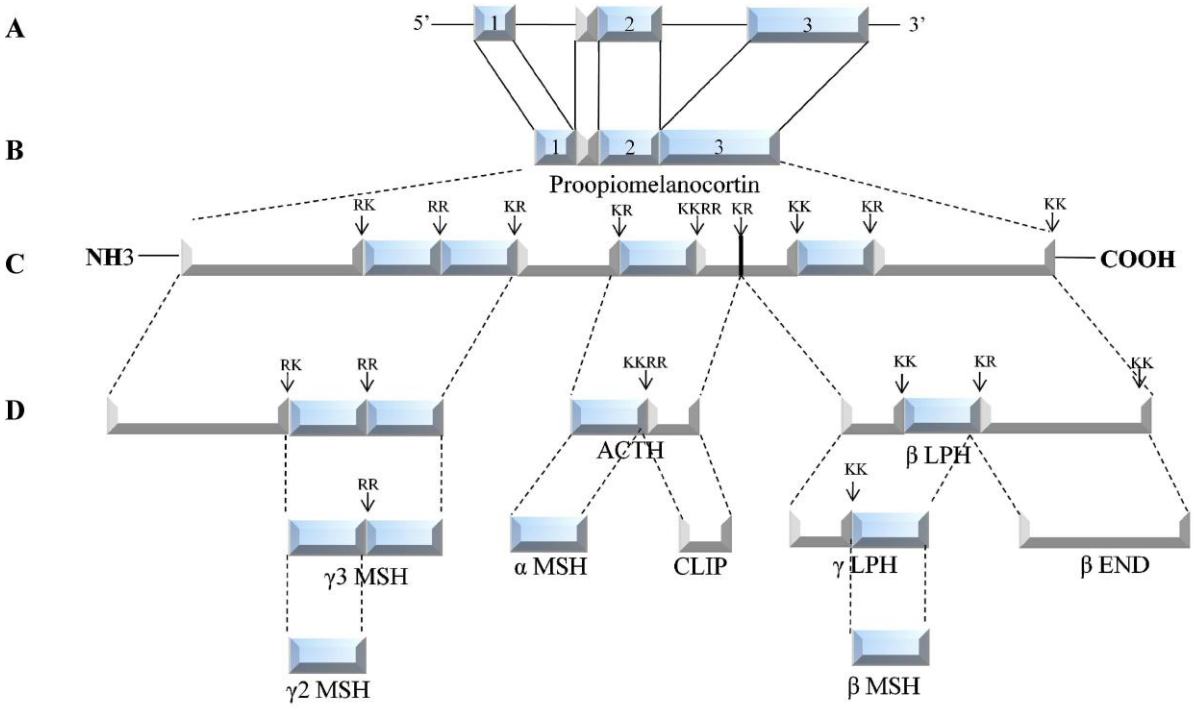
rigidez, bradiquinesia y tremor son asociadas a la pérdida celular en la SN y a la depleción de dopamina en el CE.

2.3 Proopiomelanocortina

El gen de proopiomelanocortina (Pomc) se expresa en un número limitado de tipos celulares de origen endocrino y neuronal (Smith y Funder, 1988). El transcrito de Pomc es sujeto a modificaciones post transcripcionales que dan origen a los siguientes péptidos biológicos: hormona corticotrofina (ACTH), hormona estimulante de melanocitos α (α-MSH), β-endorfina, y β- y γ-lipotrofinas (Raffin-Sanson *et al.*, 2003), además de un conjunto de péptidos derivados de modificaciones del transcrito, específicos para cada tipo celular que expresa el gen de Pomc. En el cerebro, la expresión de Pomc ha sido reportada en una población específica de neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo, el cual es responsable de la producción y liberación de ACTH y β-endorfina.

Por otra parte, la glándula hipofisiaria expresa diferentes transcriptos desde el gen de Pomc, dependiendo de su función. Este órgano ha sido subclasificado en tres regiones celulares: lóbulo neural, lóbulo intermedio y lóbulo anterior.

Pomc es transcrito en corticotropos del lóbulo anterior de la hipófisis, donde se expresa ACTH, β-endorfina y β- y γ-lipotrofinas. Esto es posible, dado que este tipo celular expresa la proteasa PC1, responsable de la proteólisis del transcrito de Pomc. En melanotropos del lóbulo intermedio se expresan otros productos del transcrito de Pomc, estos péptido son α-MSH y β-endorfina producto de la actividad proteolítica de PC1 y PC2 **(figura 3) (**Millington, 2007).



["Modificado de Millington, 2007"]

Figura 3: Representación esquemática del gen y procesos post transcripcionales de Pomc. **(A)** Estructura del gen de Pomc, compuesto por tres exones. **(B)** Transcrito de Pomc, en el exón 2 se identifica el sitio de inicio de la traducción de Pomc (cuadrante gris). **(C)** Sitios de corte de las diferentes proteasas (PC1 y PC2) sobre los aminoácidos lisinas (**K**) y argininas (**R**). **(D)** Representación de todos los péptidos posibles producidos por modificaciones post transcripcionales del transcrito de Pomc.

La expresión de Pomc ha sido reportada en ratón a partir de los 10,5 días de desarrollo embrionario en la base del diencéfalo. A los 14,5 y 16,5 días se ha detectado la expresión de Pomc en melanotropos y corticotropos de la glándula hipofisiaria, respectivamente (Japón *et al.*, 1994).

La expresión de Pomc en regiones del cerebro ha sido caracterizada a través de la identificación de dos regiones del genoma intensificadoras (del inglés *enhancer*) de la transcripción de Pomc que están conservadas entre diferentes especies, y que fueron denominadas nPE1 y nPE2. Estas secuencias permiten la expresión de Pomc en poblaciones neuronales, específicamente en el núcleo arcuato del hipotálamo (De Souza *et al.*, 2005).

Por otro lado, la expresión de Pomc en la glándula hipofisiaria es independiente de las secuencias nPE1 y nPE2 anteriormente descritas. Para la expresión de Pomc en la hipófisis de rata y ratón es necesaria la presencia de un segmento de DNA de aproximadamente 300 pb río arriba a la secuencia caja TATA (del inglés *TATA box*) (Liu *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1995). Recientes investigaciones han demostrado que un segmento de 10 pb conservado en todas las clases de vertebrados es esencial para dirigir la transcripción de Pomc en la hipófisis (Bumaschny *et al.*, 2007).

El núcleo Arc del hipotálamo expresa receptores para la hormona adipocitaria leptina (Cheung *et al.*, 1997), leptina estimula la trascripción y activación de neuronas del núcleo Arc. Por otra parte, se ha descrito la participación de los melanotropos hipotalámicos en el control de la ingesta de alimentos entre períodos de ayuna y consumo (Fan *et al.*, 1997). Estas características del sistema Pomc ha despertado interés por estudios relacionados con el control de la homeostasis y regulación del peso corporal.

La función de algunos de los diferentes péptidos derivados de Pomc en mamíferos es la respuesta a estrés. ACTH es el principal componente en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal que media la respuesta a estrés en los vertebrados (Lovejoy y Balment, 1999; Flik *et al*., 2006). Otro tipo de respuesta fisiológica al estrés, es mediada por liberación de β-endorfina en células del núcleo Arc del hipotálamo y el núcleo del tracto solitario. Este potente péptido opioide interactúa con su receptor opioide-μ induciendo un efecto analgésico posterior a una respuesta a estrés (Rubinstein *et al.*, 1996 y Schwartz *et al.*, 2000). Algunas funciones no menos importantes relacionadas a la transcripción del gen de Pomc son la regulación del comportamiento sexual, acondicionamiento y estimulo de la lactancia, ciclo reproductivo, control cardiovascular y consumo de drogas de abuso (Millington, 2006).

La construcción de ratones transgénicos como un modelo para el estudio de enfermedades humanas es una importante herramienta para entender la participación de determinadas proteínas en la fisiología de un organismo y además, evaluar la contribución de regiones no codificantes del genoma en el control de la expresión de genes. Los modelos murinos portadores del sistema Cre-loxP, permiten la generación de modelos nulos condicionales. Dada la importancia de las regiones cerebrales en donde se expresan las proteínas tirosina hidroxilasa, el transportador de dopamina y proopiomelanocortina, nuestro objetivo es expresar bajo el control de sus regiones promotoras la proteína Cre, esperando obtener una herramienta de deleción molecular sitio-especifico para modificar secuencias de DNA portadoras de sitios loxP en regiones delimitadas del SNC y la hipófisis, obteniendo como resultado un evento de recombinación de secuencias de DNA. Con el desarrollo de esta tesis esperamos generar una herramienta metodológica de estudio *in vivo,* para dilucidar la participación de estas regiones del SNC en el desarrollo de diferentes

patologías, como podrían ser el síndrome de Tourette, la PD y adicción a drogas de abuso, además de alteraciones al metabolismo energético y de respuesta a estrés.

En base a los antecedentes anteriormente descritos, planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

"Es posible dirigir la expresión específica de la enzima Cre bajo los promotores de tirosina hidroxilasa (TH) y del transportador de dopamina (DAT) en el SNC. Asimismo, el promotor proximal de Pomc permite dirigir la expresión de Cre en la glándula hipofisiaria"

Objetivo General:

Generar una herramienta molecular célula-específica de acción *in vivo,* por microinyección de las construcciones TH-Cre, DAT-Cre y Pomc-Cre para ser utilizadas como parte del sistema de deleción de genes Cre-loxP en el estudio de genes de interés.

Objetivos Específicos:

1- Utilizando un transgén TH-Cre ya existente, producir líneas de ratones transgénicos por microinyección de su construcción molecular en pronúcleos murinos (Gelman *et al*, 2003).

2- Crear un transgén en el cual la secuencia codificante del gen Cre esté bajo el control del promotor de DAT y generar ratones transgénicos por microinyección de esta construcción génica en cigotos murinos.

3- Generar un transgén en el cual la expresión de la proteína Cre esté bajo el control del promotor proximal del gen de proopiomelanocortina (Pomc-Cre) y producir ratones transgénicos portadores de esta construcción.

4- Caracterizar la expresión de Cre en las líneas transgénicas TH-Cre, DAT-Cre y Pomc-Cre a través de la cruza con ratones portadores del gen EGFP interrumpido por un sitio de término de la traducción flanqueado por sitios loxP.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

3.1.1.1 Reactivos de biología molecular

QUIAPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen), dATP (Promega), dCTP (Promega), dGTP (Promega), dTTP (Promega), 5X *Green GoTaq Reaction Buffer* (Promega), Quiaex II Gel extraction Kit (Qiagen), GeneRuler 100 pb DNA ladder (Fermentas), GeneRuler 1 kb DNA ladder (Fermentas), Lambda Mix Marker 19 (Fermentas), tampón de carga 6X DNA Loading Dye (Fermentas), Proteinasa K (Bioline), Kit de purificación de ácidos nucleicos Elutip-D Columns y Elutip-D prefilters (Whatman).

Enzimas de restricción: *Eco*RI*, Pvu*II*, Pme*I*, Pst*I*, Nhe*I, *Kpn*I, *Xba*I, *Hin*dIII, *Afi*II, *Msc*I, *Xho*I y *Pst*I (Fermentas). *Not*I y *Sal*I (New England Biolabs).

Otras enzimas: DNA Taq Polimerasa (Fermentas), T4 DNA Ligasa (New England Biolabs), Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (United States Biological), Fragmento Klenow (New England Biolabs).

Plásmidos: pBluescript SK (+/-) (fermentas), pGEMT-Easy y pGEM-7 (Promega) y TOPO (invitrogen).

3.1.1.2 Reactivos para análisis de proteínas

BioRad Protein Assay (BioRad), Precision Plus protein dual color standard (BioRad), Acrylamide/bis Acrilamyde Mix (Sigma), Inmuno-Blot PVDF membrane (BioRad), Super Signal West Femto Maximum Sensitivity (Pierce), Fluorescent Mounting Médium (Dakocytomation),

Protease Inhibitor Cocktail (Sigma), los anticuerpos primarios utilizados para inmunohistofluorescencia fueron: conejo y ratón anti-GFP (Invitrogen), ratón anti-TH (Chemicon), rata anti-DAT (Chemicon) y conejo anti-ACTH (Dr. Parlow, UCLA) y los anticuerpos secundarios fueron: Cy3 cabra anti-IgG de ratón y cabra anti-IgG de conejo (Jackson Inmunoresearch), alexa 488 burro anti-IgG de ratón y cabra anti-IgG de conejo (Invitrogen), alexa 568 cabra anti-IgG de rata (Invitrogen), para inmunotransferencia se utilizaron los anticuerpos primarios: conejo anti-β actina (Sigma) y conejo anti-GFP (Invitogen), el anticuerpos secundarios fue: cabra anti-IgG de conejo (Pierce).

3.1.1.3 Animales de experimentación

Los ratones utilizados para la obtención de las líneas transgénicas en el presente trabajo son cruza de las cepas C57BL/6J y CBA/J, el reportero Rosa26 se mantuvo en la cepa C57BL/6J, todos los ratones fueron adquiridos originalmente en Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) y luego criados en el Centro de Estudios Científicos (CECS). La línea transgénica *Mecp2-Flox* pertenecientes al Dr. J Young, se mantuvo en la cepa C57/129. Todos los animales fueron mantenidos dentro del bioterio del CECS, en condiciones SPF (Specific Patogen Free) en racks ventilados, con alimentación *ad libitum* con pellet Teklad Global 19% protein rodents diet esterilizado y ciclos de luz de 12 hrs. Su mantención, utilización y métodos de eutanasia fueron aprobados por el Comité de Ética del CECS y son acordes a los planteamientos del Comité Asesor de Bioética de CONICYT. Las carcasas fueron eliminadas en el incinerador del Hospital Regional de Valdivia.

3.1.1.4 Herramientas bioinformáticas

Se utilizaron herramientas bioinformáticas principalmente para el análisis de secuencias nucleotídicas, identificación de secuencias conservadas entre especies y diseño de partidores. Las secuencias nucleotídicas se obtuvieron desde *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov), Además, en ese sitio se utilizó la herramienta de alineamiento de secuencias BLAST (*Basic Local Alignement Tool*). Para estudios de alineamiento de secuencias se utilizó la herramienta informatica dependiente *The European Bioinformatics Institute and Genome Research Limited* (www.ensembl.org) Para el estudio de secuencias conservadas entre diferentes especies se utilizó *Evolutionary Conserved Regions Browser* (http://ecrbrowser.dcode.org) pendiente de *University of Berkeley* y la selección de los BAC se realizó desde la base de datos UCSC *Genome Bioinformatics* (http://genome.ucsc.edu/) perteneciente *University California Santa Cruz* (UCSC). Para el manejo de secuencias y construcciones de moléculas se utilizó el programa Vector NTI dependiente de *Invitrogen, The Ultimate Gateway*® (USA).

Los códigos asignados a las secuencias utilizadas son los siguientes:

- Secuencia de la proteína Cre: *GenBank* número de acceso X03453, (NCBI).
- BAC RP24-269I17, *Resources PAC Children's Hospital Oakland*.

En el caso de los partidores diseñados, se analizó su estructura, las probabilidades de formación de homodímeros y heterodímeros para cada pareja de partidores utilizada en las distintas reacciones mediante la herramienta *OligoAnalyzer* (www.idtdna.com).

3.2. Métodos

3.2.1 Partidores

TH-Cre

Los partidores usados para la amplificación del transgén TH-Cre, consistieron en un partidor sentido TH-Cre f (5'-TGG AGG GGA CTT TAT GAC AC-3', Tm de 53,7ºC) correspondiente a la región promotora de TH y un partidor antisentido Geno Cre r (5'-AGG CAA ATT TTG GTG TAC GG-3', Tm de 53,7ºC) complementario a cDNA de Cre.

DAT-Cre

Los partidores usados para la amplificación del transgén DAT-Cre, consistieron en un partidor sentido DAT-Cre f (5'-AAT GTG AAT GAG GGC TTT GG-3', Tm de 53,3ºC) correspondiente a la región promotora de DAT y un partidor antisentido Geno Cre r (5'-AGG CAA ATT TTG GTG TAC GG-3', Tm de 53,7ºC) complementario a cDNA de Cre.

Pomc-Cre

Los partidores usados para la amplificación del transgén Pomc-Cre, consistieron en un partidor sentido POMC-CRE (F) (5'-AGA GGG AAA CTG CCC ATA GCT TGT -3', Tm de 60,3ºC) correspondiente a la región del intrón 1 de Pomc y un partidor antisentido CRE HIP (R) (5'- GCC GCA TAA CCA GTG AAA CAG CAT-3', Tm de 60,3ºC) complementario a cDNA de Cre.

Pomc-Cre retrotranscripción

Los partidores empleados para la detección de la transcripción del transgén Pomc-Cre, se utilizaron el partidor sentido Pomc-Ex1-Ex2-Cre F RT (5'-AAG AGC AGT GAC TAA GAG AGG CCA-3', Tm de 59,2ºC) complementario al exón 1 y 2 de Pomc y un partidor antisentido Pomc-Cre Rb RT (5'-TCA GAA AAC GCC TGG CGA TCC- 3', Tm de 60,1ºC) complementario a la secuencia codificante para Cre.

Rosa26

Los partidores usados para la amplificación del transgén Rosa26, consistieron en un partidor sentido S3 (5'-ATC GAC TTC AAG GAG GAC G-3', Tm de 54,0ºC) correspondiente a la región codificante de la proteína fluorescente verde incrementada (EGFP) y un partidor antisentido Ptrap-LacZ (5'-TCC CAG TCA CGA CGT TGT AA-3', Tm de 56,0ºC) complementario a la secuencia codificante para LacZ.

Mecp2-Flox

Una banda reportera de 450 pb fue identifica por análisis de PCR utilizando un partidor sentido IMR 1436 (5'-GGT AAA GAC CCA TGT GAC CC-3', Tm de 53,4ºC) complementario a los nucleótidos 47535-47554 del gen para *Mecp2* (Genbank número de acceso NC 000086) y un partidor antisentido IMR 1438 (5'-GGC TTG CCA CAT GAC AA-3', Tm de 53,4ºC) correspondiente a los nucleótidos 47933-47949 de esta misma secuencia.

***Mecp2-Flox* deleción**

Una banda reportera de 370 pb fue identificada por análisis de PCR utilizando un partidor sentido IN 2 (F) (5'-AAA TTG GGT TAC ACC GCT GA-3', Tm de 54,7ºC) complementario a los nucleótidos 47700-47719 del gen para *Mecp2* (Genbank número de acceso NC 000086) y un partidor antisentido EX 4 (R) (5'-TGT CCC TAA AGG AGA ACT GGA A-3', Tm de 55,3ºC) correspondiente a los nucleótidos 51133-51154 de esta misma secuencia.

Slc6a3 Fragmento 1, 2, 3 y 4

Para la construcción de transgén DAT-Cre se levantaron 4 secuencias de DNA que conforman la secuencia de 5.1 kb del promotor de DAT. Los partidores utilizados para este procedimiento se detallan a continuación.

Los partidores usados para la amplificación del primer fragmento, consistieron en un partidor sentido 1F Slc6a3 (5'-CCA TTT GGG TCT GTC TCC-3', Tm de 52,7ºC) complementario a los nucleótidos 37993-38010 del BAC RP24-269I17 que contiene el promotor de DAT y un partidor antisentido 1R Slc6a3 (5'-TGT GCC CTC TCA CAA CCT ACA C-3', Tm de 59,0ºC) complementários a los nucleótidos 39329-29250 del BAC RP24-269I17.

Los partidores usados para la amplificación del segundo fragmento, consistieron en un partidor sentido 2F Slc6a3 (5'-ATC AGG GCC ATG GAA GAG-3', Tm de 54,3ºC) complementario a los nucleótidos 39281-39298 del BAC RP24-269I17 y un partidor antisentido 2R Slc6a3 (5'-CTG TGT GGC CAA TAT TCC TG-3', Tm de 53,6ºC) complementário a los nucleótidos 40416-40435 del BAC RP24-269I17.

Los partidores usados para la amplificación del tercer fragmento, consistieron en un partidor sentido 3F Slc6a3 (5'-CAG GAA TAT TGG CCA CAC AG-3', Tm de 53,6ºC)

complementario a los nucleótidos 40416-40435 del BAC RP24-269I17 y un partidor antisentido 3R Slc6a3 (5'-CAG AGG TAC CTG CCT GCC-3', Tm de 58,0ºC) complementário a los nucleótidos 41989-42006 del BAC RP24-269I17.

Los partidores usados para la amplificación del cuarto fragmento, consistieron en un partidor sentido 4F Slc6a3 (5'-GGC AGG CAG GTA CCT CTG-3', Tm de 58,0ºC.) complementario a los nucleótidos 41989-42006 del BAC RP24-269I17 y un partidor antisentido 4R Slc6a3 (5'-GGA AGC TTG AGG AAG TCT GTT T-3', Tm de 55,1ºC) complementário a los nucleótidos 43071-43090 del BAC RP24-269I17.

Ciclofilina A

Los partidores utilizados para identificar la secuencia genómica de ciclofilina A por análisis de PCR, amplifican una banda reportera de 270 pb. Por otro lado, estos partidores permiten identificar una banda reportera de 220 pb del cDNA de ciclofilina A. Utilizando un partidor sentido Ciclofilina A f (5´-GGC AAA TGC TGG ACC AAA CAC AA-3´, Tm de 59,0ºC) complementario a los nucleótidos 341-363 del gen para ciclofilina A de ratón (Genbank número de acceso NM 008907) y un partidor antisentido ciclofilina A r (5'-GTA AAA TGC CCG CAA GTC AAA AG-3', Tm de 55,4ºC) correspondiente a los nucleótidos 540-562 de esta misma secuencia.

3.2.2 Cuantificación de ácidos nucléicos

Para determinar la concentración de los ácidos nucléicos, éstos fueron medidos a una longitud de onda de 260 nm utilizando el espectrofotómetro RNA/DNA Calculador (GeneQuant II, Pharmacia Biotech), las muestras de DNA se prepararon a una dilución 1:40. Una unidad de

absorbancia a esta longitud de onda es igual a 50 µg/ml para DNA de doble hebra y 40 µg/ml para DNA hebra simple (Sambrook *et al.,* 2001).

3.2.3 Purificación de BAC y DNA plasmídico, método de ebullición

Se centrifugó 1,5 ml de cultivo líquido bacteriano a 13000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió por agitación con vórtex con 110 ml de solución STETL (8% sacarosa; 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 50 mM EDTA; 5% tritón X-100 y lisozima 0,5 mg/ml, añadida en el momento de usar). Luego se hirvió la suspensión a (100°C) durante 1 minuto y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo limpio y se agregó un volumen de isopropanol a temperatura ambiente, mezclando por inversión. Se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente. Luego se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y se lavó el precipitado con 0,5 ml de etanol 70%. El tubo fue centrifugado brevemente para asegurar el sedimento de DNA al tubo, el exceso de etanol se eliminó por inversión del tubo sobre papel absorbente a temperatura ambiente. Finalmente el DNA fue resuspendido en 40 µl de agua nanopura estéril.

3.2.4 Aislamiento de DNA plasmídico y BAC

El DNA del BAC y todos los plasmidos recombinantes utilizados para los experimentos realizados, fueron purificados utilizando el kit QIAPrep Spin Miniprep (Qiagen) el cual está basado en la lisis alcalina de bacterias con posterior utilización de columnas que contienen una membrana de sílica gel que une el DNA, en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas. Su posterior elución de la sílica se produce con un tampón de baja concentración de

sal. Se siguieron las instrucciones del fabricante sin modificaciones, excepto que la elución se realizó con 50 µl de agua nanopura estéril.

3.2.5 Cultivo de bacterias en LB líquido y almacenamiento de clones bacterianos a – 80ºC

Se seleccionaron para cada plásmido transformado entre 3 a 5 colonias aisladas, y fueron utilizadas para inocular 5 ml de medio Luria-Bertani (LB), todos los plasmidos presentaron resistencia al antibiótico ampicilina (Winkler) utilizado a una concentración final de 100 µg/ml. Por otro lado, el BAC presentó resistencia a cloranfenicol (USBiological) utilizado a una concentración final de 12,5 µg/ml. El cultivo se incubó por aproximadamente 12 a 16 hrs a 37°C con agitación constante (250 rpm) en incubador orbital (Stuar Scientific S150). Luego de verificar el clon correcto por análisis de digestión enzimática, se dispuso de 600 µl de este cultivo en un tubo de 1,5 ml y se le agregó 400 µl de glicerol 100% (Invitrogen) autoclavado; se mezcló y guardó a −80ºC. Todos los clones utilizados fueron resuspendidos en cultivos líquidos desde su correspondiente glicerol stock congelado.

3.2.6 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La preparación de geles de agarosa (Fermelo, Lafken), se realizó pesando la masa de agarosa necesaria para preparar un gel según el porcentaje deseado y el volumen del molde de la cámara electroforética a utilizar. La agarosa se disolvió en el volumen necesario de tampón TAE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0), esta mezcla se fundió en microondas hasta lograr una completa disolución de la agarosa, evitando la ebullición de la mezcla. Se dejó enfriando a temperatura ambiente hasta que alcanzó aproximadamente 37°C o bien hasta que la preparación no presentó gases volátiles visibles. Se agregó a la solución, dependiendo del tamaño

del gel, entre 3 a 5 µl de bromuro de etidio a una concentración 1 mg/ml (Sigma). Posteriormente se vació en el molde de acrílico de la cámara electroforética (Biojsp) y fueron montadas con sus respectivas peinetas para formar los pocillos en el gel a polimerizar. El porcentaje de agarosa del gel varió entre 0,8 a 1,5%, estas variaciones de porcentaje fueron dependiente de los tamaños de DNA separados. La separación por tamaño molecular de los fragmentos de DNA se realizó sometiendo el gel y las muestras de DNA (mezcladas con tampón de carga) a una migración electroforética de corriente a voltaje constante (entre 80-110 mV) con el mismo tampón TAE 1X de preparación del gel (Sambrook *et al*., 2001).

El tamaño de los fragmentos separados se estimó comparando las bandas obtenidas con marcadores de tamaño molecular (100 pb, 1 kb o bien Lambda 19), los cuales se cargaron en el gel junto a las muestras y controles.

Para identificar los fragmentos de DNA luego de la electroforesis, fueron visualizados por emisión de luz UV resultante de la incorporación del bromuro de etidio a la doble hebra de DNA. Todos los resultados obtenidos a partir de electroforesis en geles de agarosa fueron registrados utilizando el transluminador UV (Ultraviolet Transilluminator BioImaging Systems) acoplado a un sistema de documentación fotográfica (Gel Doc-it, Imaging System).

3.2.7 Extracción de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos aislados de DNA y empleados en experimentos posteriores, fueron separados de otros fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa. Luego, se cortó con un bisturí la banda perteneciente al fragmento de interés, visualizándolo con luz UV y procurando minimizar la exposición a esta emisión, para evitar la formación de mutaciones en la secuencia. El DNA presente en la banda de agarosa se aisló utilizando el kit Gel Extraction Kit de Qiagen,

siguiendo las instrucciones del fabricante. Este producto permitió la extracción del fragmento de interés basándose en la remoción de agarosa, colorantes y otros compuestos de la reacción enzimática presentes en el gel, mediante la adsorción cuantitativa de ácidos nucléicos a partículas de sílica gel en presencia de altas concentraciones de sales. La elución del DNA adsorbido se logra con una solución con baja concentración de sal.

3.2.8 Ligación de fragmentos de DNA

Los productos obtenidos de las digestiones enzimáticas realizadas para cada plásmido, fueron ligados utilizando los reactivos provistos por el kit (ligasa y tampón de ligación) y siguiendo las instrucciones del fabricante, sin modificaciones.

Las ligaciones de fragmentos de DNA, fueron realizadas con extremos protuberantes, romos o bien una mezcla de ambos. Se utilizaron 0,4 µl de la enzima T4 DNA Ligasa (NEB), 2 µl del tampón de la enzima, 50 ng de plásmido y la cantidad necesaria de inserto de acuerdo a la razón de inserto/plásmido calculada, determinada por la ecuación:

$$\text{X ng de inserto} = \frac{\text{ng plásmido} * \text{tamaño inserto (kb)}}{\text{tamaño plásmido (kb)}} * \frac{\text{razón inserto}}{\text{razón plásmido}}$$

Se adicionó agua nanopura estéril hasta completar un volumen final de 20 µl y se incubó a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas o bien durante toda la noche (O/N), dependiente de la complejidad de la ligación.

3.2.9 Transformación en células competentes DH5α

Una vez realizada la reacción de ligación, se transformaron con el método de shock térmico 5 µl de dicha reacción de ligación a una alícuota de 100 µl de bacterias competentes previamente descongelado. La transformación consiste en someter a las bacterias a diferentes estados de estrés por cambios de temperatura; se comenzó con el descongelamiento de la alícuota de bacterias a 4°C por 20 minutos, luego se adicionó el plásmido a la solución de bacteria y se dejó durante 30 minutos a 4°C. El segundo paso, es aplicar un shock térmico de 1 minutos a 42°C y nuevamente se dejó en hielo durante 2 minutos a 4°C, luego fueron puestas en 400 µl de medio LB sin antibiótico durante una hora y 15 minutos a 37ºC, con agitación mínima (300 rpm) para favorecer y permitir el aumento del número de bacterias. Transcurrido este tiempo, se centrifugó el tubo a 4000 rpm durante dos minutos, se eliminó la mayor cantidad de líquido, resuspendiendo las bacterias en aproximadamente 150 µl de LB sin antibiótico. Este líquido fue esparcido en placas de LB-agar con el correspondiente antibiótico a la resistencia del plásmido o BAC empleados en la transformación bacteriana. Las placas sembradas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C.

3.2.10 Digestión de DNA con enzima de restricción

Se realizaron numerosas digestiones con distintas enzimas; sin embargo, todas las reacciones fueron realizadas de la misma forma descrita más adelante. La cantidad digerida de plásmido varió dependiendo del tipo de experimento; en el caso de fragmentos de DNA para realizar procesos de ligación, se utilizaron hasta 30 µg. En el caso de digestiones para identificar productos de ligación, se utilizaron entre 1 a 3 µg de DNA. Para el primer caso se usaron hasta 30 unidades internacionales de enzima (UI), en el segundo caso, se digirió hasta con 4 UI. Se

agregaron en cada reacción una concentración final calculada de 1X del tampón específico para cada enzima, empleando la solución stock 10X. El volumen final de reacción se completó con agua nanopura estéril. Las enzimas utilizadas presentaron diferentes temperaturas óptimas de reacción. Para reacciones en las cuales era necesario utilizar diferentes temperaturas o tampones de digestión, se digirieron primero con una enzima, luego se inactivó la enzima a 65ºC por 20 minutos y se precipitó el plásmido digerido, a continuación se digirió con la segunda enzima. Las dos temperaturas óptimas empleadas fueron 30 y 37°C, el tiempo de incubación fue dependiente de la cantidad de sustrato utilizado, variando de 2 horas hasta digestiones de toda la noche.

Para productos de digestión que serían utilizados como sustratos de ligación, se les removieron los grupos fosfato de los extremo 5' del DNA, con el propósito de prevenir la religación del plásmido digerido. Para este propósito, luego de haber completado el tiempo de incubación de la digestión y previa inactivación de las enzimas de digestión utilizadas, se agregó a la solución la enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, USB Corporation, USA), la cual es activa prácticamente en todos los tampones de las enzimas de restricción y requiere una incubación de 45 minutos a 37°C. Posteriormente se inactivó por completo e irreversiblemente a 65°C por 20 minutos. A las digestiones realizadas con enzimas cohesivas que debían ser ligadas con extremos romos se procedió a realizar *Fill-in* utilizando al enzima fragmento Klenow (New England), para este procedimiento el sustrato digerido fue precipitado utilizando pasajes de alcoholes y se continuó con el procedimiento de *Fill-in*. Se siguieron las instrucciones del fabricante sin modificaciones.

3.2.11 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford modificado

La base de este método es el mismo que el método de Bradford, se utiliza la propiedad del colorante azul de Coomassie G-250 de unirse a proteínas. El colorante libre presenta un máximo de absorbancia a 465nm mientras que cuando se encuentra unido a proteínas éste presenta un λmax a 595nm.

Para obtener la concentración de proteínas de las muestras extraídas, se preparó una curva de calibración con cuatro valores de concentración del estándar de BSA: 0, 1, 5, 10 y 15 mg/ml. Se agregaron 5 µl de cada concentración de la curva o de cada muestra a 995 µl de reactivo de Bradford modificado, el cual fue diluido cinco veces. Luego se midió la absorbancia de cada muestra a 595 nm en espectrofotómetro (Génesis 5) determinando su concentración por interpolación del valor de las muestras dentro de la curva de calibración.

3.2.12 Análisis inmunotransferencia

Los diferentes tejidos fueron lisados usando 300 µl de un tampón de lísis-carga que contenía: SDS 2%, urea 2 M, glicerol 10%, 10 mM Tris pH 6.8, 0,002% azul de bromofenol, 10 mM DTT y coctel de inhibidores de proteasas (Sigma) 1:1000.

Posteriormente, se cargaron entre 40 a 60 µl de lisado en un gel de poliacrilamida y las muestras fueron sometidas a electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). A continuación fueron transferidas a una membrana PVDF por 14 horas con voltaje máximo y amperaje constante (70 y 133 mA) a 4°C. Al cabo de este período de tiempo, la membrana fue bloqueada durante 1 hora con TBS 1X, 0,1% Tween-20 y 5% de leche descremada (solución de bloqueo). Luego se incubó con el anticuerpo primario conejo anti-GFP en una dilución 1:1500 en

solución de bloqueo por 2 horas. Se lavó la membrana tres veces con una solución de lavado (TBS 1X, 0,1% Tween 20) durante 10 minutos con agitación. Se incubó por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo 1:40000 acomplejado a HRP (peroxidasa de rábano picante, Pierce). Finalmente, y luego de dos lavados de 5 minutos con solución de lavado, y un último lavado con TBS 1X, se procedió a revelar por quimioluminiscencia utilizando el kit *Super Signal West Femto Maximum Sensitivity* (Pierce), que contiene el sustrato de la enzima. Como control de carga se utilizó el anticuerpo primario anti-β-tubulina 1:2000 (Santa Cruz), se reveló con el mismo anticuerpo secundario y procesos empleados para la detección de EGFP. Las regiones cerebrales analizadas fueron: tronco Cerebral (BS); Cuerpo Estriado (CE); Hipocampo (Hpc); Cerebelo (CB); Hipotálamo (Htl); Corteza (CX); Bulbo Olfatorio (BO); Sustancia Nigra (SN).

3.2.13 Detección de la actividad de Cre por inmunohistofluorescencia

Los tejidos fueron fijados durante 6 horas post perfusión con PFA 4% (Sigma) en KPBS 1X (NaCl 0,9%, K_2HPO_4 x $3H_2O$ 16mM, KH_2PO_4 3,6mM) y puestos en sacarosa 30% (Winkler) en KPBS 1X durante toda la noche. Al siguiente día los tejidos fueron embebidos en OCT (Tissue Tek) y congelados a -20°C, para luego ser cortados en secciones coronales de 50µm de espesor en criostato Leica (Leica CM 15105-1). Los cortes fueron recolectados en solución KPBS 1X y post fijados durante 30 minutos en PFA 4% en KPBS 1X, a continuación fueron lavados 3 veces por 10 minutos con KPBS 1X y bloqueados con solución de bloqueo (con 2% NGS (Sigma) (suero normal de cabra), KPBS 1X Triton X-100 0,3% (Sigma)) durante 1 hora a temperatura ambiente. Terminado el bloqueo, se procedió a incubar con los anticuerpos primarios, ratón anti-TH 1:1000 y conejo anti-GFP 1:500 para los transgenes TH-Cre/Rosa26,

rata anti-DAT 1:1000 y conejo anti-GFP 1:500 para los transgenes DAT-Cre/Rosa26 y conejo anti-ACTH 1:500 y ratón anti-GFP 1:500 para Pomc-Cre/Rosa26, todos preparados en solución de bloqueo e incubados durante toda la noche a 4°C con agitación. Al siguiente día los cortes fueron lavados con KPBS 1X, Triton X-100 0,3%, hasta la incubación con los anticuerpos secundarios. Los anticuerpos secundarios utilizados para TH-Cre/Rosa26 fueron Cy3 cabra anti-IgG de ratón 1:500 (Jackson Inmunoresearch) y alexa 488 cabra anti-IgG de conejo Invitrogen (Molecular Probes) 1:500, para DAT-Cre/Rosa26 se utilizaron los anticuerpos alexa 568 cabra anti-IgG de rata Invitrogen (Molecular Probes) y alexa 488 cabra anti-IgG de conejo Invitrogen (Molecular Probes) 1:500 y para Pomc-Cre/Rosa26 se utilizaron los anticuerpos Cy3 cabra anti-IgG de conejo 1:500 (Jackson Inmunoresearch) y alexa 488 burro anti-IgG de ratón y cabra anti-IgG de conejo Invitrogen (Molecular Probes) 1:500. Todos los anticuerpos secundarios fueron preparados en KPBS 1X Triton X-100 0,3%, he incubados durante toda la noche a 4°C con agitación y cubiertos con papel aluminio, para evitar el contacto con luz. Al siguiente día los cortes fueron lavados dos veces con KPBS 1X Triton X-100 0,3% y una vez con KPBS 1X en agitación, cubiertos de la luz. Finalmente los cortes fueron montados en *Microscope Slides* 25.4 x 76.2 mm (Hirschmann Laborgerate) utilizando el medio de montaje *Dako Fluorescent Mounting Médium* (Dakocytomation) y protegidos con cubre objetos de 24 x 50 mm (Hirschmann Laborgerate).

3.2.14 Preparación del transgén para microinyección

Una vez digerido el plásmido que contiene el fragmento del transgén a microinyectar, fue sometido a electroforesis en gel de agarosa y posteriormente purificado utilizando el kit de extracción de agarosa Gel Extraction Kit de Qiagen.

Luego el DNA del transgén fue purificado en solución con columnas y prefiltros Elutip-D (Whatman), método basado en la utilización de columnas que contienen una matriz similar a la resina RPC-5, en donde el DNA se une en condiciones de baja concentración de sal y es eluído con una solución con alta concentración de sal. De esta manera se logró una purificación más exhaustiva y se obtuvo el transgén con el pH necesario para la microinyección. Para ésto se siguieron sin modificaciones las instrucciones del fabricante.

3.2.15 Técnica de micromanipulación de embriones y microinyección del transgén

La microinyección del transgén fue llevada a cabo por personal especializado del CECS en la instalación específica para este efecto ubicada en la zona SPF del bioterio.

A continuación se describe el protocolo general utilizado en el laboratorio de microinyección perteneciente al bioterio del CECS para la generación de ratones transgénicos:

- Se realizó una incisión entre el ovario y el oviducto y otra entre el útero y el oviducto con el fin de liberar el oviducto.

- El oviducto fue transferido a una placa de administración de gonadotrofinas para la obtención de hembras superovuladas.

- De modo intraperitoneal, se inyectó, 0,1 ml de una solución de PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotrophin*, 50 UI/ml) a cada hembra híbrida (C57B6/6J x CBAF1) de 4-5 semanas de edad.

- Luego de 46 horas se volvió a inyectar a cada hembra, esta vez con 0,1 ml de una solución de hCG (*human Chorionic Gonadotrophin*, 50 UI/ml) y se pusieron en apareo con un macho reproductor.

- Luego se recuperaron las cigotas de las hembras superovuladas, para ello se revisó la presencia de tapón vaginal, signo de copulación. Se sacrificaron y se procedió a colectar varios oviductos en una misma placa. A partir de éstos se liberaron las cigotas.

- La microinyección fue realizada entonces en el pronúcleo masculino de las cigotas, las que posteriormente fueron transferidas al oviducto de hembras seudopreñadas. Para obtener hembras seudopreñadas se puso en apareo, la noche anterior a la recolección de cigotas, a hembras jóvenes (entre 6-9 semanas) con machos vasectomizados. A la mañana siguiente se seleccionaron las hembras con tapón vaginal, las que por la tarde fueron anestesiadas para ser transferidas. Se descargó aproximadamente 10 a 15 embriones por oviducto. Las crías se obtienen 21 días después de la transferencia.

3.2.16 Aislamiento de DNA genómico

La obtención de DNA genómico de ratón se realizó a partir de biopsias de cola de aproximadamente 0,5 cm, obtenidas a los 14 días de vida. Cada trozo de cola fue incubado en 500 µl de TEL (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 100 mM NaCl y 0,5% SDS) y 20 µl de proteinasa K 10 mg/ml durante 12 horas a 55°C con agitación constante a 600 rpm. Esta solución de incubación permite la desintegración del tejido y deja intacto el DNA. Luego de la incubación, el homogeneizado fue centrifugado durante 10 minutos a máxima velocidad. El sobrenadante fue mezclado con un volumen de etanol 100% para precipitar el DNA.

Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm, el sobrenadante fue eliminado, se lavó el sedimento de DNA con etanol 70% y se volvió a centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm; luego se eliminó el sobrenadante y se dejó secando el sedimento durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente el DNA fue resuspendido en 150 µl de TE (10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) e incubado a 50°C durante 2 horas en agitación para lograr la total disolución. El DNA en suspensión fue almacenado a -20°C hasta ser analizado.

3.2.17 Obtención y purificación de RNA total

Para obtener RNA libre de DNA genómico, se purificó a partir de tejidos homogeneizados en Trizol (Invitrogen) siguiendo sin modificaciones el protocolo recomendado por el fabricante. El RNA purificado fue cuantificado y se verificó que su razón A260/A280 fuera cercana a 2. La integridad del RNA total obtenido, se comprobó corriendo una alícuota de la muestra en un gel de agarosa al 1%. Una vez verificada la calidad del RNA se continuó con la síntesis de cDNA mediante la técnica de RT-PCR.

3.2.18 Generación de cDNA a partir de RNA total (RT PCR)

Del RNA total purificado, se utilizaron 500 ng (para RT-PCR semicuantitativa) para la reacción de síntesis de DNA complementario (cDNA). Para esto se empleó el *kit Affinity Script Multi Temperature de Promega*, siguiendo el protocolo del fabricante y utilizando los parámetros de ciclado recomendados para el producto.

Se verificó la síntesis de cDNA mediante PCR utilizando los partidores de ciclofilina A. Estos partidores hibridan en los exones 5 y 6 del gen Ciclofilina A de ratón.

3.2.19 Análisis de genotipificación de ratones mediante la técnica de PCR

Para identificar a los ratones que incorporaron el transgén, una muestra de su DNA genómico fue analizado por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se realizaron seis reacciones por separado, para detectar los transgenes TH-Cre, DAT-Cre, Pomc-Cre, el reportero Rosa26, *Mecp2-Flox* y *Mecp2-Flox* delecionado.

Las reacciones de PCR para detectar a los transgenes se realizaron en un termociclador (MJ research PT-200), utilizando el siguiente esquema estándar de ramplas de temperaturas de touchdown:

1- Denaturalización del DNA a 94°C por 5 minutos.

2- Denaturalización del DNA a 94°C por 30 segundos.

3- Unión de los partidores al DNA molde, con una Tm 7,5°C superior a la Tm específica de reacción para cada par de partidores, por 30 segundos.

4- Disminución de la temperatura de alineamiento de -0,5°C, durante 5 ciclos.

5- Polimerización y extensión de los fragmentos a amplificar por la polimerasa a 72°C por 30 segundos.

6- Repetición de la curva de temperaturas desde el paso 2 al 5 durante 5 ciclos.

7- Denaturalización del DNA a 94°C por 30 segundos.

8- Unión de los partidores al DNA molde, 5ºC superior a la Tm específica de cada par de partidores, por 30 segundos.

9- Polimerización y extensión de los fragmentos a amplificar por la polimerasa a 72°C por 30 segundos.

10- Repetición de la curva de temperaturas desde el paso 7 al paso 9 durante 25 a 30 ciclos, como se estime conveniente para cada reacción en particular.

11- Finalmente al programa se da término con una extensión de la polimerasa de 5 minutos a 72°C. Para asegurar la completa polimerización de los productos amplificados.

3.2.20 Método de eutanasia

La técnica de eutanasia de ratones utilizada durante el desarrollo de este trabajo fue la de dislocación cervical o anestesia general seguida de perfusión cardíaca. Animales genotipificados como silvestres fueron eliminados según las normas del bioterio, aprobadas por la comisión de manejo de animales del CECS.

3.2.21 Perfusión cardíaca

Los animales fueron anestesiados con avertina al 2% (Sigma). El anestésico fue suministrado vía intraperitoneal, previo al pesaje de los ejemplares usando una balanza electrónica (OHAUS CS200), en una relación de 0,5 ml del anestésico por cada 20 g. Luego fueron perfundidos por el corazón a través del ventrículo izquierdo, aplicando 10 ml del tampón KPBS 1X, luego por inyección ventricular se procedió a fijar el tejido con 10 ml de PFA 4%.

3.2.22 Verificación del transgén TH-Cre

Para verificar la construcción del transgén TH-Cre se realizó un análisis de restricción al plásmido pBTH-Cre empleando las enzimas *Not*I que corta al 3’ de la secuencia de Cre y *Eco*RV dentro de Cre, como productos de digestión se obtienen los fragmentos 0,75 kb liberado de la

secuencia de Cre y 12,65 kb correspondiente al resto del plásmido. Luego de identificar la construcción del transgén de TH-Cre se procedió a purificar la construcción TH-Cre desde el plásmido pBTH-Cre, para luego ser microinyectado en pronúcleos masculinos de cigotas murinos. El proceso de purificación del transgén se realizó utilizando las enzimas de restricción *Sal*I al 5' y *Not*I al 3'de la construcción. Como producto de digestión se obtuvo una banda de 10,5 kb correspondiente al transgén y un fragmento de 2,9 kb del plásmido. El fragmento lineal de DNA de 10,5 kb, se compone desde el promotor de tirosina hidroxilasa hasta la secuencia de poliadenilación del virus SV40.

3.2.23 Identificación de las líneas transgénicas TH-Cre

Para identificar las diferentes líneas transgénicas obtenidas por microinyección de la construcción TH-Cre en cigotos murinos, se realizó genotipificación mediante PCR. La estrategia diseñada comprende una pareja de partidores que identifica únicamente al transgén. El partidor sentido TH-Cre f de 20 bases homólogo a la secuencia promotora de tirosina hidroxilasa y un partidor antisentido Geno Cre r de 20 bases homólogo a la secuencia codificante de la proteína Cre. De esta manera, el producto de PCR obtenido para un ratón transgénico es de 600 pb.

3.2.24 Identificación de la actividad recombinasa de Cre por cruza entre TH-Cre y *Mecp2-Flox*

Para determinar la actividad recombinasa de la proteína Cre se realizaron cruzas entre transgénicos F_1 de TH-Cre y animales portadores de un gen que contiene la inserción de dos sitios loxP flanqueando al tercer exón del gen *Mecp2* (*Mecp2-Flox*). Para la identificación de las líneas transgénicas *Mecp2-Flox* se realizó genotipificación por PCR utilizando un juego de

partidores que permiten la identificación de un fragmento de 420 pb para los animales *Mecp2* y 500 pb para los animales transgénicos *Mecp2-Flox*. Los partidores son complementarios a las regiones 5' y 3' flanqueantes al segundo sitio loxP de *Mecp2-Flox*. La verificación de la actividad recombinasa de Cre se realizó utilizando DNA extraído de animales portadores de los transgenes TH-Cre y *Mecp2-Flox* (TH-Cre / *Mecp2 – Flox*) mediante análisis de PCR. Los partidores utilizados son complementarios al intrón 2 y exón 4 del gen *Mecp2*. Las muestras de DNA utilizado para verificar la actividad recombinasa de Cre fueron disectadas de las siguientes áreas del cerebro: Cuerpo Estriado (CE), Sustancia Nigra (SN) y Cerebelo (CB), en donde se expresa la proteína endógena tirosina hidroxilasa. Por el contrario en donde no se expresa la proteína tirosina hidroxilasa se utilizo tejido de Corteza (CX).

3.2.25 Estudios *in silico* de secuencias conservadas para la construcción del transgén DAT-Cre

Los estudios *in silico* de regiones conservadas flanqueantes al gen Slc6a3 que codifica para la proteína DAT, se realizaron entre diferentes especies utilizando la herramienta *Evolutionary Conserved Regions Browser* (http://ecrbrowser.dcode.org) pertenecientes a la Universidad de Berkeley (USA). De este estudio informático se consideró como secuencia promotora una región de 5 kb flanqueante al gen Slc6a3. El BAC (RP24-269I17) utilizado en la construcción del transgén DAT-Cre fue seleccionado desde la base de datos UCSC *Genome Bioinformatics* (http://genome.ucsc.edu/) perteneciente a la Universidad de California Santa Cruz (UCSC) y adquirido desde BAC *Resources PAC Children's Hospital Oakland, California*.

3.2.26 Estrategia para la construcción del transgén DAT-Cre

La estrategia empleada para la construcción del transgén DAT-Cre, consistió en obtener la secuencia de 5,1 kb por 4 reacciones de PCR independientes desde el BAC RP24-269I17. Utilizando los 4 juegos de partidores descritos para Slc6a3, el primer paso fue subclonar los cuatro fragmentos obtenidos por PCR en el plásmido pGEM-T Easy. Estos fragmentos de DNA fueron obtenidos de tal forma que conservan regiones homólogas entre su fragmento contiguo, es decir el fragmento 1 se solapa con el fragmento 2, el fragmento 2 con el fragmento 3 y el fragmento 3 con el fragmento 4. Además se consideró dejar en sus extremos secuencias para enzimas de restricción de corte único para subclonar los fragmentos en los diferentes pasos de la estrategia de construcción. El fragmento 4 en su extremo 3' presenta un segmento de la secuencia del primer exón de Slc6a3, que se extiende hasta antes del codón de inicio de la traducción.

Luego de subclonar las 4 secuencias de DNA en el pGEM-T Easy, obtenidas desde el BAC RP24-269I17, se comprobó la conservación de secuencia por secuenciación (Macrogen INC, Corea del Sur), los fragmentos levantados debido a su extensión, fueron secuenciados en ambos sentidos utilizando partidores universales para los promotores SP6 y T7 presentes en pGEM-T Easy, las regiones centrales de ambas secuenciaciones se solapan, de esta forma se puede construir el fragmento completo utilizando la herramienta Vector NTI de Invitrogen.

Luego se subclonó el fragmento 1 de 1,3 kb desde el plásmido pGEM-T Easy al plásmido pGEM-7, digiriendo a ambos con la enzima *Eco*RI al 5' como al 3', a continuación el fragmento 4 de una tamaño de 1,1 kb se subclonó al 3' del fragmento 1 utilizando las enzimas *Kpn*I y *Hin*dIII, ambas enzimas cortan en ambos plasmidos. Como resultado se obtiene un plásmido con las secuencias consecutivas del fragmento 1 y 4. El siguiente paso consiste en un subclonado múltiple, de las secuencias 2 y 3 con un tamaño de 1.1 kb y 1.6 kb respectivamente, dentro de la

ligación de los fragmentos 1 y 4. Para ésto se utilizaron las enzimas *Afi*I al 5' y *Msc*I al 3' para el fragmento 2 y las enzimas *Msc*I al 5' y *Kpn*I al 3' para el fragmento 3, el plásmido 1-4 se digirió con las enzimas *Afi*I y *Kpn*I, el resultado permite obtener la completa secuencia del promotor de DAT de un tamaño de 5,1 kb.

A continuación el plásmido 1-2-3-4 fue subclonado río arriba a la secuencia codificante de la proteína Cre en el plásmido pBCre, para esto se realizó al plásmido 1-2-3-4 digestión con *Hin*dIII y *fill-in* al 3' de la secuencia promotora 1-2-3-4, luego fue liberada la secuencia por digestión al 5' del fragmento 1 con *Xho*I. Por otro lado, el plásmido pBCre fue digerido con *Pst*I al 5' de la secuencia de Cre y se realizó *fill-in*, luego se digirió con la enzima *Xho*I al 3' del plásmido linealizado. Luego el fragmento del promotor de DAT fue ligado al plásmido pBCre linealizado.

3.2.27 Purificación de transgén DAT-Cre

El proceso de purificación del transgén DAT-Cre desde el plásmido pDAT-Cre se realizó utilizando las enzimas de restricción *Xho*I al 5' y *Not*I al 3'. Esta construcción genómica está formada por la secuencia promotora de 5.1 kb de ratón, que controla la expresión del transportador de dopamina y río abajo a esta secuencia se encuentra el cDNA codificante de la proteína Cre de 1.4 kb, con la secuencias incorporada de poliadenilación del virus SV40. El resultado de la digestión permite obtener un fragmento lineal de DNA de 6.4 kb, que abarca desde el promotor del transportador de dopamina hasta la secuencia de poliadenilación del virus SV40.

3.2.28 Identificación de las líneas transgénicas DAT-Cre

Para identificar las diferentes líneas transgénicas obtenidas como resultados de la microinyección de la construcción DAT-Cre en cigotos murinos, se realizó genotipificación por PCR. Se utilizó como molde de la reacción, DNA genómico extraído de biopsias de cola. La estrategia diseñada para genotipificar los animales portadores del transgén DAT-Cre, comprende una pareja de partidores que identifica únicamente al transgén. El partidor sentido DAT-Cre f de 20 bases homólogo a la secuencia promotora del transportador de dopamina y un partidor antisentido geno Cre r de 20 bases homólogo a la secuencia codificante de la proteína Cre. De esta manera, el producto de PCR obtenido para un ratón transgénico es de 400 pb.

3.2.29 Construcción del transgén Pomc-Cre

La construcción de Pomc-Cre se realizó subclonando la proteína Cre dentro del exón 2 de Pomc, río arriba al sitio $^{+}1$ de inicio de la traducción de la proteína Pomc, para esto se linealizó el plásmido pEX2 que contiene el exón 2 de Pomc con la enzima *Stu*I, por otra parte, la proteína Cre se subclonó desde el plásmido pBCre al plásmido TOPO utilizando los enzimas *EcoR*I al 5' y *Not*I al 3'. A continuación se subclonó la secuencia de Cre desde el plásmido TOPO-Cre al plásmido pEX2, dentro del exón 2 de Pomc, para este paso se utilizaron las enzimas *Pme*I al 5' y *Pvu*II al 3' de Cre. Por último se sustituyo un fragmento 2.8 kb del plásmido pHAL que contiene al exón 2 de Pomc sin modificar, por un fragmento de 3.8 kb del plásmido pEX2 que contiene al exón 2 de Pomc modificado por la inserción de la proteína Cre utilizando las enzimas *Nhe*I al 5' y *Kpn*I al 3' del exón 2 de Pomc.

3.2.30 Identificación de las líneas transgénicas Pomc-Cre

Para identificar las diferentes líneas transgénicas obtenidas como resultados de la microinyección de la construcción Pomc-Cre en cigotos murinos, se realizó genotipificación mediante PCR. Se utilizó como molde de la reacción, DNA genómico extraído de biopsias de cola. La estrategia diseñada para genotipificar los animales F_0 como su descendencia, comprende una pareja de partidores que identifica únicamente al transgén. El partidor sentido POMC-CRE HIP de 24 bases homólogo al intrón 1 de Pomc y un partidor antisentido CRE HIP de 24 bases homólogo a la secuencia codificante de la proteína Cre. De esta manera, el producto de PCR obtenido para un ratón transgénico es de 670 pb.

3.2.31 Identificación de las líneas transgénicas Rosa26

Para identificar la línea transgénica Rosa26 se realizó genotipificación mediante PCR. Se utilizó como molde DNA genómico de cola. La estrategia diseñada para genotipificar los animales, comprende una pareja de partidores que identifica únicamente al transgén. El partidor sentido S3 de 24 bases homólogo a la secuencia codificante para EGFP y un partidor antisentido Ptrap lacZ de 24 bases homólogo a la secuencia codificante de la proteína LacZ. De esta manera, el producto de PCR obtenido para un ratón transgénico es de 670 pb.

4 RESULTADOS

4.1 Recuperación del transgén TH-Cre

Con el propósito de obtener ratones transgénicos que expresen la proteína Cre en neuronas dopaminérgicas del SNC, se utilizó una construcción formada por 9 kb de la región 5' flanqueante del gen de tirosina hidroxilasa de rata seguido del gen que codifica para la proteína Cre del bacteriófago P1 (GenBank número de acceso X03453). Este gen cuenta con una señal de localización nuclear en el extremo terminal y con una secuencia de poliadenilación del virus *simian vacuolating 40* (SV40) en el extremo 3'. **(Figura 4A)**. Este plásmido ya existía en el laboratorio y es el mismo que se utilizó para generar la línea de ratones transgénicos TH-Cre reportada en Gelman *et al*., (2003). Debido a que esta línea dejó de expresar el transgén aproximadamente a mediados del 2006, decidimos producir líneas transgénicas nuevas.

La verificación de la construcción del transgén TH-Cre se realizó mediante un análisis de restricción al plásmido pBTH-Cre. Empleando las enzimas *Eco*RV y *Not*I se obtuvo un fragmento de 0.75 kb que contiene las secuencias de Cre y otro de 12.65 kb correspondiente al vector plasmídico **(Figura 4B)**. El transgén fue preparado utilizando las enzimas de restricción *Not*I y *Sal*I, permitiendo minimizar la cantidad de DNA plasmídico en el transgén. El resultado de la digestión permitió obtener un fragmento lineal de DNA de 10.5 kb **(Figura 4C)**, que incluye desde el promotor de tirosina hidroxilasa hasta la secuencia de poliadenilación del virus SV40. La microinyección pronuclear se realizó de acuerdo a lo descrito anteriormente en la sección Materiales y Métodos.

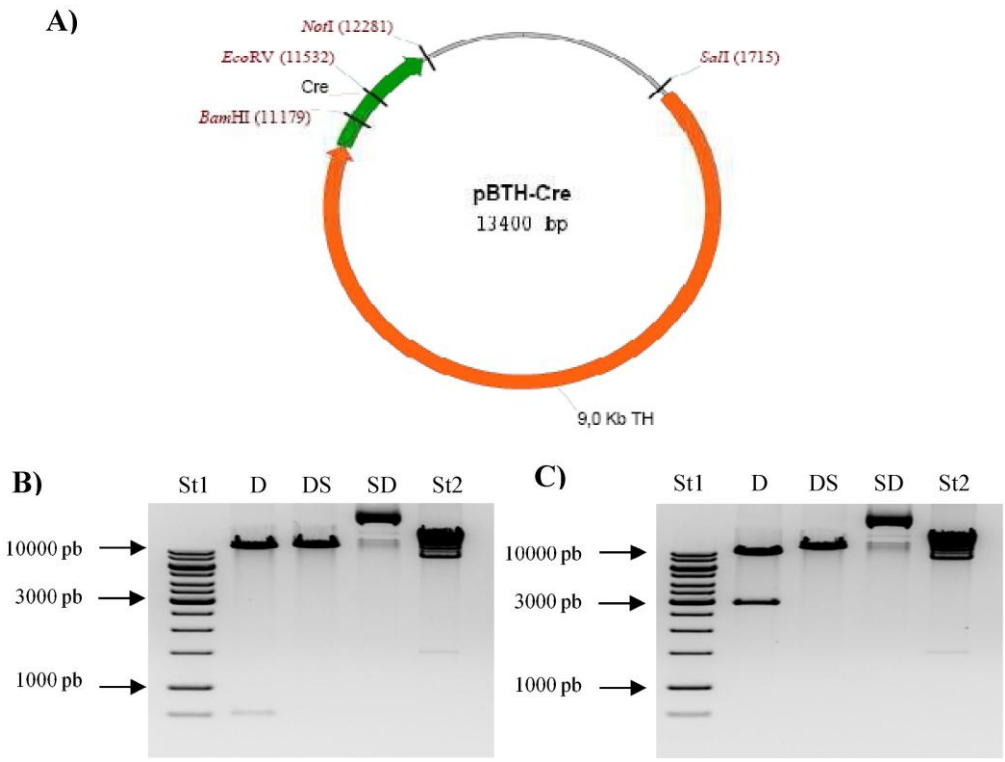


Figura 4: Esquema, identificación y purificación del transgén TH-Cre. A) Construcción del transgén TH-Cre. Con un tamaño de 10,5 kb, en color anaranjado se señalan los 9 kb del promotor de tirosina hidroxilasa y en verde los 1,4 kb de Cre. **B)** Identificación de la construcción TH-Cre utilizando la enzima *Not*I al extremo 3' de la construcción y *Eco*RV dentro de la secuencia de Cre liberando un fragmento de 750 pb. Digestión del plásmido con *Not*I y *Eco*RV, (D); plásmido linealizado con *Eco*RV, (DS); sin digerir, (SD); estándar de 1 kb, (St1) y estándar Lambda mix 19, (St2). **C)** Purificación de transgén TH-Cre para su microinyección, utilizando las enzimas *Sal*I al 5' y *Not*I al 3' desde el plásmido pBTH-Cre. Digestión del plásmido con *Not*I y *Sal*I, (D); plásmido linealizado con *Sal*I, (DS); sin digerir, (SD); estándar de 1 kb, (St1) y estándar Lambda 19 (St2).

4.2 Identificación de las líneas transgénicas TH-Cre

Se microinyectaron 212 cigotos de genética híbrida B6CBF2 (C57BL/6J x CBA/J), que fueron transferidos a 8 hembras receptoras. Luego del periodo de gestación nacieron 35 crías, las cuales fueron genotipificadas mediante análisis de PCR **(Tabla 1)**. Se utilizó DNA genómico extraído de biopsias de cola como molde. La reacción de PCR permitió la identificación de una banda de 600 pb que incluye parte del transgén formado por un fragmento de la secuencia promotora de TH y parte de la secuencia codificante para Cre **(Figura 5)**.

Del total de crías nacidas, se identificaron siete crías positivas para la incorporación del transgén TH-Cre, cada una de ellas constituyó una línea transgénica independiente, denominada según el número de identificación del ratón fundador. Para expandir cada una de estas líneas, los ratones fundadores fueron apareados con ratones B6CBF1. Las camadas nacidas a partir de estas cruzas corresponden a la generación F_1, que fueron utilizadas para los análisis posteriores.

N° de cigotos microinyectados	N° de hembras receptoras	N° de crías nacidas	N° de ratones transgénicos	% de ratones transgénicos
212	8	35	7	20

Tabla 1. Resumen del proceso de generación de las líneas transgénicas TH-Cre. Se transfirieron 212 cigotos microinyectados con el transgén linearizado a 8 hembras seudopreñadas; de éstas nacieron 35 crías, de las cuales el 20 % resultaron ser ratones transgénicos.

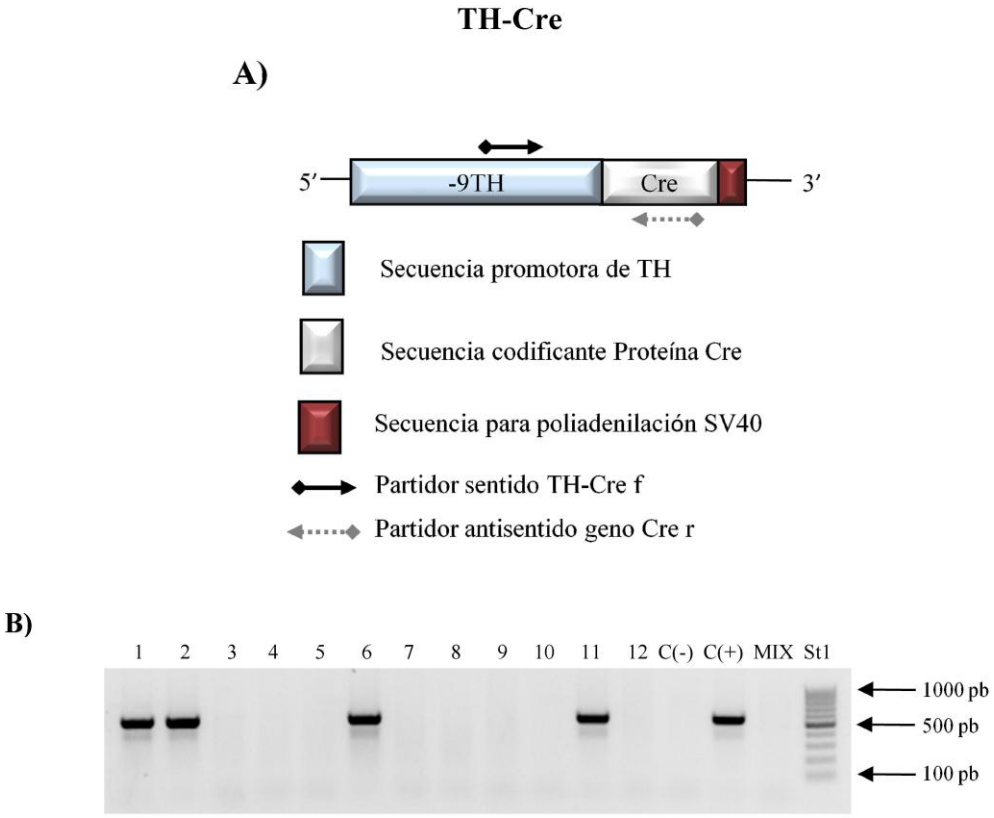


Figura 5: Esquema del transgén recombinante TH-Cre e identificación genotípica de las diferentes líneas transgénicas. A) Estructura simplificada del transgén microinyectado TH-Cre. En el esquema se indica la posición de los partidores empleados (no ha escala) para la genotipificación de los animales. El partidor sentido TH-Cre f es complementario al promotor del transgén TH-Cre, el partidor antisentido geno Cre r es complementario a la secuencia del cDNA de Cre. **B)** Genotipificación de ratones transgénicos TH-Cre, en los carriles 1, 2, 6 y 11 se puede distinguir un fragmento de amplificación de 600 pb correspondiente a la banda esperada para el transgén TH-Cre, ésta amplificación se correlaciona a la banda amplificada en el control positivo (C(+)) de igual tamaño, en los otros carriles no se identificó ninguna banda, indicando la inexistencia del transgén. Control negativo, C(-); control positivo, C(+); mezcla de reacción, MIX y estándar de 100 pb, (St).

4.3 Identificación de la actividad recombinasa de la proteína Cre

Para determinar la actividad recombinasa de la proteína Cre se realizaron cruzas entre transgénicos F_1 de TH-Cre y animales portadores de un gen que contiene la inserción de dos sitios loxP flanqueando el exón 3 que codifica para los dominios funcionales de la proteína *Mecp2* (*Mecp2-Flox*) **(Figura 6A)**. Para identificar la línea transgénica *Mecp2-Flox* se realizó análisis de PCR empleando partidores que flanquean al segundo sitio loxP presente en *Mecp2-Flox* **(Figura 6B)**. La verificación de la actividad recombinasa de Cre se realizó utilizando DNA extraído de animales portadores de los transgenes TH-Cre y *Mecp2-Flox* (TH-Cre / *Mecp2 – Flox*) mediante análisis de PCR. Los partidores utilizados son complementarios al intrón 2 y exón 4 del gen *Mecp2* **(Figura 6A)**. Estos partidores amplifican un fragmento de 3.4 kb. Si la recombinación de los sitios loxP ha ocurrido producto de la recombinación inducida por Cre, el fragmento amplificado será de 370 pb, debido a la escisión de un fragmento de 3.03 kb **(Figura 7)**. Los cerebros de los animales TH-Cre / *Mecp2-Flox* fueron disectados en distintas áreas. Los resultados de los análisis de PCR mostraron que existió recombinación de los sitios loxP en áreas del cerebro como el CE, SN y CB, y por lo tanto se debería observar expresión de Cre. Sin embargo, también se observó recombinación de los sitos loxP en áreas del cerebro donde no se expresa TH como en la CX **(Figura 7)**. Estos resultados fueron obtenidos en animales de las líneas transgénicas 808 y 816. En animales de las líneas transgénicas 822, 824 y 836 no se observó actividad reportera de Cre; y por lo tanto animales de estas líneas transgénicas fueron descartados para experimentos posteriores.

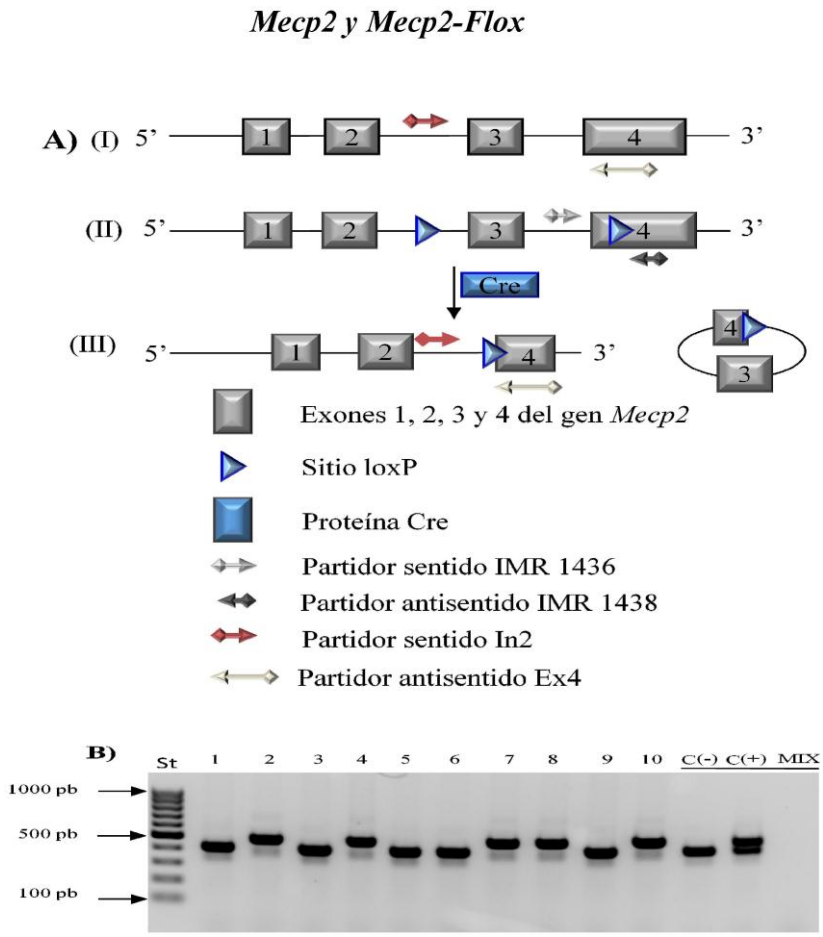


Figura 6: Esquema del gen *Mecp2* y del transgén *Mecp2-Flox,* e identificación de las líneas *Mecp2-Flox* por análisis de PCR. A) Estructura del gen *Mecp2* nativo (I), y modificado por la incorporación de sitios loxP por recombinación homóloga (*Mecp2-flox*) (II). Evento de recombinación por la enzima Cre sobre los sitios loxP en la secuencia *Mecp2-Flox* (III). **B)** Genotipificación de ratones *Mecp2-Flox*. Dependiendo del tamaño de la banda amplificada, 500 pb para el transgén *Mecp2-flox* que incluye un sitio loxP (carriles 2, 4, 7, 8 y 10) y 420 pb para el gen *Mecp2* no modificado (carriles 1, 3, 5, 6 y 9). Los partidores (no ha escala) son complementarios a regiones flanqueantes a la segunda secuencias loxP de *Mecp2-Flox*. Control negativo animal silvestre, C(-); control positivo animal portador de un alelo *Mecp2-Flox* y el segundo alelo *Mecp2* nativo, C(+); mezcla de la reacción, MIX y estándar 100 pb, (St).

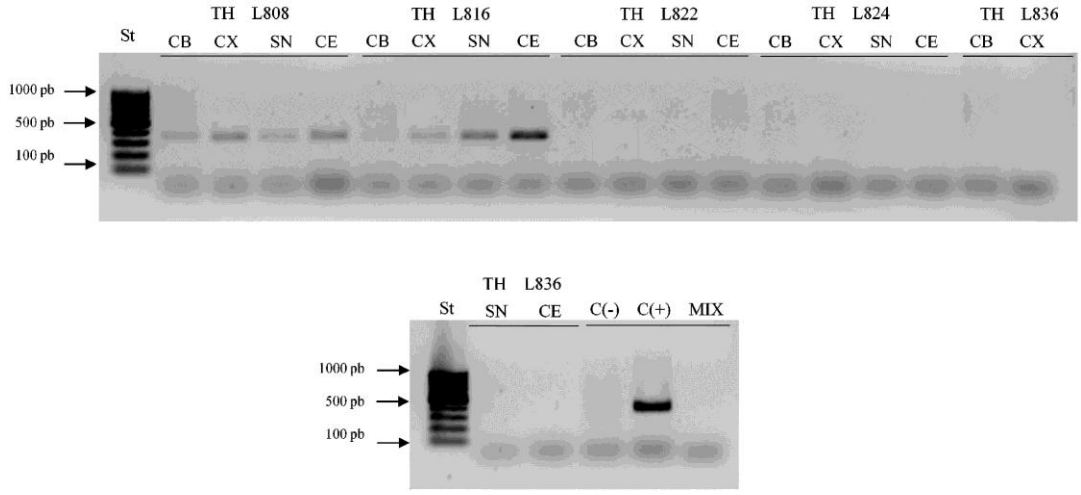


Figura 7: Prueba de la actividad recombinasa de la proteína Cre en el alelo *Mecp2-flox* en líneas transgénicas TH-Cre. La actividad de Cre sobre el alelo *Mecp2-flox* causa la deleción del exón 3 y parte del exón 4, lo que se evidencia por la amplificación de una banda de 370 pb. Esta actividad fue reportada en las líneas 808 y 816 de los transgenes TH-Cre, las líneas 817 y 818 no fueron analizadas. La ausencia de esta banda reportera en los animales de la línea 822, 824 y 836 para TH-Cre, indica la inexistente actividad de recombinación. Las regiones cerebrales analizadas fueron Cerebelo (CB), Corteza (CX), Sustancia Nigra (SN) y Cuerpo Estriado (CE). Control negativo, C(-); control positivo (plásmido *Mecp2-flox* delecionado *in vitro)*, C(+); mezcla de la reacción, (MIX) y estándar 100 pb, (St).

La especificidad del promotor de TH para dirigir la expresión de Cre en el cerebro murino fue también verificada utilizando otro animal reportero de la actividad recombinasa de Cre, Rosa26-EGFP. Este animal posee la secuencia codificante para la proteína EGFP en el locus Rosa26. Esta inserción está interrumpida por un fragmento de DNA que presenta un sitio de término de la traducción flanqueado por dos sitios loxP **(Figura 8)**. En ausencia de recombinación de los sitios loxP la traducción de EGFP será interrumpida por el codón de término de la traducción, pero en presencia de actividad recombinasa de Cre, se espera que esta escinda el codón de término de la traducción y permita la expresión de EGFP.

La identificación de la actividad recombinasa de la proteína Cre en animales TH-Cre / Rosa26-EGFP se realizó por análisis de inmunohistofluorescencia e inmunotransferencia contra la proteína EGFP. Los resultados de la inmunohistofluorescencia mostraron expresión de EGFP en cerebros de animales de las líneas 808, 816, 817 y 818. Se observó expresión de EGFP en regiones dopaminérgicas como SN (en animales de las líneas 808 y 817), Htl (808, 817 y 818) y CB (808). Sin embargo, estas líneas presentaron expresión de EGFP en áreas no dopaminérgicas como los ganglios basales (BG) y CX. En particular, animales de la línea 817 presentaron una fuerte expresión de EGFP en células de los núcleos de la amígdala. No se observó expresión significativa de EGFP en animales de la línea 816 **(Figura 9)**.

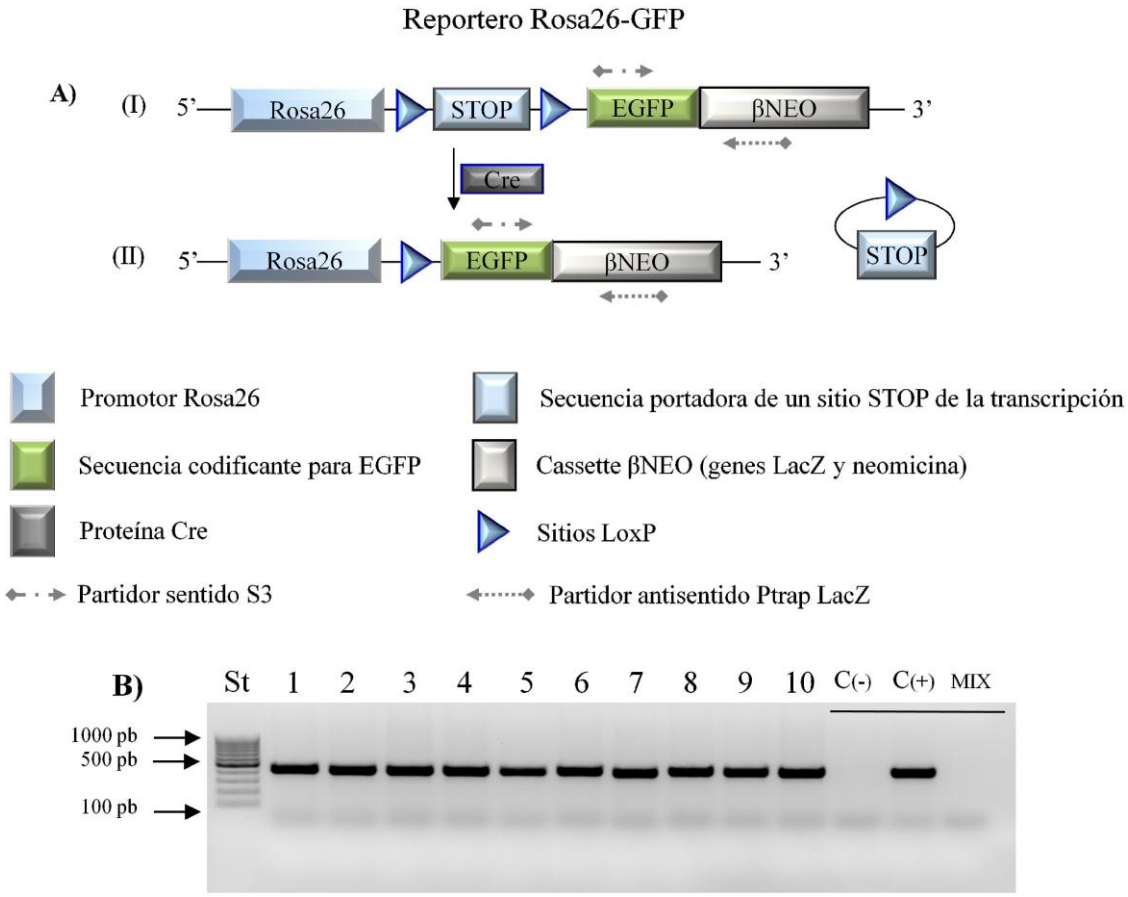


Figura 8: Esquema del locus Rosa26 y genotipificación de los ratones transgénicos Rosa26 por análisis de PCR. A) Estructura del locus Rosa26 sin deleción del sitio de detención de la traducción (I), y modificado por recombinación molecular efectuada por la proteína Cre (II). **B)** Para la genotipificación de ratones Rosa26, se utilizó el partidor sentido S3, el cual es complementario a la secuencia codifican para EGFP y el partidor antisentido Ptrap LacZ específico para la secuencia codificante para LacZ. El producto de amplificación de 450 pb, es visible en todos los carriles (1-10), debido a que los padres eran homocigotos para el transgén. Estándar 100 pb, (St); control negativo, C(-); control positivo, C(+) y mezcla de reacción, MIX.

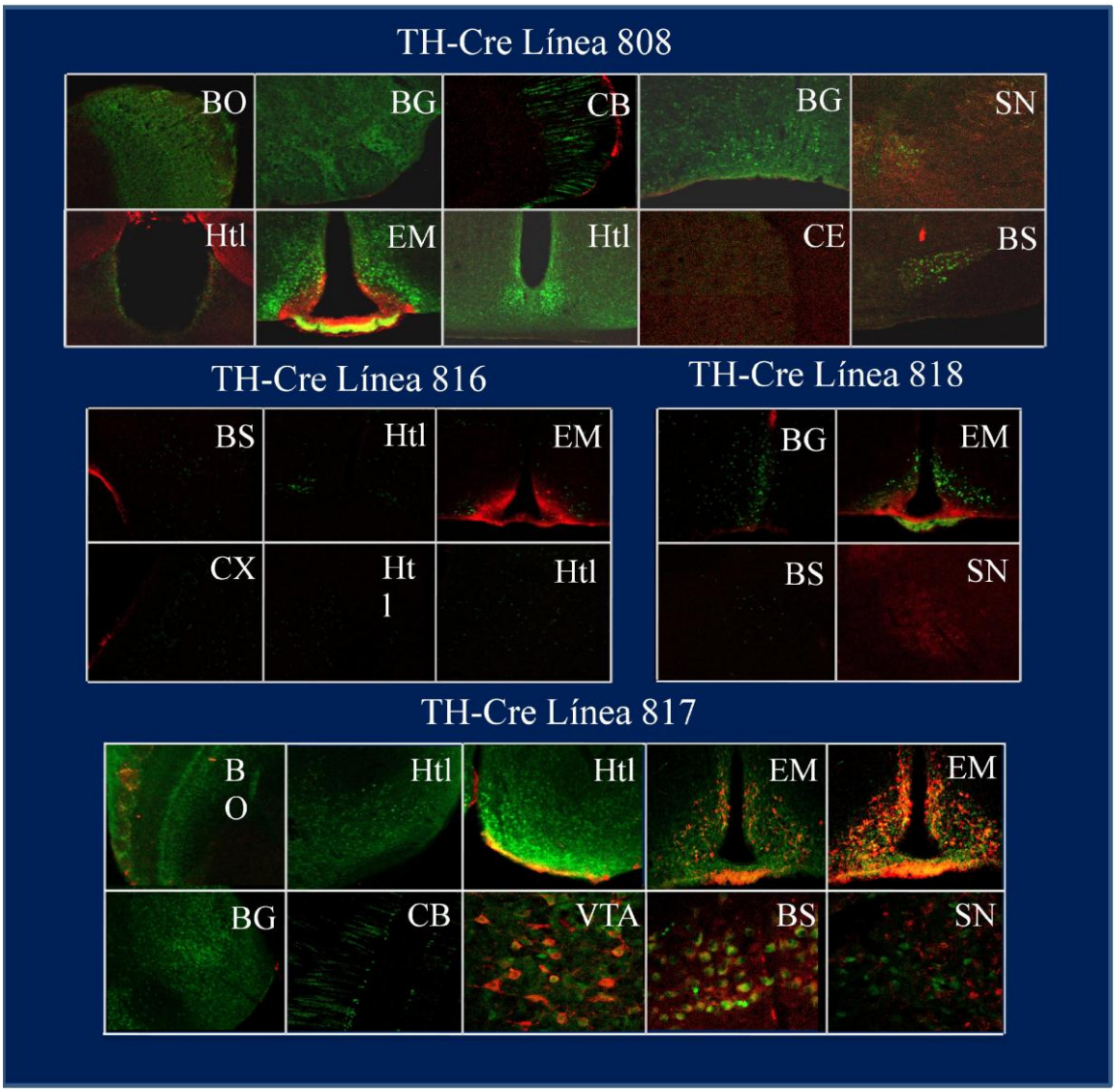
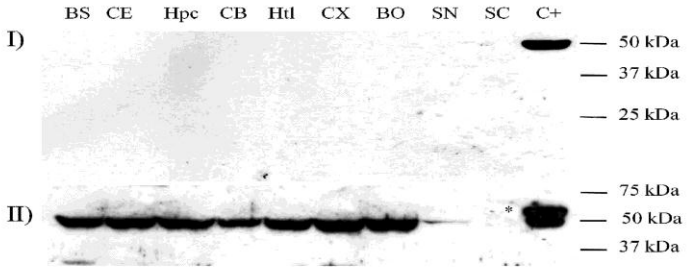


Figura 9: Detección de la actividad recombinante de Cre por inmunohistofluorescencia contra EGFP y TH endógeno. Doble inmunohistofluorescencia, en rojo se detecta la proteína endógena TH y en verde la proteína EGFP, reportera de la recombinación molecular efectuada por la enzima Cre bajo el promotor de tirosina hidroxilasa en las líneas TH-Cre 808, 816, 817 y 818**.** Las regiones cerebrales analizadas fueron bulbo olfatorio (BO), ganglios basales (BG), cerebelo (CB), sustancia nigra (SN), hipotálamo (Htl), eminencia media (EM), cuerpo estriado (CE), tronco cerebral (BS) y corteza (CX).

Los resultados de las inmunotransferencias mostraron que en áreas del cerebro donde se espera la expresión de Cre como en el CE, SN, CB, BS, Htl y BO no se observó la expresión de EGFP en las líneas 808 y 818 analizadas. Tampoco se observó la expresión de EGFP en áreas del cerebro donde no se esperaba observar actividad recombinasa de Cre, como en el hipocampo (Hpc) y CX. **(Figura 10)**.

La **Tabla 2** resume los resultados de las líneas transgénicas de TH-Cre, en cuanto a heredabilidad del transgén y localización de su actividad reportera.

A) TH-Cre/Rosa26 línea 808



B) TH-Cre/Rosa26 línea 818

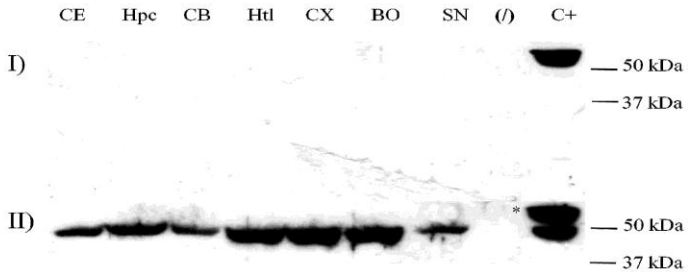


Figura 10: Inmunodetección de la proteína EGFP como reportera de la actividad recombinante de Cre. A) Inmunodetección de la proteína EGFP (I) reportera de la acción molecular de la proteína Cre, en la línea TH-Cre 808 cruzada con el reportero Rosa26. **B)** Inmunodetección de la proteína EGFP (I) reportera de la acción molecular de la proteína Cre, en la línea TH-Cre 818 cruzada con el reportero Rosa26. En ninguna de las dos líneas analizadas se detecta la banda para EGFP esperada de 25 kDa, en las diferentes regiones cerebrales analizadas Tronco Cerebral (BS), Cuerpo estriado (CE), Hipocampo (Hpc), Cerebelo (CB), Hipotálamo (Htl), Corteza (CX) Bulbo Olfatorio (BO), Sustancia Nigra (SN). Carril sin muestra de proteína (/), como control positivo (C+) para EGFP se utilizó una proteína de fusión GFP-neomicina de 55 kDa. Como control de carga en ambos análisis se utilizo β-actina de 50 kDa (II). (*) Indica la banda correspondiente a control positivo de GFP-neomicina.

Línea	herencia del transgén	% Herencia Mendeliana	Expresión del transgén	Tipo de Expresión
808	Si	34%	Si	Ectópica
816	Si	55.9%	Si	Mínima
817	Si	27,50%	Si	Ectópica
818	Si	53,30%	Si	Ectópica
822	Si	44,30%	No	-
824	Si	54,16%	No	-
836	Si	55,55%	No	-

Tabla 2. Resumen de las diferentes líneas obtenidas para el transgén TH-Cre. De las 7 líneas transgénicas obtenidas después de la microinyección, todas heredaron el transgén TH-Cre; sin embargo, las líneas 808, 816, 817 y 818 son las únicas que expresaron la proteína Cre bajo el promotor de tirosina hidroxilasa. Todas las líneas que expresan la proteína Cre presentaron expresión ectópica. Sólo las líneas 816, 818, 824 y 836 que expresaron la proteína Cre heredaron el transgén según lo esperado al patrón de herencia mendeliana.

4.4 Construcción del transgén DAT-Cre

Con el objetivo de dirigir la expresión de la proteína Cre en regiones dopaminérgicas del cerebro medio, se construyó un transgén en el cual la secuencia codificante para Cre está río abajo de la región promotora del gen Slc6a3 que codifica al transportador de dopamina (DAT) y río arriba de la región de poliadenilación SV40.

El promotor del gen Slc6a3 aún no ha sido caracterizado, por este motivo se realizaron estudios de homología entre diferentes especies para determinar regiones conservadas flanqueantes al gen Slc6a3 **(Figura 11)**, las cuales, se espera que comanden la expresión de la proteína Cre en los sitios de expresión endógenos de la proteína DAT. Los resultados del estudio de conservación de secuencias mostraron una región de 5 kb altamente conservada río arriba del codón de inicio de la transcripción del gen Slc6a3. Esta región altamente conservada fue considerada como el posible promotor de DAT y fue rescatada desde el BAC RP24-269I17 **(Figura12)**.

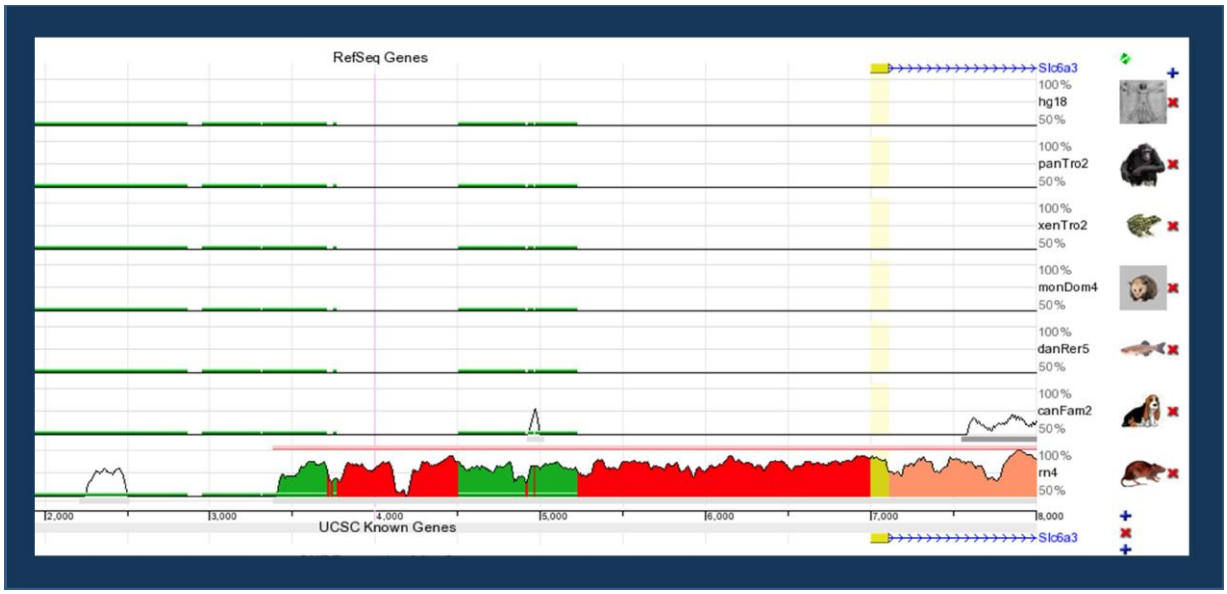


Figura 11: Análisis *in silico* de la secuencia promotora del gen Slc6a3. Se compararon las regiones promotoras del gen Slc6a3 entre ocho diferentes especies *Homo sapiens, Pan troglodytes, Xenopus tropicalis, Monodelphis domestica, Danio rerio, Canis familiaris, Mus musculus y Rattus novergicus.* El análisis de alineamiento para la secuencias *Mus musculus* sólo presentó conservación de secuencia sobre el 50% con la especie *Rattus novergicus*. La nomenclatura de colores indica lo siguiente: en azul se señalan los exones, en anaranjado regiones intronicas, en amarillo las regiones UTRs, en rojo las secuencias intergenicas, en verde las regiones de simple repeticiones o transposones y la barra rosada horizontal indica la conservación de secuencias entre especies. El programa utilizado en el análisis de homología fue *Evolutionary Conserved Regions Browser* (http://ecrbrowser.dcode.org).

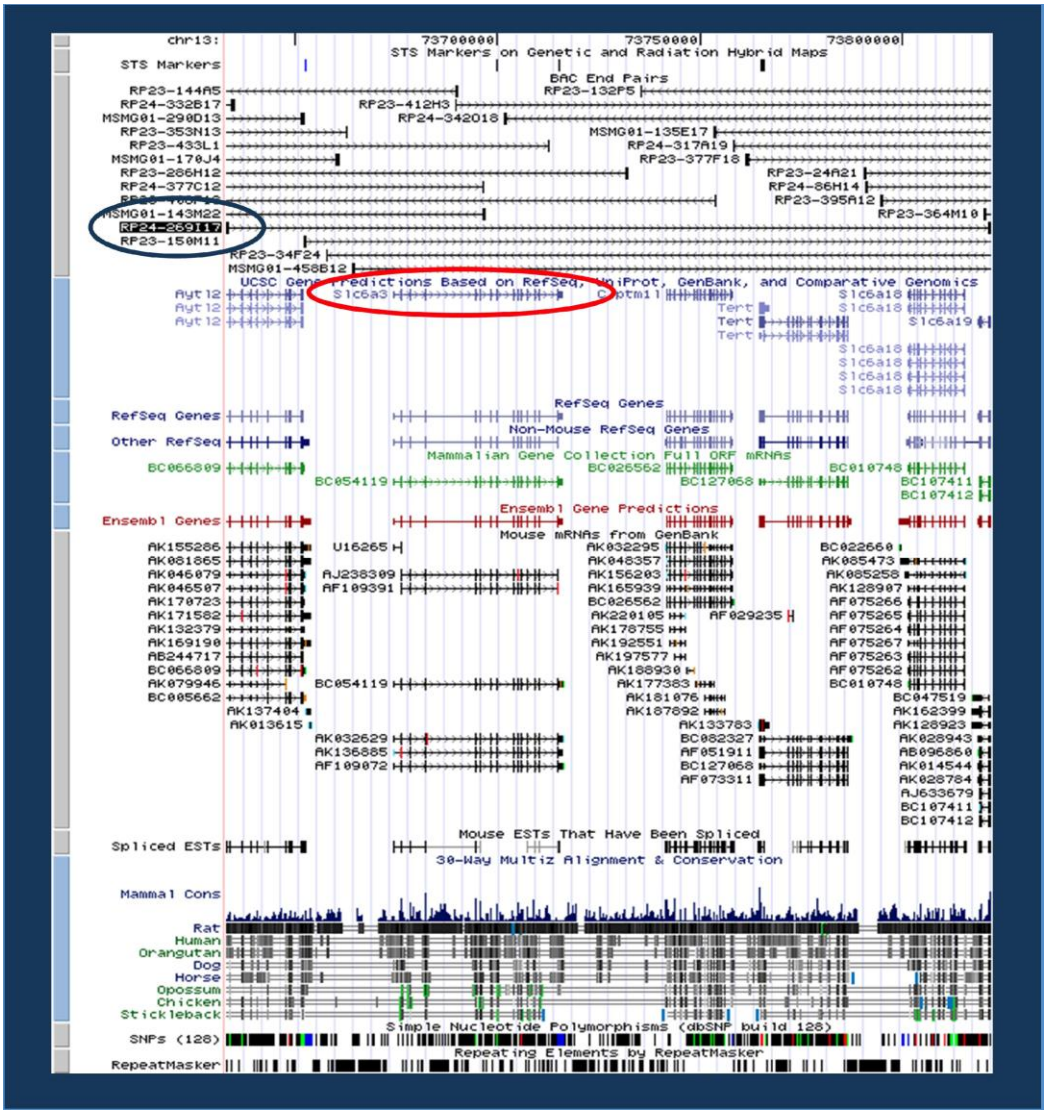


Figura 12: Identificación del BAC que contiene la región conservada del promotor de Slc6a3. Para la construcción del transgén de DAT-Cre, se utilizó el BAC RP24-269I17, que contiene la región completa del gen Slc6a3 y un segmento no menor de la secuencia promotora del gen Slc6a3 que incluye la región 5 kb seleccionada para la construcción. En azul se identifica el nombre del BAC y en rojo la posición del gen Slc6a3 dentro del BAC. Para el análisis de secuencia se utilizó el programa UCSC *Genome Bioinformatics* (http://genome.ucsc.edu/).

La estrategia empleada para la construcción del transgén DAT-Cre consistió en obtener una secuencia de 5.1 kb por 4 reacciones de PCR independientes desde el BAC RP24-269I17, utilizando los 4 juegos de partidores descritos en Materiales y Métodos. Luego los fragmentos obtenidos fueron subclonados al plásmido pGEM-T Easy y enviados a secuenciar para verificar su conservación de secuencia **(Tabla 3)**. La estrategia utilizada para la construcción del transgén DAT-Cre se realizó en tres pasos. El primero consistió en ligar el fragmento 4 al 3' del fragmento 1 en el plásmido pGEM-7 **(Figura 13)**. A continuación se ligó en forma simultánea entre las secuencias 1 y 4 el fragmento 2 y 3 **(Figura 14)**. Luego de tener la construcción con las secuencias ligadas 1-2-3-4, éstas se subclonaron al 5' de la secuencia codificante de la proteína Cre en el plásmido pBCre **(Figura 15)**. El detalle de la construcción del transgén DAT-Cre se encuentra descrito en Materiales y Métodos.

4.5 Purificación del transgén DAT-Cre

El transgén DAT-Cre fue purificado desde el plásmido pBDAT-Cre **(Figura 16A)** por digestión enzimática con las enzimas de restricción *Xho*I al 5' y *Not*I al 3', permitiendo minimizar la cantidad de DNA plasmídico en el transgén. El resultado de la digestión permitió obtener un fragmento lineal de DNA de 6.4 kb compuesta por la secuencia promotora de 5 kb de ratón y el cDNA codificante de la proteína Cre de 1.4 kb del bacteriófago P1 con la secuencia de poliadenilación del virus SV40 **(Figura 16B)**. El transgén purificado fue cuantificado, para su posterior microinyección pronuclear, según lo descrito anteriormente en Materiales y Métodos.

Fragmento	1	1	2	2	3	3	4	4
Largo del fragmento secuenciado (Kb)	1.3	1.3	1.1	1.1	1.6	1.6	1.1	1.1
Partidores usados en la secuenciación	SP6	T7	SP6	T7	SP6	T7	SP6	T7
Porcentaje de homología (%)	99	99	99	99	99	99	100	99
Extensión de la secuenciación (pb)	843	743	845	870	856	863	807	865
Nucleótidos no apareadas	0	0	0	0	0	0	0	1
Nucleótidos sin identidad	3	1	6	1	2	1	0	3

Tabla 3. Porcentaje de homología entre las regiones secuenciadas y el promotor del gen Slc6a3. Los fragmentos levantados para la construcción de DAT-Cre fueron secuenciados con el objetivo de verificar la conservación de sus secuencias con respecto a la base de datos del BAC RP24-269I17. En la tabla 3 se resumen los resultados según porcentaje de homología, extensión del fragmento secuenciado, nucleótidos de la secuencia no apareados y nucleótidos sin identidad en las secuenciaciones realizadas en ambos sentidos a los fragmentos 1, 2, 3 y 4 para el promotor de DAT.

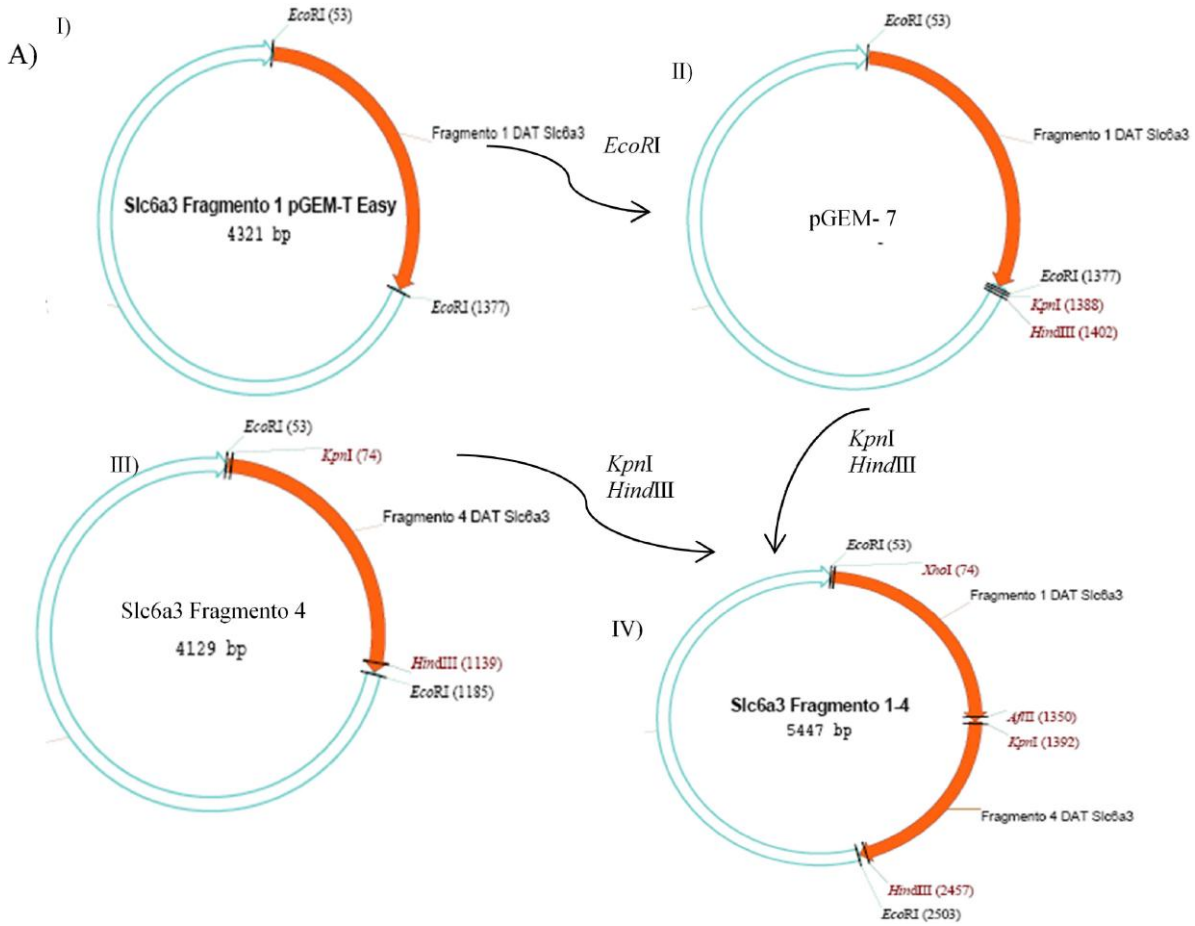


Figura 13: Etapas del primer subclonamiento del transgén DAT-Cre. Para obtener la secuencia promotora de Slc6a3 se subclonó desde el plásmido pGEM-T Easy (I) al plásmido pGEM-7 el fragmento 1 de 1,3 kb utilizando las enzimas *Eco*RI al 5' como al 3' (II), luego el fragmento 4 (III) de 1,1 kb se subclonó al 3' del fragmento 1 utilizando las enzimas *Kpn*I y *Hin*dIII (IV). En color anaranjado se especifican los fragmentos subclonados, en cada figura se indican las enzimas utilizadas para los procesos de subclonamiento.

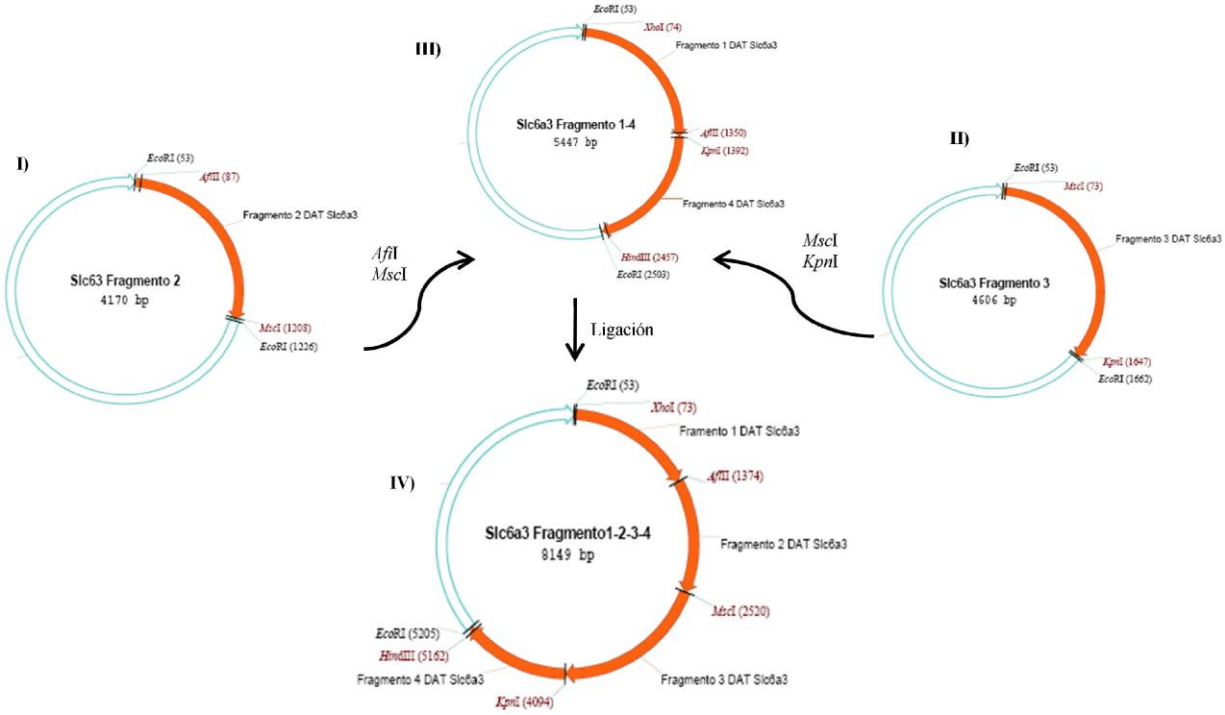


Figura 14: Etapas del segundo subclonamiento del transgén DAT-Cre. Luego de ligar los fragmentos 1 y 4 (III) se continuó con una ligación múltiple entre el fragmento 2 (I) de 1.1 kb utilizando las enzimas *Afi*I al 5'y *Msc*I al 3'y el fragmento 3 (II) de 1.6 kb utilizando las enzimas *Msc*I al 5' y *Kpn*I al 3'. A continuación, el plásmido p1-4 fue digerido con las enzimas *Afli*I al 3' del fragmento 1 y *Kpn*I al 5' del fragmento 4. Como resultado de la ligación múltiple se obtuvo el fragmento completo de promotor de DAT de 5.1 kb (IV). En anaranjado se ejemplifican los fragmentos subclonados, las enzimas utilizadas para cada proceso se enuncian entre los procesos de subclonamiento.

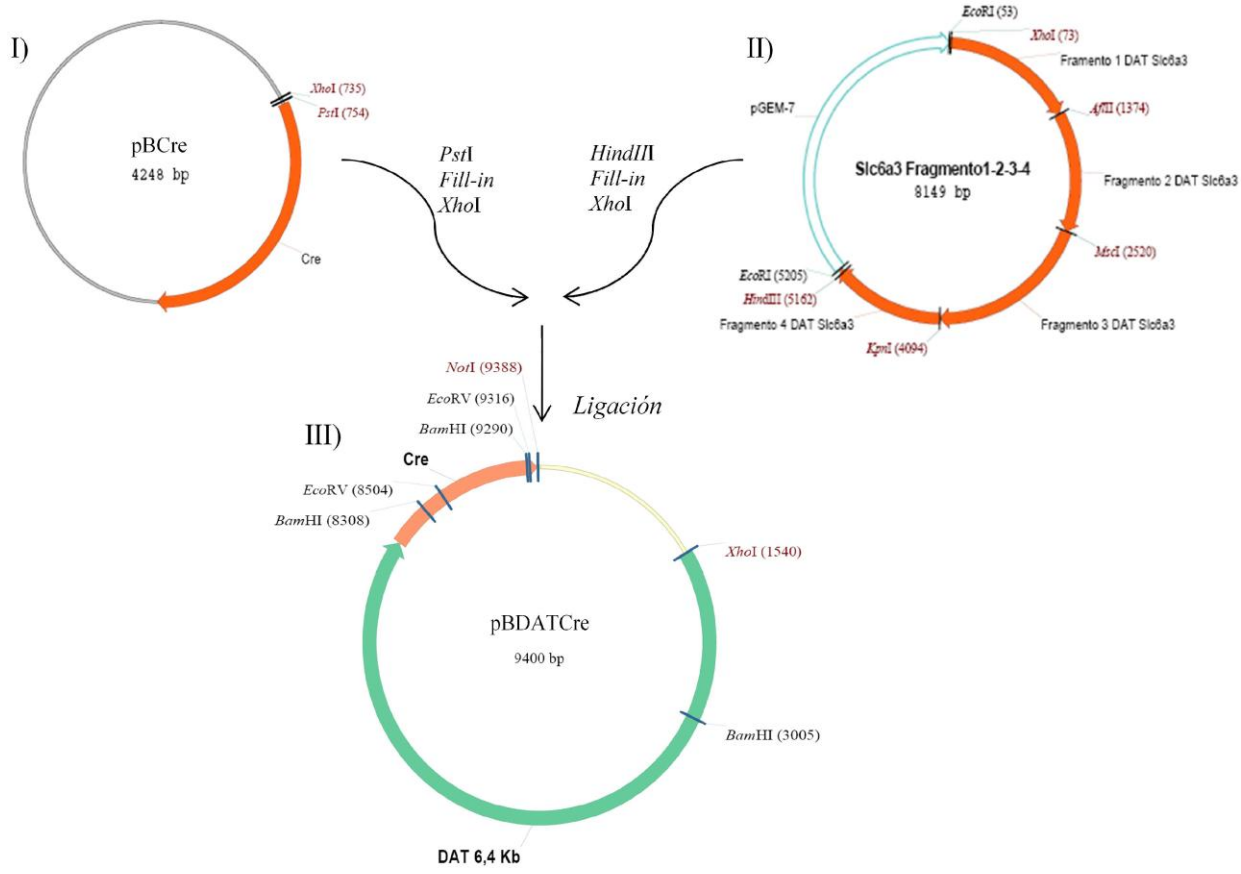


Figura 15: Término de la construcción del transgén DAT-Cre. Para obtener la completa construcción del transgén DAT-Cre (III) se realizó digestión enzimática al plásmido pBCre (I) con la enzima *Pst*I al 5' de la secuencia Cre, y se realizó *fill-in*. Luego se digirió con la enzima *Xho*I al extremo 3' del plásmido linealizado, de esta manera el plásmido se encuentra listo para aceptar la secuencia del promotor de DAT desde el plásmido 1-2-3-4 (II), esta secuencia fue digerida con la enzima *Hin*dIII y realizado *fill-in* para dejar extremo romo al extremo 3' del fragmento, luego se digirió con *Xho*I al 5' y se ligó al plásmido pBCre.

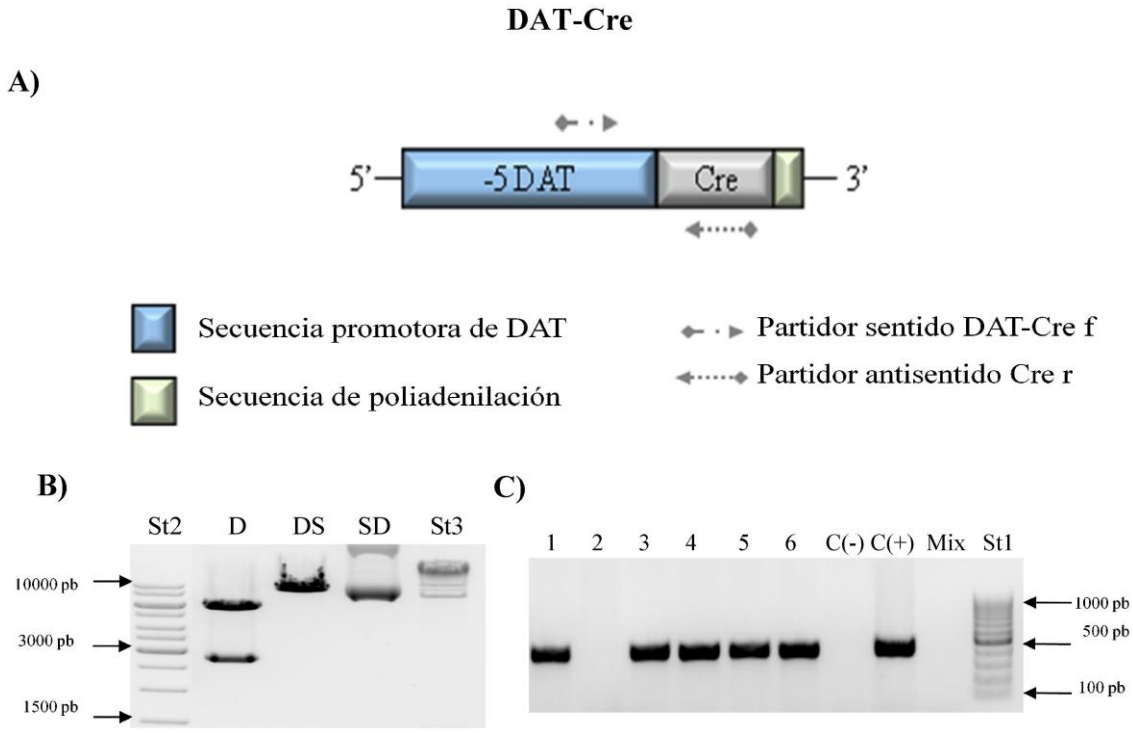


Figura 16: Esquema, purificación y genotipificación del transgén DAT-Cre. A) modelo simplificado del transgén DAT-Cre. En el esquema se indica la posición de los partidores (no ha escala). El partidor sentido DAT-Cre f es complementario a la secuencia promotora del transgén DAT-Cre, el partidor antisentido geno Cre r es complementario a la secuencia del cDNA de Cre. **B)** Purificación del transgén por digestión del plásmido pBDAT-Cre con *Xho*I y *Not*I. Digerido con *Not*I y *Xho*I, (D); plásmido linealizado con *Xho*I, (DS); sin digerir, (SD); estándar de 1.0 Kb, (St2) y estándar Lambda 19 (St3).**C)** Genotipificación de ratones transgénicos DAT-Cre, se observó una banda de 400 pb en los carriles 1, 3, 4, 5 y 6. Control negativo, C(-); control positivo, C(+); mezcla de reacción, Mix y estándar de 100 pb (St1).

4.6 Identificación de las líneas transgénicas DAT-Cre

Se transfirieron 484 cigotos microinyectados de la cepa C57BL/6J x CBA/J a 20 hembras receptoras; luego del período de gestación, nacieron 109 crías **(Tabla 4)**. Para identificar las diferentes líneas transgénicas obtenidas como resultados de la microinyección de la construcción DAT-Cre en pronúcleos murinos, se realizó genotipificación por PCR. Se utilizó como molde de la reacción DNA genómico extraído de biopsias de cola. La estrategia de PCR diseñada para genotipificar los animales portadores del transgén DAT-Cre consistió de un partidor sentido complementario a la región promotora de DAT y un partidor antisentido complementario a la secuencia codificante de la proteína Cre. La reacción de PCR permitió la identificación de una banda de 400 pb que incluye parte del transgén formado por un fragmento de la secuencia promotora de DAT y parte de la secuencia codificante para Cre **(Figura 16C)**.

Los resultados del análisis de PCR mostraron que de los 109 animales nacidos, 8 fueron positivos para la incorporación del transgén DAT-Cre. Las líneas transgénicas se denominaron de acuerdo al número correspondiente a la identidad de cada fundador de colonia y dieron origen a 5 líneas transgénica independiente, dado que tres animales fundadores no transmitieron el transgén a su descendencia. Para expandir las líneas transgénicas, cada ratón fundador fue apareado con un ratón silvestre de la cepa C57BL/6J x CBA/J. Las camadas nacidas a partir estas cruzas corresponden a la generación F_1, que fueron utilizadas para los análisis posteriores.

N° de cigotos microinyectados	N° de hembras receptoras	N° de crías nacidas	N° de ratones transgénicos	% de ratones transgénicos
484	9	109	8	7,3

Tabla 4. Resumen del proceso de generación de las líneas transgénicas DAT-Cre. Se transfirieron 484 cigotos microinyectados con el transgén linearizado a 9 hembras seudopreñadas; de éstas nacieron 109 crías, de las cuales el 7,3 % resultaron ser ratones transgénicos.

4.7 Identificación de la actividad recombinasa de la proteína Cre

La actividad recombinasa de la proteína Cre se determinó en cruzas entre transgénicos F_1 de DAT-Cre y animales *Mecp2-Flox*. La verificación de la actividad recombinasa de Cre se realizó utilizando DNA extraído de animales portadores de los transgenes DAT-Cre y *Mecp2-Flox* (DAT-Cre / *Mecp2-Flox*) mediante análisis de PCR, según lo descrito anteriormente para los animales TH-Cre / *Mecp2 -Flox.*

Los cerebros de los animales DAT-Cre / *Mecp2-Flox* fueron disectados en distintas áreas. Los resultados de los análisis de PCR mostraron que existió recombinación de los sitios loxP en la SN, pero también en áreas del cerebro catecolaminérgicas que no expresan DAT, como el CE y CB. También se observó recombinación de los sitos loxP en áreas del cerebro no dopaminérgicas como CX **(Figura 17)**. Estos resultados fueron obtenidos en animales de la línea transgénica 860.

La especificidad del promotor de DAT para dirigir la expresión de Cre en el cerebro murino fue también verificada utilizando el animal reportero de la actividad recombinasa de Cre, Rosa26-EGFP, de igual forma a lo descrito anteriormente para los animales TH-Cre / Rosa26-EGFP.

La identificación de la actividad recombinasa de la proteína Cre en animales DAT-Cre / Rosa26-EGFP se realizó por análisis de inmunohistofluorescencia e inmunotransferencia contra la proteína EGFP. Los resultados de la inmunohistofluorescencia mostraron expresión de EGFP en cerebros de animales de las líneas 860, 782a y 786a. Se observó expresión de EGFP en regiones dopaminérgicas como SN (en animales de las líneas 860). Sin embargo, estas líneas presentaron expresión de EGFP en áreas no dopaminérgicas como CX (líneas 860 y 782a). La línea 786a sólo expresó en el bulbo olfatorio. No se observó expresión de EGFP en animales de la línea 817a y 819a **(Figura 18)**.

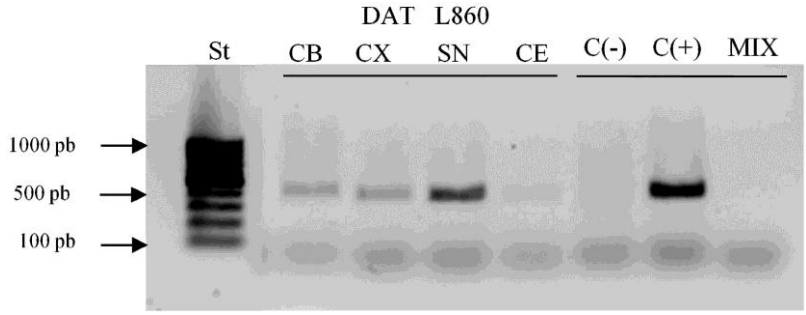


Figura 17: Reporte de la actividad recombinasa de la proteína Cre en el alelo *Mecp2-flox*. La actividad recombinasa de Cre en el alelo *Mecp2-flox* provoca la deleción del exón 3 y parte del exón 4, lo que se evidencia por la amplificación de una banda de 370 pb. Este análisis fue realizado sólo en la línea 860 del transgén DAT-Cre, las otras líneas no fueron cruzadas con *Mecp2-Flox*. Las regiones cerebrales analizadas fueron Cerebelo (CB), Corteza (CX), Sustancia Nigra (SN) y cuerpo estriado (CE). Control negativo, C(-); control positivo (plásmido *Mecp2-flox* delecionado *in vitro)*, C(+); mezcla de la reacción, (MIX) y estándar 100 pb (St).

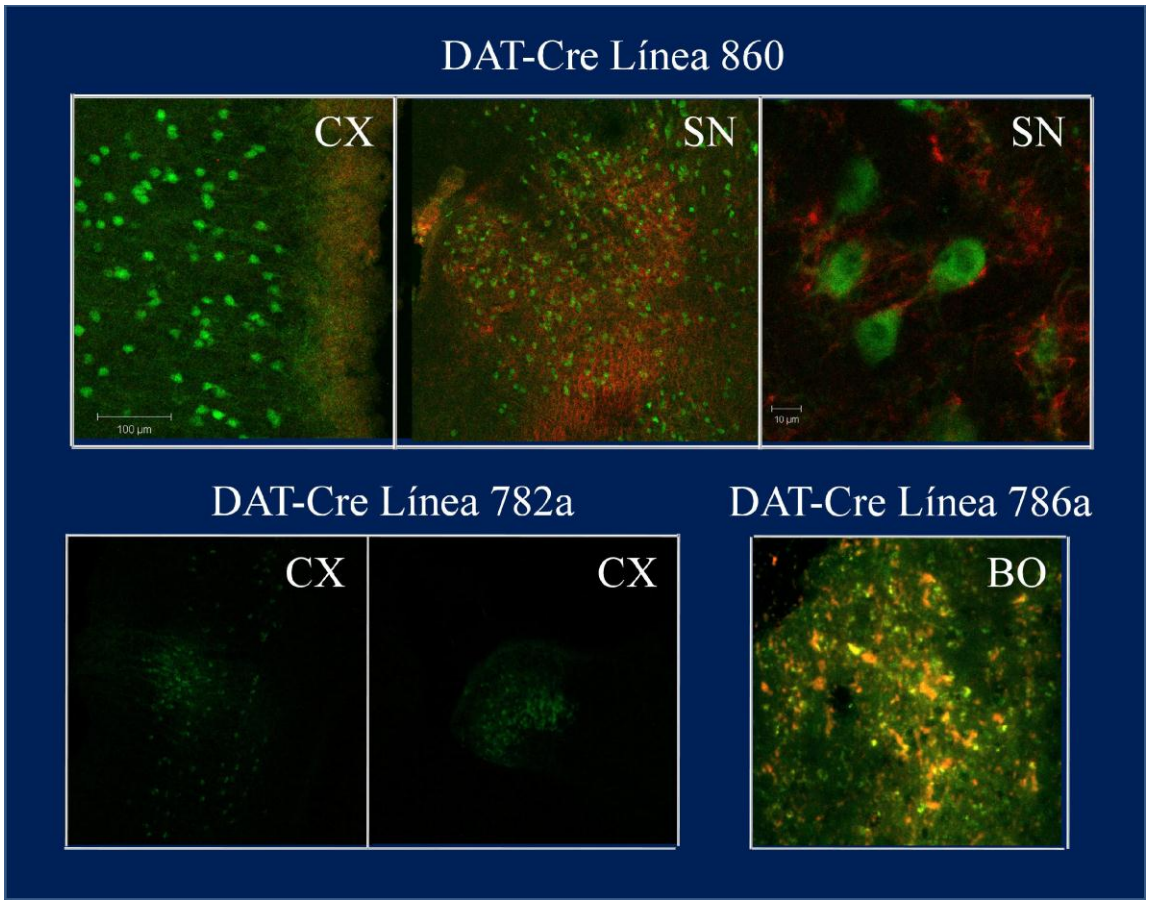


Figura 18: Detección de la actividad recombinante de Cre por inmunohistofluorescencia contra DAT endógeno y EGFP. Doble inmunohistofluorescencia, en rojo se observó la detección contra la proteína endógena DAT y en verde contra EGFP reportera de la recombinación molecular efectuada por la enzima Cre bajo el promotor del transportador de dopamina. Las regiones cerebrales observadas con actividad recombinasa fueron corteza (CX), bulbo olfatorio (BO) y sustancia nigra (SN).

Los resultados de las inmunotransferencias mostraron que en áreas del cerebro donde se espera la expresión de Cre como en BS, que incluye en esta determinación la SN, se observó la expresión de EGFP en animales de la línea 860. Sin embargo, también se observó la expresión de EGFP en otras áreas del cerebro no dopaminérgicas como CX y CE. No se observó la expresión de EGFP en el cerebro de animales de la línea 786a **(Figura 19)**.

La **Tabla 5** resume los resultados de las líneas transgénicas de DAT-Cre respecto a heredabilidad del transgén y localización de su actividad reportera.

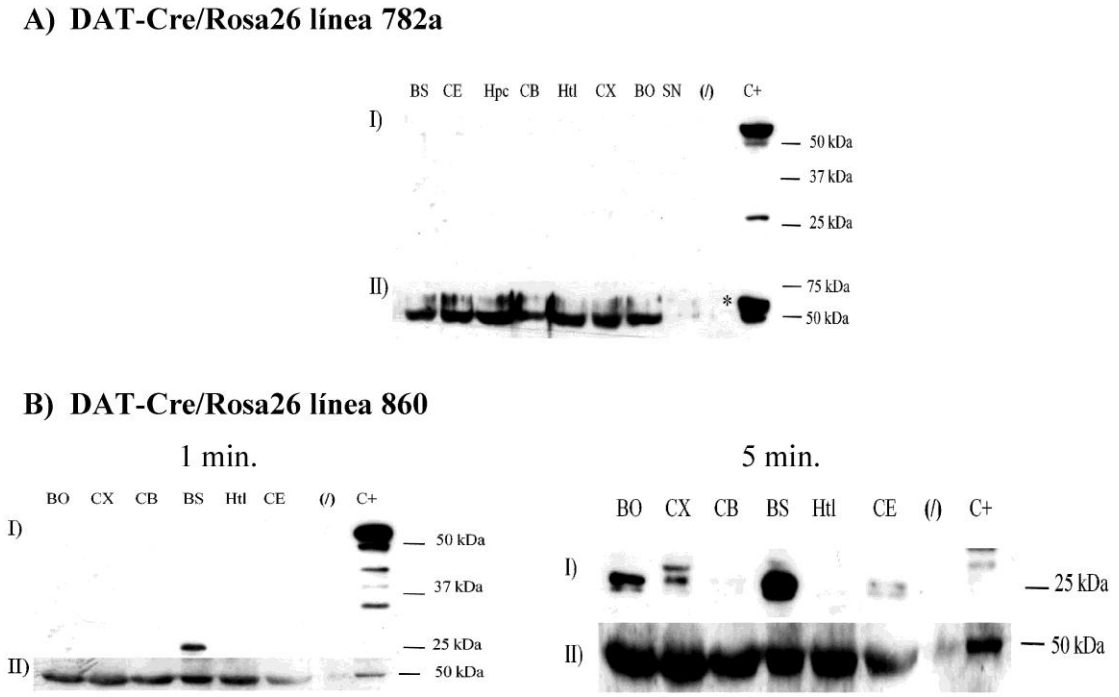


Figura 19: Inmunodetección de la proteína EGFP como reportera de la actividad recombinante de Cre. A) Inmunodetección de la proteína EGFP (I) reportera de la acción molecular de la proteína Cre, en la línea 782a cruzada con el reportero Rosa26, no se observó la banda para EGFP a 5 min de exposición. **B)** Inmunodetección de la proteína EGFP en la línea 860 cruzada con el reportero Rosa26. Se detecta la banda para EGFP esperada a 25 kDa (I), en el tronco cerebral a 1 minuto de exposición y a 5 minutos de exposición se detecta mayor número de bandas en las muestras analizadas. Las regiones cerebrales analizadas son: Tronco Cerebral (BS), Cuerpo estriado (CE), Hipocampo (Hpc), Cerebelo (CB), Hipotálamo (Htl), Corteza (CX), Bulbo Olfatorio (BO), Sustancia Nigra (SN). Carril libre (/), Como control positivo (C+) para EGFP se utilizó una proteína de fusión GFP-neomicina de 55 kDa. Como control de carga se utilizó β actina (II) de 50 kDa para cada determinación. * indica la banda correspondiente a control positivo de GFP-neomicina.

Línea	Herencia del transgén	% Herencia Mendeliana	Expresión del transgén	Tipo de Expresión
860	Si	50%	Si	Ectópica
872	No	-%	No	-
782a	Si	48,4%	Si	Ectópica
786a	Si	52,4%	Si	Ectópica
817a	Si	34,5%	No	-
819a	Si	40,5%	No	-
831a	No	-%	No	-
837a	No	-%	No	-

Tabla 5. Resumen de las diferentes líneas obtenidas para el transgén DAT-Cre. De las 8 líneas transgénicas obtenidas después de la microinyección, sólo las líneas 860, 782a, 786a, 817a y 819a heredan el transgén. Sin embargo, sólo las líneas 860, 782a y 786a expresan la proteína Cre bajo el promotor del transportador de dopamina. Todas las líneas que expresan la proteína Cre presentan expresión ectópica. Sólo las líneas transgénicas 860, 782a y 786a heredan el transgén según lo esperado al patrón de herencia mendeliana. La línea 837a murió antes de ser analizada.

4.8 Construcción del transgén Pomc-Cre

Para dirigir la expresión de la proteína Cre en tipos celulares específicos de la glándula hipofisiaria se consideró construir un transgén que exprese la proteína Cre bajo el promotor del gen de proopiomelanocortina (Pomc), con el objetivo de expresar Cre en melanotropos y corticotropos hipofisiarios. Se determinó como unidad promotora un segmento de 568 pb flanqueante al 5' del $^{+}1$ del sitio de inicio de la transcripción de Pomc, y en la secuencia codificante del gen de Pomc se incorporó el cDNA codificante para la proteína Cre de 1.4 kb perteneciente al bacteriófago P1, seguido de la secuencia de poliadenilación del virus SV40 **(Figura 20A)**.

La construcción de Pomc-Cre se realizó clonando la proteína Cre dentro del exón 2 de Pomc, río arriba al sitio $^{+}1$ de inicio de la traducción de la proteína Pomc **(Figura 21)**, luego se sustituyó al plásmido pHAL el exón 2 de Pomc sin modificar por el exón 2 modificado por la secuencia codificante de la proteína Cre desde el plásmido pEX2-Cre **(Figura 22)**. El transgén tiene un tamaño de 9.8 kb y la construcción está compuesta por el promotor de 568 pb, la secuencia codificante que incluye los tres exones e intrones del gen de Pomc y la secuencia de Cre insertada en el exón 2 de Pomc. Los procesos de construcción del transgén Pomc-Cre se realizaron como se describió en Materiales y Métodos.

El transgén Pomc-Cre se purificó desde el plásmido pPomc-Cre por digestión con las enzimas de restricción *Sma*I y *Sal*I. El resultado de la digestión entregó un fragmento lineal de DNA de 9.8 kb **(Figura 23)**, que incluye desde el promotor de Proopiomelanocortina hasta la secuencia de poliadenilación del virus SV40. La purificación y cuantificación del transgén, para su posterior microinyección pronuclear, se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

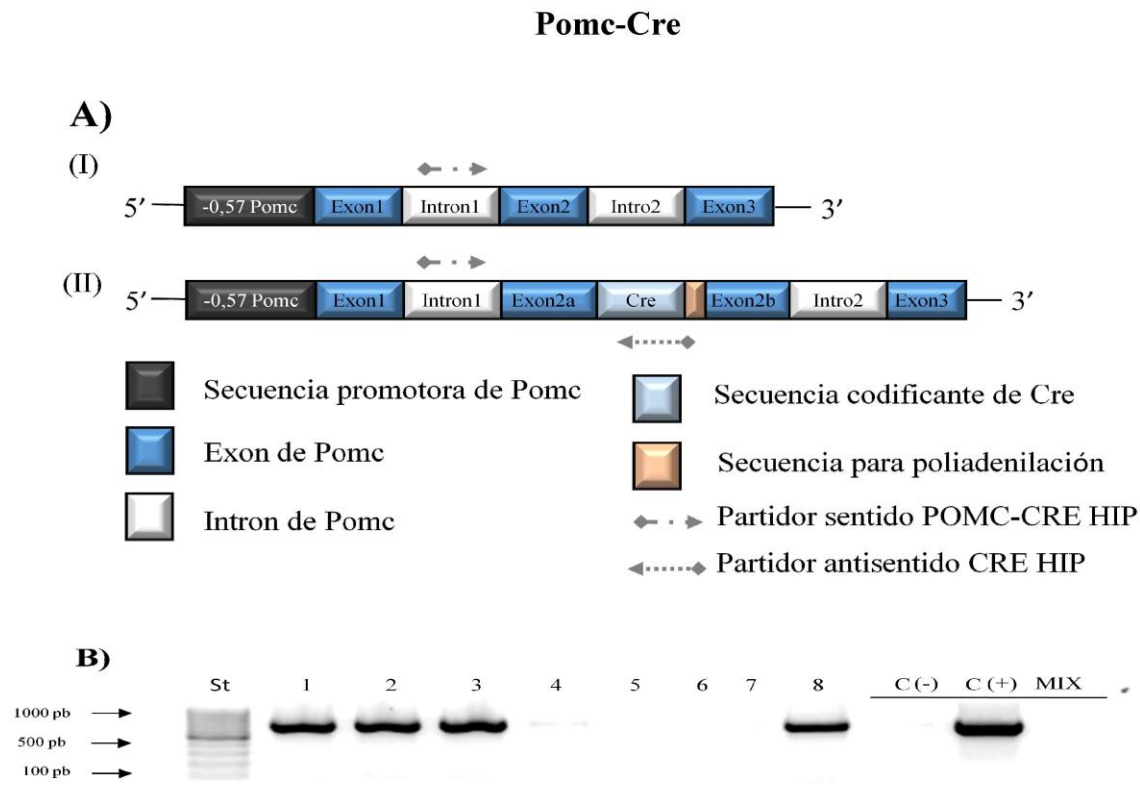


Figura 20: Modelo del gen Pomc y del transgén Pomc-Cre, e identificación por PCR de las líneas Pomc-Cre. A) Esquema simplificado del gen de Pomc de ratón (I) y del transgén Pomc-Cre (II), este último presenta en su extremo 5' 0,57 kb de la secuencia del promotor proximal del gen de Pomc, y la secuencia del cDNA de Cre en el exón 2. En el esquema se indica la posición de los partidores (no ha escala) para la genotipificación de los animales. El partidor sentido POMC-CRE HIP es complementario a la secuencia del intrón 1 de Pomc y del transgén Pomc-Cre, el partidor antisentido CRE HIP es complementario a la secuencia del cDNA de Cre. **B)** Genotipificación de ratones transgénicos Pomc-Cre, se observó una banda de 670 pb correspondiente a la identificación de los animales transgénicos Pomc-Cre la cual se correlaciona con la banda obtenida en el control positivo de esta determinación. Control negativo, C(-); control positivo, C(+); mezcla de reacción, MIX y Estándar de 100 pb, (St).

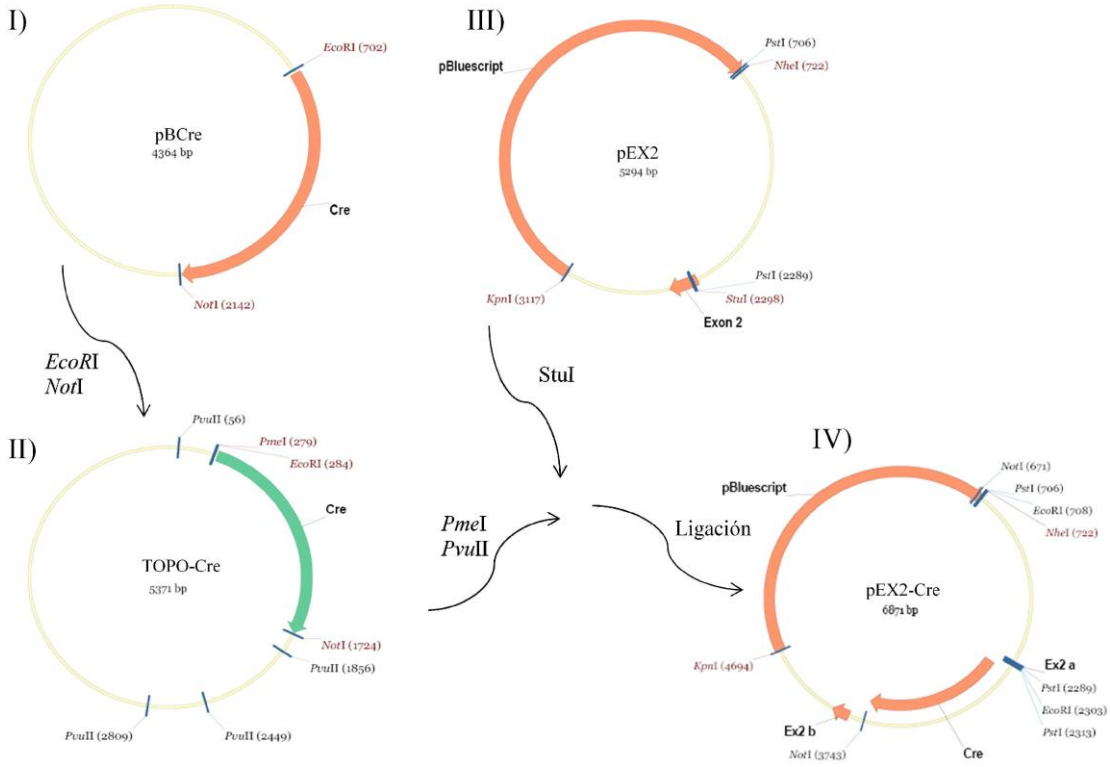


Figura 21: Primer subclonamiento del transgén Pomc-Cre. Para introducir la secuencia Cre dentro del exón 2 de Pomc se digirió el plásmido pBCre (I) con las enzimas *Eco*RI al 5' y *Not*I al 3', este fragmento se subclonó en el plásmido TOPO (II) y el producto de ligación fue subclonado al plásmido pEX2, plásmido digerido con la enzima *Stu*I (III) utilizando las enzimas *Pme*I y *Pvu*II. Como resultado se obtuvo el plásmido pEX2-Cre. En color se especifican los fragmentos sublconados, en cada figura se indican las enzimas utilizadas para los procesos de clonamiento.

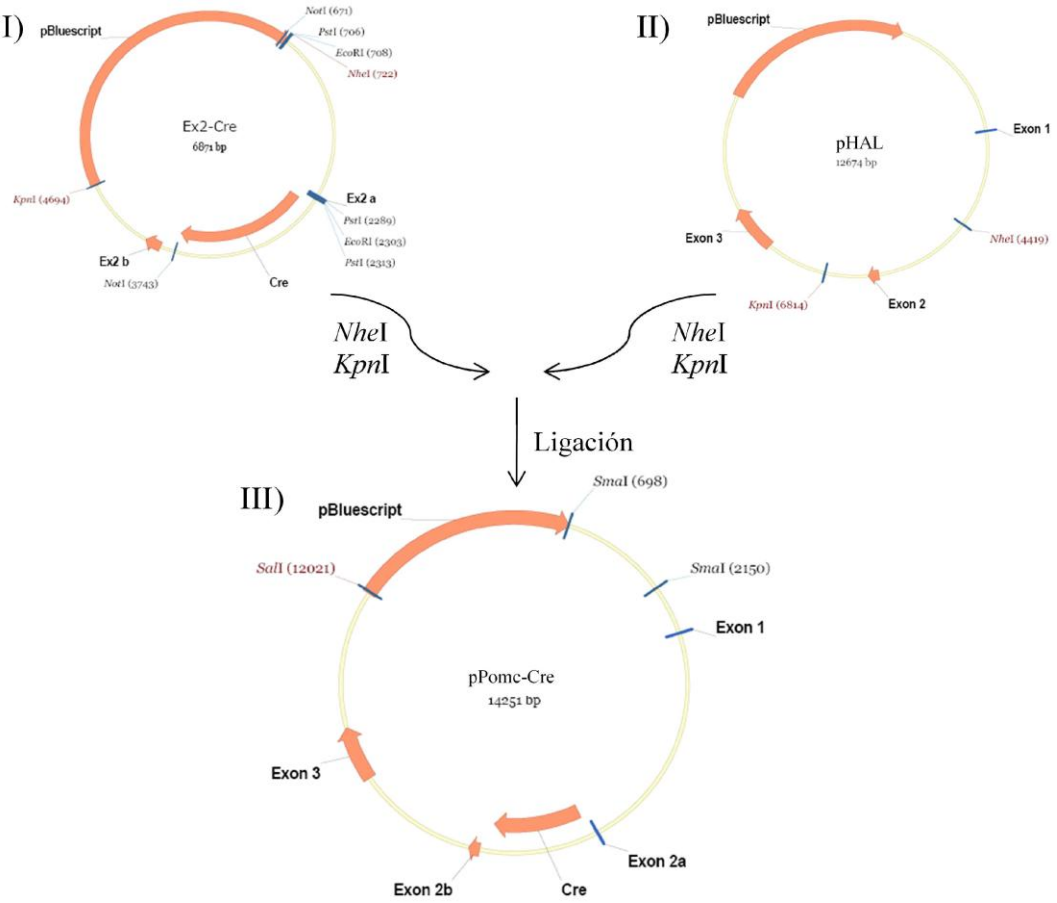


Figura 22: Término de la construcción del transgén Pomc-Cre. Para obtener la completa construcción del transgén Pomc-Cre (III) se realizó digestión enzimática al plásmido pEX2-Cre (I) con la enzima *Nhe*I al 5' y *Kpn*I al 3'de la secuencia EX2-Cre. Por otra parte, el plásmido pHAL fue digerido las enzimas NheI al 5' y KpnI al 3'. De esta manera se realizó una sustitución de secuencias entre el exón 2 modificado y no modificado de Pomc, respectivamente. En color se ejemplifican los fragmentos subclonados, las enzimas utilizadas para cada proceso se enuncian entre los subclonamiento.

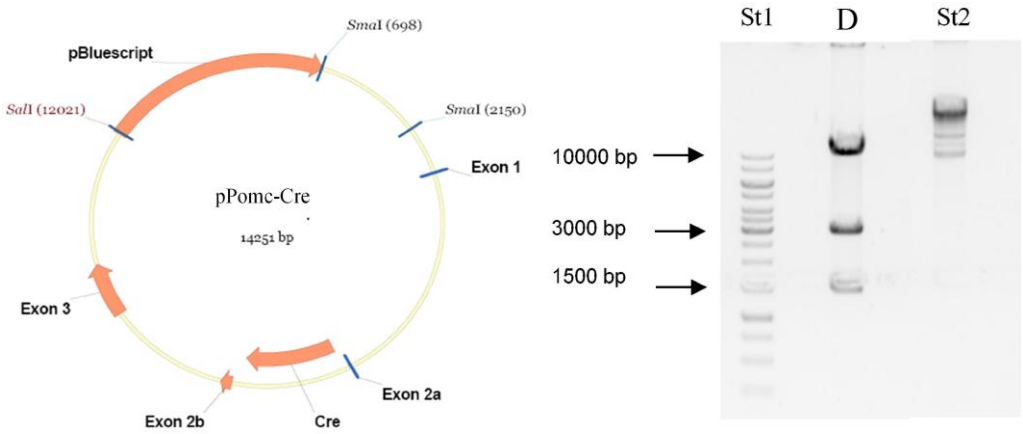


Figura 23: Purificación del transgén Pomc-Cre por actividad enzimática. La purificación del transgén se realizó por digestión del plásmido pPomc-Cre utilizando las enzimas *Sma*I al 5' y *Sal*I al 3'. El producto de la digestión tiene un tamaño de 9.8 kb. En el gel se distingue la banda para el transgén de 9.8 kb, una banda de 3.0 kb del plásmido y una banda de menor tamaño de 1.4 kb. Estándar de 1 kb, (St1); digestión del plásmido, (D) y estándar lambda 19 (St2).

4.9 Identificación de las líneas transgénicas Pomc-Cre

Se transfirieron 345 cigotos microinyectados de la cepa C57BL/6J x CBA/J a 13 hembras receptoras; luego del período de gestación, nacieron 66 crías **(Tabla 6)**. Para identificar las diferentes líneas transgénicas obtenidas como resultados de la microinyección de la construcción Pomc-Cre en pronúcleos murinos, se realizó genotipificación por PCR **(Figura 20B)**. Se utilizó como molde de la reacción DNA genómico extraído de biopsias de cola. La estrategia de PCR diseñada para genotipificar los animales portadores del transgén Pomc-Cre consistió de un partidor sentido complementario al intrón 1 de Pomc y un partidor antisentido complementario a la secuencia codificante de la proteína Cre. La reacción de PCR permitió la identificación de una banda de 670 pb que incluye parte del transgén formado por un fragmento del intrón 1 de Pomc y parte de la secuencia codificante para Cre **(Figura 21A)**. Del total de crías nacidas, catorce fueron positivas para la incorporación del transgén Pomc-Cre. Las líneas transgénicas se denominaron de acuerdo al número correspondiente a la identidad de cada fundador. Seis ratones fundadores transmitieron el transgén a su descendencia, estableciendo una línea transgénica independiente. Para expandir las líneas transgénicas, cada fundador fue apareado con un ratón silvestre de la cepa C57BL/6J x CBA/J. Las camadas nacidas a partir estas cruzas corresponden a la generación F_1, que fueron utilizadas para los análisis posteriores.

N°de cigotos microinyectados	N°de hembras receptoras	N°de crías nacidas	N°de ratones transgénicos	% de ratones transgénicos
345	13	66	14	21,2

Tabla 6. Resumen del proceso de generación de las líneas transgénicas Pomc-Cre. Se transfirieron 345 cigotos microinyectados con el transgén linearizado a 13 hembras seudopreñadas; de éstas nacieron 66 crías, de las cuales el 21,2 % resultaron ser ratones transgénicos.

4.10 Expresión de la proteína Cre en hipófisis y cerebro

La especificidad del promotor de Pomc para dirigir la expresión de Cre en la hipófisis murino fue también verificada utilizando el animal reportero de la actividad recombinasa de Cre, Rosa26-EGFP, de igual forma como anteriormente se ha describió para los animales TH-Cre / Rosa26-EGFP y DAT-Cre / Rosa26-EGFP.

La actividad recombinasa de la proteína Cre en la glándula hipofisiaria se verificó por análisis de inmunohistofluorescencia para EGFP y ACTH en animales Pomc-Cre / Rosa26-EGFP **(Figura 24)**. Los resultados mostraron la expresión de EGFP en las líneas 210b y 261b. Se observó expresión de EGFP en células del lóbulo anterior de animales de la línea 210b y en el lóbulo intermedio de animales de las líneas 210b y 261b. Esta expresión se corroboró por co-inmunoreactividad para EGFP y ACTH, permitiendo la identificación de la expresión de EGFP en corticotropos de la glándula hipofisiaria.

La especificidad del promotor de Pomc para dirigir la expresión de Cre en la glándula hipofisiaria fue también verificada utilizando retrotranscripción *in vitro* de mRNA total, por identificación del cDNA de transgén Pomc-Cre. La verificación de la actividad recombinasa de Cre se realizó utilizando cDNA extraído de tres animales fundadores 209b, 224b y 232b, mediante análisis de PCR. El partidor sentido es complementario a un segmento del exón 1 y 2 del mRNA de Pomc y el partidor antisentido es complementario a la secuencia codificante de Cre.

Para esta determinación se aisló mRNA total desde regiones que expresan el transcrito(Htl y pituitaria) y regiones en donde no se expresa el transcrito de Pomc (CX y CB). Los resultados de los análisis de PCR no mostraron expresión del cDNA del transgén Pomc-Cre en ninguno de estos tejidos. Sin embargo, las muestras analizadas sí presentaron retrotranscripción de mRNA

total en todas las áreas analizadas, por identificación del cDNA del gen constitutivo ciclofilina A **(Figura 25)**.

En la **Tabla 7** se resumen las líneas transgénicas de Pomc-Cre respecto a heredabilidad del transgén y localización de su actividad reportera.

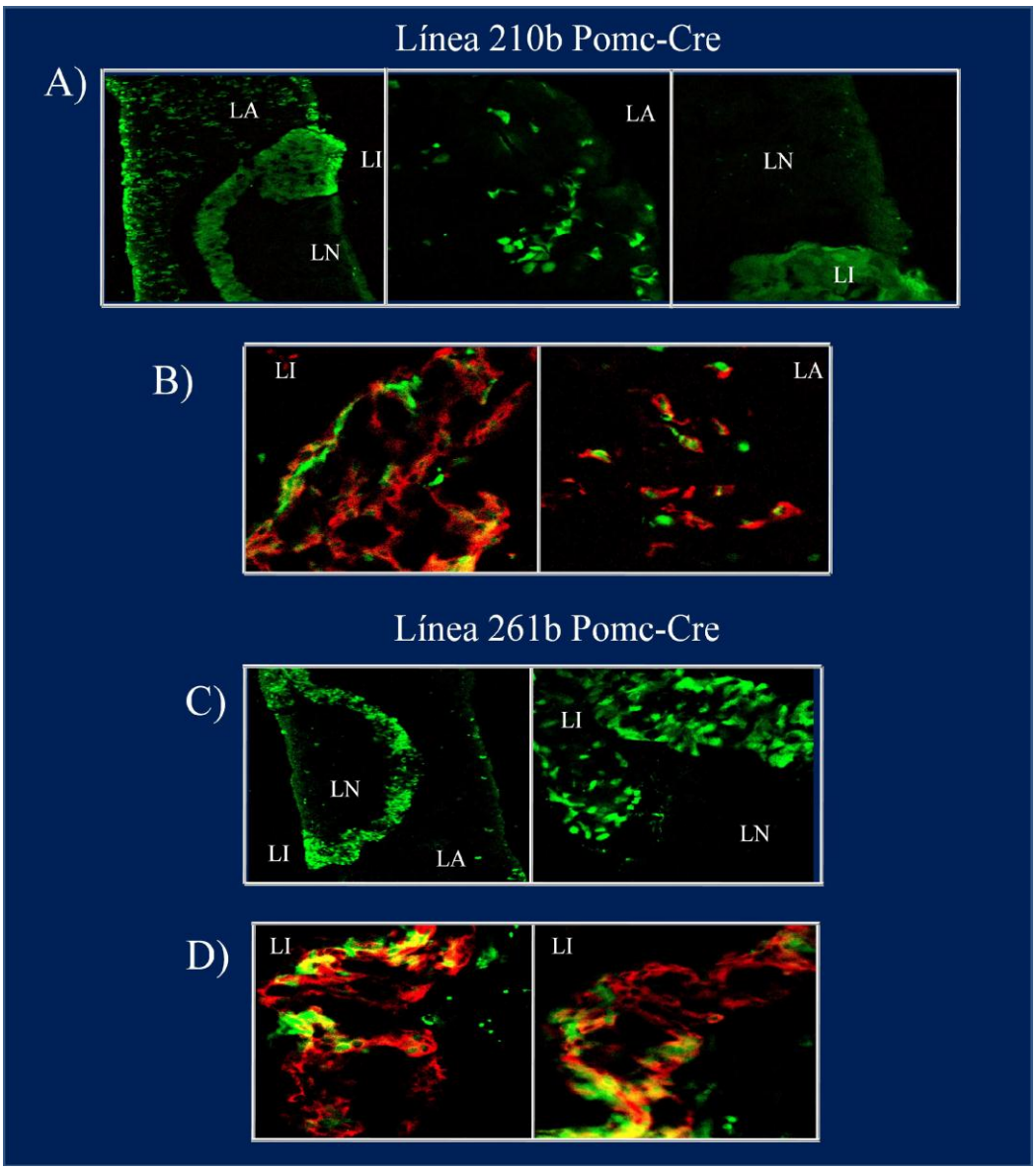


Figura 24: Detección de la actividad recombinante de Cre por inmunohistofluorescencia contra EGFP y ACTH endógeno. A) y C) Inmunohistofluorescencia contra EGFP reportera de la actividad recombinasa de Cre. **B) y D)** Doble inmunohistofluorescencia, en rojo se detecta la proteína endógena ACTH y verde la proteína EGFP, reportera de la recombinación molecular efectuada por la enzima Cre bajo en promotor proximal de proopiomelanocortina. LI: lóbulo intermedio, LA: lóbulo anterior y LN: lóbulo neural.

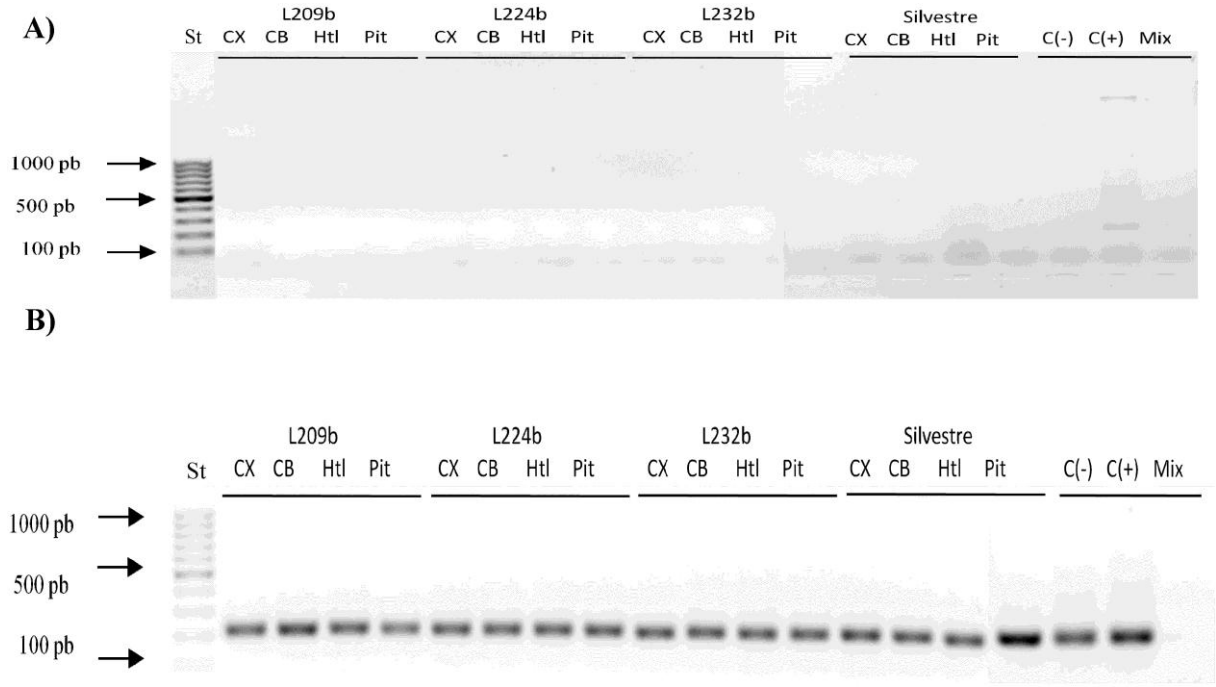


Figura 25: Estudio de la expresión de Pomc-Cre. Detección de la transcripción del transgén Pomc-Cre por retrotranscripción de mRNA total en áreas del cerebro CX, Htl y CB y la glándula pituitaria. **A)** PCR para el cDNA del transgén Pomc-Cre, no se detecta la banda de 194 pb. Se detecta una banda de 3.0 kb en el C(+) que corresponde a la secuencia transgénica de Pomc-Cre. **B)** PCR para Ciclofilina A como control de retrotranscripción. DNA genómico de un animal silvestre, C(-); DNA genómico de un animal transgénico Pomc-Cre, C(+); mezcla de la reacción, MIX y estándar de 100 pb, St.

Línea	Herencia del transgén	% Herencia mendeliana	Expresión del transgén	Tipo de Expresión
208b	No	-%	No	-
209b	-	-%	-	-
210b	Si	35,7%	Si	Endógena
224b	-	-%	-	-
225b	No	-%	No	-
228b	Si	50%	No	-
232b	-	-%	-	-
239b	No	-%	No	-
241b	No	-%	No	-
244b	No	-%	No	-
249b	Si	57,14%	No	-
261b	Si	62,5%	Si	Endógena
263b	No	-%	No	-
267b	Si	35,7%	No	-

Tabla 7. Resumen de las diferentes líneas obtenidas para el transgén Pomc-Cre. De las 14 líneas transgénicas obtenidas después de la microinyección, solo las líneas 210b, 228b, 249b, 261b y 267b transmiten el transgén a su descendencia; sin embargo, sólo las líneas 210b y 261b expresan la proteína Cre bajo el promotor de Pomc. Las líneas 210b y 261b expresan Cre en el lóbulo intermedio y sólo la línea 210b expresa en el lóbulo anterior de la pituitaria. Las líneas 228b y 249b heredan el transgén según lo esperado al patrón de herencia mendeliana.

5. Discusión

En el desarrollo de esta tesis se generaron 29 líneas de animales transgénicos portadores del cDNA de la proteína Cre bajo el control de los promotores de TH, DAT o Pomc. Del total de líneas generadas, 3 de ellas constituyen herramientas moleculares de alto valor para el estudio de la participación de genes en poblaciones celulares discretas.

Entre las 29 líneas de animales transgénicos generadas, 9 no transmitieron el transgén a su descendencia. Esto puede ser debido a que la integración del transgén haya ocurrido luego de la duplicación cromosómica y antes de la primera división celular, obteniendo como resultado animales mosaico que no contienen el transgén en todas sus células. Cuando las células de la línea germinal no tienen integrada la construcción transgénica, ésta no puede ser transmitida a la descendencia.

De las 20 líneas que transmitieron el transgén, 17 de ellas no exhibieron evidencia de la actividad recombinasa de Cre. La estrategia utilizada en esta tesis para la construcción de los animales transgénicos se basó en el modelo descrito por Nagy (Nagy *et al*., 2003). En breve, la inserción de la construcción transgénica ocurre aleatoriamente en el genoma murino. Por ésto, es posible que en estas líneas de animales transgénicos, la construcción se haya insertado en una zona transcripcionalmente silenciada del genoma, y de ahí la ausencia de actividad recombinasa como consecuencia de la falta de expresión de Cre.

Para la caracterización de las líneas transgénicas, inicialmente sólo se contempló la utilización de animales Rosa26 como reporteros de la actividad recombinasa de Cre. Debido a un retardo en la importación de estos animales y al periodo de cuarentena necesario antes de la expansión de colonia, se decidió determinar la eficiencia de la actividad recombinasa de los

animales transgénicos obtenidos hasta ese momento (TH-Cre y DAT-Cre), cruzándolos con animales portadores del alelo *Mecp2-Flox*. Por análisis de PCR en diferentes áreas cerebrales, se observó actividad recombinasa en regiones que contenían neuronas dopaminérgicas, pero también en áreas donde no se esperaba observar actividad recombinasa debido a la ausencia de neuronas dopaminérgicas. Una limitante de la detección de la actividad recombinante por este método es la falta de especificidad espacial, dado que el DNA obtenido desde las distintas regiones disectadas contenía material genómico de múltiples tipos neuronales. Sin embargo, los resultados obtenidos por esta técnica permitieron descartar las líneas transgénicas en las cuales no se observó actividad recombinasa de Cre en las áreas estudiadas.

Debido a las limitaciones espaciales obtenidas por el análisis de PCR, la continuación de la caracterización de las líneas transgénicas generadas en el desarrollo de esta tesis se realizó por análisis de inmunohistofluorescencia indirecta contra EGFP. Esto se realizó utilizando animales F_1 de las cruzas entre animales expresores de Cre y reporteros Rosa26.

En las líneas transgénicas para TH-Cre se observó un patrón de expresión ectópico en todas las líneas que expresaron el transgén. Sin embargo, animales de la línea 817 presentaron un patrón de expresión de Cre acorde a la expresión de TH, con una marcada expresión en los núcleos de la amígdala y un mínimo de ectopicidad en otras regiones. Esto es comparable a los resultados obtenidos por Liu y por Kessler, quienes en forma independiente generaron un ratón transgénico de fusión entre el promotor de TH y el cDNA de un gen reportero y encontraron expresión del reportero de la actividad transcripcional del promotor de TH en neuronas dopaminérgicas y núcleos de la amígdala, entre otros (Liu *et al*., 1997; Kessler *et al*., 2003). El transgén utilizado en nuestro estudio fue previamente utilizado y los animales generados por este grupo también expresaron la proteína Cre en los núcleos de la amígdala (Gelman *et al*., 2003). La

generación de tres líneas transgénicas con el mismo patrón de actividad transcripcional para el promotor de TH por grupos independientes, sugiere que aunque los núcleos de la amígdala no expresan TH, este promotor presenta actividad en neuronas dopaminérgicas. Esto podría ser consecuencia de una actividad transcripcional de este promotor en estadios tempranos del desarrollo embrionario (Asmus y Newman., 1993; Min *et al*., 1994). Cabe señalar que la expresión de la proteína Cre bajo el promotor de TH, temprana y transitoriamente en el desarrollo, es suficiente para inducir la recombinación de los sitios loxP del gen introducido en el genoma murino. Particularmente, una expresión transitoria de Cre en los núcleos de la amígdala determinaría la recombinación del transgén flanqueado por sitios loxP, condición que perdurará a lo largo del desarrollo del animal, aún en ausencia de la actividad transcripcional del promotor de TH en estadios posteriores. La expresión de Cre en los núcleos de la amígdala, puede ser explicada por una actividad transcripcional del promotor para TH en estas células, aunque estos núcleos no expresen TH. Esto último podría ser consecuencia de la ausencia de sitios represores de la transcripción presentes en el gen endógeno para TH, pero no incorporados en la construcción del transgén (Lindeberg *et al*., 2004; Kelly *et al*., 2006). Por otra parte, la actividad recombinasa de Cre que se observó en regiones que expresan TH en la línea 817, puede ser explicada por la presencia de cinco secuencias altamente conservadas en mamíferos entre -2 y -9 kb del promotor de TH y reconocidas como blanco de factores de transcripción para TH (Kessler *et al*., 2003).

Las líneas transgénicas DAT-Cre en las cuales se identificó la actividad reportera de recombinación por Cre, presentaron un patrón de expresión ectópico y sólo una de ellas mostró actividad recombinasa en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio. Análisis *in silico* de la secuencia del transcrito primario para DAT entre humano y murino, han permitido identificar

regiones altamente conservadas que facilitan la regulación transcripcional de DAT (Donovan *et al*., 1995; Kouzmenko *et al*., 1997). Por el contrario, análisis de conservación a una región de 10 kb del promotor de DAT en cada una de estas especies no han identificado ningún tipo de homología, excepto por una región de 200 pb cercana al sitio de inicio de la transcripción, la cual es reconocida por factores transcripcionales activadores (Donovan *et al*., 1995). Otros autores han descrito secuencias blancos para factores represores de la transcripción en el promotor humano de DAT (-5.1 al -7.2 kb), las cuales no han sido descritas para el promotor murino de DAT (Sacchetti *et al*., 1999). Considerando el número de neuronas DAT positiva presentes en el SNC, el cual alcanza la cantidad mínima de 1 en 10^6, este patrón de expresión restringido es presumiblemente regulado por una única combinación de factores positivos y negativos de regulación transcripcional. El patrón de actividad ectópica para Cre observada en la línea 860 puede ser consecuencia de la carencia de determinadas regiones represoras ausentes en el promotor utilizado en la construcción DAT-Cre (5.1 kb). Estas secuencias pueden ser importantes para delimitar la transcripción de DAT en un reducido número de neuronas, dadas las características transcripcionales constitutivas de este promotor, el cual contiene múltiples sitios de unión para SP1 que controlan el inicio de la transcripción, y ausencia de regiones TATA y CAAT (Donovan *et al*., 1995). Por otra parte, Bäckman y cols insertaron por recombinación homóloga en la región 3'UTR del gen para DAT el cDNA para Cre. Este grupo logró expresar la proteína Cre en todos los tipos neuronales que expresan DAT; sin embargo, la expresión de DAT disminuyó producto de la inestabilidad del mRNA a causa de la inserción en el 3'UTR (Bäckman *et al*., 2006).

Los resultados obtenidos por análisis de PCR, inmunotransferencia e inmunohistofluorescencia de la actividad recombinasa de Cre en animales DAT-Cre/*Mecp2-Flox*

y DAT-Cre/Rosa26 son complementarios. Los análisis de PCR para la línea DAT-Cre 860 mostraron recombinación en todas las áreas cerebrales analizadas, pero por inmunodetección se observó una baja actividad recombinasa de Cre. Esto es posible de explicar dado que la sensibilidad de la técnica de PCR es mayor a la inmunotransferencia. Además, es posible que los niveles de expresión de EGFP puedan estar bajo el umbral de detección por este método, a través del cual no se puede descartar la expresión de Cre. Los resultados obtenidos por análisis de PCR fueron confirmados por la técnica de inmunohistofluorescencia en animales DAT-Cre/Rosa26 y ésto permitió identificar un patrón más acabado de los resultados obtenidos.

En las líneas Pomc-Cre positivas para la actividad recombinasa de Cre, se identificó un patrón de expresión que se correlaciona con las células hipofisarias que normalmente expresan el gen de Pomc. La línea 210b presentó expresión en el lóbulo anterior y lóbulo intermedio de la glándula hipofisiaria. En el cerebro se identificó la expresión de Cre en pocas neuronas, lo que constituye una expresión ectópica de muy bajo nivel. La línea 261b presentó actividad recombinasa sólo en el lóbulo intermedio de la glándula hipofisiaria. No se detectó actividad recombinasa en el cerebro, a excepción de una región anterior de la corteza. El patrón de expresión observado en ambas líneas en la glándula hipofisiaria es concordante a los resultados obtenidos por Bumaschny, donde se expresó el cDNA de un gen reportero utilizando una secuencia del promotor de Pomc responsable de su transcripción sólo en el lóbulo anterior e intermedio de la glándula hipofisiaria (Bumaschny *et al*., 2007). Por otra parte, la actividad recombinasa observada en el núcleo arcuato del hipotálamo en animales de la línea 210b no se correlaciona con las características transcripcionales atribuidas al promotor utilizado (Liu *et al*., 1992; Liu *et al*., 1995). Sin embargo, no es atribuible a un patrón de expresión ectópico, dado que sólo se observó recombinación en neuronas que expresan ACTH, lo cual sugiere que en algún

momento del desarrollo del hipotálamo el promotor utilizado es transcripcionalmente activo en estas células. Además, esta recombinación sólo ocurre en algunas células Pomc positivas del hipotálamo. Esto puede ser debido a la falta de los elementos intensificadores nPE1 y nPE2, secuencias fundamentales para la transcripción de Pomc en esta área del cerebro (De Souza *et al*., 2005).

La generación de animales transgénicos portadores de la expresión de la recombinasa Cre es una herramienta metodológica de alto valor para el estudio de la función de genes, en especial si la expresión de Cre está bajo el control de promotores específicos para un tipo celular, lo cual otorga una mayor especificidad al sistema de recombinación de genes Cre-loxP. En el desarrollo de esta tesis se obtuvieron tres líneas transgénicas debidamente caracterizadas bajo el control de dos promotores independientes (TH-Cre 817 y Pomc-Cre 210b y 261b). Estas líneas expresan la recombinasa Cre en áreas celulares discretas y pueden ser usadas, en conjunto con ratones portadores de genes flanqueados por sitios loxP, para la generación de ratones *knockouts* condicionales tejido específicos, constituyendo una herramienta molecular de importante valor en el análisis de la función de genes *in vivo* en neuronas catecolaminérgicas del SNC y melanotropos y corticotropos de la glándula hipofisiaria.

6. BIBLIOGRAFIA.

Abremski, K., Frommer, B. and Hoess, R.H. (1986). Linking-number Changes in the DNA Substrate During Cre-mediated loxP Site-specific Recombination. *J Mol. Biol.*, 192, 17-26.

Abremski, K. and Hoess, H. (1984). Bacteriophage P1 Site-specific Recombination. Purification and Properties of the Cre Recombinase Protein. *J Biol. Chem.*, 259, 1509-1514.

Abremski, K. and Hoess, H. (1985). Phage P1 Cre-loxP site-specific recombination. Effects of DNA supercoiling on catenation and knotting of recombinant products. *J Mol. Biol.*, 184, 211-220.

Asmus, S.E. and Newman, S.W. (1993).Tyrosine hydroxylase mRNA-containing neurons in the medial amygdaloid nucleus and the reticular nucleus of the thalamus in the Syrian hamster. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.,* 20, 267-273.

Bäckman, C.M., Malik, N., Zhang, Y., Shan, L., Grinberg, A., Hoffer, B.J., Westphal, H. and Tomac, A.C. (2006). Characterization of a Mouse Strain Expressing Cre Recombinase From the 3' Untranslated Region of the Dopamine Transporter Locus. *Genesis*., 44, 383-390.

Booij, J., Bergmans, P., Winogrodzka. A., Speelman, J.D. and Wolters, E.C. (2001). Imaging of dopamine transporters with [123I]FP-CIT SPECT does not suggest a significant effect of age on the symptomatic threshold of disease in Parkinson's disease. *Synapse*., 39, 101-108.

Brüss, M., Wieland, A. and Bönisch, H. (1999). Molecular Cloning and Functional Expression of the Mouse Dopamine Transporter. *J. Neural. Transm.,* 106, 657-662.

Bumaschny, V.F., De Souza, F.S., López-Leal, R.A., Santangelo, A.M., Baetscher, M., Levi, D.H., Low, M.J. and Rubinstein, M. (2007). Transcriptional regulation of pituitary POMC is conserved at the vertebrate extremes despite great promoter sequence divergence. *J. Mol. Endocrinol.,* 21, 2738-2749.

Cerruti, C., Walther, D.M., Kuhar, M.J. and Uhl, G.R. (1993). Dopamine transporter mRNA expression is intense in rat midbrain neurons and modest outside midbrain. *Brain. Res. Mol. Brain. Res*., 18, 181-186.

Cheung, C.C., Clifton, D.K. and Steiner, R.A. (1997). Proopiomelanocortin Neurons are Direct Targets for Leptin in the Hypothalamus. *Endocrinology*., 138, 4489-4492.

De Souza, F., Santangelo, A.M., Bumaschny, V., Avale, M.E., Smart, J.M., Low, M.J. and Rubinstein, M. (2005). Identification of Neuronal Enhancers of the Proopiomelanocortin Gene by Transgenic Mouse Analysis and Phylogenetic Footprinting. *Mol. Cell. Biol.,* 25, 3076–3086.

Donovan, D.M., Vandenbergh, D.J., Perry, M.P., Bird, G.S., Ingersoll, R., Nanthakumar, E. and Uhl G.R. (1995). Human and mouse dopamine transporter genes conservation of 5'-flanking sequence elements and gene structures. *Brain. Res. Mol. Brain. Res*., 30, 327-335.

Edwards, R.H. (1998). Molecular Analysis of Parkinson's Disease. In: Martin JB, Ed. Molecular neurology. New York: Scientific American., 1998:155-174.

Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J. and Cone, R.D. (1997). Role of Melanocortinergic Neurons in Feeding and the Agouti Obesity Syndrome. *Nature.,* 385, 165-168.

Flik, G., Klaren, P.H., Van den Burg, E.H., Metz, J.R. and Huising, M.O. (2006). CRF and Stress in Fish. *Gen. Comp. Endocrinol*., 146, 36-44.

Freed, C., Revay, R., Vaughan, R.A., Kriek, E., Grant, S., Uhl, G.R. and Kuhar, M.J. (1995). Dopamine Transporter Immunoreactivity in Rat Brain. *J. Comp. Neurol.,* 359, 340-349.

Fujii, T., Sakai, M. and Nagatsu, I. (1994). Immunohistochemical Demonstration of Expression of Tyrosine Hydroxylase in Cerebellar Purkinje Cells of the Human and Mouse. *Neurosci. Lett*., 165, 161-163.

Fujita, M., Shimada, S., Nishimura, T., Uhl, G.R. and Tohyama, M. (1993). Ontogeny of Dopamine Transporter mRNA Expression in the Rat Brain. *Brain. Res. Mol. Brain. Res*., 19, 222-226.

Gelman, D.G., Noaín, D., Avale, ME., Otero, V., Low, M.J. and Rubinstein, M. (2003). Transgenic Mice Engineered to Target Cre/LoxP-Mediated DNA Recombination Into Catecholaminergic Neurons. *Genesis.,* 36, 196–202.

Ghosh, K. and Van Duyne, G.D. (2002). Cre–loxP biochemistry. *Methods.,* 28, 374-383.

Graybiel, A.M. and Moratalla, R. (1989). Dopamine Uptake Sites in the Striatum are Distributed Differentially in Striosome and Matrix Compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci*., 86, 9020-9024.

Hoess, R.H., Ziese, M. and Sternberg, N. (1982). P1 Site-specific Recombination: Nucleotide Sequence of the Recombining Sites. *Proc. Natl. Acad. Sci*., 79, 3398-3402.

Hoess, R.H. and Abremski, K. (1984). Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.,* 81, 1026-1029.

Japón, M.A., Rubinstein, M. and Low, M.J. (1994). In Situ Hybridization Analysis of Anterior Pituitary Hormone Gene Expression During Fetal Mouse Development. *J. Histochem. Cytochem*., 42, 1117-1125.

Kelly, B.B., Hedlund, E., Kim, C., Ishiguro, H., Isacson, O., Chikaraishi, D.M., Kimc, K.S. and Feng, G. (2006). A Tyrosine Hydroxylase–Yellow Fluorescent Protein Knock-in Reporter System Labeling Dopaminergic Neurons Reveals Potential Regulatory Role For The First Intron of the Rodent Tyrosine Hydroxylase Gene. *Neuroscience.,* 142, 343–354.

Kessler, M.A., Yang, M., Gollomp, K.L., Jin, H. and Iacovitti, L. (2003) The human tyrosine hydroxylase gene promoter. *Brain. Res. Mol. Brain. Res*., 112, 8-23.

Kouzmenko, A.P., Pereira, A.M. and Singh, B.S. (1997). Intronic Sequences Are Involved in Neural Targeting of Human Dopamine Transporter Gene Expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 240, 807–811.

Lindeberg, J., Usoskin, D., Bengtsson, H., Gustafsson, A., Kylberg, A., Söderström, S. and Ebendal, T. (2004). Transgenic Expression of Cre Recombinase From the Tyrosine Hydroxylase Locus. *Genesis*., 40, 67-73.

Liu, B., Hammer, G.D., Rubinstein, M., Mortrud, M. and Low M.J. (1992). Identification of DNA Elements Cooperatively Activating Proopiomelanocortin Gene Expression in the Pituitary Glands of Transgenic Mice. *Mol Cell Biol.,* 12, 3978-3990.

Liu, B., Mortrud, M. and Low M.J. (1995). DNA Elements with AT-rich Core Sequences Direct Pituitary Cell-Specific Expression of the Pro-opiomelanocortin Gene in Transgenic Mice. *Biochem. J.*, 312, 827-832.

Liu, J., Merlie, J.P., Todd, R.D. and O'Malley, K.L. (1997). Identification of cell type-specific promoter elements associated with the rat tyrosine hydroxylase gene using transgenic founder analysis. *Molecular Brain. Res. Mol. Brain. Res*., 50, 33-42.

Lovejoy, D.A. and Balment, R.J. (1999). Evolution and Physiology of the Corticotropin-releasing Factor (CRF) Family of Neuropeptides in Vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.,* 115, 1-22.

Mao, X., Fujiwara, Y., Chapdelaine, A., Yang, H. and Orkin, S.H. (2001). Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood.,* 97, 324-326.

Millington, G.W. (2006). Pro-opiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. *Clin. Expe. Dermatol.,* 31, 407-412.

Millington, G.W. (2007). The Role of Proopiomelanocortin (POMC) Neurones in Feeding Behaviour. *Nutr. Metab.,* 1; 4-18.

Min, N., Joh, T.H., Kim, K.S., Peng, C. and Son, J.H. (1994). 5' Upstream DNA Sequence of the Rat yrosine Hydroxylase Gene Directs High-level and Tissue-specific Expression to Catecholaminergic Neurons in the Central Nervous System of Transgenic Mice. Brain. *Res. Mol. Brain. Res.,* 27, 281-289.

Nagatsu, I., Komori, K., Takeuchi, T., Sakai, M., Yamada, K. and Karasawa, N. (1990). Transient Tyrosine Hydroxylase-immunoreactive Neurons in the Region of the Anterior Olfactory Nucleus of pre- and postnatal Mice do not Contain Dopamine. *Brain. Res.,* 511, 55-62.

Nagy, A., Vintersten, K., Gertsenstein, M. and Behringer, R. (2003). Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. 3ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 141- 160 y 289-358.

Pardridge, W.M. (2005).Tyrosine Hydroxylase Replacement in Experimental Parkinson's Disease with Transvascular Gene Therapy. *NeuroRx.,* 2, 129-138.

Polymeropoulos, M.H., Higgins, J.J., Golbe, L.I., Johnson, W.G., Ide, S.E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E.S., Pho, L.T., Schaffer, A.A., Lazzarini, A.M., Nussbaum, R.L. and Duvoisin, R.C. (1996). Mapping of a Gene for Parkinson's Disease to Chromosome 4q21-q23. *Science.,* 274, 1197-1199.

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root. H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I. and Nussbaum, R.L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.,* 276, 2045-2047.

Raffin-Sanson, M.L., De Keyzer, Y. and Bertagna, X. (2003). Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *Eur. J. Endocrinol.* 149, 79-90.

Rubinstein, M., Mogil, J.S., Japón, M., Chan, E.C., Allen, R.G. and Low, M.J. (1996). Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking β-endorphin by site-directed mutagenesis. *Neurobiology.,* 93, 3995-4000.

Sacchetti, P., Brownschidle, L.A., Granneman, J.G. and Bannon, M.J. (1999). Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Brain. Res. Mol. Brain. Res*., 74, 167-174.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Vol. 1.

Sauer, B. (1998). Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/lox System. *Methods*., 4, 381-392.

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J. and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*., 404, 661-671.

Shimada, S. Kitayama, S., Walther, D. and Uhl, G. (1992). Dopamine Transporter mRNA: Dense Expression in Ventral Midbrain Neurons. *Brain. Res. Mol. Brain. Res*., 13, 359-362.

Smith, A.I. and Funder, J.W. (1988). Proopiomelanocortin Processing in the Pituitary, Central Nervous System, and Peripheral Tissues. *Endocr. Rev*., 9, 159-179.

Sternberg, N., Hamilton, D., Austin, S., Yarmolinsky, M. and Hoess, R. (1981). Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*., 1, 297-309.

Sternberg, N. and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.,* 150, 467-486.