

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
3. HIPÓTESIS	8
4. OBJETIVOS	9
4.1 Objetivo General.....	9
4.2 Objetivos Específicos.....	9
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
5.1 Vectores adenoasociados recombinantes (VAAr)	10
5.1.1 Biología de los VAAr	13
5.2 Estrategias para el uso eficiente de vectores VAAr.....	13
5.2.1 Activación de casetes de expresión mediado por Cre recombinasa.....	14
5.2.2 Estrategias para la expresión bicistrónica en eucariontes.....	16
5.3 Secuencias CHYSEL/2A.....	16
5.3.1 Péptido P2A.....	19
5.4 Herramientas genéticas moleculares usadas en el estudio del Sistema Nervioso Central.....	21
5.4.1 Proteínas Fluorescentes.....	22
5.4.2 GECI.....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 Soluciones Stock.....	25
6.2 Construcción de la secuencia TdTomato-P2A-GCaMP6.....	25
6.2.1 Plásmidos usados durante esta tesis.....	27
6.2.2 Amplificación de ADN por PCR.....	29
6.2.3 Electroforesis de ADN geles analíticos.....	31
6.2.4 Cuantificación de ADN.....	31
6.2.5 Electroforesis de ADN de geles preparativos.....	32
6.2.6 Purificación de ADN desde gel de agarosa.....	32

6.2.7	SOEing.....	33
6.2.8	Digestión analítica.....	34
6.2.9	Precipitación de ADN.....	34
6.3	Transformación bacteriana.....	35
6.4	Purificación de plásmidos.....	35
7.	RESULTADOS.....	37
7.1	Estandarización de carga de ladders 1kb y Lambda DNA/HindIII Marker en gel de agarosa pre-teñido con GelRed™ 0,125X.....	37
7.2	Construcción de Secuencia TdTomato-P2A-GCaMP6.....	37
7.2.1	Cuantificación de plásmidos cDNA3.1-6his-TdTomato, pCAG-GCaMP6f, pCAG-GCaMP6s.....	43
7.2.2	Gel de agarosa analítico de la PCR realizada para obtener fragmentos TdTomato-P2A, P2A-GCaMP6f y P2A GCaMP6s usando la enzima <i>GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase</i>	37
7.2.3	Gel de agarosa analítico de la PCR realizada para obtener fragmentos TdTomato-P2A, P2A-GCaMP6f y P2A-GCaMP6s, usando la enzima <i>Proofreading, Herculase II fusion DNA polymerase</i>	46
7.2.4	Cuantificación de fragmentos TdTomato-P2A, P2A-GCaMP6f y P2A GCaMP6s, purificado desde gel de agarosa mediante análisis densitométrico.....	49
7.2.5	Cuantificación del producto PCR SOEing, para generar la secuencia TdTomato-P2A-GCaMP6s y TdTomato-P2A-GCaMP6f, mediante análisis densitométrico.....	52
7.3	Ensayo de restricción con EcoRI y KpnI, para la secuencia TdTomato-P2A-GCaMP6s y TdTomato-P2A-GCaMP6f.....	55
8.	DISCUSIÓN.....	58
9.	CONCLUSIÓN.....	61
10.	PERSPECTIVAS.....	62
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	63

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1	11-12
Figura 2	15
Figura 3	18
Figura 4	19-20
Figura 5	24
Figura 6	26
Tabla 1	30
Figura 7	38
Figura 8	39-40
Tabla 2	41
Tabla 3	42
Figura 9	43-45
Figura 10	47-48
Figura 11	50
Tabla 4	51
Figura 12	53
Tabla 5	54
Figura 13	55-56