

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



PAPEL FUNCIONAL DEL RECEPTOR NUCLEAR
NURR1 EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
DE MAMIFERO

Por

BIOL. ODILA SAUCEDO CARDENAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Morfología

Diciembre, 1999

BIOL. ODILA SAUCEDO CARDENAS

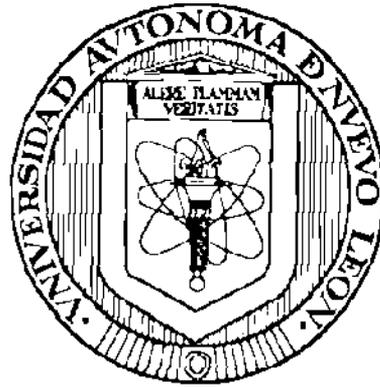
TD
QL799
.5
.S3
1999
c.1



1080090237

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**PAPEL FUNCIONAL DEL RECEPTOR NUCLEAR NURR1 EN EL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL DE MAMIFERO**

Por

BIOL. ODILA SAUCEDO CARDENAS

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

Diciembre, 1999

TD
QL799
.5
.53
1999
C.1

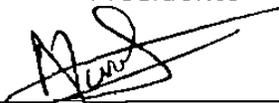


**PAPEL FUNCIONAL DEL RECEPTOR NUCLEAR NURR1 EN EL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL DE MAMIFERO**

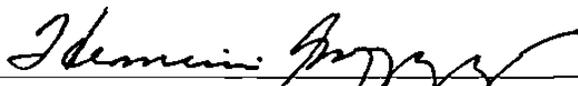
Aprobación de la Tesis:



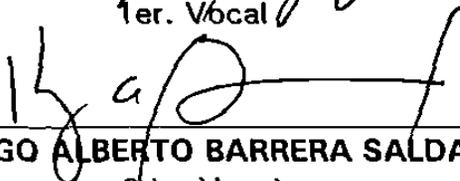
DR. JUAN MANUEL SOLIS SOTO
Presidente



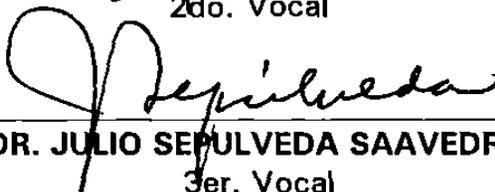
DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Secretario



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRIGUEZ
Ter. Vocal



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
2do. Vocal



DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA
3er. Vocal



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

PAPEL FUNCIONAL DEL RECEPTOR
NUCLEAR NURR1 EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL DE MAMIFERO

Presentado por Biol. Odila Saucedo Cárdenas

Este trabajo se realizó en el departamento de Biología Celular del Colegio de Medicina de Baylor, Houston, Texas, E.U.A. , bajo la asesoría externa de la Dra. Orla M. Conneely, y supervisada por el asesor interno Dr. Juan Manuel Solís Soto del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y co-asesor el Dr. Roberto Montes de Oca Luna del Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.



Dra. Orla M. Conneely
Asesor externo



Dr. Juan Manuel Solís Soto
Asesor interno



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Co-asesor

DEDICATORIA
CON TODO MI AMOR

A MIS PADRES

A MI ESPOSO

A MI HIJO

A MIS HERMANOS

A MIS AMISTADES

A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO

A TODOS QUIENES DESINTERESADAMENTE ME AYUDARON

Agradecimientos

"La obtención de un título representa la culminación de un arduo trabajo, pero que sin duda alguna no es el triunfo de una sola persona, sino de un equipo de trabajo que con dedicación y constancia permite que se lleve a cabo la realización de determinada tarea."

Por esta razón deseo de todo corazón expresar mediante este pequeño escrito mi más sincero agradecimiento.

Primeramente debo dar las gracias a Dios por permitirme terminar con este trabajo de doctorado y por permitirle a mis padres: Sr. Victoriano Saucedo Gonzalez y Sra. Odila Cárdenas Espinoza seguir a mi lado, quienes con su presencia iluminan mi vida.

A mis hermanos Manuel, Antonia, Ramona, Francisca, Jesús y Juan quienes siempre con alegría me han apoyado en mi carrera. Y en especial a mis sobrinos Rigoberto, Juan y Víctor, quienes siempre han mostrado interés por mi trabajo.

A mi pequeña familia: mi hijo Carlos Roberto Montes de Oca Saucedo quien creció siempre con la esperanza de ver llegar temprano a su mamá y quien prematuramente comprendió mi situación y sus porras me ofreció, y a mi esposo Roberto Montes de Oca quien siempre su ayuda me brindó para la realización del presente trabajo.

De manera especial, quiero dar las gracias a dos grandes amigos:

Al M.en C. Felipe Amaya Manzanares quien fue mi primer asesor en el campo de la Biología Molecular a temperatura ambiente y a -20°C . Y quien siempre me apoyó y título me adelantó.

A la Sra. Aileen Ward quien siempre desinteresadamente su ayuda me ofreció y hasta inglés me enseñó.

En la vida siempre tenemos personas que influyen de alguna manera en nuestros triunfos, en mi vida en particular han sido 2 personas las que ya sea directamente e indirectamente han permitido este logro:

El Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla que descanse en paz. Quien siempre me inculcó que las cosas no deben dejarse inconclusas, que se tiene que devolver con creces los conocimientos adquiridos a las generaciones futuras; y que junto con su frase, "te vas a dar una gran divertida", mi pensamiento siempre albergó hasta llegar al final de mi formación de posgrado.

La Dra. Orla M Conneely quien siempre influyó en mi persona para la obtención del grado de doctor y que siempre me insistió en la importancia que tiene el grado de doctor en la vida de un científico.

A la comisión de tesis por sus valiosas observaciones a la presente.

Al Dr. Roberto Montes de Oca por su asesoría y al Dr. Julio Sepúlveda S. por aceptarme como estudiante de pos-grado en la especialidad de Morfología.

A mis maestros, por sus invaluable enseñanzas.

Y como dije al principio, el trabajo se hace en equipo, y quiero mencionar especialmente a mis compañeros de trabajo quienes con su ambiente jovial disminuyeron la carga de trabajo: Pauline Ward, Grainne Cunningham, John P. Lydon, Silvia Briones , Juan de Dios Quintana, Sonia Uribe , Maricela Mendoza, Evelyn Murphie, Tiia Ponnio, Rachele Kardon, Tracy R. Ediger, Laksmi y Biserka Mulac-Jericevic.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Superfamilia de Receptores Nucleares.....	2
1.2 Subfamilia Nurrl.....	4
1.3 Estrategias Experimentales.....	7
1.4 Hipótesis.....	11
1.5 Objetivos del Trabajo.....	11
2. MATERIALES Y METODOS.....	13
2.1 Estrategias Experimentales.....	13
2.2 Materiales.....	14
2.3 Trabajo Bacteriológico.....	15
2.4 Preparación de Moléculas Recombinantes	
DNA Genómico	16
2.4.1 Preparación de DNA de Plásmido	
Recombinante.....	16
2.4.2 Preparación de DNA de Fago.....	16
2.4.3 Preparación de DNA Genómico a	
Partir de Células Embrionarias	
de Ratón.....	17
2.4.4 Digestión del DNA Recombinante	
con Enzimas.....	18
2.4.5 Preparación de DNA para Subclonar.....	19
2.4.6 Subclonación de Insertos de DNA.....	19
2.5 Electroforesis en Geles de Agarosa y	
Acrilamida.....	19
2.5.1 Electroforesis en geles de Agarosa.....	20
2.5.2 Electroforesis en geles de	
Poliacrilamida.....	20
2.5.3 Secado de gel.....	21
2.6 Hibridación de Acidos Nucleicos.....	21
2.6.1 Hibridación tipo "Southern".....	21
2.6.2 Transferencia de DNA Fágico a	
Membranas de Nitrocelulosa.....	22
2.6.3 Transferencia de DNA Bacteriano	
a Membranas de Nitrocelulosa.....	22

2.6.4	Hibridación con Sondas de DNA	
Homólogo.....		23
2.6.5	Hibridación con Sondas	
Oligonucleotídicas		24
2.7	Marcaje Radioactivo de DNA.....	24
2.7.1	El Método de Translación de la	
Muesca.....		25
2.7.2	Método del Marcaje de	
de Oligonucleótidos al Azar.....		25
2.7.3	Marcaje del Extremo 5' de	
Oligonucleótidos.....		26
2.8	Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	26
2.9	Secuenciación de DNA por el Método de	
Sanger.....		27
2.10	Hibridación <i>in situ</i>	28
2.10.1	Preparación del Material Histológico.....	28
2.10.2	Preparación de la Sonda de RNA.....	39
2.10.3	Hibridación <i>in situ</i>	39
2.10.4	Sistema de Detección.....	30
2.11	Electroporación y Cultivo de Células	
Embrionarias de Ratón.....		31
2.12	Tamizaje de Clonas de Células Embrionarias	
Mediante Mini-Southern.....		33
2.13	Inmunohistoquímica.....	34
2.14	Detección de Apoptosis.....	35
2.15	Microinyecciones.....	36
2.16	Cuantificación de Neurotransmisores y	
Medición Enzimática.....		36
3.	RESULTADOS.....	37
3.1	Caracterización Estructural del Gen Nurrl.....	37
3.1.1	Aislamiento del gen Nurrl.....	38
3.1.2	Análisis de Exones, Intrones y	
Secuencia de los Límites		
Exón/Intrón.....		39
3.1.3	Organización Estructural del gen	
Nurrl.....		42
3.2	Obtención de un vector que porta el gen	
Nurrl Mutado.....		43
3.2.1	Diseño del Vector.....	45
3.3	Análisis de la Expresión del gen Nurrl	
Mediante la Técnica de Hibridación		
<i>In situ</i>		49

3.3.1 Patrón de Expresión del gen Nurrl en el Sistema Nervioso Central (SNC) de Ratón Adulto.....	49
3.3.2 Patrón de Expresión del gen Nurrl Durante el Desarrollo Embrionario.....	61
3.4 Mutación del gen Nurrl Endógeno en Células Madre Embrionarias (CME) de Ratón.....	67
3.4.1 Estrategia Utilizada para la Mutación del gen Nurrl Endógeno de CME.....	67
3.4.2 Identificación de Clonas de Células Madres Embrionarias que Portan la Mutación del gen Nurrl.....	71
3.4.3 Análisis Adicional Mediante Southern para Confirmar la Presencia del gen Mutado Nurrl en las Clonas de CME.....	71
3.5 Obtención de un Modelo Animal deficiente de Nurrl.....	73
3.5.1 Microinyección de CME en Blastocistos.....	73
3.5.2 Resultados de las Microinyecciones.....	74
3.6 Análisis del Fenotipo de los Ratones Carentes de Nurrl.....	76
3.6.1 Datos Generales del Fenotipo.....	76
3.6.2 Rescate del Fenotipo con Glucosa.....	77
3.6.3 Análisis Histológico, Inmunohistoquímico e Hibridación <i>in situ</i>	78
4. DISCUSION.....	88
5. CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIONES.....	100
6. BIBLIOGRAFIA.....	103
APENDICE	
PUBLICACIONES GENERADAS CON LA PRESENTE TESIS.....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Organización Estructural del gen Nurrl y Ubicación de las tres Clonas Genómicas (P10,P20,P30) Identificadas Positivas para el gen Nurrl.....	40
2 Obtención del gen Nurrl Mutado.....	48
3 Patrón de Expresión de Nurrl en el Telencéfalo de Ratón Adulto.....	53
4 Hibridación <i>in situ</i> de Nurrl en el Diencéfalo y Mesencéfalo de Ratón Adulto.....	55
5 Hibridación <i>in situ</i> del RNAm de Nurrl en Hipotálamo y Pituitaria de Ratón Adulto.....	57
6 Hibridación <i>in situ</i> del RNAm de Nurrl en un Corte Frontal del Cerebro Posterior de Ratón Adulto.....	60
7 Patrón de Expresión del RNAm de Nurrl durante el Desarrollo del Cerebro de Ratón.....	63
8 Expresión de Nurrl durante el Desarrollo de la Médula Espinal del Ratón.....	66
9 Inactivación del gen Nurrl en Células Madre Embrionarias (CME) y Detección de su Genotipo.....	70
10 Análisis de los niveles de monaminas y Acetilcolintransferasa (Chat) en Ratones Recién Nacidos.....	80
11 Expresión de Tirosina Hidroxilasa (TH) y Niveles de Dopamina en Células de la Médula Adrenal y Bulbo Olfatorio de Ratones Recién Nacidos.....	82

12	Análisis del Fenotipo Celular en la Región Ventral Mesencefálica de Embriones Silvestres y Mutantes Nurrl.....	84
13	Pérdida de la Expresión de Ptx-3 y Muerte Celular en la Región Ventral Mesencefálica de Ratones Recién Nacidos Mutantes Nurrl.....	87

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Localización de Intrones y Límites Exón-Intrón del gen Nurrl.....	41
II	Distribución de Nurrl dentro del SNC.....	50

LISTA DE SIMBOLOS

DNA	Acido Desoxirribonucleico
EDTA	Acido etilen diamino tetracetico
RNA	Acido Ribonucleico
ATP	Adenosin Trifosfato
TAE	Amortiguador de corrida Tris-acetato-EDTA
PBS	Amortiguador de fosfatos
CME	Células madre embrionarias
DNAc	DNA complementario al RNAm
MgCl	Cloruro de magnesio
NaCl	Cloruro de sodio
KCl	Cloruro de potasio
M	Concentración molar
N	Concentración normal
°C	Grados centígrados
g	Gramos
NaOH	Hidróxido de sodio
Kb	Kilobases
SDS	Lauril sulfato de sodio
μCi	Micro curie
μg	Micro gramo
μl	Micro litro
mA	Miliamperios
ng	Nano gramo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNAm	RNA mensajero

RNA _t	RNA de transferencia
Tris-HCl	Trizma base 1M y ajustado a pH de 8.0 con HCl
TE 1X	Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8.0
SNC	Sistema nervioso central
SEVAG	Solución cloroformo-álcohol isoamílico en proporción 24:1
SSC	Solución salina de citratos (NaCl 0.15 M, citrato trisódico, 15 mM, pH 7.0)
dNTP's	Trifosfato de desoxinucleósidos
T.A.	Temperatura Ambiente (°C)
uv	Ultravioleta
v	Voltios

ABSTRACT

Odila Saucedo Cárdenas

Graduation date: October, 1999

Autonomous University of Nuevo León
Faculty of Medicine

Title:

FUNCTIONAL ROLE OF THE NUCLEAR
RECEPTOR NURR1 IN THE MAMMALIAN
CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Number of pages: 116

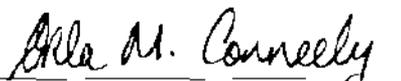
Candidate to degree of Doctor
In Sciences with major in
Morphology

Study area: Morphology

Purpose and Study Method: Nurr1 is a member of the nuclear receptor superfamily of transcription factors that is expressed predominantly in the brain. The purpose of this work was to elucidate the Nurr1 function. The specific aims of this proposal were as follows: (1) Nurr1 gene characterization, (2) analysis of the spatio-temporal expression pattern of Nurr1 during development and in the adult mouse brain by *in situ* hybridization, (3) generation of mice that are homozygous for a null mutation of the Nurr1 gene and (4) phenotypic characterization of Nurr1 mutant mice by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. To generate the mutant mouse model lacking of Nurr1 we used the genes inactivation technology by homologous recombination in embryonic stem cells. To identify apoptotic cells, we used the Trevigen apoptotic cell system *in situ* kit from Trevigen. We previously isolated the Nurr1 gene from a mouse genomic library and determined its structural organization.

Conclusions and Contributions: We found that Nurr1 gene is approximately 7.6 kb long and is organized into 8 exons. The onset of Nurr1 expression in the brain occurs at embryonic day 10.5 and is localized in the intermediate layer of the neuroepithelium. In the adult the Nurr1 expression was localized predominantly in the hypothalamus, thalamus, ventral midbrain, brain cortex, hippocampus, cerebellum and limbic system. The Nurr1 inactivating mutation is lethal, the homozygous mutant mice do not survive the first day after birth. These mice lack of the striatal dopamine neurotransmitter and of the dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area, the dopaminergic cell markers tyrosine hydroxylase and L-aromatic amino acid decarboxylase were absent in these neurons. We demonstrated that the role of Nurr1 in dopaminergic cell development is specific to the ventral midbrain where it is essential to induce final differentiation of ventral mesencephalic dopaminergic precursor neurons into a dopaminergic phenotype as well as for survival of these late dopaminergic precursors.

SIGNATURE OF EXTERNAL ADVISER


Ph. D. ORLA M. CONNEELY

RESUMEN

Odila Saucedo Cárdenas

Fecha de graduación: Diciembre, 1999

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del trabajo:

**PAPEL FUNCIONAL DEL RECEPTOR NUCLEAR
NURR1 EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
DE MAMIFERO**

Número de páginas: 114

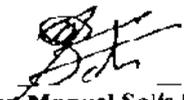
Candidato para el grado de Doctor
en Ciencias con especialidad en
en Morfología.

Area de Estudio: Morfología

Propósito y Método del Estudio: Nurr1 es un factor de transcripción de la superfamilia de receptores nucleares que se expresa predominantemente en el cerebro. Con el propósito de descifrar la función de Nurr1 se (1) caracterizó el gen Nurr1, (2) se determinó su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario y en el cerebro del ratón adulto mediante hibridación *in situ*, (3) se obtuvo un modelo animal con el gen Nurr1 mutado y (4) se analizó el fenotipo mutado mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Para generar el modelo animal carente de Nurr1 se utilizó la tecnología de inactivación de genes mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias. Para esto el gen Nurr1 se aisló de un banco genómico de ratón y se determinó su organización estructural. Para identificar células en apoptosis, utilizamos un kit de detección *in situ* de células en apoptosis de Trevigen.

Conclusiones y Contribuciones: Encontramos que este gen es de aproximadamente 7.6 kb y está organizado en 8 exones. Encontramos que la expresión de Nurr1 inicia a los 10.5 días del desarrollo embrionario, y se localizó en la capa intermedia del neuroepitelio. En el adulto Nurr1 se expresó principalmente en el hipotálamo, tálamo, región ventral mesencefálica, corteza cerebral, hipocampo, cerebelo y sistema límbico. La inactivación de este gen es letal, ya que los ratones homocigotos para esta mutación se murieron en el primer día de vida. Estos ratones carecen del neurotransmisor dopamina en el cuerpo estriado y presentan ausencia de neuronas dopaminérgicas en la región ventral mesencefálica. En esta región, se encontró que hubo una pérdida de la expresión de los genes encargados de la síntesis de dopamina: tirosina hidroxilasa y L-d Descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos. Demostramos que Nurr1 participa específicamente durante el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas ventrales, donde induce el fenotipo dopaminérgico a partir de la diferenciación de células precursoras y es esencial para la supervivencia de estos precursores. Además, este modelo animal generado tiene un gran potencial para el estudio de enfermedades neurodegenerativas.

FIRMA DEL ASESOR INTERNO



Dr. Juan Manuel Solís Soto