CAPITULO 1

INTRODUCCION

En la actualidad se han descubierto y caracterizado un gran número de genes, como los que codifican para receptores, factores de transcripción, neuropéptidos, entre otros. El análisis detallado de estos genes, ha permitido determinar homologías entre ellos y clasificarlos en familias. Una de ellas es la superfamilia de receptores nucleares, que es la familia más numerosa que se conoce de factores de transcripción en eucariotes y controla una variedad de procesos del desarrollo, fisiológicos y del comportamiento[1, 2,3].

Por otro lado, el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética ha facilitado la creación de ratones "Knock-out" (KO), en los que por recombinación homóloga se inactiva el gen deseado. Estos ratones manipulados genéticamente son excelentes modelos de enfermedades humanas y animales, representan una poderosa herramienta en los ensayos de toxicología y farmacología modernos, y constituyen una pieza básica en los estudios de fisiología de los mamíferos. En el presente trabajo se

obtuvieron ratones KO Nurr1; es decir, ratones con la función de Nurr1 ausente.

1.1 Superfamilia de receptores nucleares

Los receptores nucleares que son activados por hormonas esteroideas (estrógenos, progesterona, glucocorticoides, mineralcorticoides y andrógenos), tiroideas y ciertas vitaminas solubles en grasa (vitamina D, ácido retinoico, 9-cis ácido retinoico y ecdisona) son un prototipo de esta familia de factores de transcripción. Estos factores de transcripción una vez que se unen a su ligando, alteran el fenotipo celular al unirse a secuencias reguladoras específicas de DNA, y activan la expresión de una serie de genes blanco[3]. En los últimos años se ha obtenido información importante acerca de las características estructurales que requiere tener un receptor para unirse al ligando, dimerizar, unirse a secuencias de DNA específicas y activar la transcripción del gen blanco[4]. La secuencia de unión al DNA está determinada por una región de aminoácidos fuertemente conservada que contiene dos dedos de zinc en su estructura, que es la principal característica de esta familia de factores de transcripción[1,5]. El alto grado de conservación de aminoácidos dentro de esta región de receptores nucleares, se ha explotado para generar sondas de DNA que son utilizadas para

tamizar bibliotecas de DNAc (DNA complementario al RNAm) de diferentes tejidos y especies, con el objeto de aislar nuevos miembros de la familia de receptores nucleares. Mediante el uso de esta estrategia se han identificado más de 30 diferentes subfamilias de receptores nucleares[6,7].

La propiedad de los receptores nucleares de poseer una región de unión al DNA y ser factores de transcripción, indica que todos los miembros de la superfamilia regulan la expresión de genes, interactuando ya sea como monómeros[8,9.] o dímeros[10-14] con secuencias específicas de DNA activantes en cis (sobre las regiones contiguas), de las cuales se conocen dos tipos: AGGTCA y AGAACA[15-18]. Aunque los factores de transcripción activados por ligando, como por ejemplo los receptores para esteroides y retinoides, son los miembros más caracterizados de la superfamilia, algunos receptores nucleares pueden unirse a dicho DNA cis-activante y regular la transcripción a través de estos elementos de una manera independiente del ligando, ya sean como factores de transcripción activos en forma constitutiva[8,19] o cuando son activados por fosforilación[20-23]. A muchos de estos receptores se les ha determinado cual es su ligando, sin embargo existe un vasto grupo de receptores cuya función y ligando se desconocen todavía y a los cuales se les denomina "receptores huérfanos". Por su distribución durante el desarrollo embrionario y duración de su

expresión, se cree que estos receptores huérfanos desempeñan funciones importantes en el desarrollo de los tejidos y en la fisiología celular.

La identificación de secuencias específicas de unión al DNA que son reconocidas por receptores huérfanos, ha dado lugar a la búsqueda de genes que contienen en su región promotora dicha secuencia y los cuales serían genes blanco potenciales que pueden ser inducidos en su expresión por el receptor huérfano activo. Estos genes blanco proveen la primera pista para determinar la ruta fisiológica regulada por estos factores de transcripción. Además, a diferencia de la mayoría de los receptores, ellos son también productos de genes inmediatos tempranos cuya expresión puede ser inducida diferencialmente en respuesta a una variedad de estímulos extracelulares, incluyendo factores de crecimiento[24-26], neurotransmisores[27,28] y hormonas polipeptídicas[29,30].

1.2 Subfamilia Nurr1

Uno de estos receptores huérfanos es el factor de transcripción NURR1. El DNAc que codifica para este receptor huérfano NURR1 fue aislado de una biblioteca de DNAc de cerebro de ratón[31]. NURR1 (también llamado RNR-1[32] y NOT[33]) es muy similar a dos receptores nucleares adicionales: NUR77[24] (también llamado NGF1B/N10/NAK-1[28,34,35])y

NOR-1 (también llamado MINOR/TEC[36-38]). Estas tres proteínas constituyen una subclase de receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción y al parecer no requieren de un ligando para ser transcripcionalmente activos[29,32,37,39]. Los miembros de la subfamilia NURR1/NUR77/NOR-1, se agrupan como la subfamilia NURR1. Estos genes poseen un patrón de expresión característico y también presentan un traslape de expresión en algunas regiones del cerebro y durante su desarrollo[31]. Mientras que la expresión de NURR1 parece estar restringida a tejido del cerebro de ratón en el estado adulto y durante su desarrollo embrionario, la expresión constitutiva de NUR77 y NOR-1 está distribuida además del cerebro en algunos tejidos periféricos[31,40]. De este modo, mientras la expresión constitutiva de NURR1 esta restringida al tejido cerebral en el adulto, su expresión puede ser inducida en otros tejidos en respuesta a estímulos extracelulares. Por ejemplo, se ha encontrado expresión de NUR77 en células de linfocitos T sufriendo apoptosis[41], expresión de NURR1 en la corteza suprarrenal en respuesta a la estimulación por adrenocorticotropina[30] y en células de hígado en regeneración[32]. Al menos una de las tres proteínas, NUR77, ha demostrado ser una fosfoproteína que es fosforilada en respuesta a diferentes señales extracelulares[42]. En algunos casos, se ha demostrado que la inducción de

estos receptores nucleares está relacionada con cambios en el fenotipo celular mediados por señales extracelulares acopladas a la transcripción de genes regulados por receptores nucleares. De esta manera, la inducción de Nur77 por la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) en células de la corteza adrenal regula el proceso de esteroidogénesis mediante la inducción de la enzima esteroide-21-hidroxilasa[29]. De tal manera que tanto la expresión constitutiva como la inducible y la modificación covalente de estos factores de transcripción contribuyen en su papel funcional específico de tejido y en su respuesta a señales extracelulares.

Las 3 proteínas, NURR1, NUR77 y NOR-1 son similares en más del 90% de aminoácidos en su región de unión al DNA, incluyendo las regiones conservadas de las cajas P y A[43]. Se ha demostrado que estas cajas son requeridas para la interacción monomérica con la secuencia de DNA cis-activante AAAGGTCA, la cual contiene la secuencia AGGTCA y dos residuos A adicionales "río arriba". Esta secuencia es reconocida por las 3 proteínas y sirve como un potenciador funcional específico para mediar la activación transcripcional de manera constitutiva de un gene blanco artificial[37,39,43,44]. Posteriormente, se demostró que tanto NURR1 como NUR77 heterodimerizan con el receptor 9-cis ácido retinóico, RXR, y de esta manera son activos en la vía regulada por retinoides al unirse con la

secuencia AGGTCA, cuando está organizada en dos secuencias repetidas en forma directa[45]. Estas observaciones indican que los miembros de la subfamilia NURR1/NUR77/NOR-1 tienen la capacidad de interactuar entre ellos y de regular la transcripción de genes blanco que traslapan y pueden funcionar redundantemente si son expresados en las mismas células. De este modo, los análisis celulares y fisiológicos que se realicen para examinar las funciones de NURR1 deben tomar en cuenta la posibilidad de que NUR77 y NOR1 pueden estar presentes y proveer funciones traslapadas en estos sistemas.

1.3 Estrategias Experimentales

Desde los años 80's cuatro estrategias experimentales generales se han utilizado para determinar las rutas fisiológicas que son reguladas por receptores huérfanos. La primera consiste en determinar el patrón de expresión temporal y espacial de receptores huérfanos durante el desarrollo y en tejidos adultos. En caso de ser restringido, este patrón de expresión proporciona información importante acerca de los procesos del desarrollo o fisiológicos en los que pudieran estar involucrados receptores huérfanos, y por lo tanto se puede saber que áreas serán afectadas por la deleción de determinado receptor huérfano. La segunda estrategia consiste en explotar

la gran similitud de las regiones de unión al DNA de receptores nucleares para predecir o seleccionar mediante un tamizaje, variaciones específicas de la secuencia de DNA cis-activante que se une *in vitro* a receptores huérfanos específicos y activan la transcripción de genes blanco artificiales[39,46]. Como se indicó arriba, la identificación de genes que son coexpresados con receptores huérfanos específicos y cuyos promotores contienen estas secuencias ha conducido a la identificación de importantes blancos fisiológicos para algunos de estos receptores[29,47,48]. La tercera estrategia consiste en utilizar métodos de tamizaje para identificar ligandos que regulan la actividad de receptores huérfanos. Esta estrategia es la más difícil y cuestionable en términos de garantizar el éxito por dos razones: primera, si no se cuenta con información específica que nos permita reducir el *número de supuestos ligandos, el número de tamizajes que se requerirán* hace bastante tediosa esta estrategia. Segunda, la habilidad de algunos receptores huérfanos, incluyendo NURR1, para regular la transcripción en ausencia de un ligando, origina serias dudas como la de sí todos los miembros de la superfamilia funciona por interacción directa con ligandos. La cuarta estrategia consiste en examinar las consecuencias fisiológicas debido a la inactivación de receptores huérfanos, mediante la mutación de su gen por recombinación homóloga en células embrionarias de ratón. Esta

última estrategia, es la más reciente, y ha permitido los avances más significativos en el conocimiento de las funciones de un buen número de receptores huérfanos[49] y tiene la importante ventaja de que las alteraciones del fenotipo que se observan son definitivas, y son identificadas como requerimientos fisiológicos, ocasionados por la inactivación del receptor huérfano. Esta estrategia también tiene desventajas, ya que la deleción de un simple receptor huérfano puede no siempre resultar en un fenotipo aberrante identificable, particularmente cuando éste es un miembro de una subfamilia de receptores nucleares que interactúan con los mismos genes blanco y su expresión en tiempo y espacio se traslapa. En tales casos la deleción de más de un miembro de la subfamilia presenta algunas veces[49], pero no siempre[50-51],un fenotipo sumamente severo y de esta manera se pueden identificar las rutas reguladas por miembros que tienen funciones redundantes dentro de una subfamilia de receptores huérfanos. Por ejemplo, la subfamilia del receptor del ácido retinóico, la cual consiste de RARα o RARβ y RARγ y sus isoformas, α1 y 2, β1-4 y γ1 y 2[52-54] ha mostrado redundancia funcional entre algunos de los miembros. De este modo, ratones careciendo de RARβ aparecen normales, mientras que la deleción de subtipos RARα o RARγ resulta en anormalidades fenotípicas[55-58]. Además, estas anormalidades son extendidas y amplificadas por la

generación de ratones con doble mutación involucrando dos subtipos RAR indicando redundancia funcional parcial entre subtipos. En contraste, la deleción de dos receptores huérfanos altamente homólogos, COUP-TF1 y COUP-TFII resulta en muerte perinatal y muerte "in útero", respectivamente, lo cual indica que estas subfamilias individuales tienen funciones esenciales no redundantes *in vivo* a pesar del extensivo traslape de sus patrones de expresión[51] y su habilidad para interactuar con los mismos genes blanco[12,59].

Aunque nuestra primera prioridad fue establecer las funciones específicas de NURR1, era esencial que nosotros tomásemos en cuenta el potencial de la redundancia funcional entre los tres miembros de esta subfamilia de receptores nucleares. La importancia de esta redundancia funcional recientemente se ha reflejado con la generación de un modelo de ratón mutante carente de NUR77, el cual no mostró un fenotipo detectable debido posiblemente a la redundancia funcional entre los miembros de la subfamilia[60,61]. Las estrategias propuestas en este trabajo dieron pie a iniciar el esclarecimiento de la función del gen NURR1.

1.4 Hipótesis

El receptor huérfano Nurr1, es un factor de transcripción que se expresa predominantemente en el SNC, y tiene una gran homología con miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Se ha demostrado que los receptores nucleares activan la expresión de genes, y desempeñan funciones importantes en el SNC. Además, la inactivación de los genes de estos receptores, *in vivo*, provoca la muerte durante el desarrollo embrionario o después del nacimiento. Por lo tanto, es posible que Nurr1 sea parte de este grupo de factores de transcripción requeridos tanto para el desarrollo embrionario como para el buen funcionamiento del SNC.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

Dilucidar la función del receptor nuclear huérfano Nurr1.

1.5.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar el gen Nurr1 del ratón.
2. Determinar la expresión del gen Nurr1 durante el desarrollo embrionario y en el cerebro del ratón adulto.

3. Obtener un modelo animal carente de Nurr1.

4. Analizar el fenotipo del ratón mutante.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1 Estrategias Experimentales

Para cumplir con nuestros objetivos, utilizamos dos estrategias:

La primera consistió en establecer el patrón de expresión temporal y espacial del gene Nurr1. De acuerdo al patrón de expresión encontrado de Nurr1, obtuvimos información de la posible función de Nurr1 al hacer la relación estructura-función. La segunda estrategia consistió en la inactivación del gene Nurr1 mediante recombinación homóloga en células madres embrionarias (CME) de ratón. Analizamos las alteraciones del fenotipo observado. Nos enfocamos en las regiones del cerebro que mostraron una señal de expresión intensa para NURR1 con el objeto de saber si la función(es) ó funciones en la que está(n) involucrada(s) esta(s) estructura(s) había(n) sido afectada(s).

2.2 Materiales

La biblioteca genómica preparada en el vector λDash II que contiene DNA genómico proveniente de la cepa de ratón 129SvEv fue comprada de Stratagene y la biblioteca genómica preparada en el vector P1 lo fue de Genome Systems Inc. Las CME (AB-1) y fibroblastos SNL 76/7 usadas como células nutricionales fueron facilitados por el Dr. Allan Bradley (Baylor College of Medicine).

Todos los reactivos de laboratorio en general se obtuvieron de Fisher Scientific y Sigma.

Los componentes del medio de crecimiento de bacterias y CME fueron adquiridos de Gibco, Hyclone y Sigma. Los solventes fueron comprados de Fisher Scientific. Las enzimas fueron adquiridas de Promega, Pharmacia, Boehringer Mannheim y Bioresearch Labs. [α^{32}P]dCTP (3,000 Ci/mmole), [γ^{32}P] ATP (5,000 Ci/mmole) fueron comprados de ICN, [α^{35}] dATP (400 Ci/mmole) de Amersham y [α^{35}S] UTP (1,400Ci/mmole) de Dupont. Los "kits" para "nick translation", secuenciación, transcripción *in vitro* y apoptosis fueron adquiridos de Boehringer Mannheim, United States Biochemicals (USB), Promega y Trevigen, respectivamente. Los filtros de nitrocelulosa y nylon fueron comprados de Micron Separations Inc. y

Biorad, respectivamente. Las placas microtituladoras de 96 pozos fueron compradas de Becton Dickinson. El resto de reactivos utilizados fueron adquiridos de diversas compañías que los ofrecen de grado para Biología Molecular.

Los blastocistos para las microinyecciones fueron aislados de ratonas C57BL/6. Las hembras nodrizas pseudopreñadas fueron ratonas CBA. Las hembras utilizadas para cruzas con machos quiméricos fueron ratonas C57BL/6. Todas las ratonas hembras fueron compradas de Harlem Inc.
El medio O.C.T. de Tissue-Tek utilizado para incluir las muestras de tejido para cortes al criostato se compró de Sakura Finetek U.S.A.

CARACTERIZACION DEL GEN

2.3 Trabajo Bacteriológico

Todas las manipulaciones relacionadas al crecimiento y almacenaje de bacterias y bacteriófagos se hicieron de acuerdo a métodos descritos previamente[62-64].

2.4 Preparación de Moléculas Recombinantes y DNA Genómico

2.4.1 Preparación de DNA de Plásmido Recombinante.

Los plásmidos fueron propagados en células de *E.coli* RR1[64]. Para aislar DNA de plásmido recombinante a gran escala, se utilizó el método de lisis con tritón. El DNA plasmídico resultante fue purificado mediante un gradiente de cloruro de Cesio utilizando Ultra-centrifugación[64]. Alternativamente, se obtuvo DNA de alta calidad mediante el uso de columnas Qiagen comercialmente disponibles y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Estos procedimientos de purificación de plásmido generalmente produjeron de 1 a 2 mg de DNA de plásmido por litro de cultivo bacteriano. Para propósitos analíticos, el DNA de plásmido recombinante se preparó a partir de cultivos de 30 ml[65]. El DNA plasmídico fue almacenado a -20°C en buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) estéril.

2.4.2 Preparación de DNA de Fago.

El método del lisado de placa a gran escala se utilizó para aislar el DNA del fago lambda[64,65].

2.4.3 Preparación de DNA Genómico a Partir de Células Embrionarias de Ratón.

Para obtener gran cantidad de DNA genómico a partir de CME, generalmente 1 mg de DNA genómico por placa, las colonias de CME se crecieron hasta alcanzar confluencia dentro de placas gelatinizadas de 6 cm de diámetro. Después de aspirar el medio de cultivo y lavar dos veces con amortiguador de fosfatos (PBS 1X), las CME fueron recogidas de la placa y lisadas por una noche a 55°C en el siguiente amortiguador de lisis: Tris-HCl 10 mM, pH 7.8, NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, SDS 1% y 500 µg/ml de proteinasa K. El lisado celular fue extraído con un volumen equivalente de fenol/cloroformo y enseguida con cloroformo. El DNA fue precipitado con dos volúmenes de etanol absoluto y el DNA precipitado flotante se recogió con una pipeta pasteur previamente sellada y curveada de la punta, se lavó dos veces con etanol al 70% frío, sumergiendo y sacando la pipeta con el DNA y se dejó secar el DNA a temperatura ambiente en la varilla, antes de resupenderlo en TE. El DNA genómico íntegro se almacenó a 4°C. La calidad de las preparaciones del DNA se determinó mediante la medición de la densidad óptica (O.D.) a 260 nm y 280 nm. Se consideró una relación de absorbancia 260nm/280nm >1.8 adecuada para proceder al siguiente paso de digestión con enzimas de restricción. En un volumen total de 30 µl

se digirieron 10 μg de DNA genómico, en presencia de 3 μl de amortiguador de la enzima de restricción (*Bam H1*, 2unidades/μg de DNA), 3 μl de espermidina 30 mM y agua destilada.

2.4.4 Digestión del DNA Recombinante con Enzimas.

Todas las digestiones con enzimas de restricción fueron hechas bajo las condiciones óptimas sugeridas por la casa comercial. Se utilizaron de 1-3 unidades de enzima por μg de DNA, el volumen de enzima de restricción nunca fue mayor que el 10% del volumen final de la reacción y los tiempos de digestión fueron de 1-12 horas.

La conversión de extremos cohesivos 5' y 3' a extremos romos fue llevada a cabo usando el fragmento klenow de la DNA polimerasa I de *E.coli* y DNA polimerasa de T4 respectivamente. Los grupos 5'-fosfatos terminales fueron removidos del DNA por tratamiento con la enzima fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIP)[64]. Todas las reacciones enzimáticas fueron tratadas con fenol, fenol/cloroformo y cloroformo. El DNA fue precipitado con 1/3.7 volúmenes de acetato de amonio 7.5M y 2.5 volúmenes de etanol a –70°C.

2.4.5 Preparación de DNA para Subclonar.

Para la separación y purificación de fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa al 1%. La banda de interés fue cortada del gel y electroeluída dentro de una bolsa para diálisis[64]. Después de la electroelución, el DNA se extrajo con fenol, fenol/cloroformo y cloroformo, seguido por precipitación con etanol en la presencia de acetato de amonio 7.5 M. El DNA fue resuspendido en agua destilada estéril y su concentración y pureza se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Mediante este método se obtuvo generalmente una recuperación de 40-60% de DNA.

2.4.6 Subclonación de Insertos de DNA.

Para las ligaciones se utilizó la enzima DNA ligasa de T4 de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. La concentración de vector utilizada fue de 3-5 ng/μl y la relación inserto: vector de 3:1. Se utilizaron células competentes de *E. coli* RR1 para llevar a cabo la transformación estándar.

2.5 Electroforesis en Geles de Agarosa y Poliacrilamida

Para la electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida se utilizó el método estándar para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA. El

DNA fue observado directamente mediante la tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) utilizando un transiluminador de luz ultravioleta[65].

2.5.1 Electroforesis en gel de Agarosa.

Dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA, la concentración de agarosa utilizada varió de 0.7 a 1.5%, disuelta en el amortiguador de corrida tris-acetato-EDTA (TAE: tris-acetato 0.04M y EDTA 0.001M, pH 8.0). Un análisis rápido en un minigel se llevó a cabo a 10V/cm mientras que los geles de baja concentración se corrieron a 1-3 V/cm[64].

2.5.2 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida.

Se utilizaron geles lineales de poliacrilamida de 6-8% conteniendo 7M urea para el secuenciamento de alta resolución. Estos geles se corrieron verticalmente en una unidad de electroforesis de secuenciación (Biorad) de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. Los geles se corrieron a un voltaje constante de 35 V/cm y se pre-corrieron por 30 minutos antes de cargar la muestra de DNA.

2.5.3 Secado de gel.

Antes de la autorradiografía, los geles de secuenciación se trataron con una solución de metanol al 10% y ácido acético al 10% con el fin de remover la urea y fijar el DNA. Enseguida se procedió al secado del gel; para esto se utilizó un secador de gel comercial (Biorad) con una temperatura de 80°C por una hora, bajo vacío.

2.6 Hibridación de Acidos Nucleicos

2.6.1 Hibridación Tipo "Southern".

La técnica tipo "Southern" se utilizó para transferir los fragmentos de DNA de geles de agarosa a membranas de nylon para análisis de hibridación. El DNA genómico de ratón, digerido con enzimas de restricción, usualmente 5-10μg, se transfirió unidireccionalmente, durante una noche, a membranas de nylon utilizando el método de transferencia alcalina[66]. Enseguida las membranas se hornearon a 68°C durante 2-3 horas para fijar permanentemente el DNA a las membranas.

2.6.2 Transferencia de DNA Fágico a Membranas de Nitrocelulosa.

Para obtener una buena distribución de placas pequeñas, estas fueron plaqueadas a una densidad de 12,500 unidades formadoras de placa por cada placa de Petri grande de 15 cm y se dejaron crecer por 24 horas. La transferencia y lisis subsecuente de placas de fagos sobre los filtros de nitrocelulosa se realizó de acuerdo a protocolos descritos[64,65]. Cada filtro fue numerado y marcado en tres puntos asimétricos para asegurar una correcta orientación al ubicar las placas hibridizantes positivas. El DNA fue fijado permanentemente a las membranas, al hornearlas a 68°C por 2-3 horas.

2.6.3 Transferencia de DNA Bacteriano a Membranas de Nitrocelulosa.

Para seleccionar las recombinantes positivas después de varios intentos por subclonar, la transferencia de colonias bacterianas y análisis de hibridación se llevaron a cabo de acuerdo a métodos previamente reportados[67].

2.6.4 Hibridación con Sondas de DNA Homólogo.

Dos condiciones diferentes de hibridación se utilizaron en los análisis tipo Southern para DNA genómico y DNA fágico Lamda.

Para Southern genómicos, los filtros de nylon fueron (pre) hibridizados en Na_2HPO_4 0.5 M, pH 7.0, EDTA 1 mM y SDS al 7% a 65°C durante 4 y 16 horas respectivamente[68]. A la solución de prehibridación se le agregaron $1X10^7$ cpm/ml (actividad específica ~ 2×10^9 cpm/μg) de una sonda marcada [^{32}P]. Los filtros se lavaron dos veces en Na_2HPO_4 0.04 M y SDS al 1% a 65°C por 30 minutos.

Para Southern de DNA del fago Lambda, los filtros de nitrocelulosa fueron prehibridizados en SSC 6 X (NaCl 0.9 M, citrato trisódico 90 mM, pH 7.0), EDTA 10 mM y leche descremada al 2% a 68°C durante 4 y 16 horas, respectivamente[65]. A la solución de prehibridación se le agregaron 2×10^6 cpm/ml (actividad específica ~ 4×10^8cpm/μg) de una sonda marcada con [^{32}P]. Los filtros se lavaron dos veces en SSC (NaCl 0.15 M, citrato trisódico 15 mM, pH 7.0) a 68 °C por 30 minutos.

En todos los casos los filtros fueron hibridizados en bolsas de plástico selladas con calor y después de los lavados los filtros fueron secados a

temperatura ambiente y expuestos a una placa de rayos X a -70°C de 4 a 72 horas, dependiendo de la intensidad de la señal registrada por un contador de radiactividad manual.

2.6.5 Hibridación con Sondas Oligonucleotídicas.

Para la prehibridación e hibridación con sondas oligonucleotídicas se utilizó la siguiente solución: SSC 6X, Denhardts 5X, EDTA 10 mM, pH 7.5, SDS al 0.5% y DNA de esperma de salmón desnaturalizado (50 µg/ml) a 42 °C durante 4 y 12 horas respectivamente. Los filtros fueron lavados dos veces con cloruro de tetrametilamonio 3M (TMA), Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 a 65°C durante 30 minutos[69].

2.7 Marcaje Radiactivo de DNA

La incorporación de radiactividad dentro de DNA de doble cadena fue llevada a cabo por el método de translación de la muesca o por el método del marcaje de oligonucleótidos al azar. El DNA de cadena sencilla tales como oligonucleótidos sintéticos fueron marcados utilizando la enzima polinucleótido cinasa de T4.

2.7.1 El Método de Translación de la Muesca.

En estas reacciones, se utilizó un "kit" comercial, la cantidad de DNA fue de 50-200 ng y se marcaron con 50-200μCi de [α-^{32}P]dCTP (3,000 Ci/mmole) en un volumen total de 100 μl. La separación del DNA marcado de la marca no incorporada fue llevada a cabo mediante la centrifugación de una columna pequeña de Sephadex G-50[64]. Se obtuvieron generalmente actividades específicas de 1-5 X 10^8 cpm/μg de DNA. La sonda radiomarcada se calentó a 100°C durante 5 minutos para producir DNA de cadena sencilla e inmediatamente fueron puestas en hielo para prevenir que las cadenas se aparearan nuevamente.

2.7.2 Método del Marcaje de Oligonucleótidos al Azar.

Las sondas preparadas por este procedimiento[70] se utilizaron para los análisis tipo Southern. Para la reacción se utilizaron 100 ng de DNA y 10 μCi [α-^{32}P] dCTP (3,000 Ci/mmole) en un volumen total de 100 μl. La reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente durante toda la noche. Generalmente se incorporó por arriba del 70% del nucleótido marcado dentro del DNA y se obtuvieron generalmente actividades específicas de 0.5–2 X 10^9 cpm/μg de DNA.

2.7.3 Marcaje del Extremo 5' de Oligonucleótidos.

Se marcaron sondas de oligonucleótidos sintéticos en su extremo 5' con [γ^{32}P] ATP (5,000 Ci/mmole) utilizando polinucleotidil-cinasa de T4 (PNK)[64]. Para la reacción de marcaje se utilizaron 20 pmoles de oligonucleótidos, 30 μCi de [γ^{32}P] ATP y 20 unidades de PNK en un volumen final de 30 μl. La reacción se incubó a 37°C durante 1 hora y se precipitó con etanol para separar la sonda de oligonucleótidos marcados de la marca no incorporada. 20μg de RNA_t de levadura se utilizaron como acarreador. Actividades específicas de 1-5 X 10^8 cpm/pmole de oligonucleótidos fueron obtenidas normalmente.

2.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método *in vitro* de síntesis de ácidos nucleicos.

La PCR fue llevada a cabo usando condiciones estándar[71] en un volumen total de 25 μl en una mezcla conteniendo 1 mM de cada uno de los primeros, 250 μM de cada uno de los desoxirribonucleósidos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2.5 μl de amortiguador PCR 10X (KCl 500

mM, Tris HCl 120 mM pH 8.0, $MgCl_2$ 1.5 mM y gelatina al 0.01%) y 1 unidad de DNA polimerasa Taq. La mezcla de reacción fue cubierta con una gota de aceite mineral y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una incubación inicial a 94°C durante 5 minutos seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, apareamiento a 55°C por 1 minuto y la extensión de las cadenas a 72°C por 2 minutos en un termociclador automatizado Perkin-Elmer/Cetus. Después del último ciclo, las reacciones fueron incubadas durante 7 minutos a 72°C. La mitad del volumen de la reacción (12 µl) fue analizada en gel de agarosa al 1%.

2.9 Secuenciación de DNA por el Método de Sanger

Los plásmidos recombinantes de doble cadena se secuenciaron mediante el método de terminación de cadena por didesoxinucleótidos de Sanger por desnaturalización y apareamiento a iniciadores específicos[72]. Las reacciones de secuenciamiento fueron llevadas a cabo usando la enzima DNA polimerasa del fago T7 modificada (versión Sequenase 2.0) en la presencia de [^{35}S]dATP y de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial.

2.10 Hibridación *in Situ*

2.10.1 Preparación del Material Histológico.

Para el análisis del patrón de expresión en el cerebro de ratón adulto, los cerebros se removieron de ratones de la cepa 129SvEv de 6 semanas de edad, los cuales se sacrificaron por dislocación cervical.

Para el análisis de la expresión durante el desarrollo embrionario, se obtuvieron embriones diariamente a partir del día 7 después de la detección de un tapón vaginal (semen del macho) hasta el día 18. El mediodía del día cuando fue visto el tapón de semen en la vagina de la hembra, fue designado como 0.5 días de gestación (E0.5). Los embriones fueron liberados de toda decidua y lavados rápidamente con el amortiguador de fosfatos (PBS) frío para quitar el exceso de sangre e inmediatamente fueron congelados sobre un molde de plástico que contenía el compuesto Tissue-Tek O.C.T. (gel especial para congelar muestras de tejido) sobre una cama de hielo seco. La congelación de los cerebros de ratón adulto, se realizó de la misma forma. Los tejidos fueron almacenados a -20°C.

Para la obtención de cortes histológicos de 10μm de grosor se utilizó un criostato a -20°C. Los cortes fueron montados en portaobjetos

previamente revestidos con gelatina para permitir la adherencia permanente de los cortes. Los cortes se dejaron secar por 15 minutos a temperatura ambiente, y entonces fueron fijados en una solución de paraformaldheido al 4% preparada en PBS. Enseguida se lavaron dos veces en PBS y se deshidrataron a través de concentraciones crecientes de etanol (70%, 95%, 100%, 100%). Estos cortes se almacenaron a -20°C hasta el momento de utilizarlos en la hibridación *in situ*.

2.10.2 Preparación de la Sonda de RNA.

1 µg del plásmido Bluescript KS conteniendo un fragmento del gen Nurr1 fue utilizado como molde para la síntesis de RNA. Las sondas de RNA antisentido y sentido marcadas con [^{35}S]UTP fueron sintetizadas utilizando polimerasa T7 y T3, respectivamente, después de haberlos linearizado con *Dra II* y *Bam HI*, respectivamente.

Las condiciones de la transcripción *in vitro* fueron de acuerdo a las instrucciones del fabricante Promega.

2.10.3 Hibridación *in Situ*.

Antes de la hibridación, los cortes histológicos fueron secados al aire durante 10 minutos. Después, los cortes fueron permeabilizados con

proteinasa K (20μg/ml.), fijados nuevamente en paraformaldehido al 4%, tratados con anhídrido acético preparado en trietanolamina 0.1M, pH8.0 y deshidratados con etanol. La hibridación fue llevada a cabo con 6 X 10^6cpm de sonda de RNA en un volumen de 70 μl de buffer de hibridación conteniendo DTT 0.1M, formamida 50%, sulfato de dextran 10%, SSC 4X, solución denhardt's 1X, y 250 μg/mL RNAt de levadura a 58°C durante 18 horas dentro de una cámara húmeda. Posteriormente, las preparaciones fueron lavadas en condiciones de fuerza iónica alta con DTT 0.1 M, SSC 2X y formamida al 50% a 60°C, digeridas con RNAsa A (20μg/mL) a 37°C durante 30 minutos, y entonces lavadas a una fuerza iónica baja final de 0.1X SSC a temperatura ambiente por 15 minutos[73-74]. Las preparaciones fueron deshidratadas y secadas a temperatura ambiente.

2.10.4 Sistema de Detección.

La localización autorradiográfica de la sonda unida fue llevada a cabo por aposición de las preparaciones a una película de rayos X durante 3 días. Para obtener mejor resolución, los cortes fueron inmersos en una emulsión autorradiográfica NTB2 (Eastman Kodak). Después de un período de exposición entre 6-10 días, las preparaciones fueron reveladas utilizando el revelador Kodak D-19, seguido por el fijador Kodak, después fueron

teñidas con hematoxilina, deshidratadas, y montadas. Para la obtención de las fotografías de las preparaciones se utilizó un microscopio Zeiss Axiophot.

Las hibridaciones *in situ*[75] para detectar los RNAm del gen Ptx-3 fueron llevadas a cabo por el personal técnico del laboratorio del Dr. Peter H. Burbach del Departamento de Farmacología Médica del Instituto de Neurociencias Rudolf Magnus, Universidad de Utrecht, Holanda.

OBTENCION DE UN MODELO CON GENE INACTIVADO

2.11 Electroporación y Cultivo de Células Madre Embrionarias de Ratón

Para la manipulación de CME se utilizaron procedimientos reportados previamente[76]. El DNA del vector recombinante Nurr1 fue linearizado con la enzima de restricción *NotI* antes de la electroporación de CME creciendo activamente(AB-1). Las CME fueron resuspendidas en PBS a una densidad celular de 1.1 X 10^7 células/ml. Se mezclaron 25 µg del vector recombinante Nurr1 linearizado con 0.9 ml de la suspensión de CME (10^7células) dentro de una cubeta especial para electroporación. Se electroporaron las CME en un aparato Biorad gene Pulsar a 230 mV y 500

μFD. Después de la electroporación, las CME permanecieron a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de vaciarlas sobre una placa de petri que contenía una capa de fibroblastos SNL76/7 (células alimentadoras) tratadas con mitomicina C y resistentes a la droga G418 ($G418^R$). Los factores secretados por la línea celular de fibroblastos SNL76/7 que mantienen a las CME en un estado pluripotencial, se desconocen. Las CME se crecieron en placas de petri de 10 cm de diámetro en el medio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) con 15% de suero de ternera fetal, 2-mercaptoethanol 0.1 mM, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 μg/ml de estreptomicina.

Las CME electroporadas se cultivaron en presencia de las drogas G418 (180 μg/ml) y FIAU (0.2μM) 24 horas después de la electroporación. Después de 9-14 días de crecimiento selectivo por las drogas, las colonias de CME ($G418^R$ y $FIAU^R$) fueron recogidas y expandidas en placas de 96 pozos. Cada uno de estos pozos contenía una capa de fibroblastos SNL 76/7 (placas maestras). Extremo cuidado se tomó para asegurar que solamente se sembrara una colonia por pozo. Se preparó una réplica de la placa maestra de 96 pozos. Las placas maestras de 96 pozos se congelaron a -80°C hasta que los eventos blanco se identificaran mediante análisis mini-southern del

DNA de las clonas de la placa réplica (sección 2.12). Las placas maestras contenían las clonas de CME blanco que serían utilizadas para la microinyección de blastocistos.

2.12 Tamizaje de Clonas de Células Embrionarias Mediante Mini-Southern

El DNA genómico de CME fue purificado a partir de las placas réplica de 96 pozos. Este DNA fue utilizado durante el análisis de Mini-Southern[76],el cual es un método rápido, seguro y eficiente para tamizar grandes números de colonias de CME. Las CME fueron lisadas directamente en la placa de 96 pozos, al añadir 50 µl de amortiguador de lisis por pozo e incubarlas a 60°C dentro de una cámara húmeda durante toda la noche. Después de la lisis celular, el DNA genómico de las CME se precipitó con etanol, lavado, secado y resuspendido en TE. Finalmente, el DNA fue digerido con enzimas de restricción a 37°C dentro de la placa de 96 pozos durante toda la noche. Las enzimas de restricción que requieren amortiguadores de bajo contenido de sales (< 50 mM de NaCl) no trabajan en este sistema. Una vez digerido el DNA, se le sometió a una electroforesis en gel de agarosa. Después de la electroforesis, el DNA se transfirió a una

membrana de nylon que fue a su vez hibridizada como se describió en la sección 2.6.

Dos consideraciones importantes deben ser tomadas en cuenta cuando se escoge una sonda:

1) La sonda debe estar localizada afuera de la región de homología presente en el vector diseñado para asegurar que la sonda solamente reconozca el alelo endógeno y el mutado por recombinación homóloga (Fig.2).

2) La sonda debe ser específica para la secuencia de interés para evitar cualquier confusión que pueda originarse de otras bandas hibridizantes.

2.13 Inmunohistoquímica

Para los estudios de inmunohistoquímica, se sacrificaron por decapitación ratones recién nacidos del tipo silvestre y mutantes. Los cerebros se sacaron del cráneo e inmediatamente se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% de 12 a 24 horas a 4°C. Enseguida se pasaron a una solución de sacarosa al 30% a 4°C, durante toda la noche o hasta que los cerebros se hundieran por completo. Los cerebros incluídos en sacarosa

fueron congelados y almacenados a -20°C hasta el momento de hacer los cortes histológicos de 20µm de grosor.

Los cortes congelados fueron teñidos de acuerdo al procedimiento descrito para el kit standard avidina-biotina de Vector Laboratories. Los sueros utilizados como primer anticuerpo fueron sueros de conejo policlonales dirigidos contra TH y AADC (Eugene Tech International, Inc.) y la dilución utilizada fue de 1:600. El antisuero monoclonal de ratón 3 A10 (Developmental Studies Hybridoma Bank) fue utilizado a una dilución de 1:200.

2.14 Detección de Apoptosis

Para el análisis de cuerpos apoptóticos, se sacrificaron por decapitación ratonas heterocigotas preñadas a tiempos específicos de gestación. Se determinó el genotipo de los embriones y de recién nacidos mediante la técnica de PCR a partir del DNA extraído de las membranas fetales y de un pedazo de cola respectivamente. Los embriones y cerebros de recién nacidos se fijaron en paraformaldehído al 4%, deshidratados mediante soluciones de alcohol (30%-100%), y luego se pusieron en 2

cambios de xileno e incluídos en parafina. Para la obtención de los cortes histológicos, se escogieron 3 series de cada genotipo (silvestre, heterocigoto y mutante) y se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor de las áreas de interés. Para la identificación de células con cuerpos apoptóticos, se utilizó el kit sistema celular apoptótico Trevigen según el procedimiento descrito.

2.15 Microinyecciones

La Microinyección de las CME con la mutación Nurr1 dentro de la cavidad de blastocistos la realizó el Dr. Franco de Mayo del laboratorio de transgénicos del Departamento de Biología Celular del Colegio de Baylor en Houston Texas.

2.16 Cuantificación de Neurotransmisores y Medición Enzimática

La cuantificación[77] de Dopamina y Serotonina, así como la determinación de la actividad[78] de las enzimas Tirosina hidroxilasa (TH) y acetilcolina-transferasa (CHAT) se llevaron a cabo por el Dr. Wei-Dong Le del Departamento de Neurología del Colegio de Baylor en Houston Texas.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Caracterización Estructural del Gen Nurr 1

Uno de los objetivos del presente trabajo fue caracterizar el gen Nurr1 del ratón en términos de su estructura genómica. La caracterización del gen Nurr1 nos permitió diseñar y construir un vector que portara el gen Nurr1 mutado (vector recombinante Nurr1), y de esta manera utilizarlo para introducir una mutación en el gen Nurr1 endógeno por recombinación homóloga.

Esta caracterización fue importante por dos razones:

1) Se necesitaba un conocimiento de la estructura genómica exón-intrón del gen Nurr1 de ratón para determinar el exón más apropiado para insertar el gen Neo^R y de esta manera interrumpir eficazmente la fase de lectura del gen Nurr1 de ratón (unidad transcripcional).

2) La construcción del vector con el gen Nurr1 mutado y la identificación de los recombinantes homólogos requerían de un mapa de restricción bien definido para el gen Nurr1 de ratón.

3.1.1 Aislamiento del gen Nurr1.

El gen Nurr1 fue aislado a partir de dos bibliotecas genómicas de ratón 129/SvEv preparadas en el fago λDashII (Stratagene) y P1 (Genome Systems Inc). El tamizaje de la biblioteca en λDashII fue llevado a cabo[67] utilizando como sonda un fragmento *Dra II-Pst I* (680-pb) de la región N-terminal del DNAc de Nurr1[31]. La sonda se marcó con [^{32}P] dCTP a una actividad específica de 2 X 10^9 cpm/μg. Con ésta se identificó una clona positiva para el gen Nurr1. Al caracterizar esta clona positiva con las enzimas de restricción *Bam HI* y *Eco RI*, se encontraron los fragmentos *Eco RI* de 6.5-Kb y *Bam HI* de 5.5-Kb. Estos fragmentos se subclonaron en el plásmido pSP72 (Promega) y recibieron el nombre de p10 y p20, respectivamente. Ambos fragmentos correspondieron a la región 5' del gen Nurr1 y se muestran en la figura 1. La región codificante para la región 3' fue aislada de la biblioteca genómica en P1, la clona positiva para el gen Nurr1 fue caracterizada con enzimas de restricción, el fragmento *Bgl II* de 7.8 Kb positivo para el gen Nurr1 fue subclonado en el sitio *Bam HI* de

pUC19 y se llamó p30. Los tres fragmentos genómicos p10, p20 y p30 mostraron un traslape y se caracterizaron mediante análisis tipo Southern. La región completa del gen Nurr1 se obtuvo entre los tres fragmentos y se utilizaron para establecer la organización intrón/exón mediante las técnicas de PCR y secuenciación. En la figura1 se muestra la localización de los tres fragmentos.

3.1.2 Análisis de Exones, Intrones y Secuencia de los Límites Exón/Intrón.

Se purificó DNA genómico de ratón de la cepa 129SvEv para utilizarlo en la amplificación de regiones individuales del gen Nurr1 mediante la técnica de PCR. Para las reacciones de PCR se utilizaron 10 ng de DNA genómico de Nurr1 (p20 y p30) como molde y como iniciadores una serie de oligonucleótidos de entre 20 a 27 bases. Estos iniciadores se diseñaron a partir del DNAc de Nurr1 y por comparación con las secuencias de los límites intrón/exón de Nur77/NGF1-B, previamente publicados[28]. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se secuenciaron directamente.

En la tabla I se muestran las secuencias de las uniones intrón-exón, así como el tamaño de cada uno de los exones.

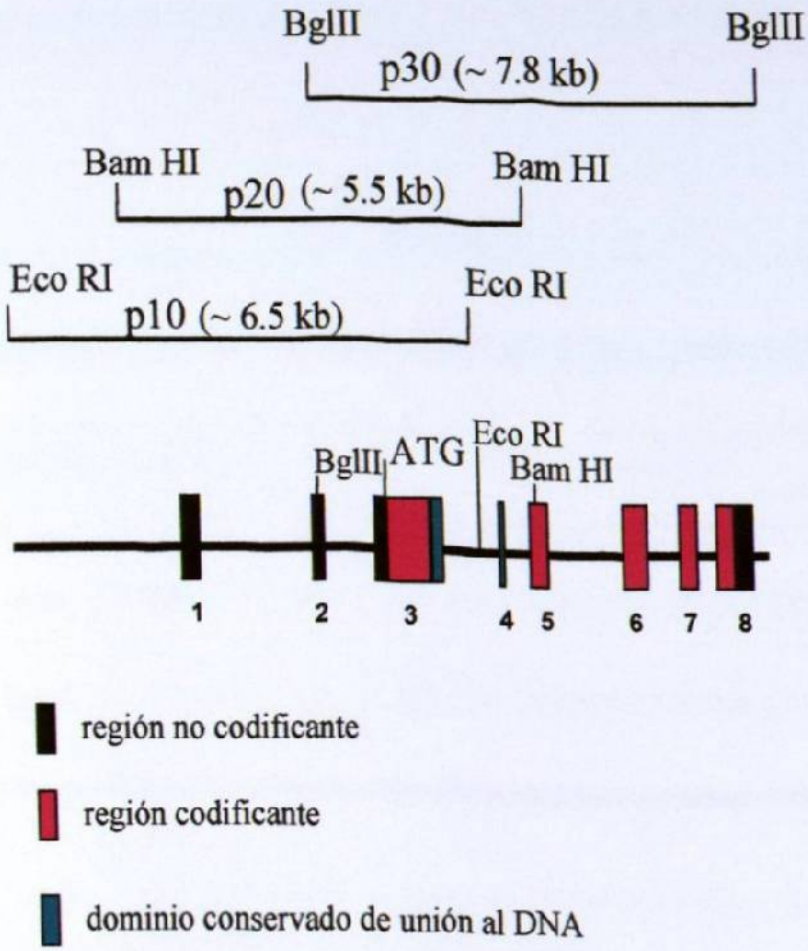


Figura 1. Organización estructural del gen Nurr1 y ubicación de las 3 clonas genómicas (P10, P20, P30) identificadas mediante análisis tipo "southern". Los rectángulos verticales corresponden a los exones y su número correspondiente se señala debajo de ellos. Se diferencian las regiones codificantes de las no codificantes y se resalta la región del dominio conservado de unión al DNA.

La tabla 1 se complementó con información adicional reportada por Castillo y cols[80]. Nosotros reportamos la presencia de 7 exones para el gen Nurr1 en 1996. Posteriormente, el grupo de Castillo y cols[80] publicó la existencia de un exón extra no codificante en el extremo 5'del gen Nurr1. Nosotros confirmamos ésta información y es la que se reporta en el presente trabajo.

TABLA I

LOCALIZACION DE INTRONES Y LIMITES EXON-INTRON DEL GEN NURR1

EXON	TAMAÑO	EXON 3'	(•)	INTRON (TAMAÑO)	EXON 5'
1	174pb	GGACAA	174	GTGAGT...INTRON1(~1.5 kb)...TTTCAG	GGA GAT
2	160pb	CTGAAG	334	GTCAGT...INTRON 2 (~600bp)... TTCCAG	CC ATG* Met
3	866pb	TTT AAG Phe Lys	1201	GTGAGC...INTRON 3 (~900bp)...CTACAG	CGC ACG Arg Thr
4	130ph	GAA G Glu	1330	GTAGGT...INTRON 4 (~500bp)...TTACAG	TG GTT Val Val
5	164pb	TCC AGG Ser Arg	1494	GTAAGA...INTRON 5 (~1 kb) . . . TTCCAG	TTC CAG Phe Gln
6	203pb	TAC AG Tyr Arg	1697	GTAATG...INTRON 6 (~600bp)... TTGCAG	G TCC Ser
7	176pb	ACA G Thr	1876	GTCAGT...INTRON 7 (~350bp).. CTGCAG	AG AGA Glu Arg
8	>347pb				

El codón ATG* está localizado en el exón 3; (•) indica el número del nucleótido del DNAc de Nurr1 en el cual se localiza el intrón.

3.1.3 Organización Estructural del gen Nurr1.

La organización estructural del gen Nurr1 se muestra en la figura 1. Una comparación entre las secuencias genómicas y del DNAc reveló que el gen Nurr1 está compuesto de 8 exones. El rango del tamaño de los exones fue desde 130 a 866 pb, el tercer exón fue el más largo, el cual contiene el codón de iniciación ATG. El tamaño de los intrones fue desde 350pb hasta 1 kb. Todas las secuencias de los límites intrón/exón encontradas para Nurr1 mostraron el patrón GT-AG de la regla de sitios donadores y aceptores en la eliminación de intrones[79]. Basados en los resultados obtenidos, el mapa físico del gene Nurr1 es de aproximadamente 7.6 kb. El dominio de unión al DNA, común para todos los miembros de la superfamilia de receptores nucleares, es codificado por los exones 3 y 4. El exón 5 codifica un dominio no conservado que se cree que funciona como un dominio de activación transcripcional situado entre los dominios de unión al DNA y el supuesto para la unión con el ligando[1]. Los exones 6,7 y 8 codifican para las secuencias involucradas en la dimerización y los supuestos dominios para la unión al ligando. Finalmente el exón 8 contiene el codón de terminación y la región 3' no traducible, la cual contiene múltiples "motifs" AUUUA que pueden jugar un papel en la regulación de

la estabilidad del RNAm de Nurr1[25]. En general, la organización genómica de Nurr1 se parece mucho a la del miembro estrechamente relacionado con la familia de Nurr1, NGF1-B.

3.2 Obtención de un Vector que Porta el gen Nurr1 Mutado

Antes de intentar interrumpir el gen Nurr1 en CME de ratón, fue necesario llevar a cabo lo siguiente:

1) Un análisis tipo southern de DNA genómico de ratón para confirmar que el gen Nurr1 tenía únicamente un solo locus y para identificar enzimas de restricción que ayudaran en la identificación de eventos de recombinación en el locus genómico de Nurr1 (sección 4.4.1). Previamente se había demostrado la existencia de un solo locus para el gen Nurr1, el cual está localizado en el cromosoma 2[80]. Un solo locus del gen facilita el proceso de interrupción del gen, ya que es únicamente una copia del locus endógeno la que se interrumpirá. Además, una copia simplifica el análisis con enzimas de restricción de los eventos de recombinación homóloga en este locus.

2) Un análisis tipo northern del RNA total de CME de ratón para establecer si el gen Nurr1 se expresa en estas células. La actividad transcripcional del

gen Nurr1 en CME de ratón determina el tipo de gen NEO^R para ser utilizado en la construcción del vector recombinante del gen Nurr1. Básicamente hay dos tipos de genes NEO^R los cuales son rutinariamente utilizados en experimentos de genes recombinantes. Estos son:

A) Un gen NEO^R que contiene un promotor y una señal de poliadenilación

B) y un gen NEO^R que carece ya sea del promotor y/o de la señal de poliadenilación. Para los genes que no se expresan en las CME de ratón el primer tipo de gen NEO^R se utiliza para generar el vector recombinante. En el caso de genes que son activos transcripcionalmente en CME, el uso del segundo tipo de gen NEO^R puede bajar significativamente el fondo proveniente por los eventos de recombinación ilegítima[81-83]. En el caso de un gen NEO^R sin promotor, la expresión de este gen y por lo tanto el crecimiento de colonias G418R puede solamente ocurrir si está localizado "río abajo" de un promotor que sea transcripcionalmente activo en CME. Para un gen NEO^R que carece de señal de poliadenilación, la expresión solamente ocurre si es insertado "río arriba" de una señal de poliadenilación genómica.

Para fines prácticos, el cassette PGKNEObpA será nombrado como el gen PNEO^R a través del presente escrito. En nuestro caso, como Nurr1 no se expresa en CME, se utilizó un gen NEO^R que contiene un promotor y una señal de poliadenilación en la construcción del vector recombinante del gen Nurr1. El gen NEO^R utilizado fue el cassette PGKNEObpA[84]. Este cassette contiene el promotor del gen fosfoglicerato cinasa de ratón, el cual es un promotor muy activo. La señal de poliadenilación es del gen de la hormona de crecimiento bovina y es una secuencia de terminación reconocida por la maquinaria de terminación de la transcripción del ratón.

3) Aislar la mayor parte del gen Nurr1, para facilitar la recombinación homóloga y llevar a cabo eficientemente la interrupción del locus genómico endógeno.

3.2.1 Diseño del Vector.

Para mutar el locus de Nurr1 en CME de ratón, se utilizó la estrategia de selección positiva-negativa descrita en la sección 2.11. En esta estrategia se utiliza un vector recombinante del tipo de reemplazo. El diseño del vector recombinante es el aspecto más importante de un experimento de inactivación de genes *in vivo*.

Una vez clonado el gen completo de Nurr1, se seleccionó un fragmento que incluía los exones del 2 al 8 del gen Nurr1 de aproximadamente 7.4 kb. El exón 3 codifica para el dominio terminal N no conservado del receptor y es donde se localiza el codón de iniciación ATG.

El diseño del vector recombinante Nurr1 se muestra en la figura 2. Este vector recombinante contiene el gen NEO^R, el cual se insertó dentro de un sitio de restricción *Nco I* único en el exón 3 localizado "río abajo" del codón de ATG, pero "río arriba" del dominio de unión al DNA del gen Nurr1. La inserción del gen NEO^R dentro del exón 3 divide el fragmento genómico Nurr1 de 7.4 kb en los brazos de homología 5' y 3' del gen Nurr1 y tienen un tamaño de 1.7 (brazo corto) y 5.7 kb (brazo largo), respectivamente. El gen timidina cinasa del virus Herpes simple (HSV-TK) de 2 kb fue liberado del vector pKS MCI HSV-TK[85] y se ligó al extremo 5´del brazo corto (1.7 kb) de Nurr1 y su inserción fue con una orientación opuesta a la transcripción de los genes Nurr1 y Neo. El fragmento de 5.7 kb o brazo largo de esta construcción contenía parte del exón 3 hasta el exón 8 del gen Nurr1.

La dirección de transcripción del gen HSV-TK, no es crítica[86]. Sin

embargo la dirección de transcripción del gen NEO^R bajo el control del promotor fosfoglicerato cinasa murino es importante. El gen NEO^R está orientado de modo que después de la recombinación homóloga, éste se encuentre en la misma dirección que la transcripción del gen Nurr1 endógeno y su promotor. De este modo cualquier transcrito que se origine del promotor de Nurr1, si no está truncado por un codón de terminación, entonces será truncado por la fuerte señal de poliadenilación del gen NEO^R.

Este vector recombinante cumplió con los requerimientos del tamaño del brazo corto de homología que debería ser al menos de 1 kb[87] y que el vector debería tener un total de homología entre 5 y 8 kb con el locus Nurr1 endógeno[88] para una mejor eficiencia de recombinación homóloga de los vectores recombinantes.

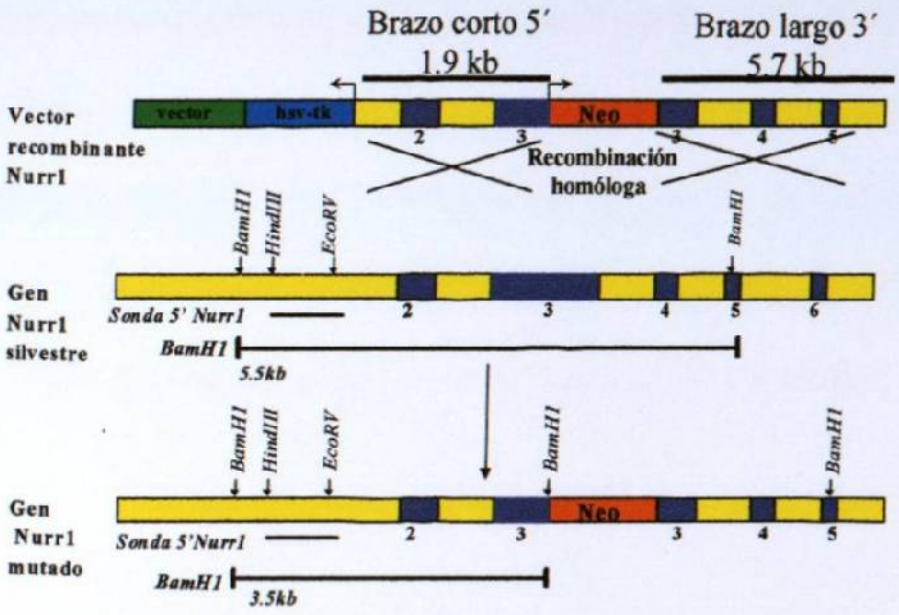


Figura 2. Obtención del gen Nurr1 mutado. El Diagrama muestra la recombinación homóloga entre el vector recombinante Nurr1 con el gen Nurr1 silvestre para generar el gen Nurr1 mutado. Se muestran los tamaños de los fragmentos BamH1 utilizados para diferenciar el alelo silvestre del alelo mutado.

3.3 Análisis de la Expresión del gen Nurr1 Mediante la Técnica de Hibridación *In Situ*

3.3.1 Patrón de Expresión del gen Nurr1 en el Sistema Nervioso Central del Ratón Adulto.

En el presente trabajo se analizaron mediante hibridación *in situ* cortes histológicos del cerebro de ratón adulto. Estos cortes fueron de tipo frontal, transversal y sagital, de modo que se pudiera obtener una mayor información del patrón de expresión de Nurr1. Se utilizaron sondas de RNA antisentido y sentido para el gen Nurr1. La distribución de Nurr1 dentro del sistema nervioso central se describe en la tabla II.

TABLA II

DISTRIBUCION DEL RNAm DE NURR1 EN EL SNC DEL RATON ADULTO

REGION	INTENSIDAD
1. TELENCEFALO	
Corteza cingulada (Cg)	++
Corteza frontal (Fr)	+
Corteza parietal (Par)	++
Corteza temporal (Te)	-++
Capa interna de la corteza (IL)	++
Corteza entorrínica (Ent)	-+
Núcleo endopiriforme dorsal (Den)	++
Corteza perirrínica (PRh)	++
Corteza piriforme (Pir)	+
Subículo (S)	+++
Hipocampo (Hi)	
Campo de Ammon 1 (CA1)	+++
Campo de Ammon 2 (CA2)	-+
Campo de Ammon 3 (CA3)	++
Pliegue dentado (DG)	+
Núcleo septohipotalámico (SHy)	+
Núcleo del cuerpo estriado terminal (BSTM)	+
Amígdala	
Área amigdalohipocampal (Ahi)	-+
Núcleo cortical posteromedial (PMCo)	++
Transición amigdopiriforme (Apir)	++
Bulbo olfatorio (OB)	+-
Claustro	+++
2. DIENCEFALO	
Tálamo	
Núcleo anteromedial (AM)	++
Núcleo parafascicular (PF)	++
Núcleo anterodorsal (AD)	+-
Núcleo anterior paraventricular (PVA)	++
Núcleo Precomisural (PrC)	+
Habénula (Hb)	+++

(+) débil (++) moderada (+++) fuerte

Continúa

Hipotálamo	
Núcleo paraventricular (Pa)	++
Núcleo periventricular (Pe)	++
Area preóptica media (MPA)	+
Area anterior (AH)	+
Area posterior (PH)	+++
Cuerpo premamilar (PMV)	+++
Area preóptica lateral (LPO)	+
Area lateral (LH)	+-
Glándula Pituitaria	
Anterior (Apit)	++
Posterior (Ppit)	+-
3. MESENCEFALO	
Núcleo pontino (Pn)	++
Area tegmentaria ventral (VTA)	+++
Sustancia Negra (SN)	+++
Núcleo del rafe dorsal (DR)	++
Núcleo del rafe linear caudal (Cli)	++
Campo retrorubral (RRF)	++
Núcleo tegmentario pedúnculo-pontino (PPTg)	+++
Núcleo intersticial del mlf (IMLF)	++
Núcleo intersticial rostral del mlf (RI)	++
Núcleo Edinger-Westphal (EW)	++
Núcleo del centro gris (CG)	+
4. ROMBENCEFALO	
Puente	
Núcleo vestibular medial (Mve)	+
Núcleo reticular intermedio (Irt)	++
Núcleo del rafe (R)	++
Núcleo reticular pontino, oral (PnO)	+
Capa granular del cerebelo (Cb)	+++
Bulbo raquídeo	+
Médula espinal (lámina X)	

(+) débil (++) moderada (+++) fuerte

A continuación se describe el patrón de expresión en las principales divisiones del cerebro.

Telencéfalo

La expresión de Nurr1 en esta región del cerebro se localizó en el sistema olfatorio, límbico y en algunas regiones asociadas con ambos sistemas (figura 3).

Dentro del sistema olfatorio, las estructuras que mostraron expresión moderada para este gen, fueron el bulbo olfatorio y la corteza piriforme (figura 3). La expresión de Nurr1 fue bastante intensa en los principales componentes del sistema límbico y en las estructuras corticales relacionadas con este sistema. La expresión se localizó (Figura 4) en el hipocampo y en estructuras hipocampales asociadas, incluyendo el subículo (S), cortezas perirrínicas (PRh), entorrínicas (Ent) y áreas de la amígdala. Dentro del hipocampo hubo diferencias en los diferentes campos de Ammon, el campo CA1 mostró tinción intensa, para los campos CA2-3 fue moderada, mientras que la zona del gyrus dentado (DG) mostró una débil tinción.

La expresión (Figuras 3 y 4) de Nurr1 en las capas corticales del cerebro mostró diferencias notables que variaron de escasas a intensas. Las zonas de la corteza cerebral positivas para Nurr1 fueron la frontal (Fr),

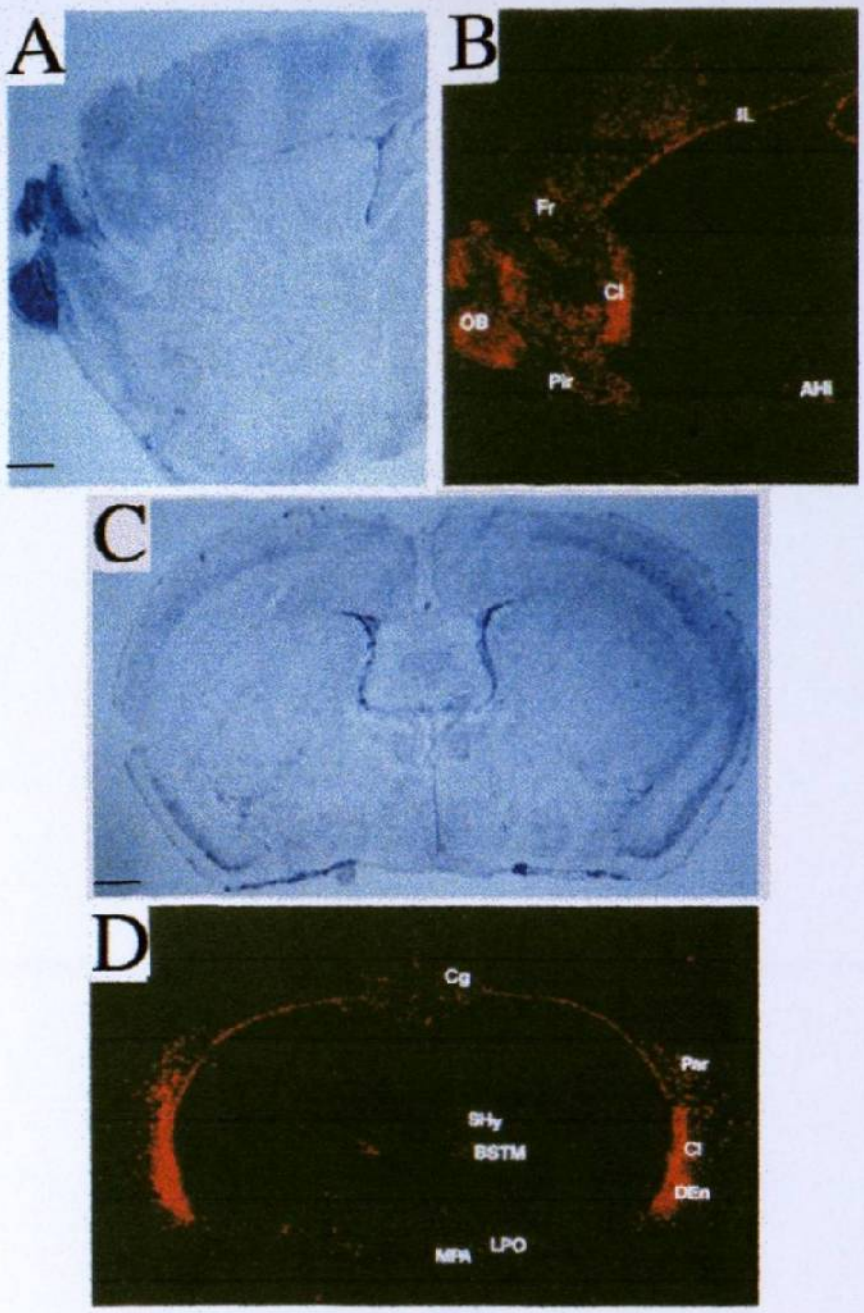
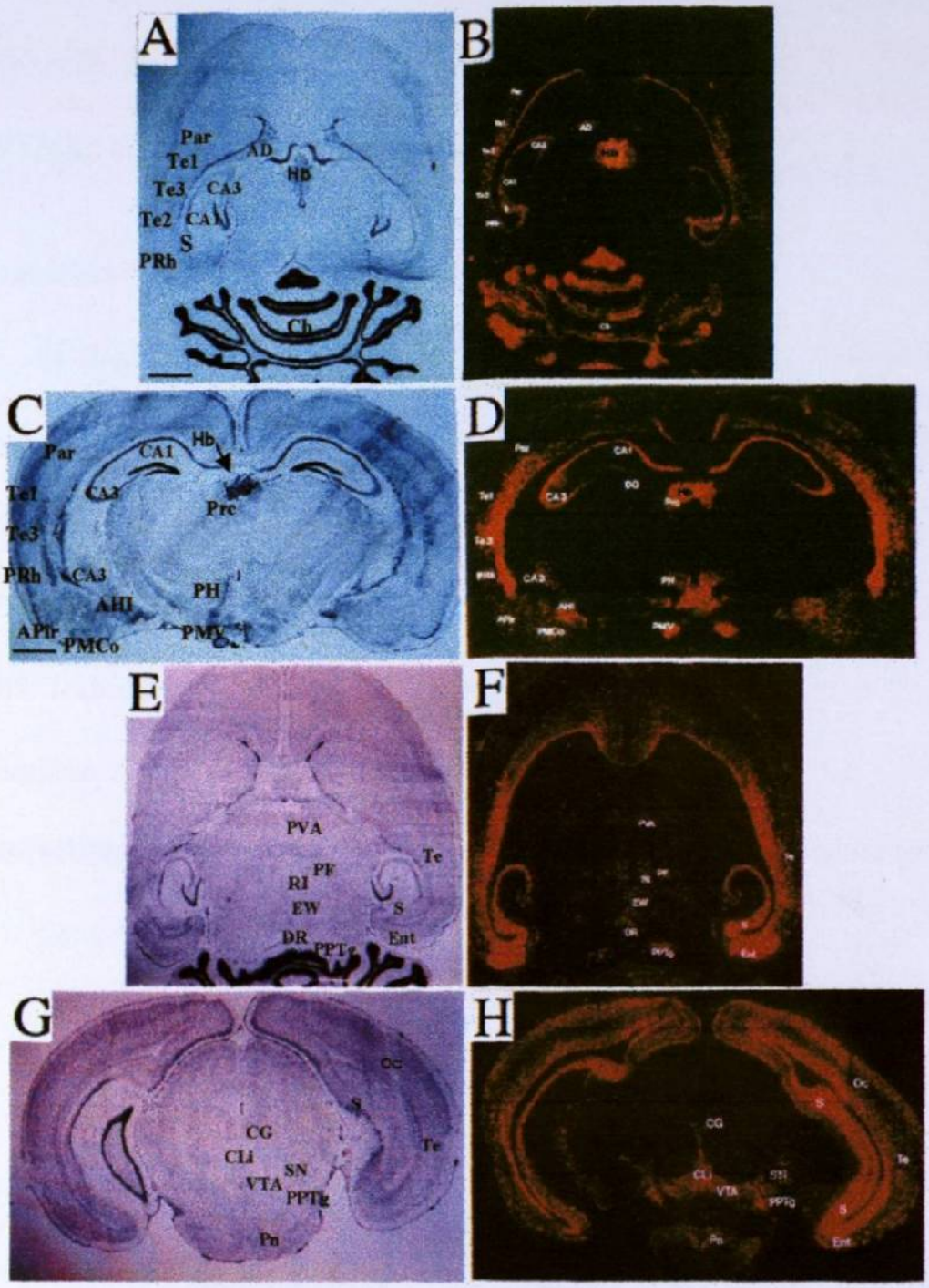


Figura 3.Patrón de expresión de Nurr1 en el telencéfalo de ratón. Las fotos A-B corresponden a cortes sagitales y C-D a cortes frontales de cerebro de ratón adulto. Las fotos A y C muestran el campo claro y B y D el campo oscuro para mostrar las zonas de hibridación para el RNAm de Nurr1. OB (bulbo olfatorio), Fr (corteza frontal), Cl (claustro), Pir (corteza piriforme), AHI (amígdala), Cg (corteza cingulada), Par (corteza parietal), Den (núcleo endopiriforme dorsal), SHy (núcleo septohipotalámico), BSTM (núcleo del cuerpo estriado terminal), MPA (área preóptica media). La barra representa 500 µm.

Figura 4. Hibridación *in situ* de Nurr1 en el diencéfalo (A-D) y mesencéfalo (E-H). Las fotos A-B y E-F corresponden a cortes transversales de cerebro y C-D y G-H son cortes frontales de cerebro de ratón. Las fotos de la izquierda corresponden al campo claro de las fotos de la derecha que muestran la señal de hibridación del RNA antisentido de Nurr1 en un campo oscuro. Par (corteza parietal), Tel-3 (corteza temporal), CA1-3 (campos del hipocampo), S (subículo), PRh (corteza perirrínica), AD (núcleo anterodorsal del tálamo), Hb (habénula), Cb (cerebelo), Apir (transición amígdala-corteza piriforme), AHI (amígdala), PH (hipotálamo posterior), PMCo (núcleo de la región posteromedial cortical de la amígdala), PMV (cuerpos premamilares), PVA (núcleo anterior paraventricular talámico), PF (núcleo parafascicular), RI (núcleo intersticial rostral del fascículo medial longitudinal), EW (núcleo Edinger-Westphal), DR (núcleo dorsal del rafe), PPTg (núcleo tegmentario pedúnculo-pontino), Ent (corteza entorrínica), CG (sustancia gris central), VTA (región ventral tegmentaria), SN (sustancia negra), Pn (núcleo pontino). La barra representa 1.8 mm en A B y E-F y 1 mm en C-D y G-H.


A
Par
Te1
Te3
Te2
S
PRh
AD
HB
CA3
CA1
Ch
B
C
Par
Te1
Te3
PRh
CA1
CA3
Hb
Prc
AHI
PH
APir
PMCo
PMV
D
E
PVA
Te
PF
RI
EW
S
DR
PPTg
Ent
F
G
CC
S
CG
CLi
Te
SN
VTA
PPTg
Pn
H
Cc
S
CG
Te
CLi
SN
VTA
PPTg
S
Pn
Ent

parietal (Par), temporal (Te) y cingular (Cg). La capa más interna de la corteza cerebral mostró una tinción moderada.

Entre otras estructuras del telencefalo que mostraron tinción positiva se encuentran el claustro (Cl), algunos núcleos del cuerpo estriado terminal (BSTM) y el núcleo septohipotalámico (Shy).

Diencéfalo

El patrón de expresión de Nurr1 en las regiones del diencéfalo se muestran en la figura 4A-D. La expresión de Nurr1 se localizó en las principales estructuras del diencéfalo, como tálamo é hipotálamo. Dentro del tálamo la estructura que mostró la tinción más intensa fue la habénula (Hb), mientras que una expresión escasa se localizó en varios núcleos talámicos como el anteromedial, parafasicular (PF), anterodorsal (AD), paraventricular (PVA) y precomisural (Prc).

En el hipotálamo (figuras 4A-D y 5A-B) se localizaron niveles de expresión de moderada a intensa en al menos 9 diferentes núcleos celulares. La señal más intensa se observó en los cuerpos premamilares (PMV), los cuales están asociados con respuestas emotivas y el área hipotalámica posterior. Un supuesto papel para Nurr1 dentro de las respuestas autonómicas y endocrinas se apoya por su

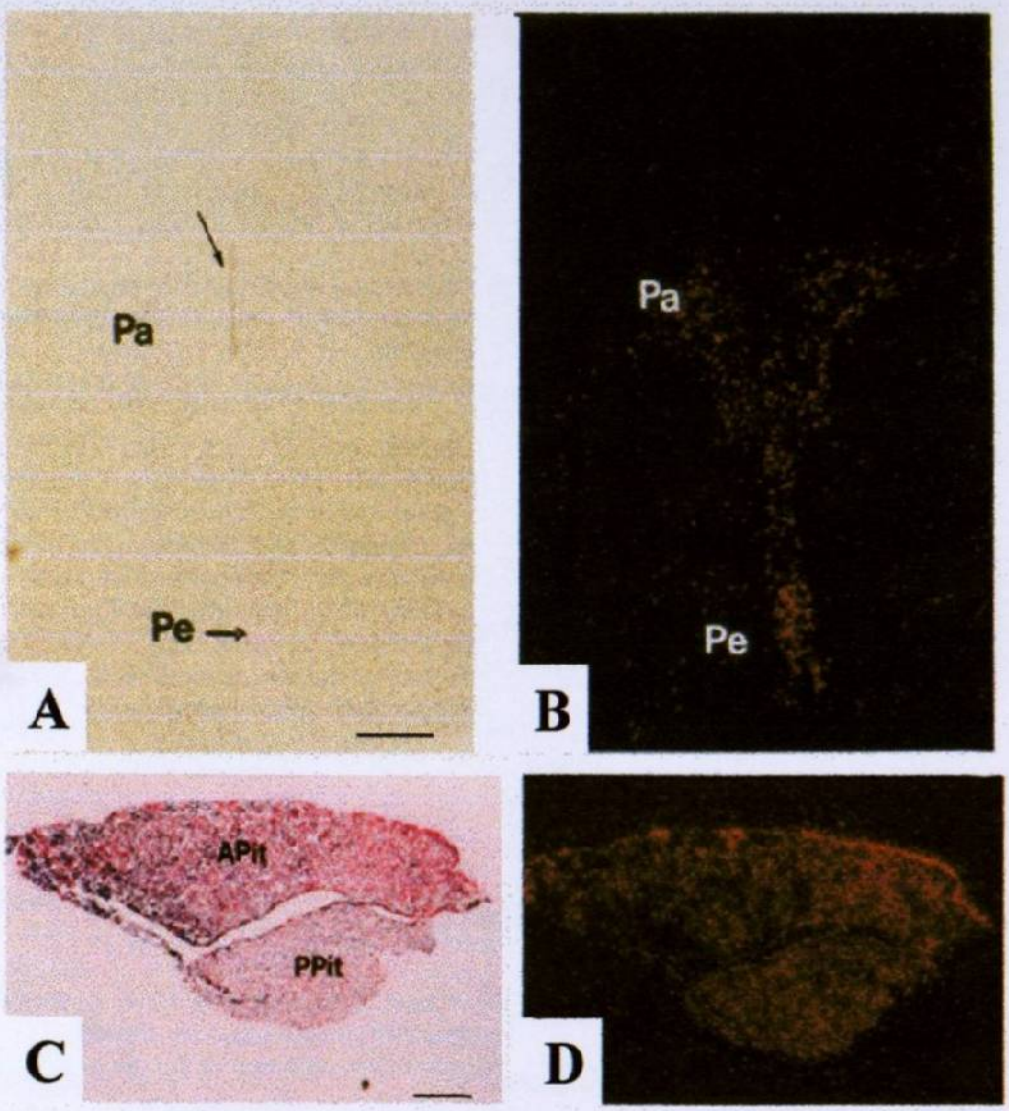


Figura 5. Hibridación in situ del RNAm de Nurr1 en hipotálamo y pituitaria. A y B corresponden a microscopía de campo claro y C y D a campo oscuro de un corte coronal de la región del hipotálamo de un cerebro de ratón adulto. El campo oscuro en B muestra las regiones paraventricular (Pa) y periventricular (Pe) del hipotálamo fuertemente teñidas con el RNAm de Nurr1. C muestra el campo claro y D el campo oscuro de un corte de la glándula Pitutaria. En D se puede observar la expresión del gen Nurr1 bastante extendida en los dos lóbulos anterior (Apit) y posterior (Ppit). La barra representa 200μm en A y 50μm en C.

patrón de expresión en las áreas hipotalámicas paraventricular (Pa), periventricular (Pe), anterior (AH), posterior (PH) y lateral (LH). Las áreas preópticas media (MPA) y lateral (LPO) mostraron una señal débil de expresión para Nurr1. Además, encontramos expresión moderada de Nurr1 en la glándula pituitaria. La expresión de Nurr1 se encontró en ambos lóbulos, anterior y posterior (Figura 5).

Mesencéfalo

La expresión de Nurr1 en el cerebro medio se muestra en la figura 4E-F.

La expresión de Nurr1 se localizó en los pedúnculos cerebrales y en núcleos conectados al sistema límbico, cuerpo estriado e hipotálamo. Entre estos núcleos están el área tegmental ventral (VTA), sustancia negra (SN), núcleos del rafe (Cli, DR), núcleo tegmentario pedúnculo-pontino (PPTg), núcleo intersticial del fascículo longitudinal medio (IMLF), campo retrorubral (RRF) y sustancia gris central (CG).

Varios núcleos con proyecciones principalmente al cerebelo como los núcleos pontino(Pn), retículo tegmental y retículo lateral también expresaron altos niveles del RNA mensajero de Nurr1. El núcleo Edinger-Westphal (EW) mostró expresión moderada Nurr1, sugiriendo un posible

papel para Nurr1 en el control de la actividad muscular del ojo.

Rombencéfalo

Los niveles mas elevados de la expresión de Nurr1 en esta región se observaron en la capa granular del cerebelo (figura 4A-B). Las regiones del puente y bulbo raquídeo presentaron una expresión moderada para Nurr1. Entre los núcleos positivos del puente (figura 6), se incluyen el vestibular medio (Mve) y reticular intermedio (Irt), los cuales están involucrados en cuatro tipos de función: control motor, control sensorial, control visceral y control de la consciencia. Consistente con su patrón de expresión en el cerebro medio, las células teñidas positivamente para Nurr1 fueron observadas en los núcleos pontino y rafe. Dentro del bulbo raquídeo, el núcleo del vago dorsal mostró tinción moderada para Nurr1 el cual esta involucrado en funciones sensoriales, motoras y parasimpáticas.

Además, en la médula espinal, la expresión de Nurr1 fue escasa y restringida a la región de la lámina X de la sustancia gris alrededor del canal central.

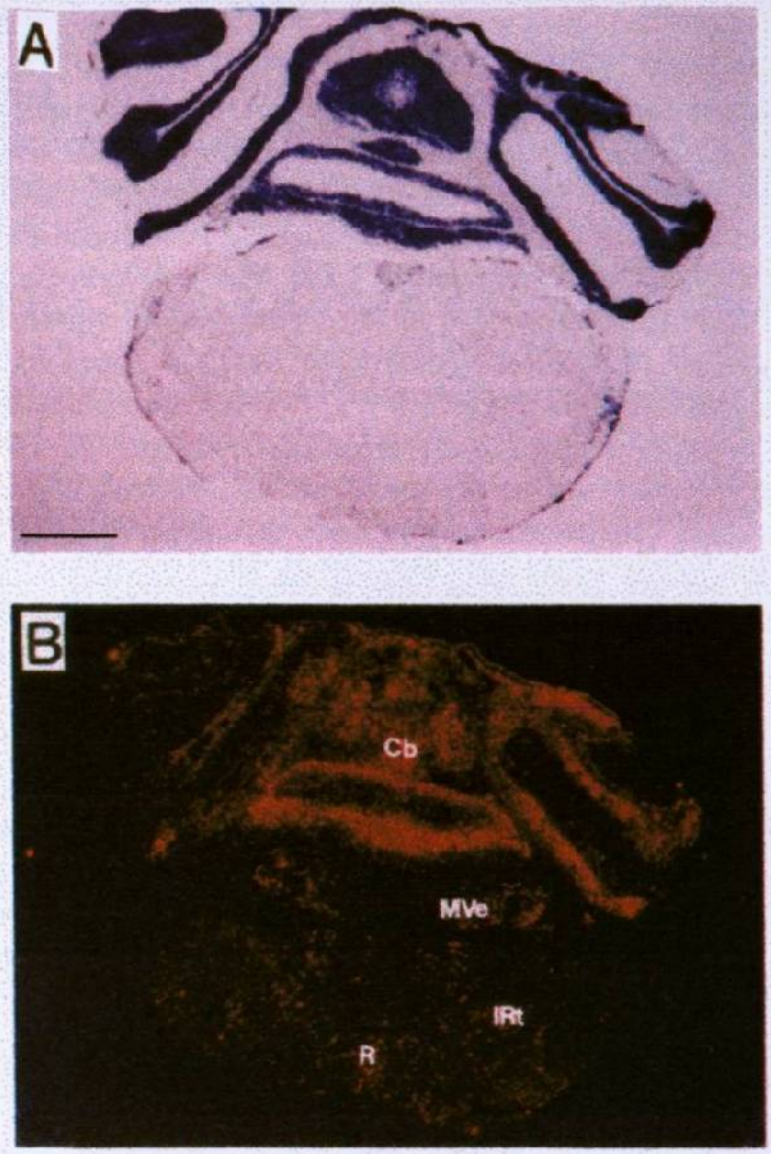


Figura 6. Localización del RNAm de Nurr1 en un corte frontal del cerebro posterior de ratón adulto. Panel A muestra el campo claro del panel B que muestra la intensa expresión de Nurr1 en la capa granular del cerebelo (Cb). En panel B también se observan núcleos del puente con moderada expresión de Nurr1. Mve, núcleo vestibular medio; Irt, núcleo reticular intermedio; R, núcleos del rafe. La barra representa 1000µm.

3.3.2 Patrón de Expresión del gen Nurr1 Durante el desarrollo embrionario.

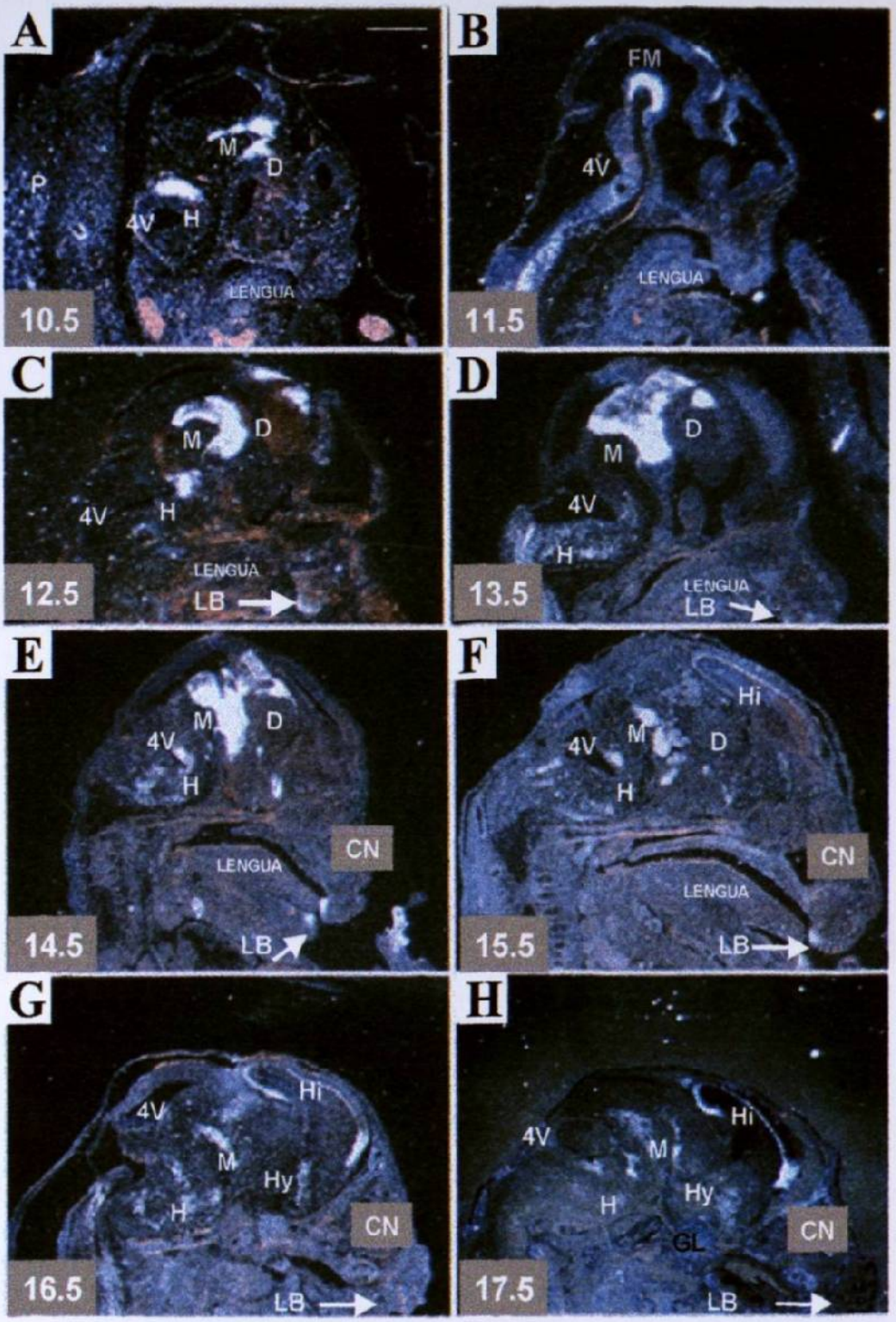
El patrón de expresión detectado para el RNA mensajero Nurr1 durante el desarrollo embrionario se observa en la figura 7.

La expresión del gen Nurr1 durante el desarrollo embrionario comienza a partir del día 10.5 (Figura 7A). Esta expresión está restringida al sistema nervioso central durante toda la gestación del ratón, a excepción de los labios que mostraron señal positiva a partir del día 12.5 del desarrollo embrionario.

Durante el desarrollo del cerebro, se distinguen 5 importantes vesículas, las cuales son el telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo. La expresión de Nurr1 se localizó en estructuras específicas de estas vesículas, el patrón de expresión se muestra en la Fig.7 y se describe a continuación:

Telencéfalo. Esta vesícula fue la última que mostró expresión de Nurr1 durante el desarrollo del cerebro de ratón. La región del hipocampo fue la primer estructura del telencéfalo donde se detectó expresión de Nurr1 y ésta

Figura 7. Patrón de expresión del RNAm de Nurr1 durante el desarrollo del cerebro del ratón. Los números del recuadro inferior izquierdo de cada feto corresponden a la edad del embrión. Los embriones se cortaron sagitalmente y muestran la expresión de Nurr1 durante el desarrollo del cerebro, desde el inicio de su detección a partir del día 10.5 hasta el 17.5 día. Se ha marcado la lengua, la cavidad nasal (CN) y el cuarto ventrículo (4V) como puntos de referencia. Así como la inicial de las principales vesículas y estructuras que dan origen al cerebro: D (diencéfalo), M (mesencéfalo), R (rombencéfalo), FM (flexura mesencefálica), Hi (hipocampo), Hy (hipotálamo). Note la extensa señal de Nurr1 durante las primeras etapas del desarrollo del cerebro en A-E, para luego restringirse a regiones específicas en las cuales persiste la expresión hasta el estado adulto. En F-H se observa la expresión de Nurr1 en estructuras como el hipocampo (Hi), hipotálamo (Hy) y un núcleo de células en el mesencéfalo (M) que se ubican en las estructuras conocidas como sustancia negra y área ventral tegmentaria. Aparte del cerebro, los labios (LB) mostraron una intensa señal de hibridación Nurr1 a partir del día 12.5. La barra representa 700µm en A-D y 1600µm en E-H.


A
M
D
P
4V
H
LENGUA
10.5
B
FM
4V
LENGUA
11.5
C
M
D
4V
H
LENGUA
LB
12.5
D
M
D
4V
H
LENGUA
LB
13.5
E
M
D
4V
H
CN
LENGUA
LB
14.5
F
Hi
4V
M
D
H
CN
LENGUA
LB
15.5
G
Hi
4V
M
Hy
H
CN
LB
16.5
H
Hi
4V
M
H
Hy
GL
CN
LB
17.5

comenzó a partir del día 15.5 (Figura 7F).

Diencéfalo. La expresión de Nurr1 se detectó en esta vesícula a partir del día 10.5. La intensa señal positiva estuvo localizada en las principales estructuras que origina el diencéfalo, las cuales son el tálamo e hipotálamo.

Mesencéfalo. Al igual que el diencéfalo, el mesencéfalo mostró una intensa expresión de Nurr1 a partir del día 10.5. La Figura 7B muestra la expresión de Nurr1 en la flexura mesencefálica y esta expresión se detecta con la misma intensidad durante todo el desarrollo del cerebro. Cabe mencionar, que únicamente la región ventral del mesencéfalo mostró una intensa expresión de Nurr1, cuyo patrón de expresión persiste hasta el adulto. Esta región ventral incluye estructuras bien conocidas como la substancia negra, área tegmental ventral, cuya población de neuronas son principalmente de tipo dopaminérgicas.

Rombencéfalo. La expresión de Nurr1 también se localizó en esta vesícula a partir del día 10.5 (Figura 7A). Esta vesícula se divide posteriormente en metencéfalo y mielencéfalo y a partir de ellas se desarrollan el puente (P) y el bulbo raquídeo (BR) respectivamente. La expresión en estas estructuras se detectó difusa en las etapas tempranas y posteriormente se observaron núcleos aislados de tinción positiva (Figura 7).

La distribución de Nurr1 durante el desarrollo del sistema nervioso

central coincidió con la encontrada en el adulto. En general, el patrón de expresión de Nurr1 inicialmente se encontró abarcando extensas zonas de tejido del cerebro (Figura 7), pero, conforme se fueron diferenciando las estructuras del cerebro, la expresión se restringió a ciertos núcleos específicos ya mencionados anteriormente. La única diferencia notable observada entre la expresión en el adulto y durante el desarrollo embrionario, fue en el cerebelo donde, la expresión de Nurr1 se encontró solamente en el adulto.

En cuanto a la expresión de la médula espinal, esta se inicia a partir del día 11.5 (Figura 8). La expresión se encontró en la capa intermedia del neuroepitelio y conforme se fue diferenciando el neuroepitelio, la expresión fue disminuyendo, hasta encontrarla escasamente en el día del nacimiento (P0), cuya expresión coincide con la observada en el adulto.

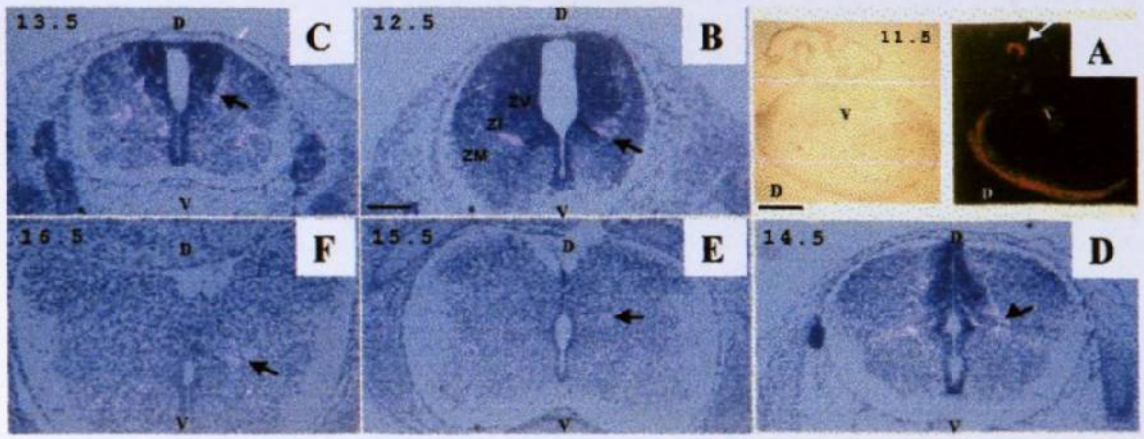


Figura 8. Expresión de Nurr1 durante el desarrollo de la médula espinal. En A se muestra el campo oscuro y claro de un corte sagital de embrión de ratón de 11.5 días de desarrollo. El campo oscuro muestra la intensa expresión de Nurr1 a todo lo largo de la médula espinal. La flecha indica la señal de hibridación de Nurr1 en la región ventral mesencefálica. En B-F se muestra la expresión de Nurr1 en orden cronológico a partir del día 11.5 hasta el día 16.5 respectivamente. Los cortes transversales muestran la localización de Nurr1 (representada por los puntos blanquecinos e indicados por la flecha negra) en la zona intermedia (ZI) del neuroepitelio.En B se marcan las zonas del neuroepitelio (ZV, zona ventricular; ZI, zona intermedia; ZM, zona marginal) el cual alcanza su forma característica de mariposa para el día 15.5 (E). Note que la intensa señal decrece con la diferenciación del neurepitelio. La barra representa 50µm en B-D y 100µm en A.

3.4 Mutación del gen Nurr1 Endógeno en Células Madres Embrionarias de Ratón

3.4.1 Estrategia Utilizada para la Mutación del gen Nurr1 Endógeno de Células Madres Embrionarias.

El siguiente paso consistió en la introducción del gen que porta la mutación para Nurr1 (*vector recombinante Nurr1*), dentro de las CME de ratón y la identificación de clonas de CME que habían sufrido recombinación homóloga. El vector recombinante Nurr1 (Figura 2) fue linearizado con la enzima *Not1*, cuyo sitio único de reconocimiento estaba situado afuera de la región de homología. Enseguida fueron electroporadas CME con este vector recombinante linearizado. Los vectores linearizados trabajan mejor posiblemente porque la linearización convierte al vector en un substrato topológico más favorable para la participación en la recombinación homóloga con el gen endógeno[89].

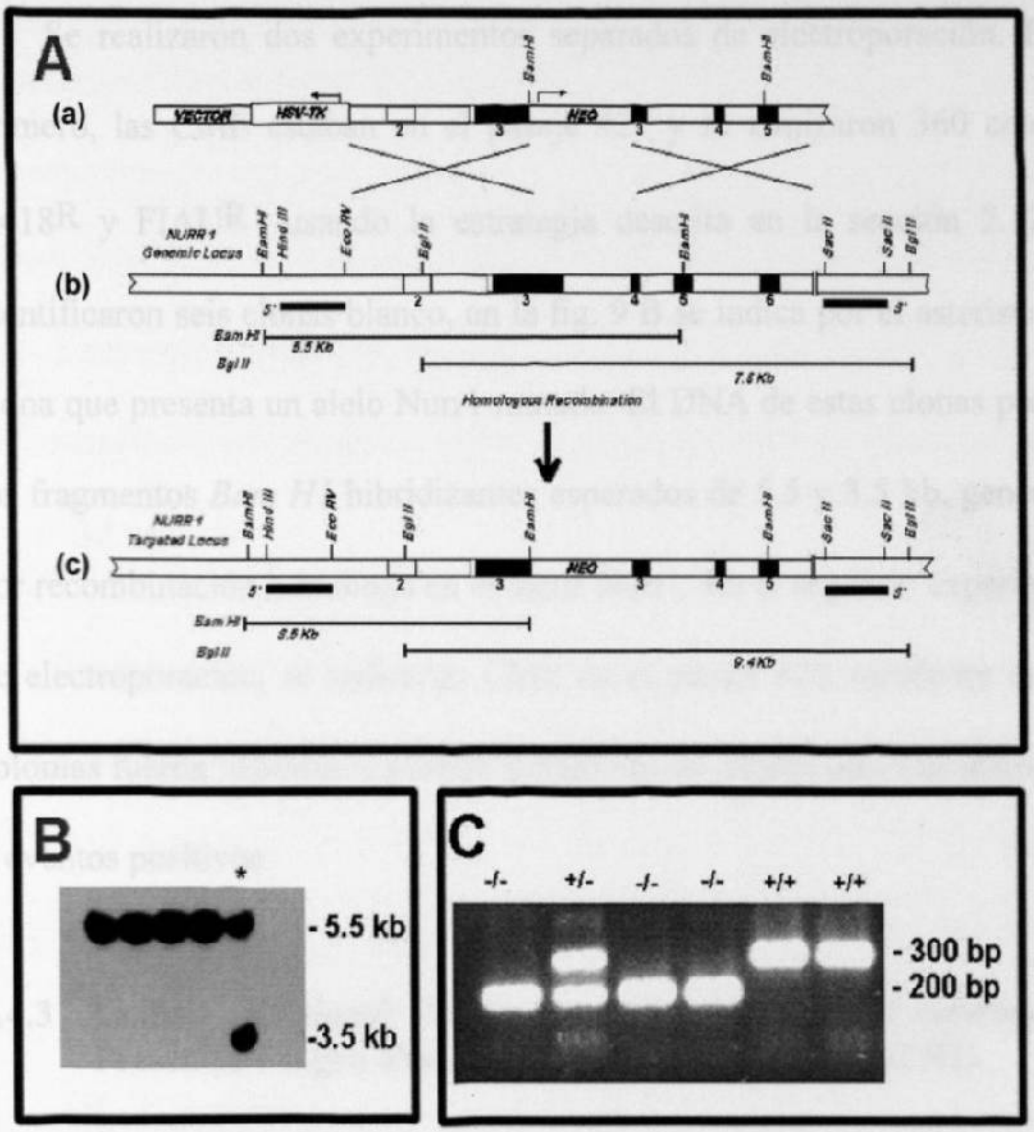
Después de la electroporación, las colonias que resultaron positivas para el gen Neo^R ($G418^R$) y negativas para el gen HSV-TK ($FIAU^R$) fueron aisladas y tamizadas mediante análisis "mini-southern" para identificar los eventos positivos de recombinación homóloga (sección 2.12). Este procedimiento permite tamizar simultáneamente un gran número de colonias. Para la detección de eventos positivos se digiere el DNA

genómico de las clonas con una enzima de digestión, y los fragmentos son hibridizados con una sonda específica para distinguir el alelo mutado del alelo silvestre.

El resultado del análisis tipo "Southern" para la identificación de un evento positivo del gen Nurr1 mutado se muestra en la figura 9B. El gen endógeno Nurr1 y la construcción del vector mutante Nurr1 se muestran en la figura 9A (b) y (a) respectivamente. La localización de los sitios *Bam H1* necesarios para la estrategia de detección se muestra en la figura 9A (b y c). La figura 9 A(c) ilustra la forma mutada del gen Nurr1 después de la recombinación homóloga. En el caso del gen Nurr1 tipo silvestre (Figura 9A), al digerir el DNA genómico de las CME con BamH1 e hibridizarlo con una sonda genómica Nurr1 de 900 pb marcada con [^{32}P] (sonda 5'Nurr1), se obtiene una banda hibridizante de 5.5 kb, debido a la presencia de un sitio BamH1 en la región 5' no traducida del gen Nurr1 y un segundo sitio *Bam H1* en el exón 5. En el caso de un evento positivo en el locus de Nurr1, la presencia del gen NEO^{R} en el exón 3 introduce un sitio *Bam H1* adicional el cual resulta en una banda hibridizante más pequeña de 3.5 kb. De esta manera, cuando el DNA genómico de las clonas de CME resistentes a G418 y FIAU se digiere con *Bam H1* y se hibridiza con la sonda 5'Nurr1, producirá dos tipos de bandas hibridizantes.

Figura 9. Inactivación del gen Nurr1 en CME y detección de su genotipo. En A (a)(b)(c) se representan el diseño del vector recombinante Nurr1, el gen silvestre Nurr1 y el gen Nurr1 mutado, respectivamente. En (b)(c) se muestra el tamaño de los fragmentos *Bam HI* y *Bgl II* que se obtienen al analizar el DNA genómico de las clonas de CME obtenidas con las enzimas de restricción *Bam HI* y *Bgl II* respectivamente.

Las flechas horizontales indican la dirección de la transcripción. En B se muestra un análisis tipo Southern blot del DNA de CME resistentes a neomicina. El DNA fue digerido con *BamHI* e hibridizado con una sonda genómica Nurr1 de 900 pb localizada río arriba de la región 5' involucrada en la recombinación homóloga. Esta sonda detectó un fragmento de 5.5 kb y otro de 3.5 kb de los alelos silvestre y mutante respectivamente. En C se muestra un análisis mediante PCR de los ratones obtenidos entre cruzas de heterocigotos Nurr1. Se obtienen dos productos de PCR, uno de 300 pb y otro de 200 pb que corresponden al alelo silvestre y mutante respectivamente.


A
(a)
VECTOR
HSV-TK
HEO
BamHI
BamHI
(b)
NURR1
Genomic Locus
BamHI
Hind III
Eco RV
Egl II
BamHI
Sac II
Sac II
Egl III
5'
3'
Bam HI
Bgl II
5.5 Kb
7.6 Kb
Homologous Recombination
(c)
NURR1
Targated Locus
HEO
9.4 Kb
B
*
- 5.5 kb
-3.5 kb
C
-/-
+/-
-/-
-/-
+/+
+/+
- 300 bp
- 200 bp

Una banda de 5.5 kb en tamaño, que representa el alelo Nurr1 tipo silvestre y una banda de 3.5 kb, que corresponde al alelo Nurr1 mutado.

3.4.2 Identificación de Clonas de Células Madres Embrionarias que Portan la Mutación del gen Nurr1.

Se realizaron dos experimentos separados de electroporación. En el primero, las CME estaban en el pasaje #21 y se tamizaron 360 colonias $G418^R$ y $FIAU^R$ usando la estrategia descrita en la sección 2.12. Se identificaron seis clonas blanco, en la fig. 9 B se indica por el asterisco una clona que presenta un alelo Nurr1 mutado. El DNA de estas clonas produjo los fragmentos *Bam III* hibridizantes esperados de 5.5 y 3.5 kb, generados por recombinación homóloga en el locus Nurr1. En el segundo experimento de electroporación, se utilizaron CME en el pasaje #20, alrededor de 300 colonias fueron resistentes a G418 y FIAU de las cuales otra vez obtuvimos 6 eventos positivos.

3.4.3 Análisis Adicional Mediante Southern para Confirmar la Presencia del gen Mutado Nurr1 en las Clonas de CME.

Mediante el tamizaje inicial de las clonas de CME se identificaron 12 clonas candidato que presentaron el fragmento esperado de 3.5 kb al hibridizar con la sonda 5'Nurr1. Sin embargo, la estrategia utilizada para

identificar las clonas blanco de CME fue específica para eventos en los cuales había ocurrido recombinación homóloga entre los genes endógenos con el vector recombinante a nivel del brazo corto de homología Nurr1. Un aspecto importante de este experimento consiste en confirmar que ha ocurrido el cambio genético deseado. Esto se debe a que posteriormente se correlaciona directamente cualquier cambio fenotípico observado en ratones homocigotos para el alelo mutado con la modificación genética específica introducida. Esta confirmación fue llevada a cabo mediante el análisis de ambos aspectos 5´ y 3' del locus blanco mediante digestiones con enzimas de restricción adicionales y utilizando sondas externas de ambos extremos 5' y 3' del gen Nurr1.

La figura 9 A (b)(c) representa la estrategia utilizada para determinar si algún otro rearreglo, ajeno al planeado, había ocurrido en la estructura del gen Nurr1. La Figura 7(b) representa la estructura genómica normal del gen Nurr1. Los sitios de enzimas de restricción y las sondas 5' y 3' Nurr1 en la Figura 9 (b) utilizadas en el análisis se indican en la Figura 9 (b) y (c). En esta figura también se ilustran los mapas de restricción para el vector diseñado y el alelo mutado después de la recombinación homóloga. La figura 9A muestra los tamaños de los fragmentos de restricción esperados para los alelos recombinantes y endógenos cuando las clonas blanco fueron

digeridas con las enzimas indicadas e hibridizadas con sondas 5' y 3'. La sonda B corresponde a un fragmento *Sac I* del extremo 3' del gen Nurr1 de alrededor de 650 pb. De este modo, los resultados obtenidos mediante el análisis tipo Southern utilizando la estrategia anterior no revelaron algún rearreglo con las sondas 5'y 3' lo cual indicó que el evento correcto de recombinación homóloga había ocurrido en el locus de Nurr1.

3.5 Obtención de un Modelo Animal Deficiente de Nurr1

El éxito obtenido en la mutación del gen Nurr1 en CME de ratón, nos proporcionó el material necesario para llevar a cabo nuestro tercer objetivo, obtener un modelo animal deficiente de Nurr1.

3.5.1 Microinyección de CME en Blastocistos.

Este procedimiento fue realizado por el Dr. Franco De Mayo del laboratorio de transgénicos del departamento de Biología Celular del Colegio de Baylor en Houston Texas.

Este procedimiento consistió en la microinyección de 15 a 20 células de la línea celular de CME mutadas Nurr1 (H1) dentro de la cavidad de un embrión en estado de blastocisto. Generalmente se microinyectaron un número suficiente de blastocistos para producir al menos 3 camadas y se

depositaron alrededor de 12 blastocistos en las trompas de Falopio de una madre nodriza pseudopreñada.

Se utilizó la cepa C57BL de ratones para generar las quimeras a partir de los blastocistos microinyectados, la cual es de color negro, non-agouti (BBaa). Ya que las CME se derivaron de un blastocisto de la cepa 129SvEv, la cual es negra, agouti (BBAA), los ratones quiméricos generados por la incorporación de CME dentro de la línea germinal de la cepa C57BL se detectaron por la presencia del color agouti en su pelaje.

3.5.2 Resultados de las Microinyecciones.

Después de la transferencia de los embriones, las camadas nacieron 17 días mas tarde. Se analizó el sexo de los descendientes y también la presencia del color agouti en su pelaje. El marcador, color agouti llegó a ser visible hasta una semana después del nacimiento. Sin embargo, las líneas celulares ME son derivadas de blastocistos machos y debido a la contribución extensa de esta línea celular en la formación del embrión microinyectado, se convierte un blastocisto femenino a un animal masculino. Esto resulta en la producción de un mayor número de machos en una camada. La proporción en forma natural de animales macho/hembra por camada es 50/50. Y en este caso la proporción macho/hembra fue

90/10.

El número de pasajes de las CME también es un factor importante para la generación de ratones quiméricos. El tiempo de duración que las CME son mantenidas en cultivo influye en el estado pluripotencial de las CME. Hay una correlación inversa entre el número de pasajes de las CME y el grado de quimerismo obtenidos de ellos.

Tres de las clonas blanco del primer experimento de electroporación fueron microinyectadas dentro de blastocistos y transferidos a madres nodrizas pseudopreñadas. De la primer microinyección con una de las clonas blanco (H1) se obtuvo un ratón macho quimérico el cual presentó un 95% de su pelaje de color agouti. Para las siguientes microinyecciones se utilizaron las otras 2 clonas blanco (D3 y F11), se obtuvieron quimeras macho las cuales presentaron una proporción de un 60 a un 100% de color agouti en su pelaje, pero no se obtuvieron resultados exitosos, porque ninguno de ellos presentó la mutación Nurr1. Una explicación a esto es que posiblemente eran machos estériles ya que las hembras con las que se aparearon no se preñaron y por otro lado quizás las CME portadoras de la mutación no fueron incorporadas en el desarrollo de las gónadas. El único ratón macho quimérico obtenido a partir de la clona H1 se apareó con ratonas de la cepa C57BL/6. A partir de estas cruzas se generaron ratones

heterocigotos, los cuales se cruzaron entre sí para generar ratones homocigotos. Para la detección de la transmisión del alelo mutante Nurr1 a través de la línea germinal se utilizó el análisis de PCR. Para esto se aisló DNA genómico de las colas de ratón. En estos análisis, el gen Nurr1 de tipo silvestre es representado por un producto de PCR de 300 pb mientras que el alelo mutado es representado por un producto de PCR de 200 pb (Figura 9C). De los genotipos obtenidos mediante estos análisis se observó que los ratones homocigotos mutantes Nurr1 (Nurr1$^{-/-}$) nacieron con la frecuencia esperada de acuerdo a la primera ley de Mendel.

3.6 Análisis del Fenotipo de los Ratones Carentes de Nurr1

3.6.1 Datos Generales del Fenotipo.

Al nacimiento de las camadas de cruzas entre heterocigotos, se hicieron las siguientes observaciones: tamaño y peso del cuerpo, presencia de leche en su estómago y movimiento corporal. Para determinar el genotipo se les cortó un pedazo de cola para purificar DNA genómico y llevar a cabo una reacción de PCR. Como resultados preliminares de nuestro trabajo, se observó que los ratones deficientes del gen Nurr1 (homocigotos para la mutación Nurr1) eran en su mayoría los que no presentaban leche en su estómago, eran hipoactivos y morían durante el

transcurso de las primeras 12 horas de vida.

En cuanto a otros parámetros como tamaño y peso, no hubo diferencias entre los ratones silvestres y mutantes.

3.6.2 Rescate del Fenotipo con Glucosa.

Para determinar si los ratones mutantes carentes de la función de Nurr1 morían por falta de alimento y no por algún problema respiratorio, se realizó el siguiente experimento:

(1) 4 camadas de ratones recién nacidos se separaron de su madre y se mantuvieron en condiciones adecuadas de temperatura y ciclos normales de horas luz y oscuridad.

(2) Se les inyectó subcutáneamente 50 µl de una solución de glucosa al 10% en solución salina, cada 8 horas.

Todos los ratones murieron después de haber sobrevivido de 30-50 horas. No hubo diferencias entre mutantes y silvestres. Se determinó su genotipo mediante PCR. En total se analizaron 4 ratones silvestres, 7 ratones heterocigotos y 5 ratones mutantes Nurr1. Estos resultados indican que no existe un problema de tipo respiratorio. Que la falta de alimento ocasionada por la incapacidad de succión es la responsable de la muerte de

los ratones deficientes de Nurr1.

3.6.3 Análisis Histológico, Inmunohistoquímico e Hibridación *In Situ*.

Se analizaron cortes histológicos del cerebro y médula espinal de ratones recién nacidos de tipo silvestre y mutantes. Estos cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina y los mutantes no mostraron aparentemente alteración alguna al compararlos con los de tipo silvestre.

Los resultados de hibridación *in situ* de este gen Nurr1 en el cerebro, identifican a la región ventral mesencefálica como sitio de expresión intensa para Nurr1. Esta región es rica en neuronas dopaminérgicas, cuya función en el cerebro es sumamente importante. Para examinar el papel de Nurr1 en el desarrollo del sistema dopaminérgico, se analizó mediante inmunohistoquímica la expresión de dos marcadores celulares dopaminérgicos, TH y AADC. Se obtuvieron cortes frontales de la región mesencefálica de ratones recién nacidos de tipo silvestre y mutante (figura 10A-D). Consistente con hallazgos de otro grupo de investigadores[90], la deleción de Nurr1 provoca una ausencia de ambos marcadores, confirmando que Nurr1 es esencial para la expresión de un fenotipo celular dopaminérgico mesencefálico. Además el análisis de neurotransmisores en

la región del cuerpo estriado confirmó estos resultados inmunohistoquímicos. Se obtuvo una pérdida total del neurotransmisor dopamina en los ratones mutantes y una disminución significativa en los ratones heterocigotos (figura 10E), mientras que los neurotransmisores norepinefrina y serotonina no sufrieron cambio alguno. También se midió la actividad enzimática de TH y CHAT y únicamente la actividad de TH se vio afectada (Figura 10F-G). Para determinar si el defecto era específico para las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, se examinó la expresión de TH en neuronas dopaminérgicas de la región periglomerular del bulbo olfatorio y las células de la médula de la glándula adrenal las cuales derivan de la cresta neural en ratones mutantes Nurr1. Ambos tipos celulares expresan tanto Nurr1 como el marcador TH. En ambos tipos celulares, la ausencia de Nurr1 no afectó la expresión del marcador TH (figura 11).

Para determinar cuando se requiere la función de Nurr1 durante el desarrollo celular dopaminérgico mesencefálico, se utilizaron marcadores de este proceso para examinar el fenotipo de las células de la región mesencefálica en embriones de 11.5 días, de tipo silvestre y mutantes. Primero, se determinó si las células habían respondido a la señal inductiva del gen morfogenético sonic hedgehog (SSH) al adoptar un fenotipo general

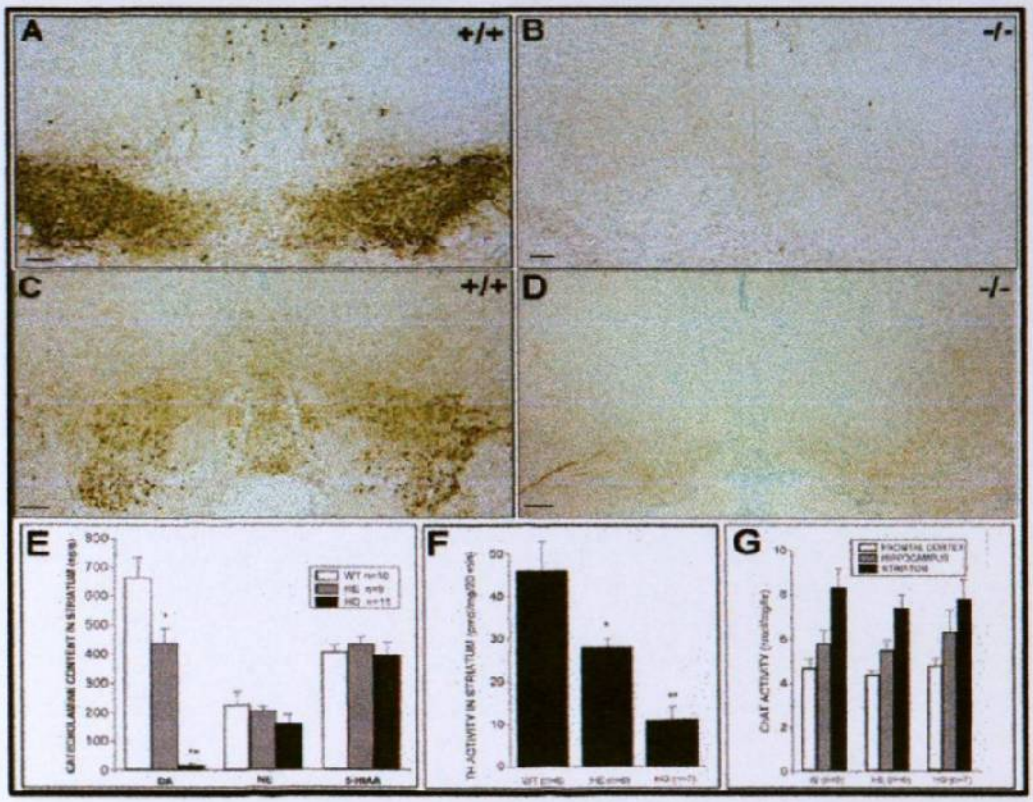
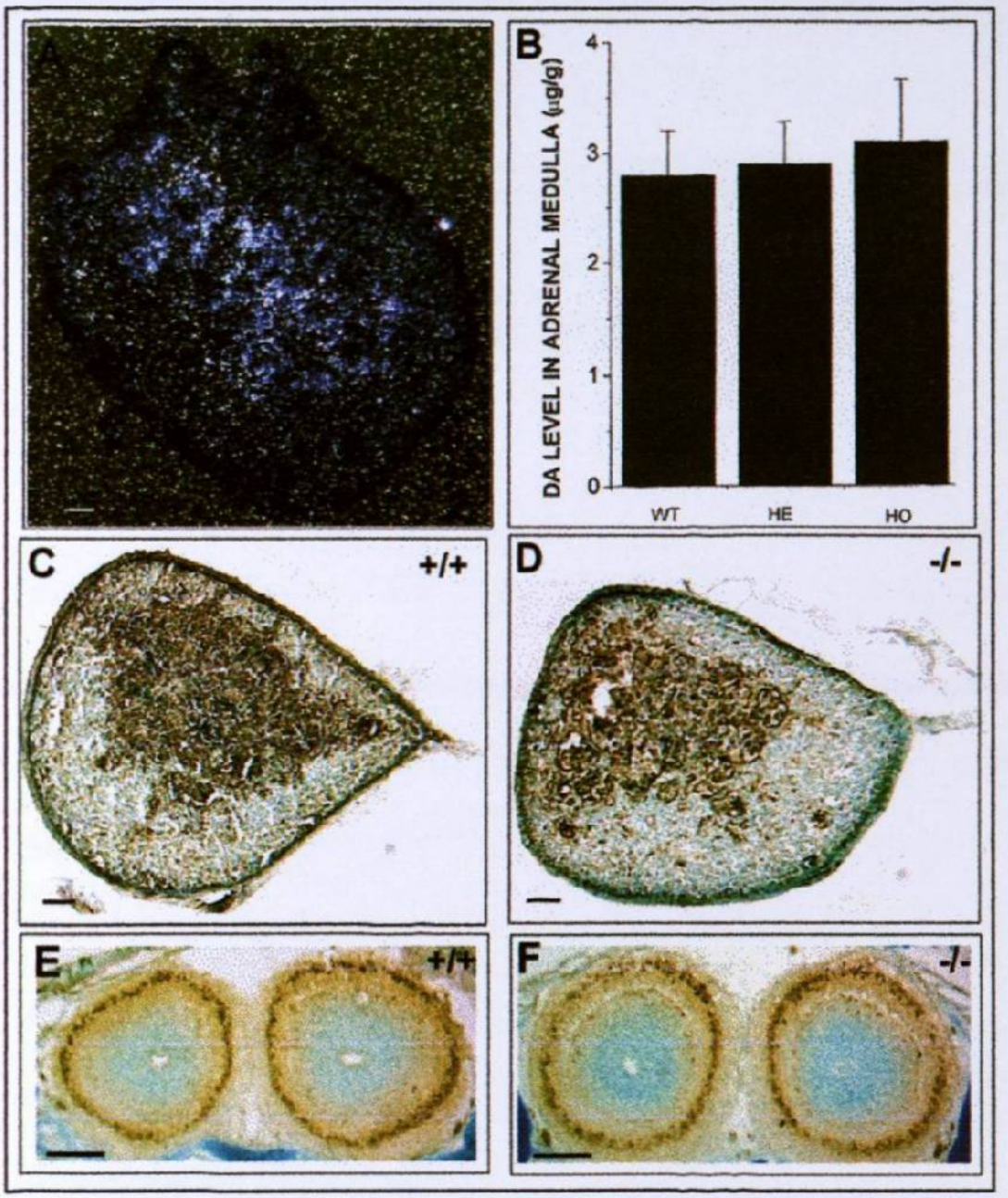


Figura 10. Análisis de los niveles de monoaminas y Chat en ratones recién nacidos.
A-D son cortes frontales del cerebro medio de ratón recién nacido. A y C muestran tinción positiva contra los anticuerpos TH y AADC respectivamente, en la sustancia negra y área ventral tegmentaria de un cerebro de ratón silvestre. B y D muestran la pérdida de ambos marcadores en las mismas regiones de un cerebro de ratón mutante Nurr1.
E. Muestra los niveles de monaminas obtenidos mediante HPLC en el cuerpo estriado de ratones silvestres, heterociogotos y mutantes. Los niveles de dopamina fueron casi nulos en los ratones mutantes, y en los heterocigotos hubo una notable disminución comparada con el grupo normal. Mientras que los niveles de norepinefrina y serotonina no se afectaron.
F. La actividad de TH en el cuerpo estriado de ratones mutantes y heterocigotos mostró una disminución significativa.
G. La actividad de acetilcolinatransferasa tampoco sufrió modificación en los diferentes tejidos analizados (corteza frontal, hipocampo y cuerpo estriado) de mutantes y heterocigotos. La barra representa 100µm.

Figura 11. Expresión de Tirosina Hidroxilasa (TH) y niveles de dopamina en células de la médula de la glándula adrenal y bulbo olfatorio de ratones recién nacidos. (A) Análisis de hibridación *in situ* de la expresión del RNAm de Nurr1 en la glándula adrenal de un ratón silvestre. (B) Niveles de dopamina en la glándula adrenal de ratones silvestres (WT), heterocigotos (He) y mutantes (Ho). No hubo diferencias significativas en los niveles de dopamina entre los 3 grupos analizados. Estos resultados se confirmaron con la detección inmunohistoquímica (C y D) de TH. (C) Detección inmunohistoquímica de TH en la glándula adrenal de un ratón silvestre (+/+). (D) Detección inmunohistoquímica de TH en la glándula adrenal de un ratón mutante (-/-). (E) (F) Detección inmunohistoquímica de TH en el bulbo olfatorio de ratones silvestres (+/+) y mutantes (-/-) respectivamente. Tampoco hubo alteraciones en la expresión de Nurr1 en los mutantes. La barra representa 50μm.


A
B
DA LEVEL IN ADRENAL MEDULLA (µg/g)
4
3
2
1
0
WT
HE
HO
C
+/+
D
-/-
E
+/+
F
-/-

neuronal. Para esto se utilizó el marcador de ventralización, el factor nuclear de hepatocitos 3B (HNF3B) y el marcador general neuronal, 3A10[91]. La expresión positiva de ambos marcadores demostró que la ventralización e inducción general neuronal de células neuroepiteliales en la placa neural ventrolateral no se afectaron por la deleción de Nurr1 (figura 12). También se examinó la expresión de la proteína homeodomain recientemente identificada, Ptx-3[75], como un marcador para células progenitoras dopaminérgicas mesencefálicas cuya expresión comienza en el día 11 después del inicio de la expresión de Nurr1. Sorprendentemente, ambos ratones, de tipo silvestre y mutante mostraron un patrón de expresión similar de Ptx-3 localizado en la zona ventral mesencefálica, lo cual indica que la expresión de Ptx-3 es independiente de Nurr1 (figura 12C). Finalmente, la ausencia del patrón de expresión en la zona ventral mesencefálica del marcador TH demuestra que la diferenciación al fenotipo dopaminérgico no se lleva a cabo en embriones mutantes Nurr1 de 11.5 días (figura 12). Estos datos indican que Nurr1 funciona en las etapas tardías del desarrollo celular dopaminérgico mesencefálico durante la diferenciación de neuronas mesencefálicas ventrales positivas a Ptx-3 hacia un fenotipo final dopaminérgico.

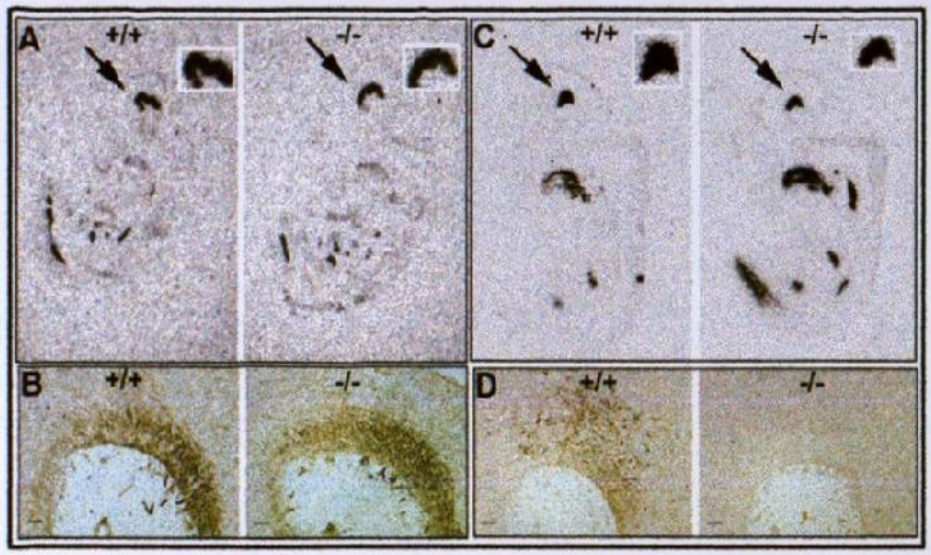


Figura 12. Análisis del Fenotipo Celular en la Región Ventral Mesencefálica de Embriones Silvestres y Mutantes Nurr1.

(A) Localización autorradiográfica del marcador ventral mesencefálico HNF3B. La flecha muestra la fuerte expresión de este marcador en embriones silvestres (+/+) y mutantes (-/-) de 12.5 días. El cuadro pequeño muestra una amplificación de esta región positiva. No se observaron diferencias en la expresión de este marcador.

(B) Detección inmunohistoquímica del marcador neuronal 3A10 en embriones silvestres y mutantes de 11.5 días. No hubo diferencias en la expresión de 3A10.

(C) Detección del RNAm de Ptx3 mediante hibridación in situ en embriones de ratón silvestre y mutantes de 11.5 días. La flecha indica la expresión de Ptx3 en la región ventral mesencefálica. No se observaron diferencias en su expresión.

(D) Análisis comparativo inmunohistoquímico de la expresión de TH en la región ventral mesencefálica de embriones silvestres y mutantes de 12.5 días. Note la ausencia de tinción en el corte histológico del mutante (-/-).

La barra representa 20μm.

Para determinar si los precursores dopaminérgicos mesencefálicos sobreviven en la ausencia de Nurr1, se analizó la persistencia de neuronas positivas Ptx-3 en ratones recién nacidos (figura 13). El análisis de la expresión de éste marcador en ratones recién nacidos demostró la persistencia de la expresión de Ptx-3 en neuronas maduras dopaminérgicas en ratones silvestres. Pero, por el contrario, los ratones homocigotos mutantes mostraron una escasa y débil expresión de Ptx-3 en la región ventral mesencefálica, lo cual indica una pérdida significativa de células positivas para Ptx-3 (figura 13). Además, la pérdida de la expresión de Ptx-3 fue específica para la región ventral mesencefálica ya que la expresión de Ptx-3 en otras regiones no sufrió cambio. Para determinar si la pérdida en la expresión de Ptx-3 estaba asociada con una pérdida de las células de la región ventral mesencefálica, se compararon los niveles de apoptosis en ratones recién nacidos de tipo silvestre y mutantes utilizando el experimento TUNEL. Los resultados de estos análisis demuestran que la pérdida de células que expresan Ptx-3 está asociada con un incremento en el número de células muertas y apoptóticas y que esta alteración esta restringida a la región ventral del cerebro medio de los ratones mutantes Nurr1. Para apoyar la observación de este incremento de muerte celular, se

cuantificaron las células en estado apoptótico en la substancia negra y en el área ventral tegmentaria del cerebro medio. Para esta cuantificación se utilizaron cortes histológicos de la región ventral mesencefálica de 3 recién nacidos tipo silvestre y 3 mutantes Nurr1 lo cual confirmó el incremento en el número de células apoptóticas de un 0.5% encontrado en el tipo silvestre comparado con un 7% observado en los ratones mutantes Nurr1. Finalmente, el incremento en la muerte celular fue consistente con un obvio decremento en el número de células observadas en la región ventral mesencefálica de un recién nacido (figura 13) Estos datos indican que Nurr1 se requiere para la supervivencia de células precursoras dopaminérgicas mesencefálicas así como para la diferenciación completa de células productoras de dopamina mesencefálicas.

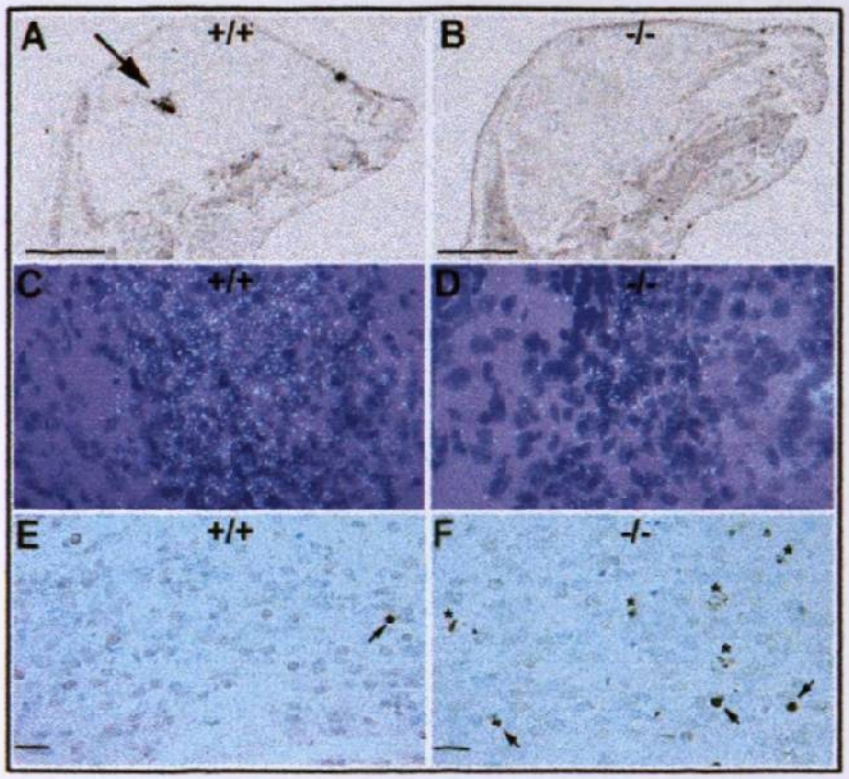


Figura 13. Pérdida de la Expresión de Ptx3 y Muerte Celular en la Región Ventral Mesencefálica de Ratones Recién Nacidos Mutantes Nurr1.
(A) y (B) Comparación de la expresión de Ptx3 mediante hibridación in situ de la región ventral mesencefálica de ratones recién nacidos silvestres (+/+) y mutantes (-/-). La flecha indica la expresión de Ptx3 en la región ventral mesencefálica de un ratón silvestre. Note la ausencia de este marcador en el cerebro de un ratón mutante Nurr1.
(C) y (D) Amplificación de los análisis de hibridación in situ mostrados en (A) y (B). Note la disminución significativa de la expresión de Ptx3 en el ratón mutante comparada con la expresión del ratón silvestre.
(E)y (F) Análisis del incremento de muerte celular en la región ventral mesencefálica de ratones mutantes mediante el ensayo TUNEL. Las flechas indican los cuerpos apoptóticos y los asteriscos, células muertas.
La barra representa 2mm en A-B y 20μm en C-F.

CAPITULO 4

DISCUSION

Se comparó la organización estructural del gen Nurr1 con la reportada para el gen NGFI-B[28], ambos miembros de la subfamilia Nurr1, y encontramos que ambos genes presentan una organización muy similar. El conocimiento de la organización estructural de este gen Nurr1 representa un avance importante para el estudio de su función tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, es importante para el conocimiento de su regulación diferencial por señales extracelulares.

La expresión de Nurr1 se localizó en la mayoría de las principales divisiones del cerebro. Sin embargo, su expresión dentro de estas divisiones se encontró predominantemente en estructuras asociadas con el sistema límbico. La asociación de Nurr1 con el hipotálamo y sistema límbico nos hace suponer un papel para este factor de transcripción en la integración y procesamiento de información motora y sensorial requerida para la expresión de comportamientos motivacionales y emocionales complejos, así

como en los procesos de aprendizaje y memoria.

La localización de Nurr1 dentro de estructuras neuroendocrinas del hipotálamo y de la glándula pituitaria anterior, y su asociación con estructuras autonómicas, incluyendo el hipotálamo, la corteza del cíngulo y los núcleos de la estría terminal, sugiere un posible papel para Nurr1 en procesos neuroendócrinos y autonómicos. La localización de Nurr1 en el núcleo paraventricular del hipotálamo y en la pituitaria anterior es de particular interés porque se han identificado secuencias de DNA cis-activantes para Nurr1 en la región promotora de los genes CRF (factor liberador de corticotropina) y POMC (pro-opio-melanocortina), los cuales son expresados en áreas del hipotálamo y de la pituitaria, respectivamente[39]. De hecho, mediante estudios de transfección de células de pituitaria con el gen Nurr1 y genes reporteros bajo la regulación del promotor de los genes CRF y POMC, se ha demostrado que Nurr1 puede regular la expresión de ellos[92]. Estos datos junto con los previamente demostrados por otros investigadores acerca de la regulación de Nur77 por ACTH en la regulación de la expresión de la enzima esteroidegénica esteroide-21 hidroxilasa[29], provee la primera indicación de que la subfamilia Nurr1 de receptores nucleares puede jugar un papel neuroendocrino importante en la regulación

coordinada de actividad del eje hipotalámico-pituitaria-adrenal (HPA).

Por otro lado, la intensa señal de Nurr1 en el cerebelo sugiere que puede tener un papel en el mantenimiento del equilibrio y coordinación de la acción muscular.

Nuestro análisis del patrón de expresión de Nurr1 en este estudio identifica regiones funcionalmente definidas del cerebro en las cuales la expresión constitutiva de este transcrito parece contribuir al mantenimiento de una línea base o nivel constitutivo de actividad neuronal. La capacidad que tiene este factor de transcripción Nurr1 para responder de una manera inducible a una variedad de estímulos indica una mayor participación de Nurr1 en la actividad neuronal bajo condiciones de estímulos específicos que no se estudiaron en el presente trabajo.

De acuerdo al patrón de expresión encontrado en las principales estructuras del cerebro, es difícil predecir qué función tiene el gen Nurr1 en el sistema nervioso central. Ya que al tratar de correlacionar estructura-función de las principales estructuras positivas para Nurr1, encontramos la expresión de Nurr1 tanto en estructuras de función motora como sensorial. Al igual que la organización estructural del gen Nurr1, su patrón de

expresión también se comparó con el reportado para los otros 2 miembros de la familia a la que pertenece Nurr1. La distribución de Nurr1 en el adulto coincidió en algunas estructuras con la de Nur77 y Nor1, lo cual indica que estos transcritos pueden tener funciones compartidas en esas regiones en el adulto.

En lo que respecta a la expresión de Nurr1 durante el desarrollo, es importante mencionar que Nur77 está ausente, mientras que Nurr1 y Nor1 están presentes desde una etapa temprana. Lo importante de esta comparación de los patrones de expresión fue que no hubo traslape de expresión, lo cual representaba una mayor responsabilidad para nuestro gen Nurr1 en el desarrollo del SNC y que el fenotipo por obtener se perfilaba para ser letal a menos que existiera otro miembro de la familia aún no identificado y reemplazara la función del gen Nurr1. El hecho de ser un factor de transcripción y expresarse al inicio del desarrollo neuronal y estar presente durante la etapa adulta sugería un papel indispensable de Nurr1. Al analizar el patrón de expresión en la médula espinal, es importante hacer notar la ubicación de Nurr1 en el neuroepitelio, cuya expresión se restringió a la capa intermedia, la cual incluye a los neuroblastos en estado de diferenciación. Cabe mencionar que las primeras neuronas que se

diferencian son las motoras y luego las sensitivas. Y el patrón de expresión de Nurr1 se detectó primero en la parte ventral de la médula espinal, donde se originan las neuronas motoras, para luego extenderse en la parte dorsal donde se originan las neuronas sensitivas. Como la expresión de Nurr1 en el adulto se localizó tanto en neuronas motoras como sensitivas, podemos sugerir que posiblemente Nurr1 esté involucrado en la diferenciación de ambas neuronas, ya que su expresión está presente durante la diferenciación de las neuronas. En la etapa postnacimiento, la expresión bajó notablemente pero no desapareció, lo cual indica que posiblemente Nurr1 se requiera para el mantenimiento de ciertas neuronas específicas.

Una vez obtenido el patrón de expresión de Nurr1, tanto en el adulto como durante el desarrollo embrionario, nos enfocamos en obtener el modelo animal que nos aclarara las posibles funciones de Nurr1 inferidas de acuerdo a su patrón de expresión, preguntándonos: ¿afecta la ausencia de Nurr1 el desarrollo de las neuronas?, ¿qué estructuras serán afectadas principalmente? ¿es Nurr1 indispensable para el mantenimiento de las neuronas? etc.

Durante la identificación de clonas de CME que portaban la mutación

del gen Nurr1 observamos que la frecuencia de recombinación homóloga obtenida con la construcción Nurr1, fue del 2%. Una variación en la eficiencia de recombinación homóloga entre experimentos de electroporación se ha observado en la mayoría de los laboratorios que producen animales transgénicos mediante recombinación homóloga. El origen de esta variación se desconoce; aunque en nuestro caso no hubo tal variación. Un factor que puede contribuir a la variación en eficiencia entre estos experimentos es el estado del ciclo celular en el cual las CME son electroporadas con el vector linearizado que porta la mutación. Por ejemplo, en la fase S del ciclo celular el DNA cromosómico está más desenrollado y de allí que puede estar más accesible a la maquinaria de la recombinación homóloga.

También el medio ambiente cromósomico alrededor del gen blanco puede afectar la eficiencia de recombinación homóloga en el locus, al afectar el acceso de las enzimas involucradas en la recombinación homóloga. Además, algunas regiones de DNA parecen ser más propensas a recombinación que otras.

Meses después se obtuvieron las primeras camadas de cruzas entre heterocigotos con la mutación para Nurr1. Como se mencionó en la sección

de resultados, los recién nacidos mutantes no sobrevivieron más de 12 horas, y nuestras preguntas iniciales seguían sin respuesta. Lo primero que observamos en los ratones deficientes de Nurr1 fue la falta de leche en su estómago, y esto originó la siguiente cuestión: ¿Mueren los ratones mutantes por falta de alimento o por algún defecto respiratorio?. El rescate con glucosa nos ayudó a contestar nuestra pregunta. Los ratones sobrevivieron entre 30-50 horas, lo cual descartó problemas respiratorios e indica que los ratones mutantes presentan un problema grave de succión. Hasta este momento, solo sabíamos: que la deficiencia de Nurr1 era letal en los ratones mutantes. Posteriormente los estudios inmunohistoquímicos con los marcadores dopamina y tirosina hidroxilasa demostraron que la función de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de ratones deficientes de Nurr1 estaba afectada. De hecho se demostró que este tipo de neuronas sufría un proceso apoptótico, principalmente aquellas de la región ventral mesencefálica, que incluye la substancia negra y el área ventral tegmentaria. Pero cabe señalar que únicamente esta región fue afectada, ya que otros núcleos dopaminérgicos no sufrieron alteración alguna. Con estos resultados hemos demostrado que Nurr1 es esencial en esta región mesencefálica tanto para inducir la diferenciacion final de neuronas

precursoras dopaminérgicas mesencefálicas ventrales como para su supervivencia.

Ptx-3 es un producto del gen homeótico que es fuertemente expresado en células dopaminérgicas de la parte ventral del cerebro medio durante su diferenciación, lo que sugiere que la proteína puede estar involucrada en la determinación del linaje dopaminérgico mesencefálico[75]. La expresión de Ptx-3 en células dopaminérgicas en desarrollo provee un excelente marcador para células progenitoras dopamina mesencefálicas[75]. La expresión de Ptx-3 y Nurr1 persiste en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio del adulto, indicando que ambas proteínas pueden estar involucradas en el mantenimiento de la función celular dopamina en el cerebro adulto. La expresión fuerte de Ptx-3 en el cerebro medio ventral de embriones homocigotos para Nurr1 indica que la inducción de expresión de esta proteína y el desarrollo de neuronas precursoras dopaminérgicas son independientes de Nurr1. En contraste, Nurr1 es esencial para la inducción de un fenotipo dopaminérgico en las neuronas precursoras positivas para Ptx-3. A este respecto, es posible que Ptx-3 y Nurr1, aunque reguladas independientemente, puedan funcionar de una manera cooperativa para regular factores requeridos para la diferenciacion final de este tipo de

neuronas. Consistente con esta hipótesis, es el caso de las interacciones cooperativas que se han demostrado recientemente[93-94] entre el receptor nuclear huérfano (FTZ-F1) y la proteína con homeodominio FTZ. En el caso de Nurr1, tales interacciones cooperativas pueden explicar la especificidad de los defectos neuronales en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio debido a que el gen Ptx-3 no se expresa en otras neuronas conteniendo Nurr1, incluyendo el sistema límbico y neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio e hipotálamo.

La observación de que Nurr1 es esencial para el mantenimiento de los progenitores positivos para Ptx-3 origina una serie de especulaciones acerca del papel de Nurr1 en la supervivencia celular dopaminérgica.

La muerte celular incrementada en recién nacidos homocigotos para Nurr1 puede simplemente deberse a una incapacidad de los precursores dopaminérgicos indiferenciados para hacer contactos sinápticos con sus blancos. Estudios previos usando ratones mutantes en los cuales TH estuvo ausente en neuronas dopaminérgicas han indicado que el señalamiento mediado por dopamina no parece requerirse para la sinaptogénesis funcional de proyecciones neuronales de la sustancia negra al cuerpo