

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



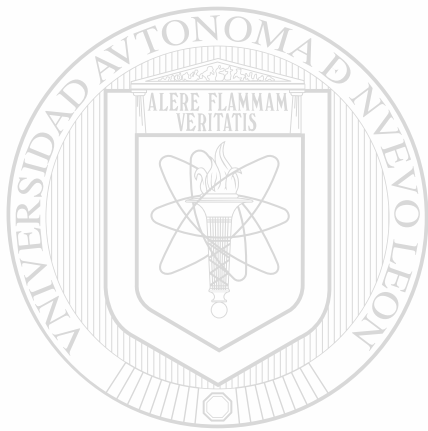
PAPEL FUNCIONAL DEL RECEPTOR NUCLEAR
NURR1 EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
DE MAMIFERO

Por

BIOL. ODILA SAUCEDO CARDENAS

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

Diciembre, 1999



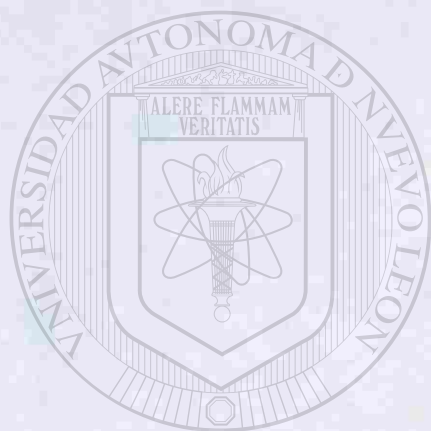
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIOL. ODILA SAUCEDO CARDENAS

TD
QL799
.5
.S3
1999
c.1



1080090237



UANL

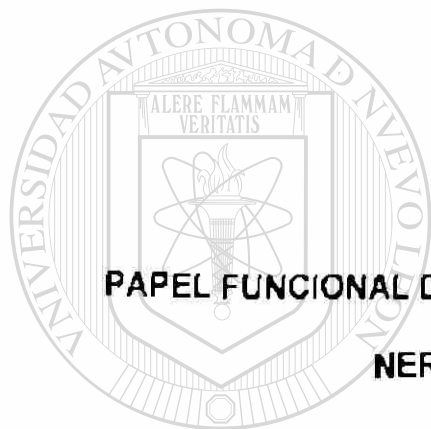
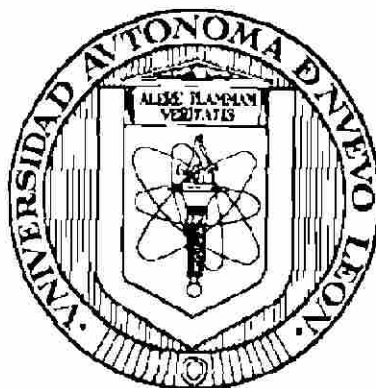
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



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

Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

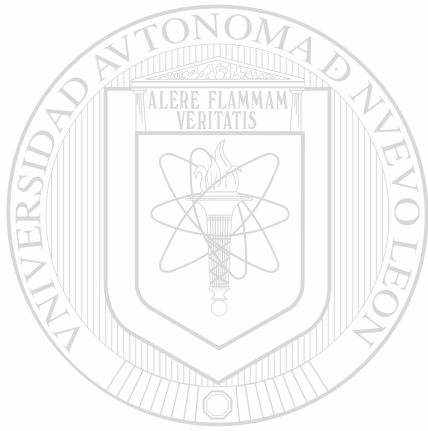
BIOL. ODILA SAUCEDO CARDENAS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

Diciembre, 1999

TD
QL799
.5
.S3
1999
C.1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

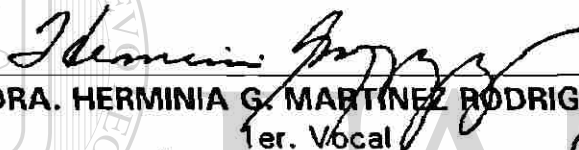
Aprobación de la Tesis:



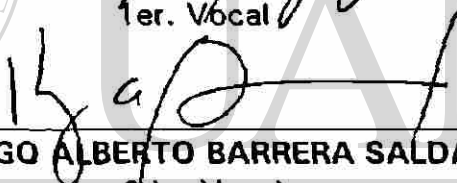
DR. JUAN MANUEL SOLIS SOTO
Presidente



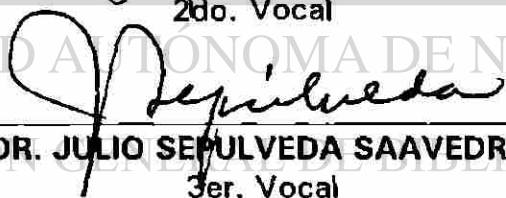
DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Secretario



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRIGUEZ
1er. Vocal



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
2do. Vocal



DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA
3er. Vocal

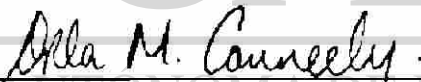


DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

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

Presentado por Biol. Odila Saucedo Cárdenas

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



Dra. Orla M. Conneely
Asesor externo

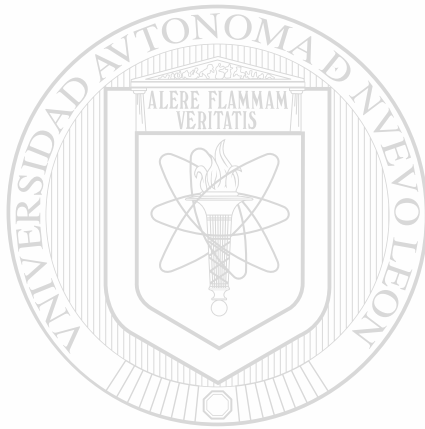


Dr. Juan Manuel Solís Soto
Asesor interno



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Co-asesor

DEDICATORIA
CON TODO MI AMOR



A MIS PADRES

A MI ESPOSO

A MI HIJO

A MIS HERMANOS

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A MIS AMISTADES

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO

A TODOS QUIENES DESINTERESADAMENTE ME AYUDARON

Agradecimientos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

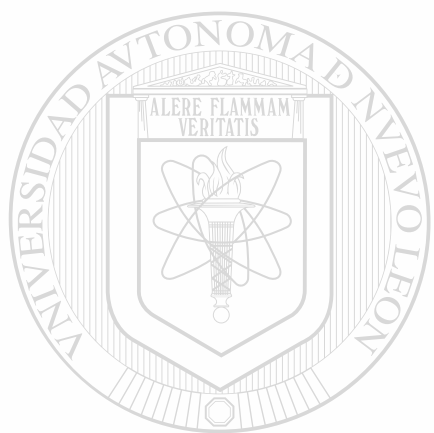
La Dra. Orla M Conneely quien siempre influyó en mi persona para la obtención del grado de doctor y que siempre me insistió en la importancia que tiene el grado de doctor en la vida de un científico.

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

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

A mis maestros, por sus invaluable enseñanzas.

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABLAS

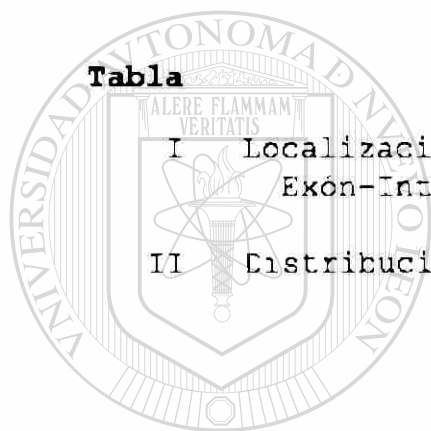


Tabla		Página
I	Localización de Intrones y Límites Exón-Intrón del gen Nurrl.....	41
II	Distribución de Nurrl dentro del SNC.....	50

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

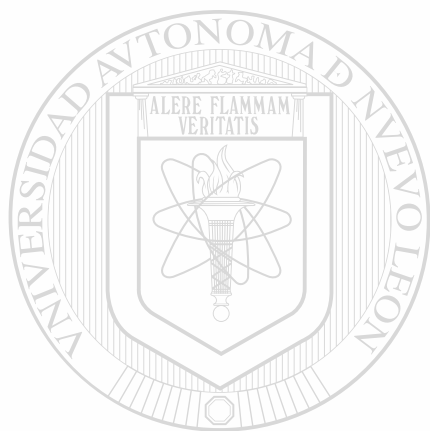


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE SIMBOLOS

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABSTRACT

Odila Saucedo Cárdenas

Graduation date: October, 1999

Autonomous University of Nuevo León
Faculty of Medicine

Title:

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

Number of pages: 116

Candidate to degree of Doctor
In Sciences with major in
Morphology

Study area: Morphology

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

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

SIGNATURE OF EXTERNAL ADVISER


Ph. D. ORLA M. CONNEELY

RESUMEN

Odila Saucedo Cárdenas

Fecha de graduación: Diciembre, 1999

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del trabajo:

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

Número de páginas: 114

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

Area de Estudio: Morfología

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

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

FIRMA DEL ASESOR INTERNO


Dr. Juan Manuel Solís Soto

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 blanco³. 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 blanco⁴. 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 dímeros¹⁰⁻¹⁴ con secuencias específicas de DNA activantes en cis (sobre las regiones contiguas), de las cuales se conocen dos tipos: AGGTCA y AGAACA¹⁵⁻¹⁸. 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 fosforilación²⁰⁻²³. 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 crecimiento²⁴⁻²⁶, neurotransmisores^{27,28} y hormonas polipeptídicas^{29,30}.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2 Subfamilia Nurrl

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 ratón³¹. NURR1 (también llamado RNR-1³² y NOT³³) es muy similar a dos receptores nucleares adicionales: NUR77²⁴ (también llamado NGF1B/N10/NAK-1^{28,34,35})y

NOR-1 (también llamado MINOR/TEC³⁶⁻³⁸). 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 desarrollo³¹. 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 apoptosis⁴¹, expresión de NURR1 en la corteza suprarrenal en respuesta a la estimulación por adrenocorticotropina³⁰ y en células de hígado en regeneración³². Al menos una de las tres proteínas, NUR77, ha demostrado ser una fosfoproteína que es fosforilada en respuesta a diferentes señales extracelulares⁴². 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-hidroxilasa²⁹. 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 A⁴³. Se ha demostrado que estas cajas son requeridas para la interacción monomérica con la secuencia de DNA cis-DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS 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 directa⁴⁵. 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 delección 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 si 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 huérfanos⁴⁹ 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 delección 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 delección de más de un miembro de la subfamilia presenta algunas veces⁴⁹, pero no siempre⁵⁰⁻⁵¹, 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 RAR α o RAR β y RAR γ y sus isoformas, $\alpha 1$ y 2 , $\beta 1-4$ y $\gamma 1$ y 2 ⁵²⁻⁵⁴ ha mostrado redundancia funcional entre algunos de los miembros. De este modo, ratones careciendo de RAR β aparecen normales, mientras que la delección de subtipos RAR α o RAR γ resulta en anormalidades fenotípicas⁵⁵⁻⁵⁸. 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 delección 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 expresión⁵¹ 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

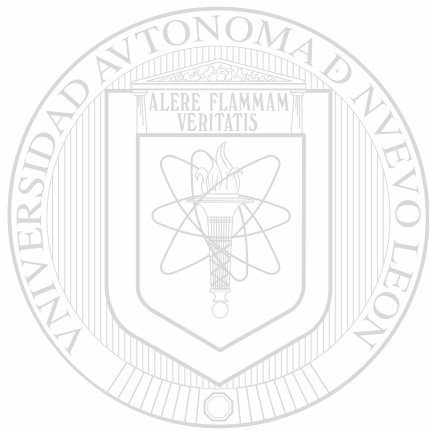
1.5.1 Objetivo General

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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 λ Dash 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 Bioreserch Labs. [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (3,000 Ci/mmole),

[$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (5,000 Ci/mmole) fueron comprados de ICN, [α^{35}] dATP (400

Ci/mmole) de Amersham y [$\alpha^{35}\text{S}$] 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 cruza 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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

2.3 Trabajo Bacteriológico

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Todas las manipulaciones relacionadas al crecimiento y almacenaje de bacterias y bacteriófagos se hicieron de acuerdo a métodos descritos previamente⁶²⁻⁶⁴.

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* RR1⁶⁴. 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-centrifugación⁶⁴.

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 ml⁶⁵. 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 curvada 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 resuspenderlo 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 HI*, 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 electroeluida dentro de una bolsa para diálisis⁶⁴. 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/ μ l 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 ultravioleta⁶⁵.

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/cm⁶⁴.

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 5-10 μ g, se transfirió unidireccionalmente, durante una noche, a membranas de nylon utilizando el método de transferencia alcalina⁶⁶. 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 reportados⁶⁷.

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 Lambda.

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 respectivamente⁶⁸. A la solución de prehibridación se le agregaron 1×10^7 cpm/ml (actividad específica $\sim 2 \times 10^9$ 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, respectivamente⁶⁵. A la solución de prehibridación se le agregaron 2×10^6 cpm/ml (actividad específica $\sim 4 \times 10^8$ cpm/ 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, Denhardtts 5X, EDTA 10 mM, pH 7.5, SDS al 0.5% y DNA de esperma de salmón desnaturalizado (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 minutos⁶⁹.

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 50-200 μ Ci de [α - 32 P]dCTP (3,000 Ci/mmole) en un volumen total de 100 μ l. La separación del DNA marcado de la marca no incorporada fue llevada a cabo mediante la centrifugación de una columna pequeña de Sephadex G-50⁶⁴. Se obtuvieron generalmente actividades específicas de 1-5 X 10⁸ cpm/ μ g 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 procedimiento⁷⁰ se utilizaron para los análisis tipo Southern. Para la reacción se utilizaron 100 ng de DNA y 10 μ Ci [α - 32 P] dCTP (3,000 Ci/mmole) en un volumen total de 100 μ l. 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 10⁹ cpm/ μ g de DNA.

2.7.3 Marcaje del Extremo 5' de Oligonucleótidos.

Se marcaron sondas de oligonucleótidos sintéticos en su extremo 5' con [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (5,000 Ci/mole) utilizando polinucleotidil-cinasa de T4 (PNK)⁶⁴. Para la reacción de marcaje se utilizaron 20 pmoles de oligonucleótidos, 30 μCi de [$\gamma^{32}\text{P}$] 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. 20 μg de RNA_t de levadura se utilizaron como acarreador. Actividades específicas de 1-5 X 10⁸ 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 estándar⁷¹ 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, MgCl₂ 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 específicos⁷².

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 [³⁵S]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 $10\mu\text{m}$ 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 paraformaldehído 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 [³⁵S]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

proteínasa K (20µg/mL), fijados nuevamente en paraformaldehído al 4%, tratados con anhídrido acético preparado en trietanolamina 0.1M, pH8.0 y deshidratados con etanol. La hibridación fue llevada a cabo con 6×10^6 cpm 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 minutos⁷³⁻⁷⁴. 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 previamente⁷⁶. 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 1.1×10^7 células/ml. Se mezclaron 25 μ g del vector recombinante Nurr1 linearizado con 0.9 ml de la suspensión de CME (10^7 células) dentro de una cubeta especial para electroporación. Se electroporaron las CME en un aparato Biorad gene Pulsar a 230 mV y 500

μ FD. 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 μ g/ml de estreptomina.

Las CME electroporadas se cultivaron en presencia de las drogas

G418 (180 μ g/ml) y FIAU (0.2 μ M) 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-Southern⁷⁶, 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 μ l 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 incluidos en sacarosa

fueron congelados y almacenados a -20°C hasta el momento de hacer los cortes histológicos de $20\mu\text{m}$ 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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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 incluidos 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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

2.16 Cuantificación de Neurotransmisores y Medición

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS Enzimática

La cuantificación⁷⁷ de Dopamina y Serotonina, así como la determinación de la actividad⁷⁸ 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 Nurr1

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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 λ DashII (Stratagene) y P1 (Genome Systems Inc). El tamizaje de la biblioteca en λ DashII fue llevado a cabo⁶⁷ 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 [³²P] dCTP a una actividad específica de 2×10^9 cpm/ μ g. 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 figura 1 se muestra la localización de los tres fragmentos.

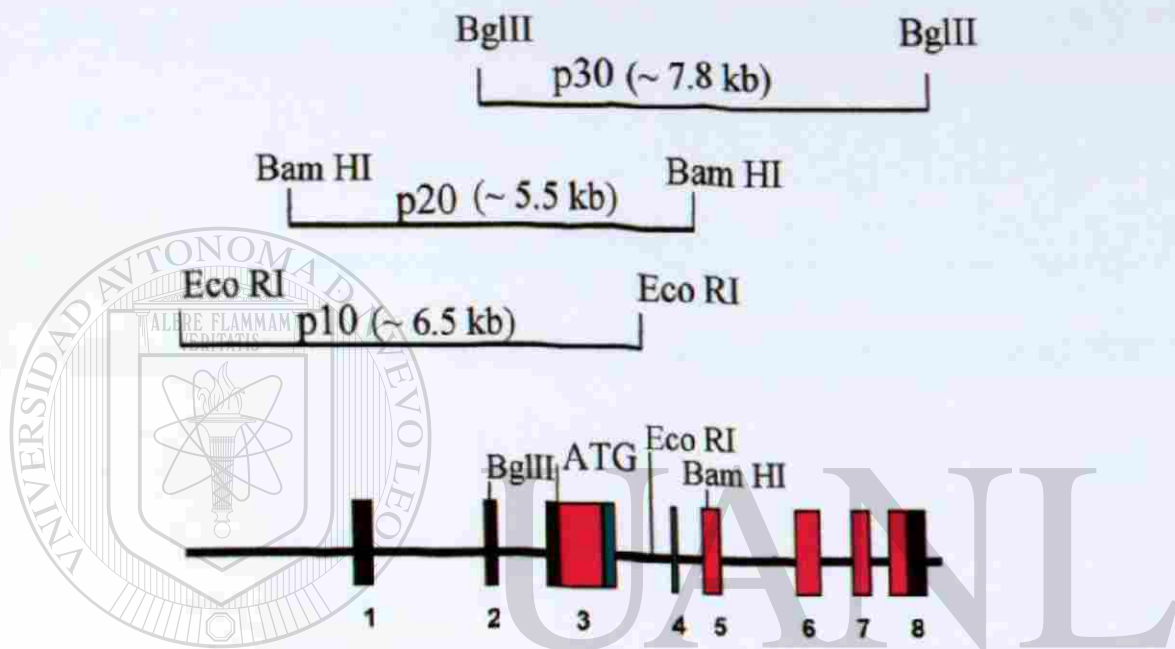
3.1.2 Análisis de Exones, Intrones y Secuencia de los Límites Exón/Intrón.

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 publicados²⁸.

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.



- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
- DIRCCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
- región no codificante
 - región codificante
 - dominio conservado de unión al DNA

Figura 1. Organización estructural del gen Nurrl 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 cols⁸⁰. Nosotros reportamos la presencia de 7 exones para el gen Nurr1 en 1996. Posteriormente, el grupo de Castillo y cols⁸⁰ 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	130pb	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 intrones⁷⁹. 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 ligando¹. 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 2⁸⁰. 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 ilegítima⁸¹⁻⁸³. 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 PGKNEObpA⁸⁴. 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-TK⁸⁵ 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 crítica⁸⁶. 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 kb⁸⁷ y que el vector debería tener un total de homología entre 5 y 8 kb con el locus Nurr1 endógeno⁸⁸ para una mejor eficiencia de recombinación homóloga de los vectores recombinantes.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

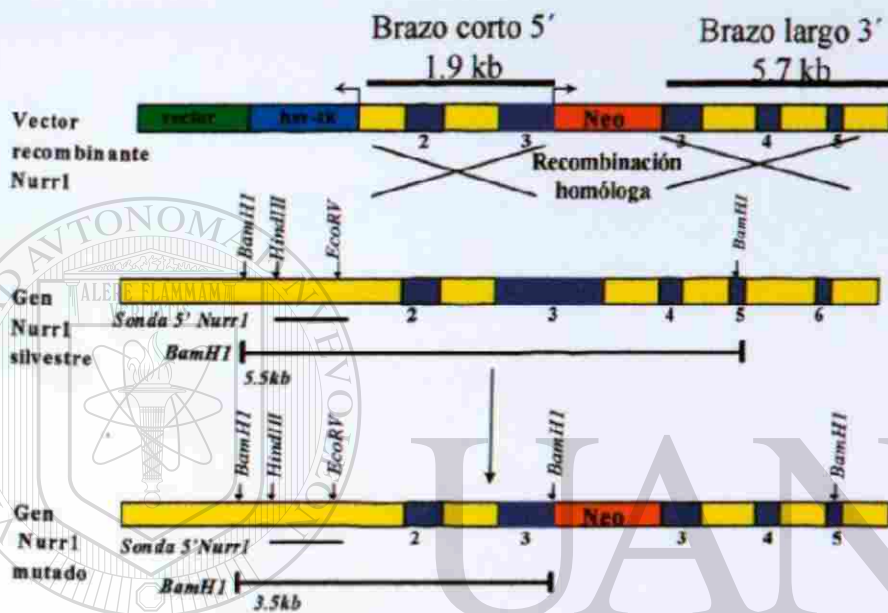
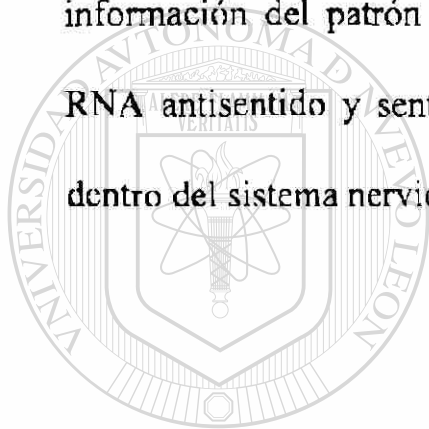


Figura 2. Obtención del gen *Nurr1* mutado. El Diagrama muestra la recombinación homóloga entre el vector recombinante *Nurr1* con el gen *Nurr1* silvestre para generar el gen *Nurr1* mutado. Se muestran los tamaños de los fragmentos *Bam*HI utilizados para diferenciar el alelo silvestre del alelo mutado.

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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 amígdalohipocámpal (Ahi)	++
Núcleo cortical posteromedial (PMCo)	++
Transición amígdalohipocámpal (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 (AE)	+
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 pedículo-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 hipocámpales asociadas, incluyendo el subículo (S), cortezas perirrónicas (PRh), entorrónicas (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),

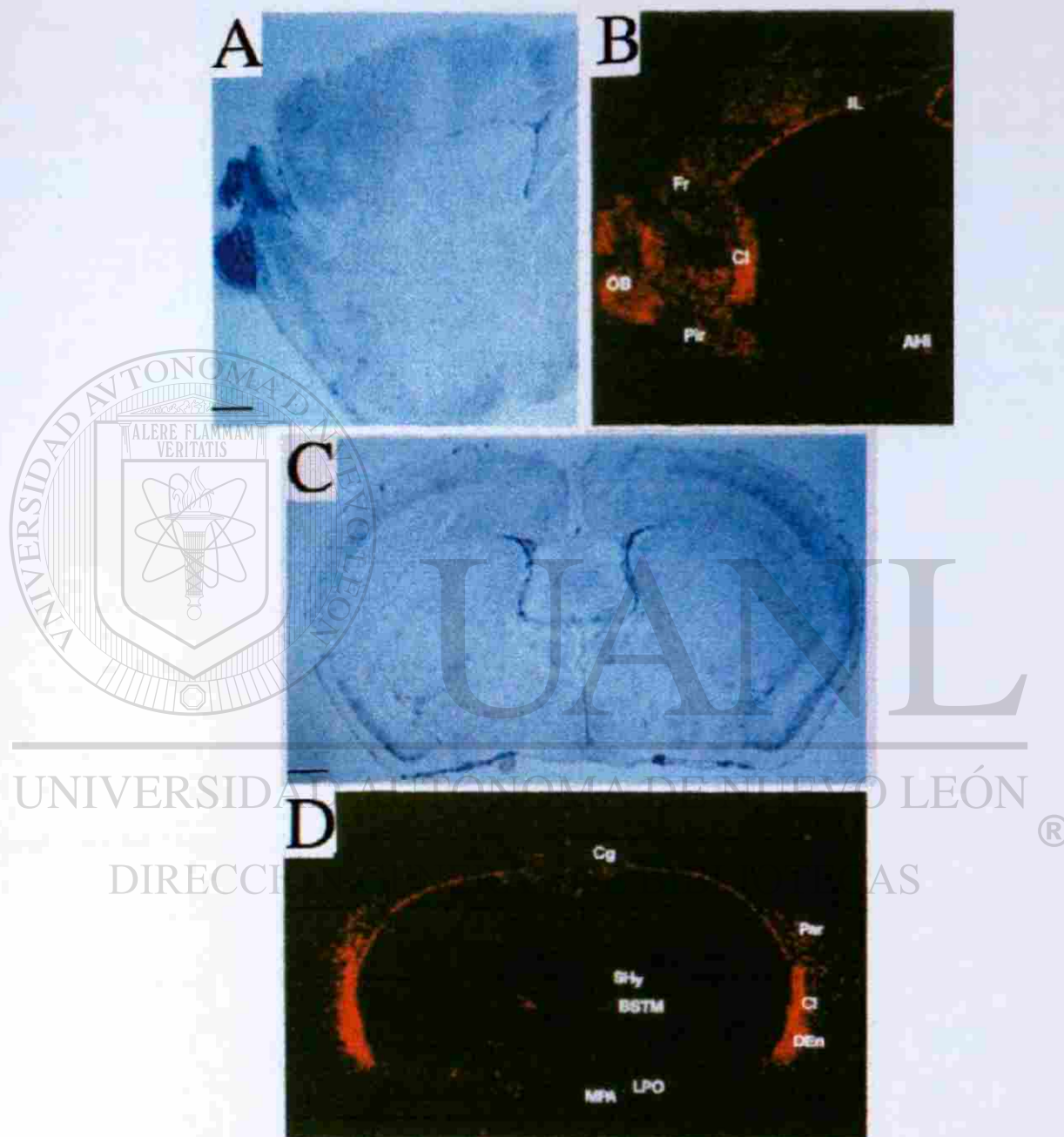
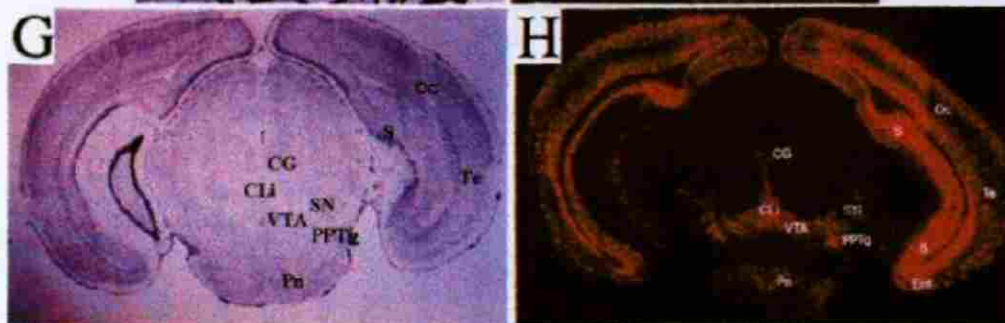
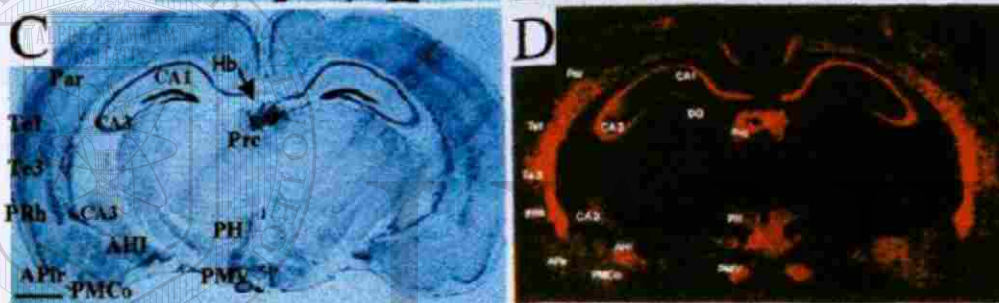
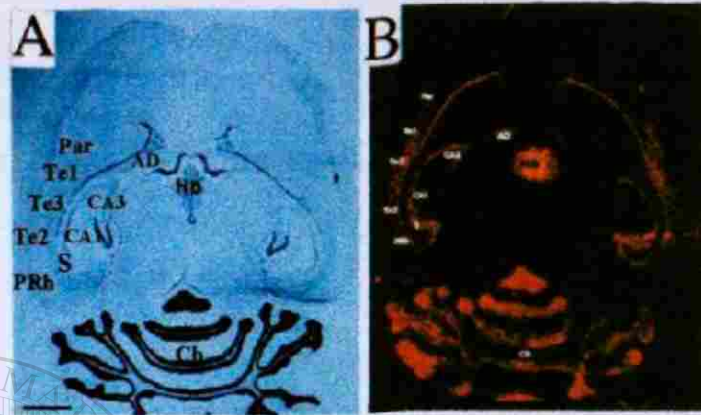


Figura 3. Patrón de expresión de Nurrl en el telencéfalo de ratón. Las fotos A-B corresponden a cortes sagitales y C-D a cortes frontales de cerebro de ratón adulto. Las fotos A y C muestran el campo claro y B y D el campo oscuro para mostrar las zonas de hibridación para el RNAm de Nurrl. OB (bulbo olfatorio), Fr (corteza frontal), Cl (claustró), 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 Nurrl 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 Nurrl en un campo oscuro. Par (corteza parietal), Tc1-3 (corteza temporal), CA1-3 (campos del hipocampo), S (subículo), PRh (corteza perirrínica), AD (núcleo anterodorsal del tálamo), Hb (habenula), Cb (cerebelo), Apir (transición amígdala-corteza piriforme), AHI (amígdala), PH (hipotálamo posterior), PMCo (núcleo de la región posteromedial cortical de la amígdala), PMV (cuerpos premamiliare), 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), Pt (núcleo pontino). La barra representa 1.8 mm en A B y E-F y 1 mm en C-D y G-H.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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 claustró (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, parafascicular (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 premilares (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

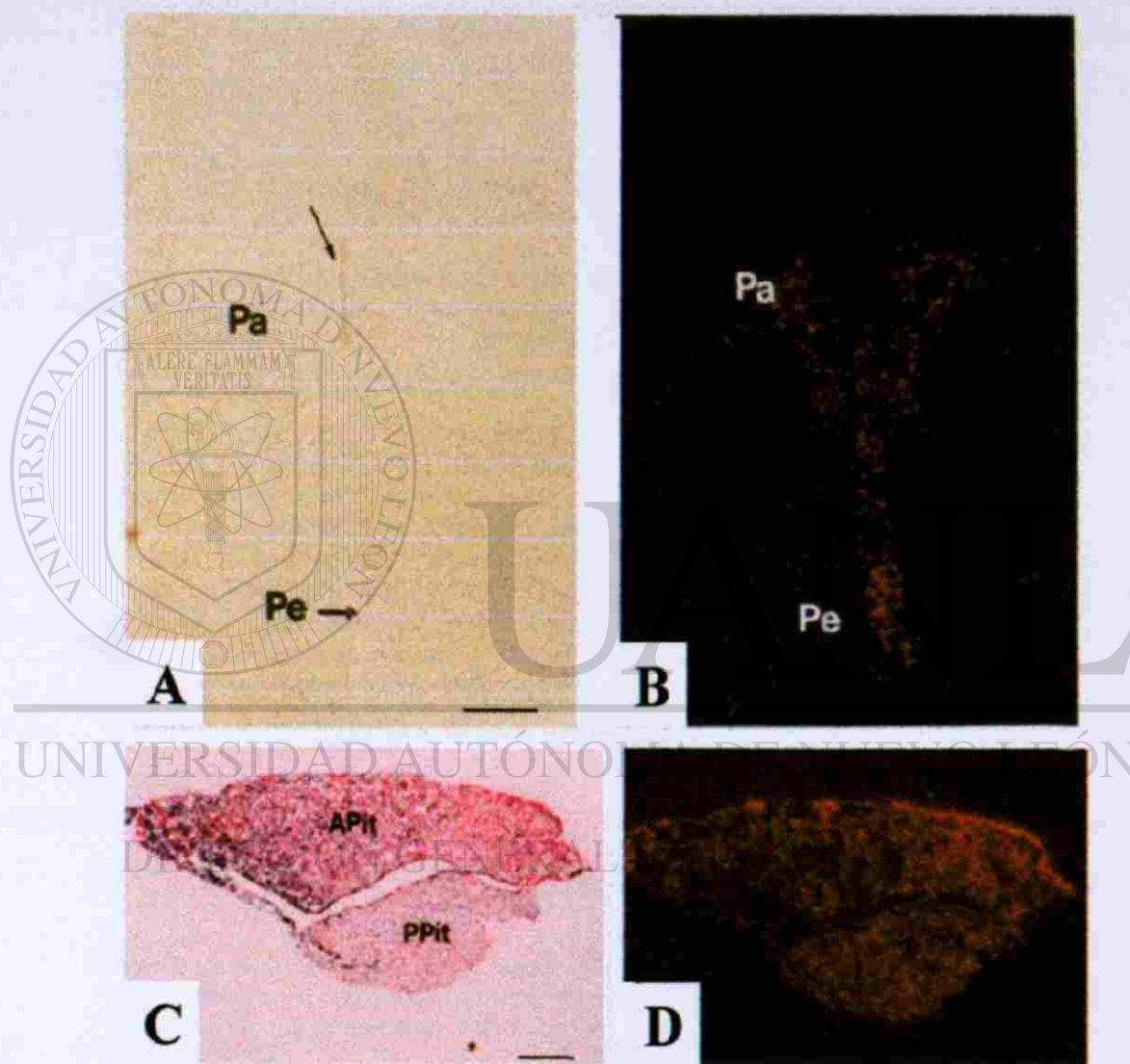


Figura 5. Hibridación in situ del RNAm de Nurrl en hipotálamo y pituitaria. A y B corresponden a microscopía de campo claro y C y D a campo oscuro de un corte coronal de la región del hipotálamo de un cerebro de ratón adulto. El campo oscuro en B muestra las regiones paraventricular (Pa) y periventricular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

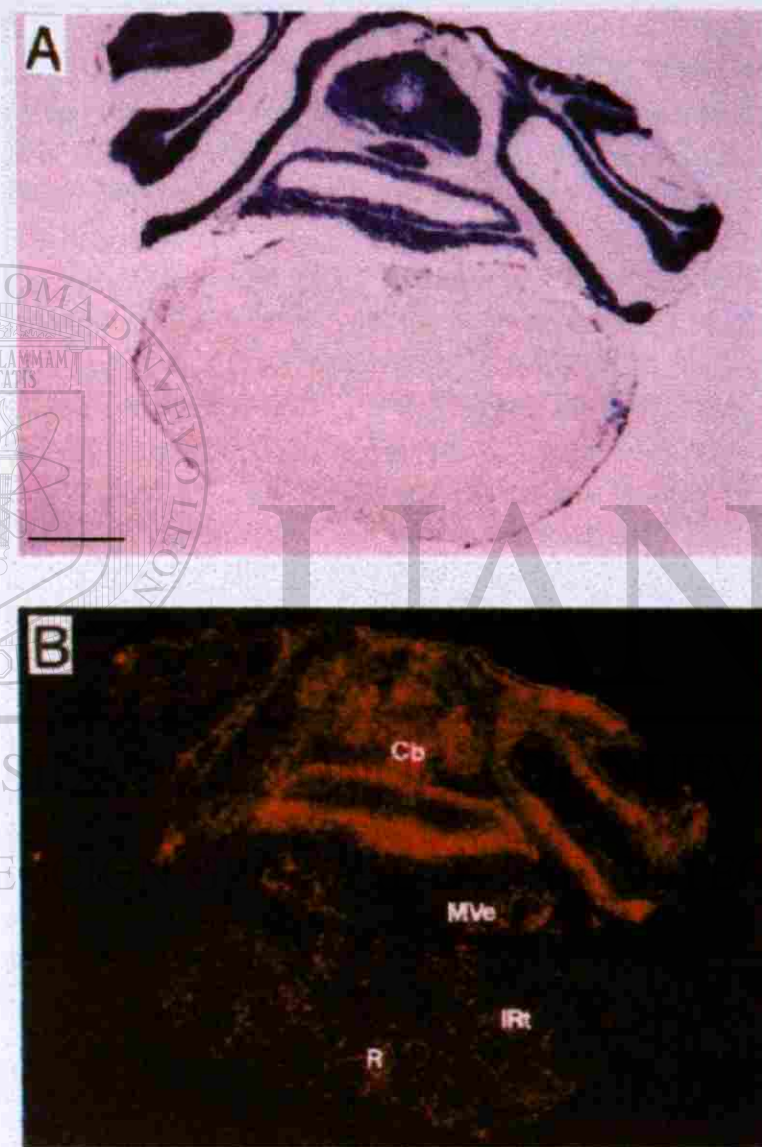


Figura 6. Localización del RNAm de Nurrl en un corte frontal del cerebro posterior de ratón adulto. Panel A muestra el campo claro del panel B que muestra la intensa expresión de Nurrl en la capa granular del cerebelo (Cb). En panel B también se observan núcleos del puente con moderada expresión de Nurrl.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

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, diencefalo, mesencefalo, metencefalo y mielencefalo. 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:

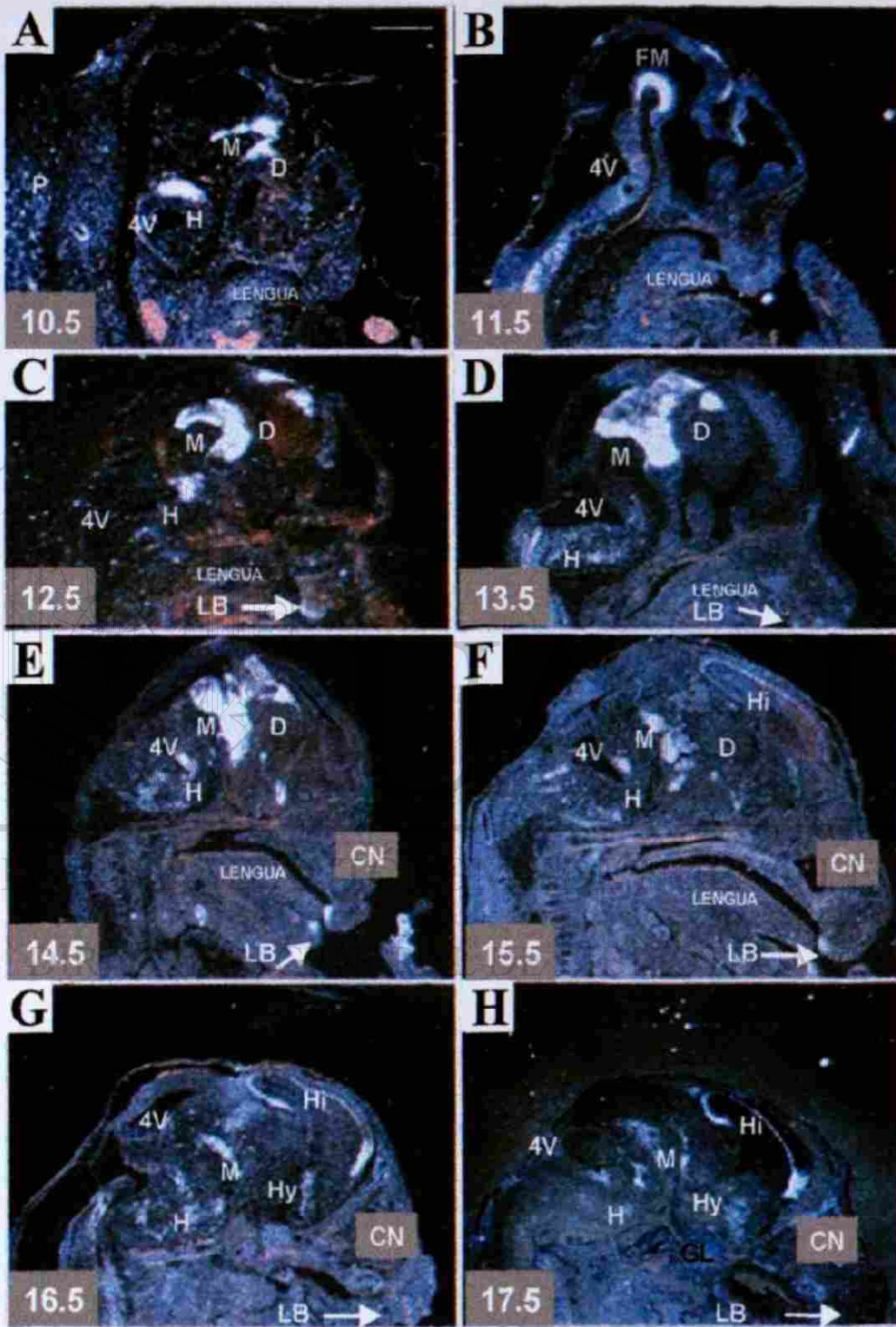
Telencéfalo. Esta vesícula fue la última que mostró expresión de *Nurr1* durante el desarrollo del cerebro de ratón. La región del hipocampo fue la primer estructura del telencéfalo donde se detectó expresión de *Nurr1* y ésta

Figura 7. Patrón de expresión del RNAm de Nurrl durante el desarrollo del cerebro del ratón. Los números del recuadro inferior izquierdo de cada foto corresponden a la edad del embrión. Los embriones se cortaron sagitalmente y muestran la expresión de Nurrl 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 Nurrl 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 Nurrl 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 Nurrl a partir del día 12.5. La barra representa 700µm en A-D y 1600µm en E-H.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

Diencefalo. 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 diencefalo, las cuales son el tálamo e hipotálamo. ¹

Mesencefalo. Al igual que el diencefalo, el mesencefalo 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 mesencefalo mostró una intensa expresión de Nurr1, cuyo patrón de expresión persiste hasta el adulto. Esta región ventral incluye estructuras bien conocidas como la sustancia negra, área tegmental ventral, cuya población de neuronas son principalmente de

tipo dopaminérgicas.

Rombencefalo. La expresión de Nurr1 también se localizó en esta vesícula a partir del día 10.5 (Figura 7A). Esta vesícula se divide posteriormente en metencefalo y mielencefalo 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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

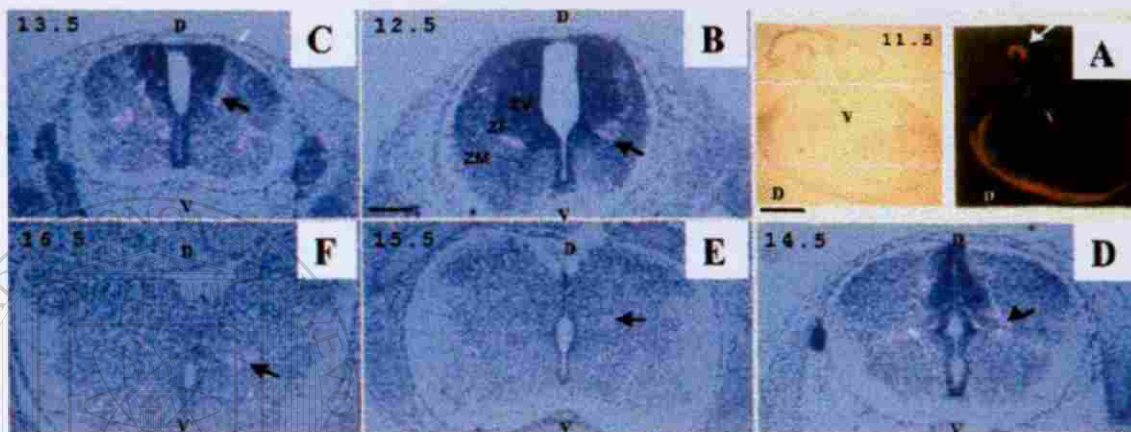


Figura 8. Expresión de Nurrl durante el desarrollo de la médula espinal. En A se muestra el campo oscuro y claro de un corte sagital de embrión de ratón de 11.5 días de desarrollo. El campo oscuro muestra la intensa expresión de Nurrl a todo lo largo de la médula espinal. La flecha indica la señal de hibridación de Nurrl en la región ventral mesencefálica. En B-F se muestra la expresión de Nurrl en orden cronológico a partir del día 11.5 hasta el día 16.5 respectivamente. Los cortes transversales muestran la localización de Nurrl (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 neuroepitelio. La barra representa 50 μ m en B-D y 100 μ m 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 endógeno⁸⁹.

Después de la electroporación, las colonias que resultaron positivas para el gen Neo^R (G418^R) y negativas para el gen HSV-TK (FIAUR) 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 HI* 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 CMEs con *Bam*HI e hibridarlo

con una sonda genómica *Nurr1* de 900 pb marcada con [³²P] (sonda 5'*Nurr1*), se obtiene una banda hibridizante de 5.5 kb, debido a la presencia de un sitio *Bam*HI en la región 5' no traducida del gen *Nurr1* y un

segundo sitio *Bam HI* en el exón 5. En el caso de un evento positivo en el

locus de *Nurr1*, la presencia del gen *NEOR* en el exón 3 introduce un sitio

Bam HI 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 III* y se hibridiza con la

sonda 5'*Nurr1*, producirá dos tipos de bandas hibridizantes.

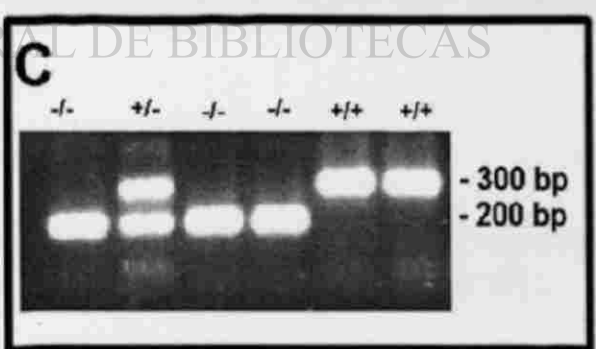
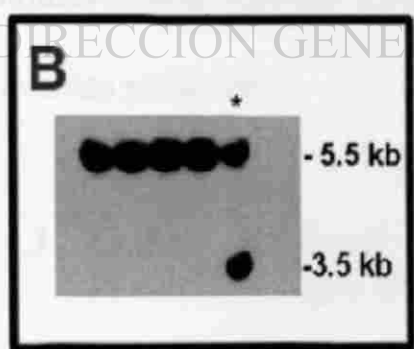
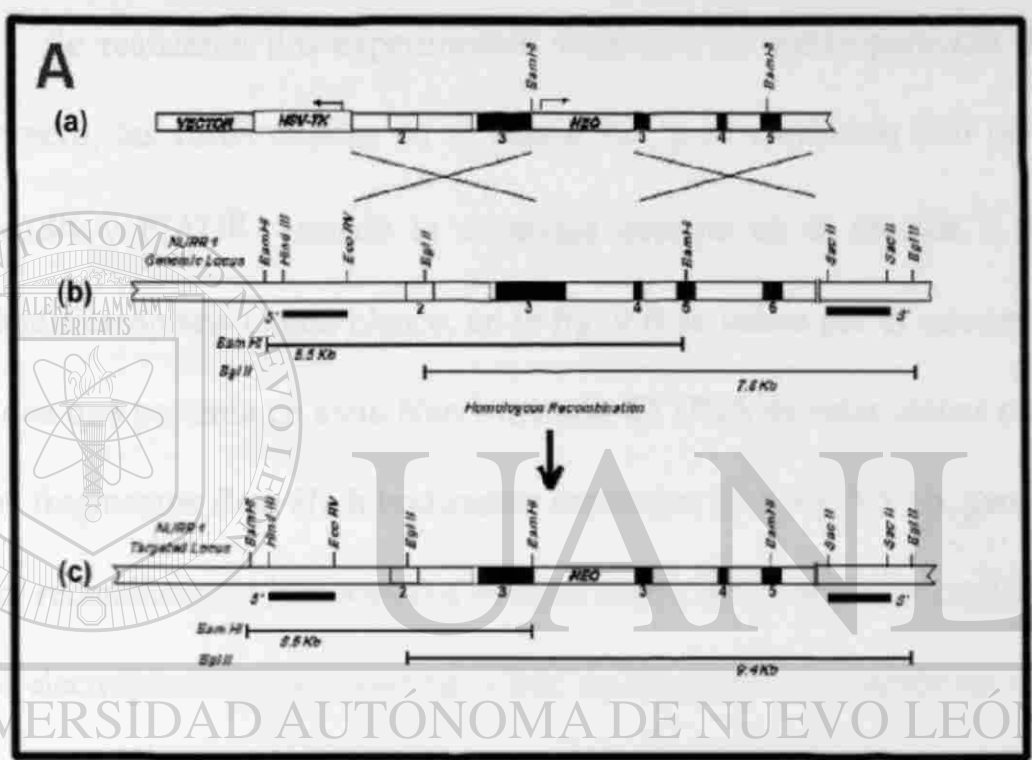
Figura 9. Inactivación del gen *Nurr1* en CME y detección de su genotipo. En A (a)(b)(c) se representan el diseño del vector recombinante *Nurr1*, el gen silvestre *Nurr1* y el gen *Nurr1* mutado, respectivamente. En (b)(c) se muestra el tamaño de los fragmentos *Bam* HI y *Hgl* II que se obtienen al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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Una biblioteca de 4.5 kb en *EMBL3* se transformó en el vector *NotI* que clonó el fragmento de 3.2 kb que correspondía a la región 3.

3.4.2 Identificación de Clonas en Librerías de Genes Exprimidos en Puntos de Atención del gen *NotI*.



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 FIAUR 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 rearrreglo, 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 rearrreglo 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 más 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 cruces 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 μ l 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 investigadores⁹⁰, la delección 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).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

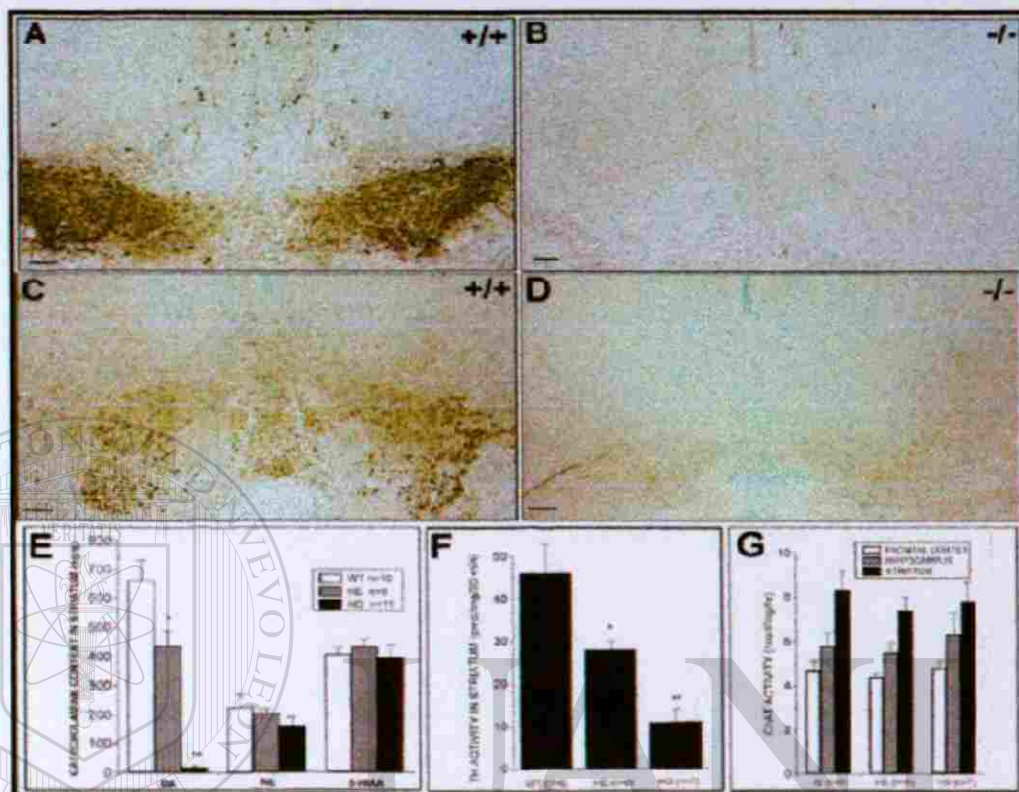


Figura 10. Análisis de los niveles de monoaminas y Chat en ratones recién nacidos.

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 Nurrl.

E. Muestra los niveles de monoaminas obtenidos mediante HPLC en el cuerpo estriado de ratones silvestres, heterocigotos 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.

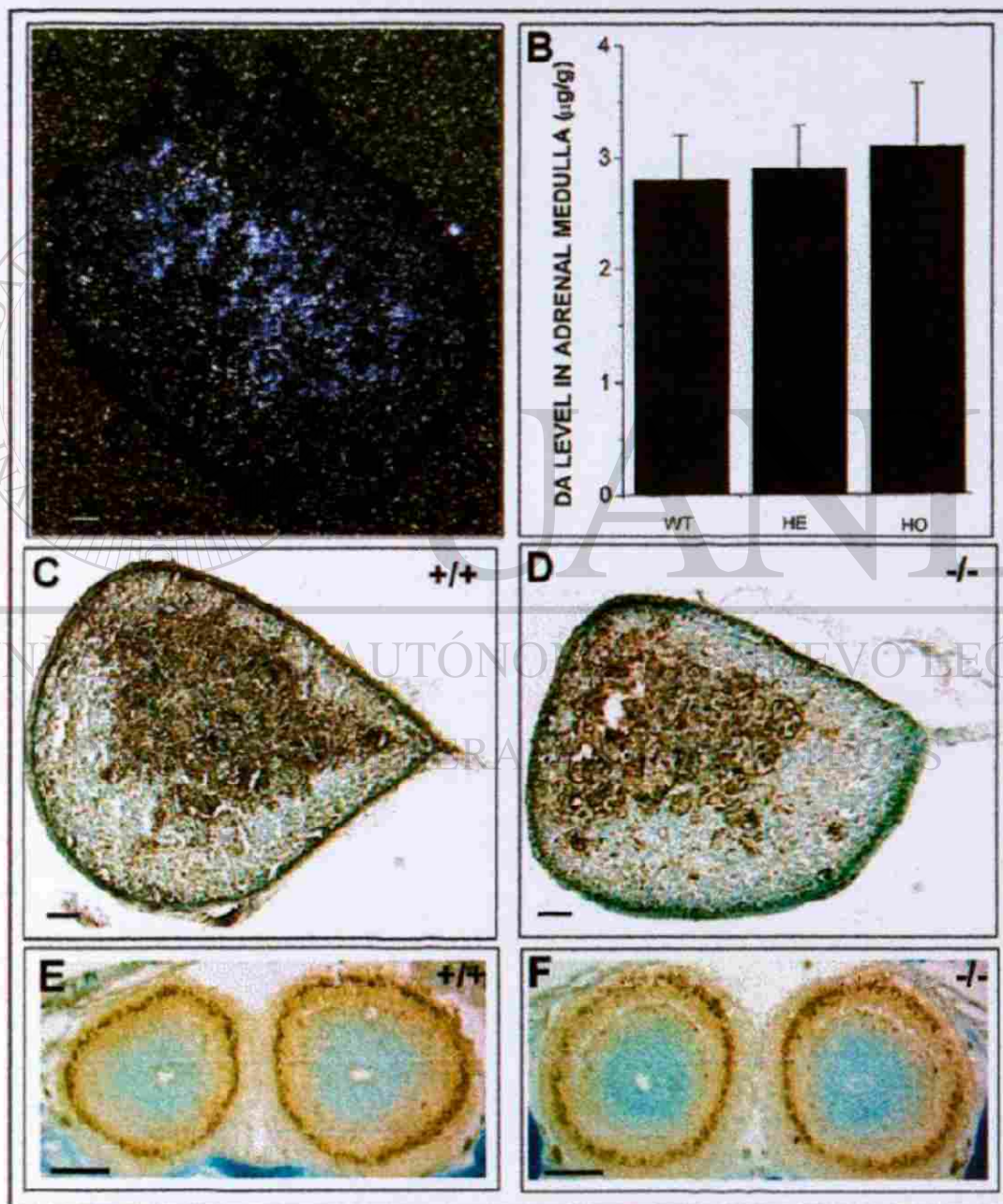
G. La actividad de acetilcolintransferasa tampoco sufrió modificación en los diferentes tejidos analizados (corteza frontal, hipocampo y cuerpo estriado) de mutantes y heterocigotos. La barra representa 100 μm.

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 RNA de Nurrl 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 Nurrl en los mutantes. La barra representa 50µm.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



neuronal. Para esto se utilizó el marcador de ventralización, el factor nuclear de hepatocitos 3B (HNF3B) y el marcador general neuronal, 3A10⁹¹. 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 delección de Nurr1 (figura 12). También se examinó la expresión de la proteína homeodomain recientemente identificada, Ptx-3⁷⁵, 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.

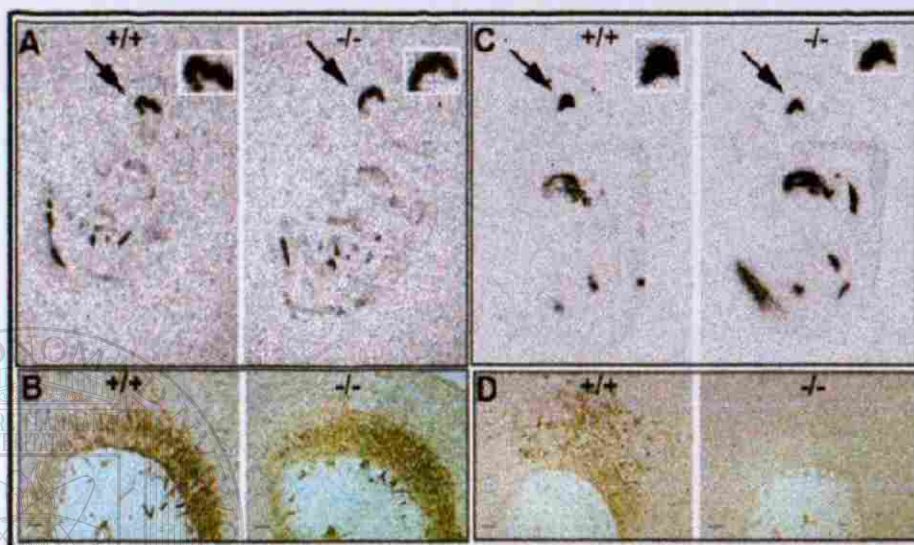


Figura 12. Análisis del Fenotipo Celular en la Región Ventral Mesencefálica de Embriones Silvestres y Mutantes *Nurr1*.

(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 20 μm .

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 está 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 sustancia 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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

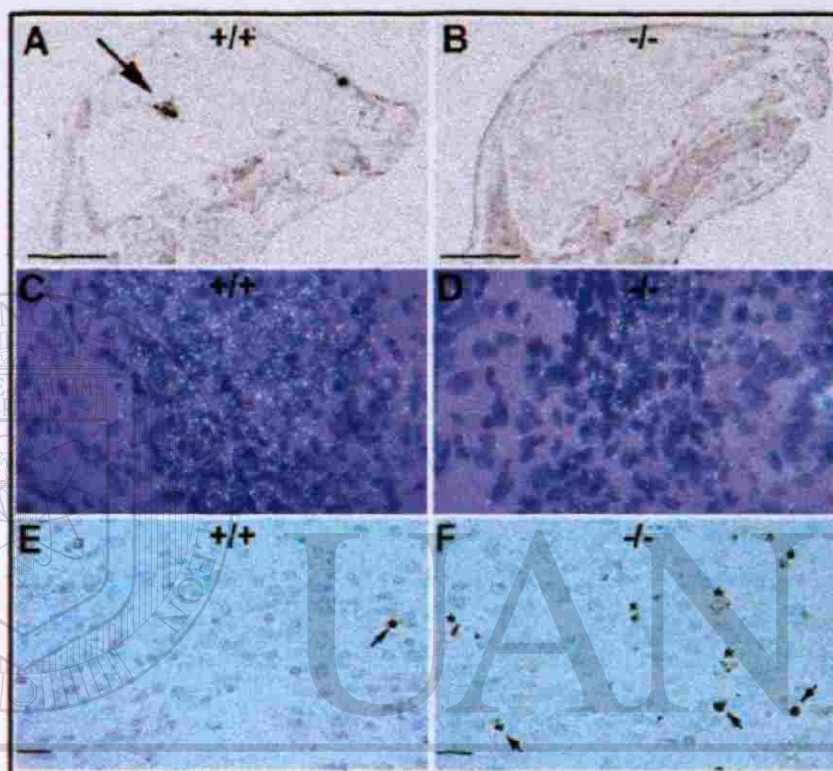


Figura 13. Pérdida de la Expresión de Ptx3 y Muerte Celular en la Región Ventral Mesencefálica de Ratones Recién Nacidos Mutantes *Nurr1*.

(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 20 μ m en C-F.

CAPITULO 4

DISCUSION

Se comparó la organización estructural del gen *Nurr1* con la reportada para el gen *NGF1-R*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 estria 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, respectivamente³⁹.

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 ellos⁹². 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 hidroxilasa²⁹, 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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 clones 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 cromosómico 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 cruas 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 sustancia 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 diferenciación 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 mesencefálico⁷⁵. La expresión de Ptx-3 en células dopaminérgicas en desarrollo provee un excelente marcador para células progenitoras dopamina mesencefálicas⁷⁵. 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 diferenciación final de este tipo de

neuronas. Consistente con esta hipótesis, es el caso de las interacciones cooperativas que se han demostrado recientemente⁹³⁻⁹⁴ entre el receptor nuclear huérfano (ITZ-F1) y la proteína con homeodominio ITZ. 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

estriado⁹⁵. Sin embargo, no puede ser una regla el que la pérdida de todos los marcadores del fenotipo dopaminérgico, como se observa en los ratones mutantes *Nurr1*, tenga un impacto en el establecimiento de tales conexiones. Una segunda posibilidad es que *Nurr1* puede ser requerida para la expresión de factores que promuevan tanto la supervivencia como la diferenciación de progenitores de dopamina. Se sabe que la supervivencia celular dopaminérgica es regulada por las neurotrofinas, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y neurotrofinas 4/5⁹⁶⁻⁹⁸ y por miembros de la familia TGF β de factores tróficos, siendo él mas conocido el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF)⁹⁹⁻¹⁰⁰. Los efectos tróficos de estos factores en la supervivencia de células que sintetizan dopamina son aparentemente redundantes porque la delección de miembros individuales de estas familias o sus receptores no resulta en la pérdida de células productoras de dopamina¹⁰¹⁻¹⁰³. Sin embargo, se desconoce el papel de estos factores en promover la supervivencia y diferenciación de neuronas precursoras productoras de dopamina.

Un papel para *Nurr1* en la regulación de la supervivencia tanto de células precursoras dopaminérgicas como, de células dopaminérgicas diferenciadas al menos en parte a través de la regulación de estos factores

y/o sus receptores, es apoyado por la observación de que la ausencia de Nurr1 resulta en pérdida de expresión del receptor para el factor neurotrófico GDNF, c-ret⁹⁰ y por la identificación de sitios de unión para Nurr1 en la región promotora del gene BDNF¹³⁴. De esta manera, es posible que Nurr1 puede ser un regulador transcripcional de varios de estos genes. Los estudios futuros que se lleven a cabo para dilucidar el papel de Nurr1 en la regulación de factores neurotróficos y sus receptores aportaran hallazgos importantes acerca del papel de Nurr1 durante el desarrollo de las células dopaminérgicas y su supervivencia.

Por último cabe discutir la presencia de Nurr1 en labios y bulbo olfatorio durante el desarrollo embrionario. Ya se mencionó la posible

función de Nurr1 en la diferenciación y mantenimiento de las neuronas en el sistema nervioso central. De allí que tanto en labios como en el bulbo olfatorio, Nurr1 también pudiera tener la misma función. Debido a que Nurr1 es un factor de transcripción, su ausencia estaría ocasionando la falta de genes involucrados en funciones tan importantes como la ingestión de alimento ó la detección de olores. Hasta la fecha aún se desconocen los mecanismos involucrados en el proceso de mamar, lo que sí sabemos es que el animal tiene que detectar la ferohormona que secreta la madre y de este

modo la cría alcanza su alimento. Como segundo paso, la presencia de células sensitivas en los labios ayudan a detectar los pezones de la madre y con ello iniciar la succión de la leche. Además intervienen regiones del telencéfalo y diencéfalo para la integración y procesamiento de información motora y sensorial requerida durante el proceso de mamar y como sabemos, Nurr1 está presente en dichas regiones.

Aún no se conoce la función exacta de Nurr1 que explique el fenotipo obtenido, y son varias las preguntas que aún están por resolverse, tales como: ¿Fueron las estructuras implicadas en el proceso de mamar afectadas ó es Nurr1 un factor de transcripción importante en la regulación de la ingestión de alimento? ¿Qué genes activa Nurr1 directamente?

¿Participa Nurr1 en procesos neuroendocrinos? ¿Qué induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas?. Son sin duda, nuevos objetivos que ayudarán a conocer más acerca de las rutas fisiológicas en las que participa Nurr1.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIONES

5.1 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados aquí presentados, podemos decir que se cumplieron los 4 objetivos propuestos:

- (1) Se caracterizó el gen *Nurr1* del ratón.
- (2) Se determinó la expresión del gene *Nurr1* durante el desarrollo embrionario y en el cerebro del ratón adulto.
- (3) Se obtuvo un modelo animal carente de *Nurr1* y
- (4) Se analizó el fenotipo del ratón mutante.

Y por lo tanto se acepta la hipótesis de trabajo propuesta:

“*Nurr1* se requiere tanto para el desarrollo embrionario como para el buen funcionamiento del SNC”.

De acuerdo con los resultados obtenidos, demostramos nuestra hipótesis y concluimos que:

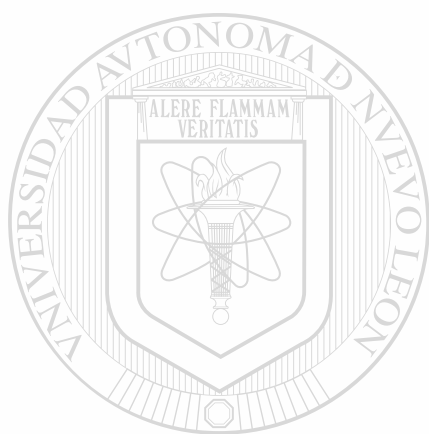
- (1) El gen *Nurr1* está compuesto de 8 exones y 7 intrones que se expanden en una región de 7.6 kb.
- (2) *Nurr1* se expresa en regiones específicas del SNC involucradas en funciones motoras, sensitivas, de memoria, de aprendizaje y relacionadas con el comportamiento de tipo emocional.
- (3) *Nurr1* es esencial para la vida. Los ratones carentes de *Nurr1* presentan un problema de succión y mueren por falta de alimento.
- (4) *Nurr1* es esencial para la supervivencia de células precursoras dopaminérgicas mesencefálicas, así como también para su diferenciación en células productoras de dopamina.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS **5.2 CONTRIBUCIONES**

Generación de un modelo animal transgénico mediante recombinación homóloga para el estudio *in vivo* de la función del receptor nuclear huérfano *Nurr1* en el SNC de mamífero. La ausencia de este receptor *Nurr1* provoca la pérdida de las neuronas que sintetizan dopamina en la región ventral del mesencéfalo, las cuales son las mismas que degeneran en la enfermedad de

Parkinson. Por lo tanto este modelo animal tiene un gran potencial para el estudio de enfermedades neurodegenerativas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



9. **Harding, H. P.** and Lazar, M.A. The orphan receptor *Rev-ErbA* alpha activates transcription via a novel response element. *Mol. Cell Biol.* 13: 3113-3121. (1993).
10. **Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B.A., Dahlman, K., Freedman, L.P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K.R., Gustafsson, J.A., and Kaptein, R.** Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science.* 249: 157-160. (1990).
11. **Naar, A.M., Boutin, J.M., Lipkin, S.M., Yu, V.C., Holloway, J.M., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G.** The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell.* 657: 1267-1279. (1991).
12. **Conney, A.J., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W., and Tsai, M. J.** Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimer binds to different GGTC A response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D₃, thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol. Cell Biol.* 12: 4153-4163. (1992).
13. **Kliwer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A., and Evans, R.M.** Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* 358: 771-774. (1992).
14. **Perlmann, T., Rangarajan, P.N., Umesono, K., and Evans, R.M.** Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev.* 7: 1411-1422. (1993).
15. **Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U., and Ryffel, G.U.** An estrogen-responsive element derived from the 5'-flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell.* 46: 1053-1061. (1986).
16. **Martinez, E., Givel, F., and Wahli, W.** The estrogen-responsive element as an inducible enhancer: DNA sequence requirements and conversion to a glucocorticoid-responsive element. *EMBO J.* 6: 3719-3727. (1987).
17. **Strahle, U., Klock, G. and Schutz, G.** A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7871-7875. (1987).
18. **Umesono, K. and Evans, R.M.** Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell.* 57: 1139-1146. (1989).

19. **Lydon, J.P., Power, R.F., and Conneely, O.M.** Differential modes of activation define orphan subclasses within the steroid/thyroid receptor superfamily. *Gene Express.* 2: 273-283. (1992).
20. **Denner, L.A., Weigel, N.L., Maxwell, B.L., Schrader, W.T., and O'Malley, B.W.** Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science.* 250: 1740-1743. (1990).
21. **Aronica, S.M. and Katzenellenbogen, B.S.** Progesterone receptor regulation in uterine cells: stimulation by estrogen, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and insulin-like growth factor I and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors. *Endocrinology.* 128: 2045-2052. (1991).
22. **Power, R.F., Mani, S.K., Codina, J., Conneely, O.M., and O'Malley, B.W.** Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science.* 254: 1636-1639. (1991).
23. **Ignar-Trowbridge, D.M., Nelson, K.G., Bidwell, M.C., Curtis, S.W., Washburn, T.F., Machlachlan, J.A., and Korach, K.S.** Coupling of dual signalling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 4658-4662. (1992).
24. **Hazel, T.G., Nathans, D. and Lau, L.F.** A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8444-8448. (1988).
25. **Milbrandt, J.** Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1: 183-188. (1988).
26. **Williams, G.T. and Lau, L.F.** Activation of the inducible orphan receptor gene *nur77* by serum growth factors: dissociation of immediate-early and delayed-early responses. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6124-6136. (1993).
27. **Arenander, A.T., de Vellis, J., and Herschman H.R.** Induction of *c-fos* and *TIS* genes in cultured rat astrocytes by neurotransmitters. *J. Neurosci.* 24: 107-114. (1989).
28. **Watson, M.A. and Milbrandt, J.** The *NGFI-B* gene, a transcriptionally inducible member of the steroid receptor gene superfamily: Genomic structure and expression in rat brain after seizure induction. *Mol. Cell. Biol.* 9: 4213-4219. (1989).
29. **Wilson, T.E., Mouw, A.R., Weaver, C.A., Milbrandt, J. and Parker, K.L.** The orphan nuclear receptor, *NGFI-b* regulates expression of the gene encoding steroid-21-hydroxylase. *Mol. Cell. Biol.* 13: 861-868. (1993).

30. **Davis, I.J.** and Lau, L.F. Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol. Cell Biol.* 14: 3469-3483. (1994).
31. **Law, S.W.,** Conneely, O.M., DeMayo, F.J. and O'Malley, B.W. Identification of a new brain specific transcription factor, Nurrl. *Mol. Endocrinol.* 6:2129-2135. (1992).
32. **Scearce, L.M.,** Laz, T.M., Hazel, T.G., Lau, L.F. and Taub, R. RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in regenerating liver. *J. Biol. Chem.* 268: 8855-8861. (1993).
33. **Mages, H.W.,** Rilke, O., Bravo, R., Senger, G. And Kroccek, R.A. NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol. Endocrinol.* 8:1583-1591. (1994).
34. **Ryseck, R.P.,** MacDonald-Bravo, H., Mattei, M.G., Ruppert, S. and Bravo, R. Structure, mapping and expression of a growth factor inducible gene encoding a putative nuclear hormonal binding receptor. *EMBO J.* 8: 3327-3335. (1989).
35. **Nakai, A.,** Kartha, S., Sakurai, A., Toback, F.G. and DeGroot, L.J. A human early response gene homologous to murine nur77 and rat NGFI-B, and related to the nuclear receptor superfamily. *Mol. Endocrinol.* 4:1438-1443. (1990).
36. **Maruyama, K.,** T. Tsukada, S. Bandoh, K. Sasaki, N. Ohkura, and K. Yamaguchi. Expression of NOR-1 and its closely related members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily in human neuroblastoma cell lines. *Cancer Letters* 96: 117-122. (1995).
37. **Hedvat, C.V.** and Irving, S.G. The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen inducible nuclear orphan receptor. *Mol. Endocrinol.* 9:1692-1700. (1995).
38. **Ohkura, N.,** Hijikuro, M., Yamamoto, A. and Miki, K. Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 1959-1965. (1994).
39. **Murphy, E.P.,** Dobson, A.D.W., Keller, C.H. and Conneely, O.M. Differential regulation of transcription by the NURR1/NUR77 subfamily of nuclear transcription factors. *Gene Express.* 5: 169-179. (1995).
40. **Labelle, Y.,** Zucman, J., Stenman, G., Kindblom, L.-G., Knight, J., Ture-Carel, C., Dockhorn-Dworniczak, B., Mandahl, N., Desmaze, C.,

- Peter, M., Aurias, A., Delattre, O. and Thomas, G. Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. *Hum. Mol. Gen.* 4:2219-2226. (1995).
41. **Okabe, T. R.**, Takayanagi, Imasaki, M. Haji, M. Nawata, H. and Watanabe, T. cDNA Cloning of a NGF1-B/nur77-Related Transcription Factor from an Apoptotic Human T Cell Line. *J. Immunol.* 154:3871-3879. (1995).
 42. **Hazel, T.G.**, Misra, R., Davis, I.J., Greenberg, M.E. and Lau, L.F. Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment. *Mol. Cell Biol.* 11: 3239-3246. (1991).
 43. **Wilson, T.E.**, Paulsen, R.E. Padgett, K.A. and Milbrandt, J. Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science*, 256: 107-110. (1992).
 44. **Davis, I.J.**, Hazel, T.G. and Lau, L.F. Transcriptional activation by NUR77, a growth factor inducible member of the steroid hormone receptor superfamily. *Mol. Endocrinol.* 5:854-859. (1991).
 45. **Perlmann, T.** and Jasson, L. A novel pathway for vitamin A signalling mediated by RXR heterodimerization with NGF1-B and Nurrl. *Genes Dev.* 9: 769-782. (1995).
 46. **Wilson, T.E.**, Fahrner, T.J., Johnston, M. and Milbrandt, J. Identification of the DNA binding site for NGF1-beta by genetic selection in yeast. *Science* 252: 1296-1300. (1991).
 47. **Lala, D.S.**, Rice, D.A., and Parker, K.L. Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression is the mouse homolog of fushi tarazu-factor 1. *Endocrinol.* 6: 1249-1258. (1992).
 48. **Dreyer, C.**, Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. and Whali, W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* 68: 879-887. (1992).
 49. **Kastner, P.**, Mark, M. and Chambon, P. Nonsteroid Nuclear Receptors: What are Genetic Studies Telling Us About their Role in Real Life? *Cell.* 83: 859-869. (1995).
 50. **Lee, S. S.-T.**, Pincau, T. Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W. Kroczt, D.I., Fernandez-Salguero, P.M., Westphal, H., and Gonzalez, F.J. Targeted disruption of the α isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell Biol.* 15: 3012-3022. (1995).
 51. **Qui, Y.**, Krishnan, V., Pereira, F., Tsai, S.Y. and Tsai, M.-J. Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors and their

- regulation. *J. Steroid Biochem.* 56: 81-85. (1996).
52. **Leid, M., Kastner, P., and Chambon, P.** Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signaling pathways. *Trends Biochem. Sci.* 17: 427-433. (1992).
 53. **Mangelsdorf, D.J., Borgmeyer, U., Heyman, R.A., Zhou, J.Y., Ong, E.S., Org, A. E., Kakizura, A., and Evans, R.M.** Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes and Dev.* 6: 329-344. (1992).
 54. **Mangelsdorf, D. J., Umesono, K., and Evans, R.M.** The Retinoid Receptors. M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman, editors. Raven Press, New York. 319-349. (1994).
 55. **Lohnes, D., Kastner, P., Dierich, A., LeMeur, M., and Chambon, P.** Function of retinoic acid receptor in the mouse. *Cell* 73: 643-658. (1993).
 56. **Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A. and Chambon, P.** Function of retinoic acid receptors (RARs) during development. (I) Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120: 2723-2748. (1994).
 57. **Lufkin, T., Lohnes, D. Mark, M. Dierich, A., Gorry, P. Gaub, M.P., LeMeur, M., and Chambon, P.** High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor a mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7225-7229. (1993).
 58. **Luo, J., Pasceri, P., Conlon, R.A., Rossant, J., and Giguere, V.** Mice lacking all-isoforms of retinoic acid receptor b develop normally and susceptible to the teratogenic effects of retinoic acid. *Mechanisms of Development* 53: 61-71. (1995).
 59. **Qui, Y., Cooney, A.J. Kuratani, S., DeMayo, F.J., Tsai, Y.S., and Tsai, J.-M.** Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors in the developing mouse central nervous system: Evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 4451-4455. (1994).
 60. **Crawford, P.A., Sadovsky, Y., Woodson, K., Lee, S.L. and Milbrandt, J.** Adrenocortical Function and Regulation of the Steroid 21-Hydroxylase Gene in NGFI-B-Deficient Mice. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4331-4336. (1995).
 61. **Lee, S.L., Wesselschmidt, R.I. Linette, G.P., Kanagawa, O., Russell, J.H., and Milbrandt, J.** Unimpaired thymic and peripheral T cell death in

- mice lacking the nuclear receptor NGF1-B (Nur77). *Science*. 269: 532-535. (1995).
62. **Hendrix, R.W., Roberts, J.W., Sthal, F.W. and Weisberg, R.A.** *Lambdall*. Cold Spring Harbour Laboratories, Cold Spring Harbour, New York. (1983).
 63. **Miller, H.** Practical aspects of preparing phage and plasmid DNA: Growth, maintenance and storage of bacteria and bacteriophage. In: *Guide to molecular cloning techniques*. Berger, S.L. and Kimmel, A.R., eds. *Methods Enzymol.*, 152, 145-170. Academic Press. (1987).
 64. **Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. (1989).
 65. **Conneely, O.M., McDonnell, D.P., Beattie, W.G. and Woo, S.L.C.** Cloning and characterization of eukariotic genes. In: *Hormone Action and Molecular Endocrinology*, 14th edition. Hughes, M.R., Scradar, W.T. and O'Malley, B.W., eds., 5.1-5.52. (1990).
 66. **Reed, K.C. and Mann, D.A.** Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.*, 13: 7202-7221. (1985).
 67. **Grunstein, M. and Hogness, D.S.** Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 3961-3965. (1975).
 68. **Church, G.M. and Gilbert, W.** Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 1991-1995. (1984).
 69. **DiLella, A.G. and Woo, S.L.C.** Hybridization of genomic DNA to oligonucleotide probes in the presence of tetramethylammonium chloride. In: *Guide to molecular cloning techniques*. Berger, S.L. and Kimmel, A.R., eds. *Methods Enzymol.*, 152: 447-451. Academic Press. (1987).
 70. **Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.** Addendum: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 137: 266-267. (1984).
 71. **Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R.** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239: 487-491. (1988).
 72. **Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74: 5463-5467. (1977).
 73. **Simmons, D.M., Arriza, J.L. and Swanson, L.W.** *A complete Protocol for*

- In Situ Hybridization of Messenger RNAs in Brain and Other Tissues With Radiolabeled Single-Stranded RNA Probes. *J. of Histotechnol.* 12 (3): 169-181. (1989).
74. **Saucedo-Cardenas, O.,** and **Conneely, O.M.** Comparative Distribution of Nurrl and Nur77 Nuclear Receptors in the Mouse Central Nervous System. *J. Mol. Neurosci.* 7: 1-11. (1996).
 75. **Smidt, M.P.,** van Schaick, H.S.A., Lanct, C., Tremblay, J.J., Cox, J. J., van der Kleij, A.A.M., Wolterink, G., Drouin, J. and Burbach, J.P.H. A homedomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 13305-13310. (1997).
 76. **Ramírez-Solis, R.,** Rivera-Pérez, J., Wallace, J.D., Wims, M., Zheng, H. and Bradley, A. Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. *Anal. Biochem.,* 201: 331-335. (1993).
 77. **Warnhoff M.** Simultaneous determination of norepinephrine, dopamine, 5-hydroxytryptamine and their main metabolites in rat brain using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Enzymatic hydrolysis of metabolites prior to chromatography. *J. Chromatogr.* 307: 271-281. (1984).
 78. **Bostwick, J.R.** and **Le, W.D.** A tyrosine hydroxylase assay in microwells using coupled nonenzymatic decarboxilation of dopa. *Anal. Biochem.* 192: 125-130. (1997).
 79. **Mount, S.M.** A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* 10: 459-472. (1982).
 80. **Castillo, S.O.,** Xiao, Q. Lyu, M.S., Kozak, C.A. and Nikodem, V.M. Organization, sequence, chromosomal localization, and promoter identification of the Mouse Orphan Nuclear Receptor Nurrl Gene. *Genomics.* 41: 250-257. (1997).
 81. **Schwartzberg, P.L.,** Goff, S.P. and Robertson, E.J. Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science.* 246: 799-803. (1989).
 82. **Charron, J.,** Malynn, B.A., Robertson, E.J., Goff, S.P. and Alt, F.W. High-frequency disruption of the N-myc gene in embryonic stem and pre-B cell lines by homologous recombination. *Mol. Cell.Biol.* 10: 1799-1804. (1990)
 83. **Joyner, A.L.,** Skarnes, W.C. and Rossant, J. Production of a mutation in mouse En-2 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature.* 338: 153-156. (1989).

84. **Soriano, P.**, Montgomery, C., Geske, R. and Bradley, A. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell*. 64: 693-702. (1991).
85. **Mansour, S.L.**, Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. Disruption of the protooncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*. 336: 348-352. (1988).
86. **Thomas, K.R.**, and Capecchi, M.R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 51: 503-512. (1987).
87. **Thomas, K.R.**, Deng, C. And Capecchi, M.R. High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2919-2923. (1992).
88. **Hasty, P.**, Ramírez-Solis, R., Krumlauf, R. and Bradley, A. Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature*. 350: 243-246. (1991).
89. **Thomas, K.R.**, Folger, K.R. and Capecchi, M.R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*. 44: 419-428. (1986).
90. **Zetterstrom, R. H.**, Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B., Olson, L. and Perlmann, T. Dopamine Neuron Agenesis in *Nurr1*-Deficient Mice. *Science*. 276: 248-250. (1997).
91. **Yamada, T.**, Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J. and Jessel, T.M. Control of Cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64: 635-647. (1991).
92. **Murphy, E.P.** and Conneely, O.M. Neuroendocrine regulation of the hypothalamic Pituitary Adrenal Axis by the *nurr1/nur77* subfamily of nuclear receptors. *Endocrinology* 16 (1): 39-47. (1997).
93. **Yu, Y.**, Li, W., Su, K., Yussa, M., Han, W., Perrimon, N. and Pick, L. The nuclear hormone receptor Ftz-F1 is a cofactor for the *Drosophila* homeodomain protein Ftz. *Nature (London)*. 385: 552-555. (1997).
94. **Guichet, A.**, Copeland, J.W., Erdelyi, M., Hlousek, D., Zavorszky, P., Ho, J., Brown, S., Percival-Smith A., Krause, H.M. and Ephrussi, A. The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. *Nature*. 385: 548-552. (1997).
95. **Zhou, Q.-Y.** and Palmiter, R.D. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell*. 83: 1197-1209. (1995).

96. **Hynes, M.A.,** Poulsen, K., Armanini, M., Berkemeier, L., Phillips, H. and Rosenthal, A.J. Neurotrophin-4/5 is a survival factor for embryonic midbrain dopaminergic neurons in enriched cultures. *Neurosci. Res.* 37: 144-154. (1994).
97. **Hyman, C.,** Hofer, M., Barde, Y., Juhasz, M., Yancopoulos, G., Squinto, S. and Lindsay, R. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature.* 350: 230-232. (1991).
98. **Knusel, B.,** Winslow, J.W., Rosenthal, A., Burton, L.E., Seid, D.P., Nikolics, K. and Hefti, F. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 961-965. (1991).
99. **Lin, L.-F.H.,** Doherty, D. H., Lile, J.D., Bektesh, S. and Collins, F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 260, 1130-1132. (1993).
100. **Choi-Lundberg, D.L.,** Lin, Q.L., Chang, Y.-N., Chiang, Y.L., Hay, C.M., Mohajeri, H., Davidson, B.L. and Hon, M.C. Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science.* 275: 838-840. (1997).
101. **Snider, W.** Cell. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us?. *Cell.* 77: 627-638. (1994).
102. **Pichel, J.G.,** Shen, L., Sheng, H.Z., Granholm, A.-C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E.J., Huang, S.P., Saarma, M., Hoffer, B.J., Sariola, H. and Westphal, H. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature.* 382: 73-75.
103. **Moore, M.W.,** Klein, R.D., Farinas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Reichardt, L. F., Ryan, A. M., Carver-Moore, K. and Rosenthal, A. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature.* 382: 76-79. (1996).
104. **Shintani, A.,** Ono, Y., Kaisho, Y. and Igarashi, K. Characterization of the 5'-flanking region of the human brain-derived neurotrophic factor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182 (1): 325-332. (1992).

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Odila Saucedo Cárdenas

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en Morfología

Título de Tesis: PAPEL FUNCIONAL DEL RECEPTOR NUCLEAR NURRL EN
EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE MAMIFERO

Campo de estudio: Morfología

Biografía:

Datos personales:

Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 28 de
Febrero de 1961, hija de la Sra. Odila
Cárdenas Espinoza y el Sr. Victoriano
Saucedo Gonzalez.

Escolaridad:

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo
León, con el título profesional de
Biólogo en 1982.

Experiencia profesional:

1999-PRESENTE

Investigador Asociado 'B', División Genética, Centro de
Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Monterrey, N.L.

1991-1998

Senior Research Assistant, Department of Cell Biology, Baylor
College of Medicine, Houston, Tx U.S.A.

1990-1991

Research assistant, Institute for Molecular Genetics, Baylor College
of Medicine, Houston, Tx. U.S.A.

1987-1990

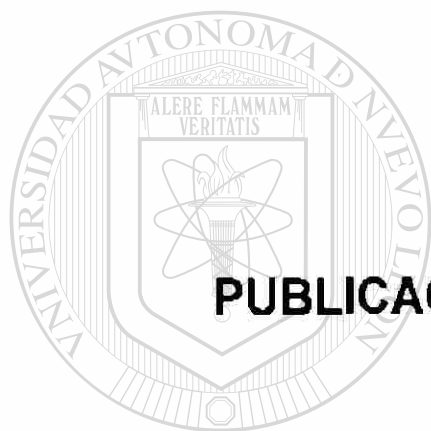
Auxiliar de investigación, Departamento de Ingeniería Genética de
Plantas. CINVESTAV, I.P.N., Unidad de Irapuato, Irapuato, Gto.

1985-1987

Voluntaria como auxiliar de investigación, U.L.I.E.G, departamento
de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.N.L.

1982-1984

Gerente de Fomento para el Desarrollo Rural. Secretaria de la
Reforma Agraria, San Luis Potosí.



APENDICE

PUBLICACIONES GENERADAS CON LA PRESENTE TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Comparative Distribution of NURR1 and NUR77 Nuclear Receptors in the Mouse Central Nervous System

Odila Saucedo-Cardenas and Orla M. Conneely*

Department of Cell Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030

Received February 5, 1996; Accepted February 19, 1996

Abstract

NURR1 and NUR77 are members of the nuclear receptor superfamily of transcription factors. Both proteins can interact with common enhancer elements to regulate target gene expression. In order to establish whether both transcription factors are likely to regulate overlapping genes, we have used an *in situ* hybridization approach to relate the constitutive expression pattern of these mRNAs with functionally defined regions of the adult mouse brain. By Western analysis, NURR1 mRNA expressed by brain cells appeared to be translated.

Here we show that both transcripts display a differential but partially overlapping pattern of expression within the central nervous system (CNS). The expression of NURR1 is more restricted than NUR77 and is localized predominantly in sensory neuronal structures associated with the limbic system and in the cerebellum. In contrast, the expression pattern of NUR77 is more widespread. Positively staining cells for NUR77 appear to overlap with NURR1-containing cells in the limbic system and cerebellum, suggesting overlapping roles for these proteins in mediating behavioral and cognitive function as well as equilibrium maintenance. However, the differential expression of NUR77 in motor areas of the cortex and basal ganglia suggest a selective role for this transcription factor in regulation of motor function at the constitutive level. Our data indicates that these nuclear receptors are likely to have both shared and independent gene regulatory roles in neuronal cells.

Index Entries: Orphan receptors; *in situ* hybridization.

Introduction

The nuclear receptor superfamily comprises a group of structurally related transcription factors that program developmental, physiological, and behavioral responses to a variety of chemical signals. The family includes receptors for steroids,

certain vitamins, and thyroid hormone (Evans, 1988; Beato, 1989; Tsai and O'Malley, 1994) in addition to a growing number of orphan members whose physiological function and cognate ligand, if any, remain to be established (O'Malley and Conneely, 1992). Nuclear receptors regulate the expression of specific target genes by interacting

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

as either monomers (Harding and Lazar, 1993; Wilson et al., 1993a) or dimers (Hard et al., 1990; Naar et al., 1991; Cooney et al., 1992; Kliewer et al., 1992; Perlman et al., 1993) with specific DNA elements based on extensions or repeated spatial variations of two types of core sequence motifs, AGGTCA and AGAACA (Klein-Hitpass et al., 1986; Martinez et al., 1987; Strahle et al., 1987; Umesono and Evans, 1989). DNA sequence-specific binding by nuclear receptors is specified by a highly conserved DNA binding domain that consists of two zinc finger structural motifs and is the hallmark of this transcription factor family (Evans, 1988; Freedman et al., 1988). Binding of nuclear receptors to DNA and regulation of transcription through specific *cis*-acting sequences may occur in a ligand-dependent or -independent manner (Denner et al., 1990; Aronica and Katzenellenbogen, 1991; Power et al., 1991; Ignar-Trowbridge et al., 1992; Lydon et al., 1992).

We previously reported the isolation of a murine orphan receptor NURR1 (also termed RNR-1 and NOT) that is expressed predominantly in brain tissue (Law et al., 1992; Searce et al., 1993; Mages et al., 1994). The protein exhibits a close structural relationship to a previously characterized orphan nuclear receptor, NUR77/NGFI β (Hazel et al., 1988; Milbrandt, 1988). Both NURR1 and NUR77 are part of a subclass of nuclear receptors that function as constitutively active transcription factors and thus do not appear to require binding of a ligand for activity (Davis et al., 1991; Wilson et al., 1991; Searce et al., 1993). As predicted by the strong amino acid conservation (99%) between the DNA binding domains of NURR1 and NUR77, both proteins bind as monomers to the same *cis*-acting enhancer DNA sequence to regulate target gene expression (Wilson et al., 1993a,b; Searce et al., 1993; Murphy et al., 1996). These observations suggest that both transcription factors may regulate overlapping target gene networks.

Like NURR1, NUR77 is expressed in mouse brain tissue but spatial expression pattern is less restricted than NURR1 and the transcript is found in a variety of tissues (Law et al., 1992). Unlike most nuclear receptors, NURR1 and NUR77 also are the products of immediate early genes whose expression is induced in response to distinct stimuli both within (Watson and Milbrandt, 1989; Chan et al., 1993) and outside (Searce et al., 1993; Davis

and Lau, 1994; Mages et al., 1994) the central nervous system (CNS), indicating that both constitutive and inducible expression of these transcription factors contribute to their tissue-specific functional roles. In the case of NUR77, induced expression of this transcript has been demonstrated in response to a variety of extracellular signals, including growth factors (Hazel et al., 1988; Milbrandt, 1988; Williams and Lau, 1993), neurotransmitters (Arenander et al., 1989; Watson and Milbrandt, 1989), seizure activity (Watson and Milbrandt, 1989), polypeptide hormones (Wilson et al., 1993b; Davis and Lau, 1994), and T-cell antigens (Liu et al., 1994; Woronicz et al., 1994). In at least two of these cases, the transcription factor has been shown to play an important role in stimulus transcription coupling. For example, the induction of NUR77 by adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in adrenal cortical cells can mediate steroidogenesis by regulating the expression of the steroidogenic enzyme steroid-21-hydroxylase (Wilson et al., 1993b). The protein also mediates programmed cell death in self-reactive T-lymphocyte cells in response to apoptotic signals (Liu et al., 1994; Woronicz et al., 1994). Thus, some of the physiological roles of this transcription factor are beginning to unravel.

The selective constitutive expression of NURR1 in brain tissue predicts an important role for this transcription factor in regulation of target genes within the CNS. In support of this hypothesis, specific DNA binding sites for NURR1 have recently been identified in the promoter region of several neuronal potential target genes (Murphy et al., 1995). Therefore, in order to gain further insight into the neural pathways that may be influenced by NURR1 and to establish whether NURR1 and NUR77 may regulate overlapping target genes, we have analyzed their spatial distribution within the CNS by *in situ* hybridization. In the present article we have focused on the comparative constitutive expression of NURR1 and NUR77 mRNAs in mouse brain tissue, where both mRNAs are expressed, to determine whether they are localized in overlapping or independent neural structures.

Here we demonstrate that both transcripts show a differential but overlapping pattern of expression throughout the mammalian brain. NURR1 is expressed in sensory neurons associated with the hypothalamus, olfactory, and limbic systems as well as limbic-associated cortical areas, whereas

NUR77 is more widely expressed in a variety of neural structures, including both motor and sensory pathways

The overlapping expression of NUR77 in sensory pathways that express NURR1 suggests that these transcription factors may have shared roles in mediating limbic-associated behavioral and cognitive functions. However, the selective expression of NUR77 in motor areas suggests that this protein may play an independent role in regulation of motor function.

Materials and Methods

Tissue Preparation

A total of five males and 5 females were used in these studies. The mice were sacrificed by decapitation and the brains were removed from the skull, frozen with Tissue-Tek on dry ice, and stored at -70°C until cryostat sectioning. Serial sections of 10 μm thickness were thaw-mounted onto gelatin-coated microscope slides, dried for 15 min by air, and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature. These slides were then stored at -20°C until use.

Probe Preparation

The NURR1 probe was derived from a 371-bp *Dra*II-*Ava*I fragment between positions 367 and 738 of the NURR1 cDNA. The NUR77 probe was derived from a 287-bp *Mae*III fragment between positions 168 and 455 of the NUR77 cDNA. Both fragments were cloned in the pBluescript KS vector (Stratagene, Los Angeles, CA). The [^{35}S]UTP-labeled antisense strand RNA probes for NURR1 and NUR77 were synthesized using T7 polymerase after linearizing with *Dra*II and *Hind*III, respectively. The [^{35}S]UTP-labeled sense strand RNAs used as controls were synthesized using T3 polymerase after linearizing with *Bam*HI. All probes were hydrolyzed to a length of approx 150 nucleotides before use.

In Situ Hybridization

Before hybridization, sections were warmed to room temperature and allowed to dry. Sections were then permeabilized with proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$),

postfixed in 4% paraformaldehyde, treated with acetic anhydride in 0.1M triethanolamine, pH 8.0, and dehydrated through graded ethanol. The hybridization was carried out with a 6×10^6 cpm RNA probe in a volume of 70 μL hybridization buffer containing 0.1M DTT, 50% formamide, 10% dextran sulfate, 4X SSC, 1X Denhardt's solution, and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ yeast tRNA at 58°C for 18 h in a humid chamber. Slides were washed in high stringency with 0.1M DTT, 2X SSC, and 50% formamide at 60°C , digested with RNase A (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) solution at 37°C for 30 min, and then rinsed to a final stringency of 0.1X SSC at room temperature for 15 min. Sections were dehydrated and air-dried at room temperature. Autoradiographic localization of bound probe was performed by apposition of the sections to X-ray film for 3 d. For higher resolution, the sections were dipped into NTB2 autoradiography emulsion (Eastman Kodak, New Haven, CT). After an appropriate exposure period ranging 6–10 d, slides were developed by using Kodak D-19 developer followed by Kodak fixer, stained with hematoxylin, dehydrated, and coverslipped. The sections were photographed with a Zeiss Axiophot microscope.

Western Blot Analysis

A fusion between six histidines and an amino terminal portion of NURR1 protein was made and expressed in *Escherichia coli*, allowing purification over nickel-chelated agarose beads. Briefly, a 0.7-kb fragment of NURR1 cDNA coding sequence spanning amino acids 9–236 was ligated into the *Kpn*I and *Pst*I sites of PQE-30 (Qiagen, Chatsworth, CA). The 30-kDa fusion protein was expressed from the strong *E. coli* phage T5 promoter in strain M15[pREP4] and purified on nickel-chelated agarose according to the manufacturer's instructions (Ni-NTA; Qiagen). Polyclonal antibodies were raised by injection of the fusion protein into New Zealand white rabbits. All immunization procedures were carried out by Bethy Laboratories, Inc (Montgomery, TX). Tissue samples were treated by sonication in TESH 0.4M NaCl buffer. After two centrifugations (10,000g for 10 min and 100,000g for 30 min at 4°C) the supernatant proteins were quantified by Bradford protein assay. Samples (25 μg) were separated on a 7.5% acrylamide gel run for 5 h at constant voltage (100 V) at

room temperature and were transferred to Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA) for 17 h in 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, and 20% methanol; the membrane was blocked for 1 h in 10 mM Tris HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, containing 2% nonfat dried milk. The immunological reactions were performed with antibody at a 1:4000 dilution for 2 h at room temperature. The antigen-antibody complex was revealed by chemiluminescence (ECL Western blotting kit, Amersham, Arlington Heights, IL).

Results

Comparative Distribution of NURR1 and NUR77 in Adult Mouse Brain

Since our previous analysis demonstrated that both NURR1 and NUR77 are expressed in the adult mouse brain we have compared the spatial expression of both mRNAs within the brain to establish whether these transcription factors are expressed in overlapping or distinct neural structures. In these studies, we analyzed coronal, horizontal, and sagittal brain sections from adult mouse by *in situ* hybridization with antisense and sense NURR1 or NUR77 RNA probes.

Two general observations can be made from these analyses. First, both NURR1 and NUR77 mRNAs show a restricted pattern of expression within the CNS with positively staining cells in every major brain division. Second, NURR1 and NUR77 show a differential pattern of expression throughout the brain, although staining for both transcripts appears to overlap in some neural structures. The comparative distribution of these mRNAs within the major brain divisions is described below and summarized in Table 1.

Telencephalon

The expression of NURR1 and NUR77 mRNAs overlaps most extensively in the telencephalon (Fig. 1). NURR1 expression in this brain region was more restricted than NUR77 and was localized primarily in the olfactory areas, the limbic system, and limbic-associated cortical structures. The expression of NUR77 appeared to overlap with NURR1 in the olfactory (Fig. 1B,C) and lim-

bic areas but unlike NURR1, NUR77 staining was widespread throughout all regions of the cortex and also was observed in the basal ganglia (Fig. 1E,F).

Within the olfactory areas, positively staining cells for both transcripts were observed in the olfactory bulb and piriform cortex, although staining for NUR77 was more intense than NURR1 in these areas. However, unlike NURR1, NUR77 was also observed in the olfactory tubercle and accumbens nucleus (Fig. 1).

Both transcripts were expressed at high levels in the major components of the limbic system and limbic-associated cortical structures. In these areas, positively staining cells were localized in the hippocampus and hippocampal-associated structures, including the presubiculum, subiculum, perirhinal and entorhinal cortex, and amygdaloid areas. Within the hippocampus, intense staining for both transcripts was detected in the CA fields of Ammon's horn whereas weak staining for both mRNAs was observed in the dentate gyrus (Fig. 2).

In addition, positively staining cells for both transcripts were found in the frontal, temporal, and parietal cortices (Figs. 1 and 2). Low-level staining for both mRNAs was found in the septo-hypothalamic nucleus. However, only NUR77 was detected in the lateral septal nucleus. Overlapping expression of NURR1 and NUR77 also was observed in the Bed nucleus of the stria terminalis and in the claustrum (Fig. 1E,F), suggesting a role for these proteins in mediating autonomic and visual responses.

The most striking differences in expression pattern within the telencephalon were observed in the cortex and basal ganglia (Fig. 1E,F). Intense staining for NUR77 was observed throughout the frontal lobe as well as in the caudate putamen, ventral pallidum, and globus pallidus, suggesting a selective role for this factor in mediating motor responses. In contrast, NURR1 was localized to the supralimbic layer of the parietal and temporal lobes and was concentrated in the deepest layer (VI) of the cortex (Figs. 1B,E, 2B,E).

Diencephalon

NURR1 and NUR77 showed mostly a differential pattern of staining in the diencephalon. Positively staining cells that express NURR1 were observed in all major diencephalic structures,

Table 1
Distribution of NURR1 mRNA in the Mouse Central Nervous System

Region	NURR1	NUR77
Telencephalon		
Neocortex		
Cingulate cortex (Cg)	++ ^a	++
Frontal cortex (Fr)	+	+++
Parietal cortex (Par)	++	++
Temporal cortex (Te)	+++	++
Inner layer of the cortex (IL)	++	+
Entorhinal cortex (Ent)	++	+
Dorsal endopiriform nucleus (DEn)	++	++
Perirhinal cortex (PRh)	++	++
Piriform cortex (Pir)	+	+++
Subiculum (S)	+++	+
Hippocampus		
Field CA1	+++	+++
Field CA2	++	++
Field CA3	++	++
Dentate gyrus (DG)	+	+
Septohypothalamic n. (SHy)	+	+
Bed nu of the stria terminalis (BSTM)	+	+
Amygdala		
Amygdalohip area (AHi)	++	++
Posteromed cortical amygnu (PMCo)	++	++
Amygdopiriform transition (Apir)	++	++
Olfactory bulb (OB)	++	+++
Olfactory tubercle (Tu)	-	++
Caudate putamen (CPu)	+++	++
Globus pallidus (GP)	-	+++
Ventral pallidum (VP)	-	++
Accumbens nucleus (Acb)	-	++
Lateral septal nu (LS)	-	++
Diencephalon		
Thalamus		
Anteromedial thalamic nu (AM)	++	-
Parafascicular nucleus (PF)	++	-
Anterodorsal thalamic nu (AD)	++	++
Paraventricular thal nu, anterior (PVA)	++	-
Precommissural nu (PrC)	+	-
Medial habenular nu (MHb)	+++	-
Lateral habenular nu (LHb)	+++	-
Medial geniculate body (MG)	-	+
Hypothalamus		
Periventricular zone		
Paraventricular hypothalamic nu (Pa)	++	-
Periventricular hypothalamic nu (Pe)	++	-
Medial zone		
Medial preoptic area (MPA)	+	++
Medial preoptic nucleus (MPO)	-	++

(continued)

Table 1 (continued)

Region	NURR1	NUR77
Anterior hypoth area (AH)	+	-
Posterior hypoth area (PH)	+++	+
Premammillary body (PMV)	+++	+
Lateral zone		
Lateral preoptic areas (LPO)	+	+
Lateral hypoth area (LH)	++	-
Pituitary gland		
Anterior pituitary (APit)	++	+++
Posterior pituitary (PPit)	++	+
Mesencephalon		
Pontine nuclei (Pn)	++	+
Tegmentum		
Ventral tegmental area (VTA)	+++	+
Dorsal nucleus raphe (DR)	++	-
Caudal linear nu raphe (CLi)	++	-
Dorsal tegmental decussation (dtgx)	++	+
Retrorubral field (RRF)	++	+
Pedunculopontine tegmental nu (PPTg)	+++	+
Interstitial nu of the mlf (IMLF)	++	-
Rostral interstitial nu mlf (RI)	++	++
Interpeduncular nucleus (IL)	-	+
Edinger-Westphal nucleus (EW)	++	-
Central gray (CG)	+	+
Rhombencephalon		
Pons		
Medial vestibular nu (MVe)	+	-
Intermediate reticular nu (IRt)	++	-
Raphe nucleus (R)	++	-
Pontine reticular nu, oral (PnO)	+	-
Cerebellum (Cb), granular layer	+++	+++
Medulla oblongata	+	+
Spinal cord (SP)		
Lamina X of the gray matter	+	-
Dorsal horn	-	+

*Semi-quantitative estimates of the signals are indicated: +, weak; ++, moderate; +++, strong.

including the thalamus, habenula, and hypothalamus (Fig 2B,E). Intense staining for NURR1 was observed in the medial and lateral habenular region whereas lower levels of staining were observed in several thalamic nuclei, including the anteromedial, parafascicular, anterodorsal, paraventricular, and precommissural nuclei. Within the main hypothalamic zones, moderate to high levels of NURR1 staining were observed in at least nine discrete nuclei (Table 1). The most intense hybridization signal was observed in premammillary nuclei,

which are associated with emotive responses and in the posterior hypothalamic area (Fig 1E). A role for NURR1 in mediating neuroendocrine and autonomic responses is supported by its expression in the paraventricular, periventricular (Fig. 3), anterior, posterior, and lateral hypothalamic areas (Fig. 2B,E). The medial and lateral preoptic areas also showed a faint and diffuse NURR1 expression (Fig. 1E).

In contrast to NURR1, staining for NUR77 was weak in the diencephalon with positive cells

observed in fewer thalamic and hypothalamic nuclei. NUR77 staining was absent from the habenula and was detected at low levels in the anterodorsal (Fig. 2C) and medial geniculate nucleus of the thalamus. Within the hypothalamus, moderate to weak staining was observed in the medial preoptic nucleus, posterior hypothalamic area, premammillary body, and lateral preoptic areas (Figs. 1F, 2F).

The pituitary gland showed differential staining of NURR1 and NUR77 between the posterior and anterior regions (Fig. 4). Widespread expression of NURR1 was observed in both the anterior and posterior regions, whereas positively staining cells for NUR77 were localized predominantly in the anterior region, with few NURR1-positive cells in the posterior lobe.

Mesencephalon

The expression of NURR1 and NUR77 in the midbrain is shown in Fig. 5. NURR1 was expressed at high levels in the cerebral peduncles where positively staining cells were observed in several nuclei with fiber pathway connections to the limbic system, ventral striatum, and hypothalamus. These included the ventral tegmental area, raphe nuclei, pedunculo-pontine tegmental nucleus, interstitial nucleus of the medial longitudinal fasciculus, retrorubral field, and central gray (Fig. 5B,E).

Several nuclei with major projections to the cerebellum (pontine, reticulotegmental, and lateral reticular) also expressed high levels of NURR1 mRNA. The Edinger-Westphal nucleus showed moderate NURR1 expression, suggesting a pos-

Fig. 1. (Figs. 1–6 on pp. 58–59; *In situ* hybridization analysis of NURR1 and NUR77 mRNA expression in the telencephalon of the mouse adult brain. Bright field (A) and dark field photomicrographs of adjacent sagittal sections hybridized to NURR1 (B) and NUR77 (C) antisense ³⁵S probes through the olfactory bulb. Bright field (D) and dark field photomicrographs of adjacent coronal sections hybridized to NURR1 (E) and NUR77 (F) antisense ³⁵S probes at rostral level. No hybridization was detected using the sense probes. Note that NUR77 distribution is widespread in this rostral region of the brain. OB, olfactory bulb; Cl, claustrum; Fr, frontal cortex; Pir, piriform cortex; Ahi, amygdalohip area; Cpu, caudate putamen; GP, globus pallidus; Acb, Accumbens nu; VP, ventral pallidus; Tu, olfactory tubercle; Cg, cingulum; Shy, septohypothalamic nu; BSTM, bed nucleus of the stria terminalis; MPO, medial preoptic nucleus; Den, dorsal endopiriform nucleus; IL, inner layer of the cortex.

Fig. 2. Distribution of NURR1 and NUR77 gene expression through diencephalon. Bright field (A) and dark field photomicrographs of adjacent horizontal sections hybridized to NURR1 (B) and NUR77 (C) antisense probes through the habenula of the thalamus. Bright field (D) and dark field photomicrographs of adjacent coronal sections hybridized to NURR1 (E) and NUR77 (F) antisense probes through posterior part of thalamus and hypothalamus regions. Hb, habenula; Prc, precommissural nucleus; AD, anterior dorsal thalamus; PH, posterior hypothalamic nu; PMV, premammillary body; Ahi, amygdalohip area; PMCo, posteromed cortical amygd nu; Apir, amygdopiriform transition; Cg, cingulum cortex; Par, parietal cortex; Te, temporal cortex; Frh, perirhinal cortex; S, subiculum; CA-3, hippocampus fields; DG, dentate gyrus.

Fig. 3. Mouse coronal section showing the distribution of NURR1 and mRNA in the hypothalamus. (A) Bright field; (B) dark field. Pa, paraventricular hypothalamic nucleus; Pe, periventricular hypothalamic nucleus.

Fig. 4. Pituitary gland showing the expression pattern of NURR1 and NUR77. Top panels show the bright (A) and dark field (B) of NURR1 mRNA. Bottom panels show the bright (C) and dark (D) field of NUR77 mRNA. APit, anterior pituitary; PPit, posterior pituitary.

Fig. 5. Distribution of NURR1 and NUR77 gene expression through midbrain. Bright field (A) and dark field photomicrographs of adjacent horizontal sections hybridized to NURR1 (B) and NUR77 (C) antisense probes through the raphe nucleus of the brain. Bright field (D) and dark field photomicrographs of adjacent coronal sections hybridized to NURR1 (E) and NUR77 (F) antisense probes through the ventral tegmental area of the midbrain. PVA, Paraventricular thal nu, anterior; PF, parafascicular nu; RI, rostral interstitial nu mlf; DR, dorsal nu raphe; Pptg, pedunculo-pontine tegmental nu; VP, ventral pallidus; GP, globus pallidus; Cpu, caudate putamen; LS, lateral septal nu; S, subiculum; Ent, entorhinal cortex; Te, temporal cortex.

Fig. 6. Localization of NURR1 mRNA in a coronal section of the mouse hindbrain bright field (A) and dark field (B) photomicrographs. Cb, cerebellum; R, raphe nucleus; MVe, medial vestibular nucleus; IRt, intermediate reticular nucleus.

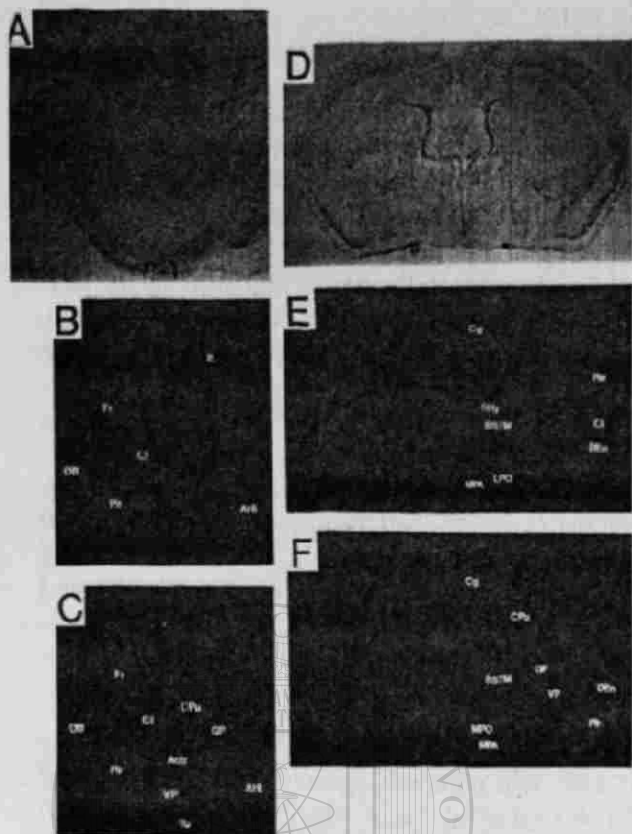


Fig. 1.

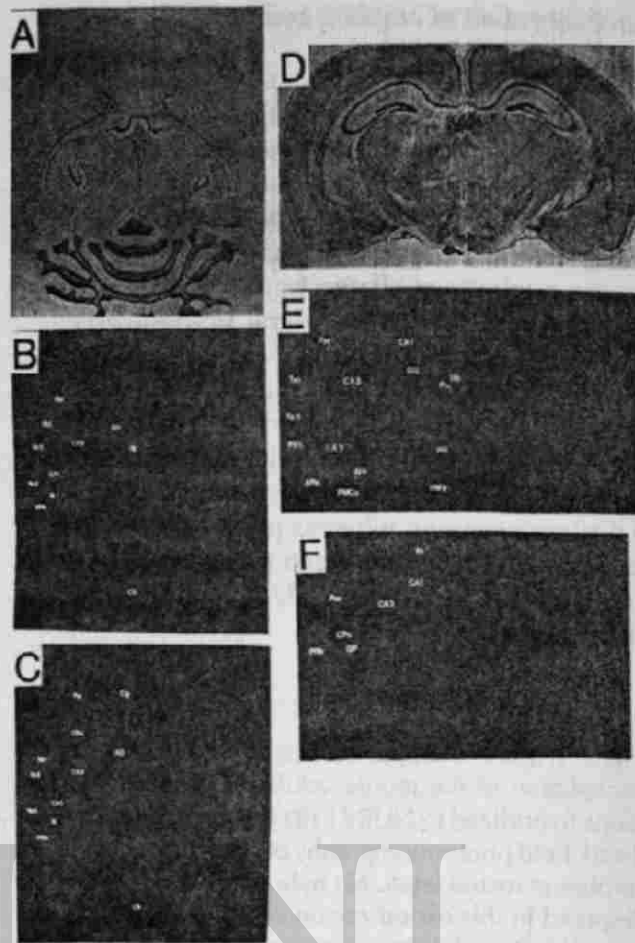


Fig. 2.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TAMPICO
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Pa

Pe →

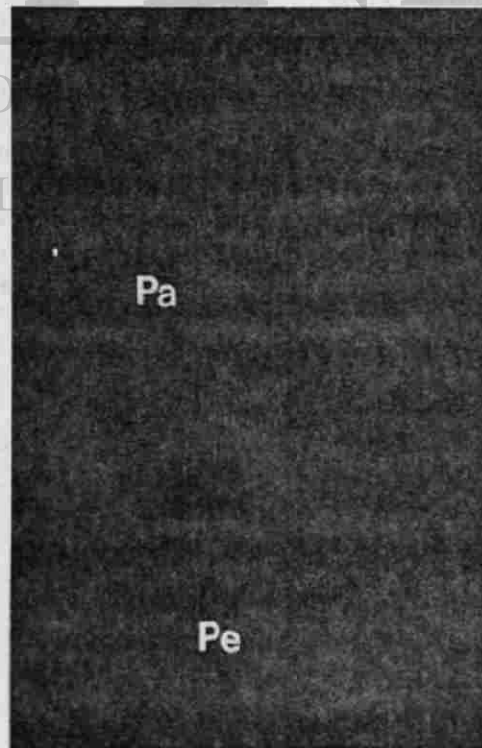


Fig. 3.

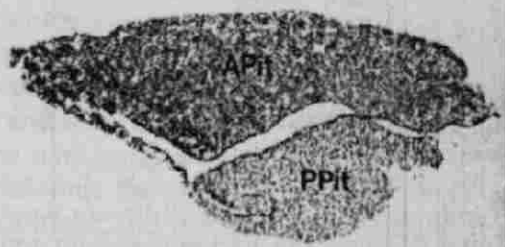


Fig. 4.

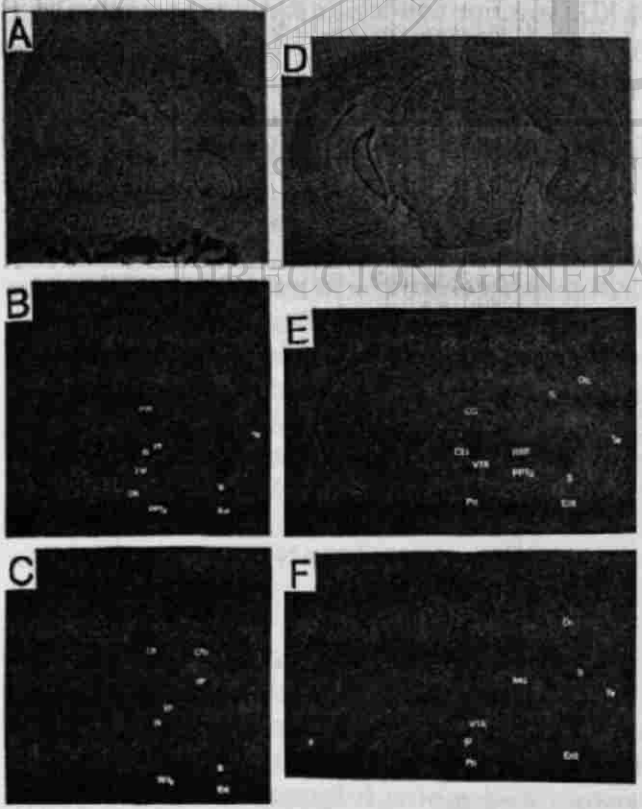


Fig. 5.

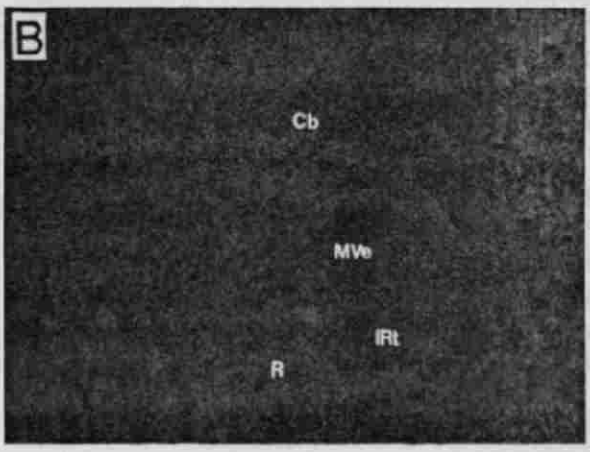


Fig. 6.



Fig. 7. Expression of NURR1 protein. Extracts prepared from various mouse adult tissues were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gel, transferred to immobilon-P membrane, and probed with anti-NURR1 (immune) serum. The number at the left indicates the mobility of the molecular weight of NURR1 protein.

sible role for NURR1 in control of eye muscle activity. In contrast, we observed only faint expression for NUR77 within these tegmental regions and this transcript was not expressed in the raphe nucleus (Fig. 5C). Low levels of NUR77 mRNA also were observed in the medial geniculate and interpeduncular nucleus (Fig. 5F).

Rhombencephalon and Spinal Cord

The highest levels of expression of NURR1 and NUR77 in this region were observed in the cerebellum (Fig. 2B,C), where intense staining for both transcripts was detected throughout the granular layers. The most striking difference in the expression pattern of NURR1 and NUR77 in this brain region was observed in the pons and medulla, which lacked detectable expression of NUR77. The pons showed moderate NURR1 staining (Fig. 6) in several nuclei, including the medial vestibular and intermediate reticular nucleus, which is involved in four general types of function: motor control, sensory control, visceral control, and control of consciousness. Consistent with its midbrain expression pattern, positively staining cells for NURR1 were observed in the pontine nuclei and raphe nuclei. The medulla showed moderate NURR1 expression (data not shown) in the dorsal vagal nucleus involved in sensory, motor, and parasympathetic functions. The remaining portions of these nuclei were unlabeled.

Finally, very low intensity staining for NURR1 and NUR77 was observed in the spinal cord, where the transcripts showed a differential non overlapping expression pattern. Expression of NUR77 was localized in the dorsal horn whereas NURR1 staining was confined to the lamina X region of the gray matter surrounding the central canal (data not shown).

Western Blot Analysis of NURR1 Protein in Mouse Tissue Extracts

In order to confirm that NURR1 protein is also detected in areas that express NURR1 mRNA transcripts, we carried out Western immunoblot analysis of tissue extracts from cerebrum, thalamus, midbrain, hypothalamus, cerebellum, pons, adrenal gland, liver, and heart. A polyclonal antibody that recognizes the amino terminal portion of NURR1 protein detected a specific band, corresponding to NURR1 protein in all the brain tissue extracts and in the adrenal gland. This band of 66 kDa was not detected in the liver and heart tissue extracts (Fig. 7).

Discussion

The present analysis of the comparative spatial distribution of NURR1 and NUR77 within the CNS indicates that these transcripts may have both shared and independent functions in neuronal cells. Both mRNAs show a different but partially overlapping pattern of expression within the CNS. The function of NURR1 may be more specific since its expression is more restricted than NUR77 and appears to be mainly localized to sensory neural structures.

Positively staining cells for NURR1 were observed in all major brain divisions. However, its expression within these areas was found predominantly in structures associated with the limbic system. The association of NURR1 with the hypothalamus and limbic system predicts a role for this transcription factor in the integration and processing of sensory and motor information required for expression of complex motivational and emo-

tional behaviors as well as learning and memory. A role for NURR1 in mediating both neuroendocrine and autonomic components of these behaviors is supported by the localization of NURR1 within neuroendocrine structures of the hypothalamus and the anterior pituitary gland, and its association with autonomic structures, including the hypothalamus, the cingulate gyrus, Bed nucleus of stria terminalis, and ventral tegmental area. The localization of NURR1 in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the anterior pituitary is of particular interest because we previously have identified *cis*-acting enhanced sequences for NURR1 in the promoter regions of the corticotrophin-releasing factor (CRF) gene and the pro-opiomelanocortin (POMC) gene, which are expressed in the hypothalamic and pituitary areas, respectively (Murphy et al., 1995). Furthermore, using synthetic target genes containing the CRF and POMC promoters, we recently have demonstrated that NURR1 can regulate the expression of these genes when transfected into pituitary cells in culture (E. Murphy and O. M. Conneely, unpublished results). These data, together with the previous demonstration by others that NUR77 upregulation by ACTH can mediate regulation of expression of the steroidogenic enzyme steroid-21-hydroxylase (Wilson et al., 1993b), provide the first indication that the NURR1/NUR77 subfamily of nuclear receptors may play an important neuroendocrine role in the coordinate regulation of activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

The expression of NUR77 overlaps extensively with NURR1 in the limbic system but also shows significant differences in its expression pattern in all major brain divisions. Most striking is the widespread expression of NUR77 throughout all regions of the cerebral cortex and its selective expression in telencephalic structures within motor areas. The expression of NUR77 in the basal ganglia, nucleus accumbens, and olfactory tubercle suggests that this transcription factor may participate in the regulation of motor activity.

Significant differences in expression patterns of the two transcripts also are observed in the diencephalon (Fig. 2). Most notable is the lack of appearance of positively staining cells for NUR77 in the habenula and its low expression in the hypothalamus. Although this transcript is not constitutively expressed in the endocrine hypo-

thalamus, its expression in the anterior pituitary together with the previously reported stress-inducible expression of NUR77 in the paraventricular hypothalamic nucleus (Chan et al., 1993) support a role for this protein in mediating neuroendocrine responses.

Unlike NURR1, which shows significant expression in mid- and hind-brain structures, particularly those with fiber connections to the limbic system, the expression of NUR77 in these areas is extremely low to undetectable. However, the intense staining for both transcripts throughout the cerebellum suggests that they may have overlapping roles in mediating maintenance of equilibrium and coordination of muscle action.

Our analysis of the expression patterns of NURR1 and NUR77 in this study identifies functionally defined brain regions in which constitutive expression of these transcription factors is likely to contribute to maintenance of a base-line or constitutive level of neuronal activity. The ability of these transcripts to respond in an inducible manner to a variety of stimuli provides an additional level of contribution of these transcription factors to neuronal activity under specific stimulatory conditions that are not detected in this study.

We did not see a discrepancy between expression of the NURR1 mRNA and its protein in the main structures of the brain. The overlapping expression of NURR1 and NUR77 in the limbic system together with their ability to interact with similar enhancer elements (Searce et al., 1993) clearly predicts that both proteins may interact with similar gene networks in behavioral and cognitive pathways. Whether this overlapping interaction leads to a redundancy of function of both proteins or a differential regulation of gene transcription remains to be established.

Acknowledgment

We would like to thank Irene A. Harrison for her assistance in preparing the manuscript.

References

- Arenander A. T., de Vellis J., and Herschman H. R. (1989) Induction of *c-fos* and *TIS* genes in cultured rat astrocytes by neurotransmitters. *J. Neurosci.* **24**, 107-114.

- Aronica S. M. and Katzenellenbogen B. S. (1991) Progesterone receptor regulation in uterine cells: stimulation by estrogen, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and insulin like growth factor I and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors. *Endocrinology* 128, 2045-2052.
- Beato M. (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335-344.
- Chan R. K. W., Brown E. R., Ericsson A., Kovacs K. J., and Sawchenko P. E. (1993) A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *J. Neurosci.* 13, 5126-5138.
- Cooney A. J., Tsai S. Y., O'Malley B. W., and Tsai M.-J. (1992) Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimer binds to different GGTTCA response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D3, thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4153-4163.
- Davis I. J., Hazel T. G., and Lau L. F. (1991) Transcriptional activation by NUR77, a growth factor inducible member of the steroid hormone receptor superfamily. *Mol. Endocrinol.* 5, 854-859.
- Davis I. J. and Lau L. F. (1994) Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurrl in the adrenal glands. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3469-3483.
- Denner L. A., Weigel N. L., Maxwell B. L., Schrader W. T., and O'Malley B. W. (1990) Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science* 250, 1740-1743.
- Evans R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Freedman I. P., Luisi B. F., Korszun Z. R., Busavappa E., Sigler P. B., and Yamamoto K. R. (1988) The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* 334, 543-546.
- Hard T., Kellenbach E., Boelens K., Maler B. A., Dahlman K., Freedman I. P., Carlstedt-Duke J., Yamamoto K. R., Gustafsson J.-A., and Kaptein R. (1990) Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* 249, 157-160.
- Harding H. P. and Lazar M. A. (1993) The orphan receptor Rev-ErbA α activates transcription via a novel response element. *Mol. Cell. Biol.* 13(5), 3113-3121.
- Hazel T. G., Nathans D., and Lau L. F. (1988) A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8444-8448.
- Ignar-Trowbridge D. M., Nelson K. G., Bidwell M. C., Curtis S. W., Washburn T. F., Machlachlan J. A., and Korach K. S. (1992) Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4658-4662.
- Klein-Hitpass L., Schorpp M., Wagner U., and Ryffel G. U. (1986) An estrogen-responsive element derived from the 5'-flanking region of the Xenopus vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell* 46, 1053-1061.
- Kliewer S. A., Umesono K., Noonan D. J., Heyman R. A., and Evans R. M. (1992) Convergence of γ cis retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771-774.
- Law S. W., Conneely O. M., DeMayo F. J., and O'Malley B. W. (1992) Identification of a new brain specific transcription factor, Nurrl. *Mol. Endocrinol.* 6, 2129-2135.
- Liu Z.-G., Smith S. W., McLaughlin K. A., Schwartz L. M., and Osborne B. A. (1994) Apoptotic signals delivered through the T-cell hybrid require the immediate-early gene NUR77. *Nature* 367, 281-284.
- Lydon J. P., Power R. F., and Conneely O. M. (1992) Differential modes of activation define orphan subclasses within the steroid/thyroid receptor superfamily. *Gene Express* 2, 273-283.
- Mages H. W., Rilke O., Bravo R., Senger G., and Kroczeck R. A. (1994) NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol. Endocrinol.* 8, 1583-1591.
- Martinez E., Givel F., and Wahli W. (1987) The estrogen-responsive element as an inducible enhancer: DNA sequence requirements and conversion to a glucocorticoid-responsive element. *EMBO J.* 6, 3719-3727.
- Milbrandt J. (1988) Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1, 183-188.
- Murphy E. P., Dobson A. D. W., Kellerk C. H., and Conneely O. M. (1996) Differential regulation of transcription by the NURR1/NUR77 subfamily of nuclear transcription factors. *Gene Express.* 5, 169-179.
- Naar A. M., Boutin J. M., Lipkin S. M., Yu V. C., Holloway J. M., Glass C. K., and Rosenfeld M. G. (1991) The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* 657, 1267-1279.

- O'Malley B. W. and Conneely O. M. (1992) Minireview: orphan receptors: in search of a unifying hypothesis for activation. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1359-1361.
- Perlmann T., Rangarajan P. N., Umesono K., and Evans R. M. (1993) Determinants for selective RAR and TK recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev.* **7**, 1411-1422.
- Power R. F., Mani S. K., Codina J., Conneely O. M., and O'Malley B. W. (1991) Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* **254**, 1636-1639.
- Scearce L. M., Laz T. M., Hazel T. G., Lau L. F., and Taub R. (1993) RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in degenerating liver. *J. Biol. Chem.* **268**, 8855-8861.
- Strable U., Klock G., and Schutz G. (1987) A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7871-7875.
- Tsai M.-J. and O'Malley B. W. (1994) *MBII: Mechanism of Steroid Hormone Regulation of Gene Transcription*. R. G. Landes, Austin, TX.
- Umesono K. and Evans R. M. (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57**, 1139-1146.
- Watson M. A. and Milbrandt J. (1989) The NGFI-B gene, a transcriptionally inducible member of the steroid receptor gene superfamily: genomic structure and expression in rat brain after seizure induction. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4213-4219.
- Williams G. T. and Lau L. F. (1993) Activation of the inducible orphan receptor gene *nur77* by serum growth factors: dissociation of immediate-early and delayed-early responses. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6124-6136.
- Wilson T. E., Fahrner T. J., Johnston M., and Milbrandt J. (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-beta by genetic selection in yeast. *Science* **252**, 1296-1300.
- Wilson T. E., Fahrner T. J., and Milbrandt J. (1993a) The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5794-5804.
- Wilson T. E., Mouw A. R., Weaver C. A., Milbrandt J., and Parker K. L. (1993b) The orphan nuclear receptor, NGFI-b regulates expression of the gene encoding steroid-21-hydroxylase. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 861-868.
- Woronicz J. D., Calman B., Ngo V., and Winoto A. (1994) Requirement of the orphan steroid receptor NUR77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* **367**, 277-281.

 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cloning and structural organization of the gene encoding the murine nuclear receptor transcription factor, NURR1

Odila Saucedo-Cardenas, Rachele Kardon, Tracy R. Ediger, John P. Lydon, Orla M. Conneely *

Baylor College of Medicine, Department of Cell Biology, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA

Received 19 June 1996; revised 9 September 1996; accepted 20 September 1996; Received by J.A. Engler

Abstract

NURR1 is an immediate early gene product and a member of the nuclear receptor superfamily of transcription factors. Using the NURR1 cDNA as a probe, we isolated the genomic DNA encoding NURR1 from a mouse 129SvEv genomic library. The NURR1 gene is approximately 6.7 kb long and is organized into 7 exons separated by 6 introns. Structural analysis of the NURR1 reveals that this gene shares a similar structure with that of the nuclear receptor NUR77/NGF1-B. As in NUR77, the promoter region of NURR1 lacks an identifiable TATA box, but is GC-rich. The proximal promoter region also contains an ATF/CREB consensus binding site that may participate in cAMP-mediated induction of this immediate early gene product. *Isolation and structural characterization of the NURR1 gene provides information for further developmental and transcriptional regulation studies of this gene.*

Keywords: Promoter; Consensus sequence; NUR77

1. Introduction

We previously reported the isolation of a murine orphan receptor NURR1 (also termed RNR-1 and NOT) that is expressed predominantly in the main regions of the central nervous system (Law et al., 1992; Searce et al., 1993; Mages et al., 1994; Saucedo-Cardenas and Conneely, 1996). NURR1 is a member of the nuclear receptor superfamily. This family comprises a group of structurally related transcription factors that program developmental, physiological and behavioral responses to a variety of chemical signals. The family includes receptors for steroids, certain vitamins and thyroid hormone (Evans, 1988; Beato, 1989; Tsai and O'Malley, 1994) in addition to a growing number of orphan members whose physiological function and cognate ligand, if any, remain to be established (O'Malley and Conneely, 1992).

NURR1 cDNA encodes a 66-kilodalton protein and exhibits close structural relationship to previously characterized orphan nuclear receptors, NGF1-B/

NUR77/N10/NAK-1 (Mihbrandt, 1988; Hazel et al., 1988; Ryseck et al., 1989; Nakai et al., 1990) and NOR-1/MINOR/TEC (Ohkura et al., 1994; Hedvat and Irving, 1995; Labelle et al., 1995). These receptors are part of a subclass of nuclear receptors that are immediate early gene products and function as constitutively active transcription factors that do not appear to require binding of a ligand for activity (Chalepakis et al., 1988; Davis et al., 1991; Wilson et al., 1991). In addition, these three transcription factors are able to bind to the same cis-acting enhancer DNA sequence to regulate target gene expression (Chalepakis et al., 1988; Ohkura et al., 1994; Hedvat and Irving, 1995; Wilson et al., 1993a,b; Murphy et al., 1995). These observations suggest that these transcription factors may regulate overlapping gene networks.

To understand the regulation of the NURR1 gene and its relationship to other members of the nuclear receptor superfamily, we have determined its structural organization. The exon intron arrangement is similar to that of the NGF1-B/NUR77 nuclear receptor supporting the conclusion that this subclass of gene products have a close evolutionary relationship within the nuclear receptor superfamily. Analysis of the proximal promoter region of NURR1 reveals at least one potential cis-acting sequence that may participate in signal induced transcription of this immediate early gene.

* Corresponding author. Fax +1 713 7931275.

Abbreviations: bp, base pair(s); kb, kilobase(s) or 1000 bp; nt, nucleotide(s).

2. Experimental and discussion

2.1. Isolation of the NURR1 gene

Two mouse 129/SvEv genomic libraries prepared in λ Dash II (Stratagene) and P1 (Genome Systems Inc) were used to isolate the NURR1 gene. Screening of the λ Dash II library was performed (Grunstein and Hogness, 1975) using as probe a *DraII-PstI* (680-bp) fragment from the N-terminal region of NURR1 cDNA (Law et al., 1992). The probe was radiolabeled using [³²P] dCTP to a specific activity of 2×10^9 cpm/ μ g. Using this approach, one positive clone was identified from the λ DASH II genomic library. Two fragments of this clone, 5.5-kb *Bam*HI (p20) and 6.5-kb *Eco*RI (p10), corresponding to the 5' portion of the NURR1 gene, were subcloned into pSP72 (Promega). The P1 library was initially screened by PCR using oligonucleotides specific for the same N-terminal region of the NURR1 gene. Two NURR1 positive clones were identified. One of these clones, 7.8-kb *Bgl*II (p30), containing the 3' end of the NURR1 gene was subcloned into *Bam*HI site of pUC19 (New England Biolabs, Inc.). The three overlapping genomic fragments (p10, p20 and p30) were characterized by Southern analysis (Fig. 1). Together, these fragments spanned the entire NURR1 gene and were used to establish the intron/exon organization by PCR amplification and sequence analysis.

2.2. Analysis of exons, introns and exon/intron boundaries

To identify and sequence the exon/intron boundaries, amplification of individual regions of the NURR1 gene was performed. This was done by using 10 ng of NURR1 genomic DNA (p20 and p30) as template and a variety of 20-27-mer oligonucleotide primers. These primers were designed from the NURR1 cDNA and by comparison to sequences flanking the published NUR77/

NGFI-B intron/exon boundaries (Watson and Milbrandt, 1989). The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and sequenced directly (Sanger et al., 1977; Casanova et al., 1990).

The structural organization of the NURR1 gene is shown in Fig. 1. Sequences of the exon/intron junctions, as well as the size of each exon and corresponding encoded amino acids, are shown in Table 1. A comparison of the genomic and cDNA sequences revealed that the NURR1 gene is composed of seven exons. Exon sizes ranged from 130 to 866 bp, the largest being the second exon which contains the first ATG codon. The introns vary in size from 350 bp to 1 kb. All of the exon-intron boundaries satisfy the GT-AG intron donor-acceptor splice rule (Mount, 1982). Based on this data, the physical map of the NURR1 gene spans approximately 6.2 kb.

Comparison of the NURR1 gene structure with its closely related family member NGFI-B (Watson and Milbrandt, 1989) reveals that the exon/intron boundaries are identical. The two genes have seven exons which are similar in length and in the distribution of the protein-coding sequence. Both contain the amino terminal transactivation domain in exon 2. The DNA binding domain, common to all members of the nuclear receptor superfamily, is encoded by exons 2 and 3. Exon 4 encodes a nonconserved domain thought to function as a hinge region transactivation domain between the DNA- and the putative ligand-binding domains (Evans, 1988). The exons 5, 6, and 7 encode the dimerization and putative ligand binding domains. In addition, like NGFI-B, the NURR1 gene contains in exon 7, the termination codon and the 3' untranslated region, which contains multiple AUUUA motifs that may play a role in the regulation of NURR1 mRNA stability (Milbrandt, 1988). While the gene structure shares a similar general organization with other members of the nuclear receptor superfamily (Hazel et al., 1988), the NURR1 and NUR77/NGFI-B genes contain an addi-

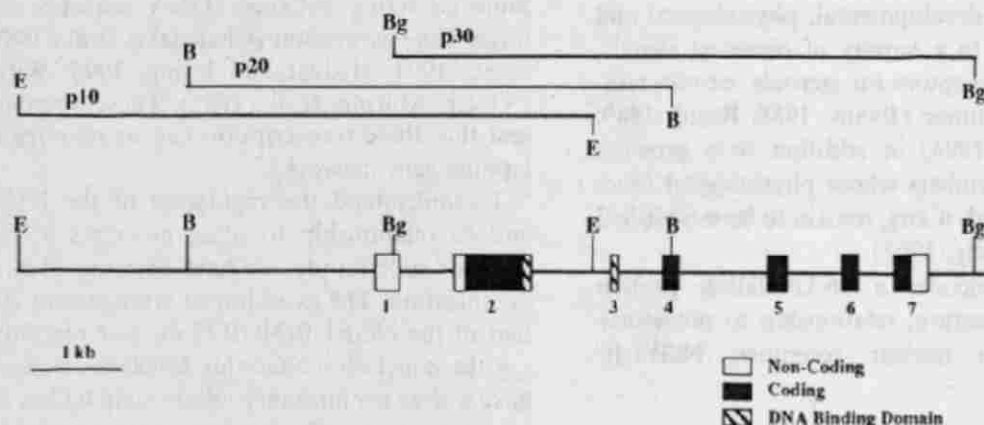


Fig. 1. Structural organization of the NURR1 gene and its relationship to the three overlapping genomic clones identified from hybridization screening. The boxes in the map denote exons with the exon number shown below each box and the line connecting each box denotes introns. The coding region and DNA binding domain of NURR1 are indicated. B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; E, *Eco*RI.

Table 1
Location of introns and exon-intron boundaries of NURR1 gene

EXON (SIZE)	EXON 5'	(*)	INTRON (SIZE)	EXON 3'
1 334bp	GAA G	334	<u>GTCAGT</u> ..INTRON 1 (~600bp).. <u>TTCCAG</u>	CC ATG* Met
2 866bp	TTT AAG Phe Lys	1201	<u>GTGAGC</u> ..INTRON 2 (~900bp).. <u>CTACAG</u>	CGC ACG Arg Thr
3 130bp	GAA G Glu V	1330	<u>GTAGGT</u> ..INTRON 3 (~500bp).. <u>TTACAG</u>	TG GTT al Val
4 164bp	TCC AGG Ser Arg	1494	<u>GTAAGA</u> ..INTRON 4 (~1 kb).. <u>TTCCAG</u>	TTC CAG Phe Gln
5 203bp	TAC AG Tyr Ar	1697	<u>GTAATG</u> ..INTRON 5 (~600bp).. <u>TTGCAG</u>	G TCC g Ser
6 176bp	ACA G Thr G	1876	<u>GTCAGT</u> ..INTRON 6 (~350bp).. <u>CTGCAG</u>	AG AGA lu Arg
7 >347bp				

Exon-intron boundaries and the size of each exon and intron are shown. The ATG* codon is located in exon 2; (●) indicates the nucleotide number of the NURR1 cDNA at which the intron is located

tional intron in the amino terminal portion of the gene 5' to the DNA binding domain.

2.3. Determination of the transcription initiation site and 5' sequence analysis

Total RNA was prepared from adult 129/C57 mouse brain (Kingston, 1989). An 18-mer antisense oligonucleotide primer was synthesized corresponding to nucleotides 97-114 of exon 1 of NURR1. The oligonucleotide was labeled with T4 polynucleotide Kinase and ($\gamma^{32}\text{P}$) to a specific activity of 10^8 cpm/ μg . The extension reactions were performed as described (Wong et al., 1989). As is typical of genes with TATA-less promoters, some heterogeneity was observed in the transcription start site. However, five potential initiation sites were detected (Fig. 2), one of which was clearly identified as the major transcriptional start site located 322 bp upstream of the translation initiation ATG in the NURR1 cDNA. We sequenced ~500 bp of the 5' flanking sequence of NURR1 gene (Fig. 3). Like NUR77/NGFI-B, the NURR1 gene lacks identifiable TATA and CAAT boxes and contains several GC boxes. Computer analysis of this 5' flanking sequence revealed that there is an ATF/CREB consensus cis-acting binding site located at -165 nucleotide (Fig. 3). The identification of this consensus CREB site in the proximal promoter region of the NURR1 gene is of particular interest in light of the known induction of NURR1 expression in the adrenal glands by ACTH (Wilson et al., 1993b) and our recent observation that NURR1 mRNA is induced in primary pituitary cells by corticotrophin releasing factor (CRF) (Murphy E. and Conneely O.M., in preparation). Both CRF and ACTH play an important role in neuroendocrine regulation of the hypothalamic/pituitary/adrenal axis and the signal/



Fig. 2. Identification of the transcriptional start site of NURR1. Primer extension analysis of the NURR1 gene is shown in lane 1. The arrows show the five potential transcription initiation sites.

transcription coupling by these effectors is mediated by activation of a cAMP dependent pathway.

Cloning and sequence characterization of the NURR1 gene provides an important tool to facilitate elucidation of the mechanisms that underlie the restricted temporal and spatial expression of this gene as well as its differential regulation by extracellular signals.

```

-500 AAAGTTACCGAAGCCACCGA
-480 CAACITGTCCTCCACTTCTGCTAAACGGTGTGAGGAGGGTATGTTGGCGAGCTCCAAAGCCAC
420 ACCTCTGCCCTCTCGGCCAGGTGCTAGCTACCTGGCCACCGGAGTGTCTTTTCGGTT
360 CAACCTTTTGTTCACCCCTCCACAGTGTGAGGACGCCAAGGTCTCCCCACGTGGGGGAGG
-300 GGCAGGTGAGCGTAGCATCACCACGGACTTCACGGACCTGGGTTGCAGAAGTCACACTT
240 CTTTCGGAAAAAATAATCCACCAAGCTGKKCTARCAAGGTGAACCGTTCCACACTTAA
180 AATCAGCCCCAGTGTGACGTCAGGTCCGAAATATACCAAAGCGAGCGCGGGCCAGGAGT
-120 CCGGGGAGCGCGGGCGGTTCGCGGATTCGACTGCGGGCTGACCGCGCTGACGCGGCGACAC
-60 TTTAGGTGCATGTTGGCAGCAGCAGCTCGAGCCACATAAAACAAGGCACATGGCGCCAGG
↓
+1 GGCAGTACGCCCGCCCTGGCCACAGCTCCGCGTCCCTCTCTCCGGGCCCGGTGGCTTG
+61 CCCTCCCTCTCTCTGGCGCCGGGCTGGCTGGCTGTTGTTCTCCCGCGCCCGCTTCGGCAGCG
+181 CTCCTCCGCGGACCGGGCTCCCTCTGCTCCCGGAGGGAACCTGCACCTTCGGCGGAGTTGAATG
+241 AATGAAGCAGAGCGGACAAGGAGATCTGACGGGCTGGATTCCTCAATAGCTCTTTTAAAA
+301 TCTTGGAAACTTTGTCCTTGGCTGAATTAAGGACACTGTCCACCTTAAATTCCTCGAAAA
+361 CTCCAATAACTCTGCTGAAG... intron 1 (~600 bp)... CC ATG

```

Fig. 3. Sequence of the NURR1 5' flanking region. The major transcription initiation site is indicated by an arrow. The NURR1 cDNA sequence is underlined. A potential ATF/CREB consensus binding site is highlighted in bold letters. The ATG translation initiation codon is at the 3' end of the sequence. The nt sequence reported in this paper has been deposited in GenBank/NCBI under accession No. U67738.

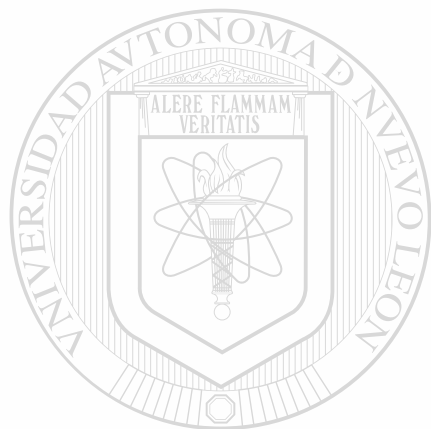
Acknowledgement

The authors would like to thank Irene Harrison for her excellent secretarial assistance in typing the manuscript. O. S.-C. is a recipient of a fellowship from the National Council of Science and Technology (CONACYT) of Mexico.

References

- Beato, M. (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335–344.
- Cacanova, J.L., Parneter, C., Jauch, C. and Kourilsky, P. (1990) Optimal conditions for directly sequencing double stranded PLR products with sequenase. *Nucleic Acids Res.* 18, 4028.
- Chalpakis, G., Arneimann, J., Slater, E.P., Briller, H.J., Gross, B. and Beato, M. (1988) Differential gene activation by glucocorticoids and progestins through the hormone regulatory element of the mouse mammary tumor virus. *Cell* 53, 371–382.
- Davis, J.J., Hazel, T.G. and Lau, L.F. (1991) Transcriptional activation by NUR77, a growth factor inducible member of the steroid hormone receptor superfamily. *Mol. Endocrinol.* 5, 854–859.
- Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889–895.
- Grinstein, M. and Hogness, D.S. (1975) Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3961–3965.
- Hazel, T.G., Nathans, D. and Lau, L.F. (1988) A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8444–8448.
- Hedvat, C.V. and Irving, S.G. (1995) The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen inducible nuclear orphan receptor. *Mol. Endocrinol.* 9, 1692–1700.
- Kingston, R.E. (1989) Primer extension assay. In: F.A. Ansabel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl (Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, pp. 4.8.
- Labelle, Y., Zucman, J., Sienman, G., Kindblom, L.-G., Knight, J., Turc-Carel, C., Dockhorn-Dworietzak, B., Mandahl, N., Desnaze, C., Peter, M., Aurias, A., Delattre, O. and Thomas, G. (1995) Oncogene conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. *Hum. Mol. Gen.* 4, 2219–2226.
- Law, S.W., Conneely, O.M., DeMayo, F.J. and O'Malley, B.W. (1992) Identification of a new brain specific transcription factor, Nurrl. *Mol. Endocrinol.* 6, 2129–2135.
- Mages, H.W., Rilke, D., Bravo, R., Senger, G. and Kroczeck, R.A. (1994) NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol. Endocrinol.* 8, 1583–1591.
- Milbrandt, J. (1988) Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1, 183–188.
- Mount, S.M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* 10, 459–472.
- Murphy, E.P., Dobson, A.D.W., Keller, C.H. and Conneely, O.M. (1995) Differential regulation of transcription by the NURR1/NUR77 subfamily of nuclear transcription factors. *Gene Express* 5, 169–179.
- Nakai, A., Kartha, S., Sakurai, A., Toback, F.G. and DeGroot, L.J. (1990) A human early response gene homologous to murine nur77 and rat NGF1-B, and related to the nuclear receptor superfamily. *Mol. Endocrinol.* 4, 1438–1443.
- O'Malley, B.W. and Conneely, O.M. (1992) Minireview: Orphan Receptors. In search of a unifying hypothesis for activation. *Mol. Endocrinol.* 6, 1359–1361.
- Ohkura, N., Hijikuro, M., Yamamoto, A. and Miki, K. (1994) Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene

- from cultured rat neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1959-1965.
- Ryseck, R.P., MacDonald Bravo, H., Mattei, M.G., Ruppert, S. and Bravo, R. (1989) Structure, mapping and expression of a growth factor inducible gene encoding a putative nuclear hormonal binding receptor. *EMBO J.* 8, 3327-3335.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Saucedo Cardenas, O. and Conneely, O.M. (1996) Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *J. Mol. Neurosci.* 7, 51-63.
- Scarse, L.M., Laz, T.M., Haze, T.G., Lau, L.F. and Taub, R. (1993) RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in degenerating liver. *J. Biol. Chem.* 268, 8855-8861.
- Shul, M.J. and O'Malley, B.W. (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.* 63, 451-486.
- Wilson, M.A. and Milbrandt, J. (1989) The NGFI-B gene, a transcriptionally inducible member of the steroid receptor gene superfamily: Genomic structure and expression in rat brain after seizure induction. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4213-4219.
- Wilson, T.E., Fahrner, T.J., Johnston, M. and Milbrandt, J. (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-beta by genetic selection in yeast. *Science* 252, 1296-1300.
- Wilson, T.E., Fahrner, T.J. and Milbrandt, J. (1993a) The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5794-5804.
- Wilson, T.E., Mouw, A.R., Weaver, C.A., Milbrandt, J. and Parker, K.L. (1993b) The orphan nuclear receptor, NGFI-b regulates expression of the gene encoding steroid-21-hydroxylase. *Mol. Cell. Biol.* 13, 861-868.
- Wong, G., Ilkorn, T., Kawanji, K., Skow, L. and Negishi, M. (1989) Gene family of nucleospecific testosterone 16 α -hydroxylase (C P 450₁₆) in mice. *J. Biol. Chem.* 264, 2920-2921.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons

ODILA SAUCEDO-CARDENAS*, JUAN D. QUINTANA-HAU*, WEI-DONG LE†, MARTEN P. SMIDT†, JOKE J. COX†, FRANCESCO DE MAYO*, J. PETER H. BURBACH†, AND ORLA M. CONNEELY*§

Departments of *Cell Biology and †Neurology, Baylor College of Medicine, 1 Baylor Plaza, Houston, TX 77030; and ‡Department of Medical Pharmacology, Rudolf Magnus Institute for Neurosciences, Utrecht University, 3584 CG Utrecht, The Netherlands

Communicated by Bert W. O'Malley, Baylor College of Medicine, Houston, TX, December 31, 1997 (received for review December 1, 1997)

ABSTRACT Nurr1 is a member of the nuclear receptor superfamily of transcription factors that is expressed predominantly in the ventral nervous system, including developing and mature dopaminergic neurons. Recent studies have demonstrated that Nurr1 is essential for the induction of phenotypic markers of ventral mid-brain dopaminergic neurons whose generation is specified by the floor plate-derived morphogenic signal sonic hedgehog (SHH), but the precise role of Nurr1 in this differentiative pathway has not been established. To provide further insights into the role of Nurr1 in the final differentiation pathway, we have examined the fate of dopamine cell precursors in Nurr1 null mutant mice. Here we demonstrate that Nurr1 functions at the later stages of dopamine cell development to drive differentiation of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. In the absence of Nurr1, neuroepithelial cells that give rise to dopaminergic neurons adopt a normal ventral localization and neuronal phenotype characterized by expression of the homeodomain transcription factor and mesencephalic marker, Ptx-3, at embryonic day 11.5. However, these late precursors fail to induce a dopaminergic phenotype, indicating that Nurr1 is essential for specifying commitment of mesencephalic precursors to the full dopaminergic phenotype. Further, as development progresses, these mid-brain dopamine precursor cells degenerate in the absence of Nurr1, resulting in loss of Ptx-3 expression and a concomitant increase in apoptosis of ventral midbrain neurons in newborn null mutant mice. Taken together, these data indicate that Nurr1 is essential for both survival and final differentiation of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons into a complete dopaminergic phenotype.

The catecholamine neurotransmitter dopamine plays a central role in the control of voluntary movement, cognition, and emotive behaviors (1). The majority of neurons that produce dopamine originate in the ventral midbrain in the substantia nigra (A9) and the ventral tegmental area (A10). Neurons arising from the substantia nigra project to the striatum to regulate motor control and their degeneration is associated with Parkinson's disease (1–3). Neurons from the ventral tegmental area give rise to a distinct system that projects to the limbic system and cortex, and regulates emotional and reward behavior and motivation (4). Disturbances in this system are implicated in schizophrenia and addictive behavioral disorders (5–7).

While the physiological relevance and clinical significance of dopaminergic neurons are well recognized, the mechanisms

underlying their development are poorly understood and are the subject of intense investigation. The development of mid-brain dopaminergic neurons is initiated at embryonic day 10 in the mouse in the ventrolateral neural tube adjacent to the floor plate and is regulated by the floor plate-derived morphogenic signal, sonic hedgehog (SHH) (8–11). SHH initially induces a general ventral cell fate characterized by the induction of ventral markers, including the SHH receptor, *ptc*, the winged helix, and zinc finger transcription factors, HNF3 β and Gli-1 (11–14). Subsequently, these ventralized cells further differentiate to adopt different specific cell fates along the anterior–posterior axis. Indeed, ectopic expression of SHH in the dorsal neural tube of transgenic mice is sufficient to drive induction of dopaminergic and serotonergic neurons of the mid- and hindbrain, respectively (11). At the level of the midbrain, this differentiation leads ultimately to the expression of dopamine synthetic enzymes including tyrosine hydroxylase (TH) and L-aromatic amino acid decarboxylase (AADC). The expression of these enzymes in the ventral midbrain at embryonic day 11.5 in the mouse is characteristic of the emergence of a dopaminergic phenotype (15).

Nurr1, a member of the nuclear receptor superfamily of transcription factors (15–18), is expressed predominantly in the central nervous system in limbic areas and the ventral midbrain, including dopamine neurons (19–21). The onset of Nurr1 expression in the ventral midbrain occurs at embryonic day 10.5 before the appearance of the dopaminergic marker enzyme, TH, at embryonic day 11.5. Expression of Nurr1 continues in mature dopaminergic neurons during adulthood, suggesting that the protein may also be required for normal function of mature dopaminergic neurons. Using Nurr1 null mutant mice, Zetterstrom *et al.* (19) recently demonstrated that ablation of Nurr1 leads to agenesis of midbrain dopaminergic neurons as evidenced by an absence of the dopaminergic cell markers, TH, the retinoic acid converting enzyme, *ADH2* and the receptor tyrosine kinase, *c-ret*, and a loss of striatal dopamine neurotransmitter. However, the precise role of nurr1 in this developmental cascade has not been established.

The objective of this study was to examine the role of Nurr1 in mediating the final differentiation of ventral dopaminergic neurons. Here we demonstrate that in the absence of Nurr1, neuroepithelial cells undergo normal ventralization, differentiate into neurons, and adopt a specific mesencephalic phenotype that is identified by the expression of the homeodomain protein, Ptx-3 (22). However, these dopamine precursor cells are arrested in a developmental state described by a lack of dopamine phenotypic markers. Further, these dopaminergic precursors do not survive and die as development progresses to the neonatal stage. Together, these data indicate that Nurr1

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

© 1998 by The National Academy of Sciences. 0027-8424/98/954013-6\$2.00/0
PNAS is available online at <http://www.pnas.org>.

Abbreviations: SHH, sonic hedgehog; TH, tyrosine hydroxylase; AADC, L-aromatic amino acid decarboxylase; Chat, choline acetyltransferase; ES cell, embryonic stem cell.

§To whom reprint requests should be addressed.

regulates dopaminergic cell development by promoting both survival of ventral mesencephalic neurons and their differentiation into the final dopaminergic phenotype.

MATERIALS AND METHODS

Gene Targeting. The *Nurr1* genomic DNA fragment (~7.6 kb) that comprised the gene targeting vector was isolated from mouse 129Sv A Dash II genomic library (Stratagene) using as a probe a fragment from the N-terminal region of *Nurr1* cDNA (16, 23). This m*Nurr1* genomic fragment contained exons 2–8 of the *Nurr1* gene. Exon 3 encodes the nonconserved N-terminal domain of the receptor that contains the initiating methionine residue, ATG. The *neof* gene PGKNEObpA (24) was inserted into a unique *NcoI* restriction site in exon 3 that was located downstream from the initiator codon ATG but upstream of the DNA-binding domain in the *Nurr1* gene (16). The insertion of the *neof* gene into exon 3 divides the 7.6-kb *Nurr1* genomic fragment into 5' and 3' arms of *Nurr1* homology that are 1.9 kb and 5.7 kb in size, respectively. The herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) gene (25) was attached 5' to exon 3 and inserted with a transcriptional orientation opposite to both the *neo* and *Nurr1* genes. The cloning plasmid used in this vector construction was PSP72 (Promega). The targeting vector was linearized by the restriction enzyme *NotI* located in a synthetic linker at the 3' end of the long arm of homology.

Introduction of Targeting Vector into Mouse Embryonic Stem (ES) Cells. The general procedures for culturing and manipulating ES cells before and after the electroporation step were followed as described (26). Briefly, 10^6 ES cells were electroporated with 25 μ g of linearized targeting vector in 0.9 ml of PBS at 230 V and 500 μ F with a Bio-Rad Gene Pulser. Electroporations were performed routinely using the actively growing ES cell line AB-1 (27). ES cells were cultured in the presence of G418 (350 μ g/ml) and 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl) 5-iodouracil (FIATU) drug selection. Drug-resistant ES cell colonies were picked and expanded in 96-well SNL76/7 feeder plates (master plates). A duplicate gelatinized 96 well (no feeder layer) of each master plate was also prepared to identify targeted events by Southern blot analysis. The master plates containing the ES cell clones for blastocyst microinjection were frozen at -70°C until identification of those ES cells scoring positive for the targeted event.

Generation of Chimeric Mice and Germ-Line Transmission of the *Nurr1* Mutation. Four targeted ES cell clones were tested for germ-line transmission of the *Nurr1* mutation. ES cells (13–15) were microinjected into the blastocoel of 3.5-day-old blastocyst stage embryos derived from C57BL/6 females. Embryos were transferred unilaterally into the uterine horn (six to seven embryos per horn) of pseudopregnant F₁ (CBA \times C57BL/6) foster mothers. Approximately 10 days after birth, the sex of the offspring was determined and the extent of agouti coat color was evaluated. Male chimeras with 60% to 100% agouti coat color were backcrossed to C57BL/6 females, and germ-line transmission was determined by the presence of agouti offspring.

Screening of ES Cells and Mouse Tail DNA for Targeted Events. To identify the *Nurr1* mutation in ES cells, Southern blot analysis was performed on genomic DNA isolated from ES cell colonies. DNA samples were digested with *Bam*HI overnight, resolved by electrophoresis, and transferred onto nylon membranes for hybridization with a radiolabeled 0.9-kb *Hind*III-*Eco*RV genomic DNA fragment located outside but immediately 5' to the disrupted *nurr1* genomic fragment (see Fig. 1A). Hybridization and washing conditions were as described (28). To detect germ-line transmission of the null mutant allele, PCR analysis of tail DNA from agouti offspring from chimeric mice was carried out. Three oligonucleotides were used in a single PCR for genotyping. They consisted of

a 5' primer (GGCACTCCTGTGTCTAGCTGCC) located on the 5'-end of the *neof* gene in exon 3 and two 3' primers, one (CTGCCTTGGGAAAAGCGCCIC) located in the *neof* gene to generate a 200-bp PCR product representing the mutated allele and the other (CAGCCCTCACAAGTGC-GAACAC) located in a 3' portion of exon 3 that was deleted in the targeting vector to allow selective detection of the wild-type allele as a 300-bp product.

Determination of TH Activity, Catecholamine, and Related Compounds. TH was measured using coupled nonenzymatic decarboxylation of L dopa (29). Briefly, mouse striatal tissues after dissection were homogenized in 50 mM of cold Tris-HCl buffer containing 1 mM EDTA and 0.2% Tween 20, pH 7.2 (1:20 vol/vol) with a Teflon homogenizer. Twenty-five microliter aliquots of homogenate were incubated in a microwell culture plate with reaction solution containing [¹⁴C]tyrosine [NEN, specific activity 48.6 mCi/mmol (1 Ci = 37 GBq)] and cofactors at 37°C for 20 min. The L-[¹⁴C]dopa formed was decarboxylated by adding 33 mM potassium ferricyanide and heating the mixture at 55°C for 30 min. The [¹⁴C]CO₂ released was absorbed on filter paper impregnated with benzethonium hydroxide and quantified by counting the radioactivity on the paper covering each well.

Catecholamines and related compounds in homogenized tissue were extracted with 10% perchloric acid (1:10 vol/vol), clarified by centrifugation, and chromatographed by HPLC on a BAS P/N reversed-phase cartridge column (Phase-II ODS 3 μ m \times 100 \times 3.7 mm). The acid extract was applied isocratically and detected electrochemically according to published procedures (30).

Measurement of Choline Acetyltransferase (Chat) Activity. Chat activity was assayed in the caudate nucleus, hippocampus, and frontal cortex, using a slight modification of Fonnum's method (31). After brain tissues were homogenized in 10 mM (1:50 vol/vol) of cold PBS containing 1 mM of EDTA (pH 7.4), and centrifuged at 10,000 \times g for 10 min, 25 μ l of supernatant was incubated with 75 μ l of assay medium (150 mM NaCl/0.5 mM EDTA/0.15 mM serine/0.2 mM [³H]acetyl-CoA/5 mM choline chloride/50 mM PBS) in 96-well plate microwells. After 45 min incubation at 37°C, reactions were terminated by transferring 80 μ l of incubation mixtures into vials containing Fonnum's scintillation solution, and were counted in the Rockbeta LKB scintillation counter.

Immunohistochemistry and *In Situ* Hybridization. For immunohistochemical studies, brains of wild-type and mutant newborns were fixed in 4% paraformaldehyde for 12–24 hours at 4°C and soaked in 30% sucrose overnight, frozen, and cut on a cryostat to 20 μ m. Frozen sections were stained according to standard avidin-biotin immunohistochemical procedures (Vector Laboratories). Primary antisera included polyclonal rabbit antiserum against TH and AADC diluted 1:600 (Eugene Tech International, Inc.) and mouse monoclonal antiserum 3A10 diluted 1:200 (Developmental Studies Hybridoma Bank). *In situ* hybridization with TH, Ptx-3, HNF3 β , and *Nurr1* riboprobes were performed as described previously (20, 22).

Apoptosis Detection. Embryos were obtained by dissection of pregnant mice at specific stages of pregnancy [noon of the day on which the copulatory plug was detected was designated day 0.5 of gestation (E0.5)]. The embryos and newborn brains were fixed in 4% paraformaldehyde, dehydrated by washing in graded alcohol solutions, embedded in paraffin, and sectioned at 5 μ m. To identify apoptotic cells, we used the trevigen apoptotic cell system *in situ* kit (TACS) from Trevigen (Gaithersburg, MD) according to manufacturer's recommendations.

RESULTS

Targeted Disruption of the *Nurr1* Gene in Mice. The *Nurr1* gene was disrupted in mouse embryonic stem cells using the targeting vector shown in Fig. 1. The vector contained a 7.6-kb

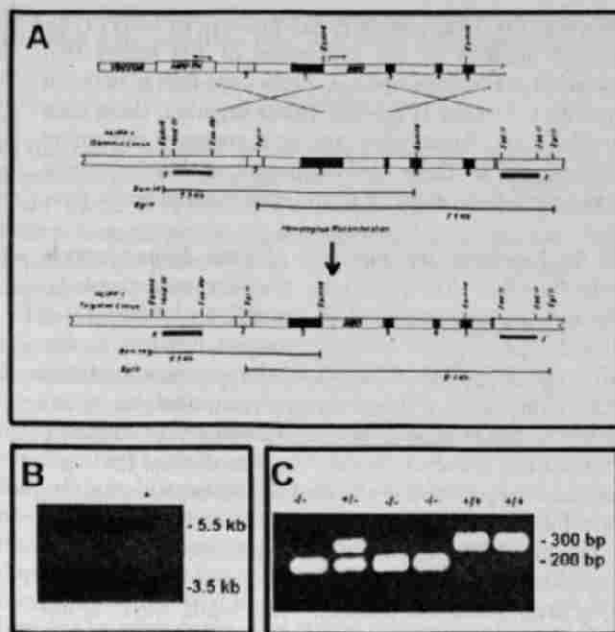


FIG. 1. Targeted inactivation of *Nurr1* gene in mouse ES cells and generation of mutant mice. (A) Schematic diagram of the strategy used to target *Nurr1* gene. (Top) The 13.7-kb targeting vector used for electroporation. Numbered boxes represent exons. The PGK-neobpA and the HSV-thymidine kinase cassettes are indicated by open boxes. The arrows indicate the direction of transcription. (Middle) Genomic structure of the *Nurr1* gene. (Bottom) Representation of the structure of the inactivated *Nurr1* gene. (B) Southern blot analysis of the DNA from G418-resistant ES cells. The DNA was digested with *Bam*HI and hybridized to a 900-bp genomic probe located upstream of the 5' homologous arm. This probe hybridized to a 5.5-kb and a 3.5-kb fragment from wild-type and mutant alleles, respectively. (C) PCR analysis of mice derived from heterozygous *Nurr1* (+/-) crosses. Two PCR products are shown at 300 bp and 200 bp correspond to the wild-type and mutant alleles, respectively.

fragment of the mouse *nurr1* gene interrupted within exon 3 by the introduction of a neomycin resistance cassette (*neo^r*) downstream of the initiator ATG and upstream of the DNA-binding domain of *nurr1*. Targeted integration of this vector into the *nurr1* genomic locus was detected by Southern blot analysis of *Bam*HI-digested ES cell DNA using a ³²P-labeled genomic probe (900 bp) located 5' to the *nurr1* sequences used in the targeting vector (Fig. 1A). Using this strategy, the wild-type *nurr1* gene is represented by a 5.5-kb radioactive band containing exons 2-4, whereas the mutated *nurr1* allele is represented by a shorter hybridizing band at 3.5-kb due to the presence of an additional *Bam*HI site within the *neo^r* gene (Fig. 1B). Targeted ES cell clones were microinjected into blastocysts to generate chimeric mice and germ-line transmission of the mutant allele was detected by PCR analysis of tail DNA from agouti offspring of chimeras derived from one ES cell clone. In these analyses (see *Materials and Methods*), the wild-type *nurr1* gene is represented by a 300-bp PCR product while the mutated allele is represented by a 200-bp PCR product (Fig. 1C). Genotype analysis indicated that homozygote *Nurr1* null mutant (*Nurr1*^{-/-}) mice were born at the expected frequency but consistent with previous findings these mice died within 12 hours after birth (19).

Ventral Midbrain Dopaminergic Neurons Specifically Require *Nurr1* for Final Differentiation. To examine the role of *nurr1* in development of the dopaminergic system, we analyzed the expression of two dopaminergic cell markers, TH and AADC, in the substantia nigra and ventral tegmental area of wild-type and *nurr1*^{-/-} neonatal mice by immunohistochemistry (Fig. 2A-D). Consistent with previous findings, ablation of *nurr1* resulted in a complete absence of both markers, confirming that *nurr1* is essential for expression of a mesen-

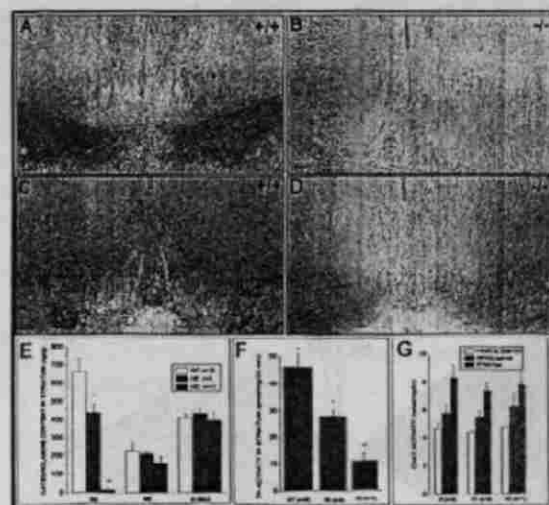


FIG. 2. Analysis of monoamines and Chat levels in newborn mice. Coronal sections (A and C) show the TH and AADC immunostaining, respectively, in the substantia nigra (A9) and ventral tegmental (A10) area of wild-type brain. (B and D) Loss of both markers at the same level in coronal sections of *nurr1*^{-/-} mice. (E) Monoamine levels were measured in the striatum of newborn wild-type, heterozygous, and homozygous mice by HPLC. A complete loss of dopamine levels in the homozygous mice and a significant decrease in the heterozygous mice was detected. The TH activity in the striatum (F) was significantly decreased in the homozygous and heterozygous mice, while choline acetyltransferase activity (G), norepinephrine, and serotonin (E) were unaffected. (Bars = 100 μ m.)

cephalic dopaminergic cell phenotype. Analysis of striatal neurotransmission confirmed that this defect is associated with a significant decrease in TH activity at the striatal axon terminals (Fig. 2F), a complete loss of dopamine from the striatum of *Nurr1*^{-/-} mice and a significant decrease in dopamine levels in heterozygote mice (Fig. 2E). Furthermore, analysis of the levels of catecholamines, serotonin, and cholinergic activity demonstrated that the defect in striatal neurotransmission was specific to dopamine because levels of norepinephrine, serotonin, and Chat were unaffected (Fig. 2E and G). Finally, to determine whether the defect was specific to the mesencephalic dopamine neurons, we examined TH expression and dopamine levels in neural crest-derived cells of the adrenal medulla that also express *Nurr1* (Fig. 3A). Comparison of TH immunoreactivity (Fig. 3C and D) and dopamine transmitter levels (Fig. 3B) in wild-type and *Nurr1*^{-/-} mice revealed no abnormalities associated with *Nurr1* ablation, indicating that *Nurr1* is not required for development of these cells. Similarly, no changes in TH expression were observed in dopaminergic neurons of the periglomerular region of the olfactory bulb in *nurr1* null mutant mice (Fig. 3E and F) even though these neurons normally express *nurr1* (21).

***Nurr1* Is Essential for Terminal Differentiation of Late Mesencephalic Precursor Neurons into a Full Dopaminergic Phenotype.** To examine the stage in mesencephalic dopaminergic cell development at which *Nurr1* functions, we examined the phenotype of cells in the ventral midbrain of wild-type and *Nurr1* null mutant embryos at embryonic day 11.5 using specific markers of the dopaminergic developmental cascade. First, we determined whether the cells have responded to the SSH inductive signal by adopting a general neuronal phenotype. Comparison of the expression of the ventral marker, HNF3 β , and the general neuronal marker, 3A10 (32), in wild-type and *Nurr1*^{-/-} mice showed similar expression of both markers in wild-type and *Nurr1*^{-/-} mice demonstrating that ventralization and general neuronal induction of neuroepithelial cells in the ventrolateral neural plate are unaffected by *Nurr1* ablation (Fig. 4A and B). Next, we examined the

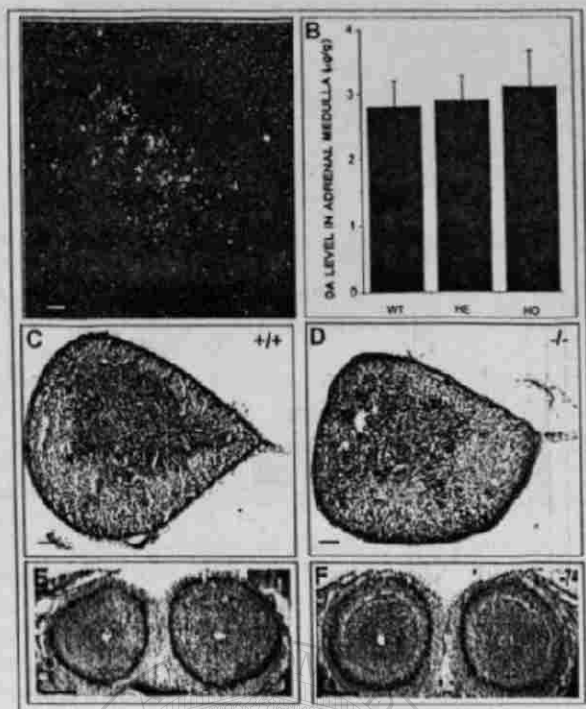


FIG. 3. TH expression and dopamine levels in neural crest-derived cells of the newborn adrenal medulla. (A) *In situ* hybridization analysis of *Nurr1* mRNA expression in the adrenal gland of a wild-type mouse. *Nurr1* mRNA was detected in the medulla of the adrenal gland. (B) Dopamine levels in adrenal medulla of wild-type, heterozygous, and homozygous mice. No significant differences in dopamine levels were detected. TH immunoreactivity of wild-type (C) and mutant adrenal gland from newborn mice (D). (E and F) No detectable differences in TH immunoreactivity in the periglomerular dopaminergic cells of the olfactory bulb in wild-type and *nurr1* null mutant mice, respectively. (Bar = 50 μ m.)

expression of the recently identified homeodomain protein, Ptx-3, as a marker for mesencephalic dopaminergic progenitor cells whose onset of expression at embryonic day 11 is subsequent to that of *Nurr1* (22). Surprisingly, both wild-type and *Nurr1*^{-/-} mice showed similar expression patterns of Ptx-3 that appeared to be in all cells of the ventral midbrain,

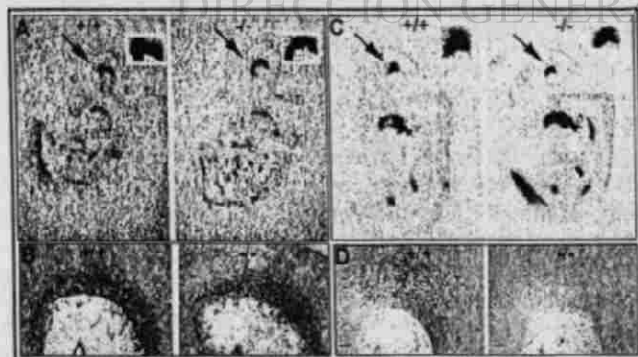


FIG. 4. Analysis of the phenotype of cells in the ventral midbrain of wild-type and *Nurr1* mutant embryos. (A) Autoradiographic localization of hybridization to the ventral marker, HNF3 β . The arrow shows the strong staining in the ventral part of the midbrain of both 12.5 days wild-type (Left) and mutant (Right) mice embryo. The square on the top shows a higher magnification of this expression. (B) Immunostaining for the general neuronal marker, 3A10, in 11.5 day wild-type and mutant mouse embryos. (C) *In situ* hybridization analysis of Ptx-3 mRNA expression in 11.5 day mouse embryo. The arrow indicates the positive staining in the ventral midbrain. Wild-type and mutant mice showed similar staining. (D) Immunohistochemical localization of TH expression in the ventral midbrain of 12.5 day wild-type embryo and lack of expression in the *nurr1*^{-/-} midbrain. (Bars = 20 μ m.)

indicating that Ptx-3 expression is independent of *Nurr1* (Fig. 4C). Finally, analysis of the expression of TH shows that differentiation to the dopaminergic phenotype fails to occur at E11.5 in *Nurr1*^{-/-} mice (Fig. 4D). Taken together, these data indicate that *Nurr1* functions at the later stages of dopaminergic cell development to drive differentiation of Ptx-3 positive ventral mesencephalic neurons to the final dopaminergic phenotype.

***Nurr1* Is Essential for Survival of Late Dopaminergic Precursor Neurons.** To determine whether mesencephalic dopaminergic precursors survive in the absence of *Nurr1*, we examined the persistence of Ptx-3 positive neurons to the neonatal stage (Fig. 5A). Analysis of the expression of this marker in neonatal mice demonstrated continued strong expression of Ptx-3 in mature dopaminergic neurons of wild-type mice. In contrast, however, *Nurr1*^{-/-} mice showed few scattered cells expressing Ptx-3 in the ventral mid-brain, indicating significant loss of Ptx-3 positive cells in the neonate (Fig. 5C and D). Furthermore, the loss of Ptx-3 expression was specific to the mid-brain region and was not observed in other Ptx-3 expressing areas (data not shown). Thus, while *Nurr1* is not involved in induction of Ptx-3 expression, it is critically involved in maintenance of Ptx-3 expressing cells. To determine whether the loss in Ptx-3 expression was associated with a loss of ventral midbrain cells, we compared the levels of apoptosis in wild-type and *Nurr1*^{-/-} mutant neonates using a TUNEL assay. The results of these analyses demonstrated that the loss in Ptx-3-expressing cells was associated with an increase in the number of apoptotic and dying cells that was specific to the ventral midbrain of the *Nurr1* null mutant mice (Fig. 5E and F). Quantitation of apoptotic cells in the substantia nigra and VTA regions in three independent wild-type and *Nurr1* null mutant neonates confirmed an increase in apoptotic cells from 0.5% in wild-type mice to 7% in *Nurr1* null mutant mice. Finally, the increase in cell death was consistent with an obvious decrease in the number of cells observed in the neonatal ventral midbrain (see Fig. 5C and E versus D and F). These data indicate that *Nurr1* is required for survival of

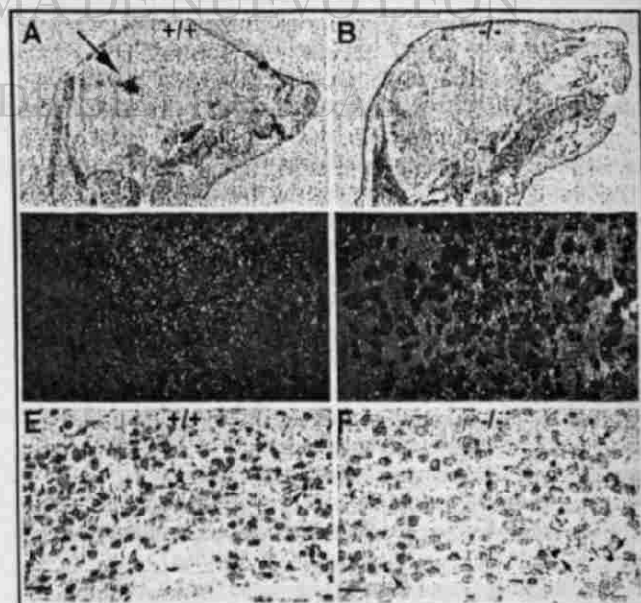


FIG. 5. Loss of Ptx-3 expression and increased cell death specifically in the ventral midbrain region of newborn *Nurr1*^{-/-} mice. (A and C) Localization of Ptx-3 expression in the ventral midbrain (arrow) of wild-type neonate. (B and D) Ptx-3 staining is almost depleted in the *Nurr1*^{-/-} midbrain. TUNEL staining in the ventral midbrain region of wild-type (E) and *Nurr1*^{-/-} mice (F). Notice the increase in TUNEL positive nuclei (arrowheads) and dying cells (asterisk) in the *Nurr1*^{-/-} mice. (Bars = 20 μ m.)

mesencephalic dopaminergic precursor cells as well as their terminal differentiation into dopamine producing cells.

DISCUSSION

In this study, we have demonstrated that the role of *Nurr1* in dopaminergic cell development is specific to the ventral mid-brain where it is essential to induce final differentiation of ventral mesencephalic dopaminergic precursor neurons into a dopaminergic phenotype as well as for survival of these late dopaminergic precursors.

The expression of *Ptx-3* in developing dopaminergic cells coincident with the onset of expression of a fully differentiated dopaminergic phenotype provides an excellent marker for late dopamine progenitor cells in the mid-brain (22). *Ptx-3* is a novel homeodomain-related homeobox gene product that is strongly expressed in dopaminergic cells of the ventral mid-brain at the time of their differentiation, suggesting that the protein may be involved in determination of the mesencephalic dopaminergic lineage (22). Expression of *Ptx-3* and *nurr1* persists in midbrain dopaminergic neurons of the adult, indicating that both proteins may be involved in maintenance of dopamine cell function in the adult brain. The strong expression of *Ptx-3* in the ventral mid-brain of *Nurr1*^{-/-} embryos indicates that induction of expression of this protein and the development of late dopamine precursor neurons are independent of *Nurr1*. In contrast, *Nurr1* is essential for induction of a dopaminergic phenotype in *Ptx-3* positive precursor neurons. In this regard, it is possible that *Ptx-3* and *Nurr1*, although regulated independently, may function in a cooperative manner to regulate factors required for terminal differentiation of dopaminergic neurons. Consistent with this hypothesis, cooperative interactions between a nuclear orphan receptor (FTZ-F1) and a homeodomain protein (FTZ) have been demonstrated recently (33, 34). In the case of *Nurr1*, such cooperative interactions may explain the specificity of the neuronal defects in midbrain dopaminergic neurons because *Ptx-3* is not expressed in other *Nurr1*-containing neurons, including the limbic system and dopaminergic neurons of the olfactory bulb and hypothalamus (20, 21).

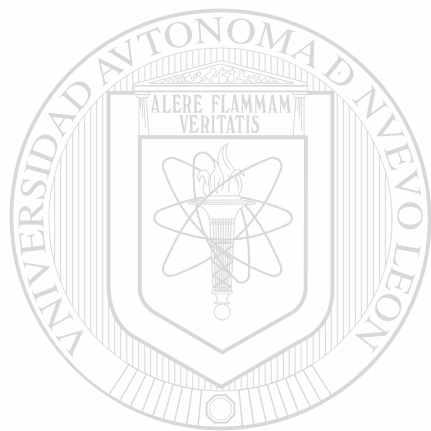
The observation that *Nurr1* is essential for maintenance of *Ptx-3* positive progenitors raises speculation as to the role of *Nurr1* in dopaminergic cell survival. Increased cell death in *Nurr1*^{-/-} neonates may simply be due an inability of undifferentiated dopamine progenitors to make synaptic contacts with their targets. Previous studies using mutant mice in which TH was ablated in dopaminergic neurons have indicated that dopamine-mediated signaling does not appear to be required for functional synaptogenesis of neuronal projections from the substantia nigra to the striatum (35). However, it cannot be ruled out that loss of all markers of the dopaminergic phenotype as is observed in the *Nurr1* null mutant mice has an impact on the establishment of such connections. A second possibility is that *Nurr1* may be required for the expression of factors that promote survival as well as differentiation of dopamine progenitors. Dopaminergic cell survival is known to be regulated by the neurotrophins, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 4/5 (36–38) and by members of the TGF β family of trophic factors, most notably glial-derived neurotrophic factor (GDNF) (39, 40). The trophic effects of these factors on dopamine cell survival are apparently redundant because ablation of individual members of these families or their receptors does not result in dopamine cell loss (41–43). However, the role of these factors in promoting survival and differentiation of late dopamine precursor neurons is unknown. A role for *nurr1* in regulation of survival of both dopamine precursors and differentiated dopaminergic cells at least in part through regulation of these factors and/or their receptors is supported by the observation that ablation of *Nurr1* results in loss of expression of the tyrosine kinase signal

transducing receptor for GDNF, c-ret (19) and by the identification of binding sites for *Nurr1* in the promoter region of the BDNF gene (44). Thus, it is possible that *Nurr1* may be a transcriptional regulator of several of these genes. Further studies to examine the role of *Nurr1* in the regulation of neurotrophic factors and their receptors should provide important insights into the role of *Nurr1* in dopaminergic cell commitment and survival.

We gratefully acknowledge Silvia Briones for mouse breeding and genotyping and Aileen Ward for her help with photography and imaging. This work was supported by National Institutes of Health Grant DK-52429 to U.M.C. and by the Korczak Foundation for Autism and Related Disorders (M.P.S.).

1. Bjorklund, A. & Lindvall, O. (1984) in *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, eds. Bjorklund, A. & Huitfeldt, T. (Elsevier, Amsterdam), pp. 55–122.
2. Lindvall, O. & Bjorklund, A. (1983) in *Chemical Neuroanatomy*, eds. Emswiler, P. C. (Raven, New York), pp. 229–255.
3. Hirsch, E. C., Graybiel, A. M. & Agid, Y. A. (1988) *Nature (London)* 334, 345–348.
4. Self, D. W. & Nestler, E. J. (1995) *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 463–495.
5. Seeman, P., Guan, H. C. & Van Tol, H. H. M. (1997) *Nature (London)* 365, 441–445.
6. Ritz, M. C., Lamb, R. J., Goldberg, S. R. & Kuhar, M. J. (1987) *Science* 237, 1219–1223.
7. Koob, G. F. (1997) *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 177–184.
8. Hynes, M., Poulson, K., Tessier-Lavigne, M. & Rosenthal, A. (1995) *Cell* 80, 95–101.
9. Hynes, M., Porter, J. A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P. A. & Rosenthal, A. (1995) *Neuron* 15, 35–44.
10. Wang, M. Z., Jin, P., Bumerot, D. A., Margo, V., McMahon, A. P., Wang, E. A., Woolf, T. & Pang, K. (1995) *Nature Med.* 1, 1184–1188.
11. Hynes, M., Stone, D. M., Dowd, M., Pitts Meek, S., Goddard, A., Gurney, A. & Rosenthal, A. (1997) *Neuron* 19, 15–26.
12. Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A. & McMahon, A. P. (1993) *Cell* 75, 1417–1430.
13. Ericson, J., Muhr, I., Flazcek, M., Lints, T., Jessell, T. M. & Edlund, T. (1993) *Cell* 81, 747–756.
14. Sasaki, H. & Hogau, B. L. M. (1993) *Development (Cambridge, U.K.)* 118, 47–59.
15. Solberg, Y., Silverman, W. F. & Pollack, Y. (1993) *Dev. Brain Res.* 73, 91–97.
16. Law, S. W., Conneely, O. M., DeMayo, F. J. & O'Malley, B. W. (1992) *Mol. Endocrinol.* 6, 2129–2135.
17. Tsai, M.-J. & O'Malley, B. W. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63, 451–486.
18. Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. & Evans, R. M. (1995) *Cell* 83, 835–839.
19. Zetterstrom, R. H., Selman, L., Jansson, L., Hoffer, B., Olson, L. & Perlmann, T. (1997) *Science* 276, 248–250.
20. Saucedo-Cardenas, O. & Conneely, O. M. (1996) *J. Mol. Neurosci.* 7, 1–11.
21. Zetterstrom, R. H., Williams, R., Perlmann, T. & Olson, L. (1996) *Mol. Brain Res.* 41, 111–120.
22. Smid, M. P., van Schaick, H. S. A., Lanet, C., Tremblay, J. J., Cox, J. J., van der Kleij, A. A. M., Wolterink, G., Diouin, J. & Buchach, J. P. H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13305–13310.
23. Saucedo-Cardenas, O., Kardon, R., Ediger, T. R., Lydon, J. P. & Conneely, O. M. (1997) *Gene* 187, 135–139.
24. Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R. & Bradley, A. (1991) *Cell* 64, 693–702.
25. Mansour, S. L., Thomas, K. R. & Capococchi, M. R. (1988) *Nature (London)* 336, 348–352.
26. Robertson, E. J. (1987) in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, ed. Robertson E. J. (IRL, Oxford, U.K.), pp. 71–112.
27. McMahon, A. P. & Bradley, A. (1990) *Cell* 62, 1073–1085.

28. Church, G. M. & Gilbert, W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1995.
29. Bestwick, J. R. & Le, W. D. (1997) *Anal. Biochem.* **192**, 125-130.
30. Lin, P. Y. T., Bulawa, M. C., Wong, P., Lin, L., Scott, J. & Blank, C. L. (1984) *J. Liquid Chromatogr.* **7**, 509-514.
31. Fonnum, F. (1975) *J. Neurochem.* **24**, 407-409.
32. Yamada, T., Plazcek, M., Tanaka, H., Dodd, J. & Jessel, T. M. (1991) *Cell* **64**, 635-647.
33. Yu, Y., Li, W., Su, K., Yussa, M., Han, W., Perrimon, N. & Pick, L. (1997) *Nature (London)* **385**, 552-555.
34. Guichet, A., Copeland, J. W., Erdelyi, M., Hlousek, D., Zavorszky, P., Ho, J., Brown, S., Percival-Smith, A., Krause, H. M. & Ephraussi, A. (1997) *Nature (London)* **385**, 548-552.
35. Zhou, Q. Y. & Palmiter, R. D. (1995) *Cell* **83**, 1197-1209.
36. Hynes, M. A., Poulsen, K., Armanini, M., Berkemeier, L., Phillips, H. & Rosenthal, A. (1994) *J. Neurosci. Res.* **37**, 144-154.
37. Hyman, C., Hofer, M., Bardic, Y., Juhász, M., Yancopoulos, G., Squinto, S. & Lindsay, R. (1991) *Nature (London)* **350**, 230-232.
38. Knusel, B., Winslow, J. W., Rosenthal, A., Burton, L. E., Seid, D. P., Nienhies, K. & Heftli, F. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 961-965.
39. Lin, L.-F. H., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S. & Collins, F. (1993) *Science* **260**, 1130-1132.
40. Choi Lundberg, D. L., Lin, Q. L., Chang, Y.-N., Chiang, Y. L., Hay, C. M., Mohajeri, H., Davidson, B. L. & Bohn, M. C. (1997) *Science* **275**, 838-840.
41. Snider, W. (1994) *Cell* **77**, 627-638.
42. Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A.-C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E. J., Huang, S. P., Saarma, M., Hoffer, B. J., Sariola, H. & Westphal, H. (1996) *Nature (London)* **382**, 73-75.
43. Moore, M. W., Klein, R. D., Farinas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Reichardt, L. P., Ryan, A. M., Carver Moore, K. & Rosenthal, A. (1996) *Nature (London)* **382**, 76-79.
44. Shintani, A., Ono, Y., Kaisho, Y. & Igarashi, K. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 325-332.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

