

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANALISIS DEL PATRON DE EXPRESION DE UN GEN
CUYA EXPRESION ES AFECTADA POR LA
INACTIVACION DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCION NURR1**

Por

Q.F.B. DIANA LAURA CASTILLO CARRANZA

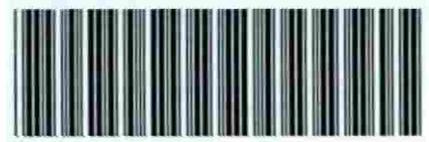
**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
con Especialidad en Morfología**

Febrero, 2002

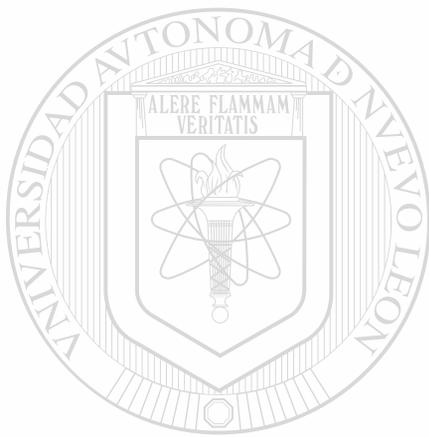
5-13-56

Q.F.B. DIANA LAURA CASTILLO CARRANZA

5-13-56



1080113111



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE UN GEN CUYA EXPRESIÓN
ES AFECTADA POR LA INACTIVACIÓN DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN NURR1**

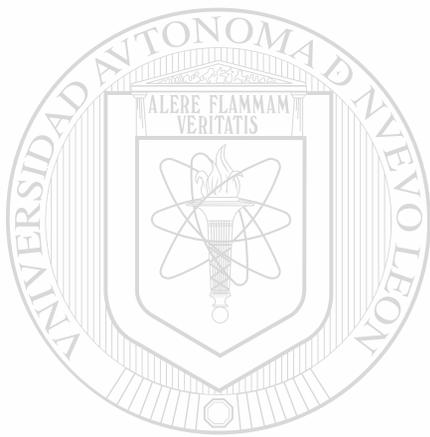
Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Q.F.B. DIANA LAURA CASTILLO CARRANZA

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

Febrero, 2002



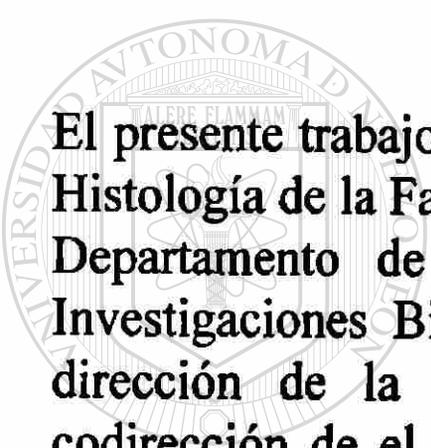
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL y en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la codirección de el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y el Dr Roberto Montes de Oca Luna.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**ANÁLISIS DEL PATRON DE EXPRESIÓN DE UN GEN CUYA EXPRESIÓN
ES AFECTADA POR LA INACTIVACION DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCION NURR1**

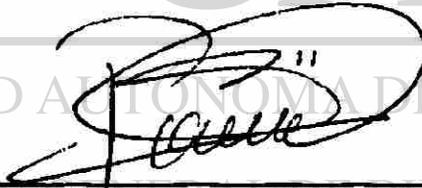
Aprobación de la Tesis:



DRA. ODILA SAUCEDO CARDENAS
Director de Tesis



DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Co-Director de Tesis



DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Comisión de Tesis

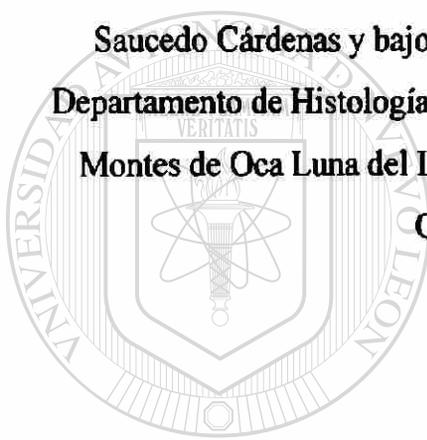


DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
De Investigación y Estudios de Posgrado

**ANALISIS DEL PATRON DE EXPRESION DE UN GEN CUYA EXPRESION
ES AFECTADA POR LA INACTIVACION DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCION NURRI**

Presentado por la Q.F.B. Diana Laura Castillo Carranza

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y bajo la co-dirección de el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL y el Dr. Roberto Montes de Oca Luna del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL



UANL

Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Director

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dr. Julio Sepúlveda Saavedra
Co-Director

Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Co-Director

DEDICATORIA

A mis padres

A quienes les debo todo lo que soy y a quienes no me alcanzaría la vida para agradecerles lo mucho que de ellos he recibido.

A mis hermanos

Enrique y Jesús por estimularme a salir adelante y brindarme su apoyo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mis sobrinos

**Anaid, Enrique y Jesús, aunque algunas veces me pregunto:
¿Dónde está Herodes?**

A mi familia

Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

En la vida de cada persona siempre existen “ángeles” que nos motivan a ser mejores seres humanos, los míos son mis padres.

A mi madre, la Sra. Ma. Lucila Carranza de Castillo, agradezco todo su apoyo, consejos y el compartir mis sueños.

A mi padre, el Sr. Santos Castillo Campos, de quien aprendí que todo cuanto se desea en la vida se puede lograr con esfuerzo y tenacidad.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, por aceptarme en el postgrado y sobre todo por la confianza que ha depositado en mí y el apoyo brindado para sacar adelante este trabajo.

A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas por todo lo que de ella he aprendido, por su entusiasmo, pero sobre todo por su amistad.

A la Dra. Rocío Ortiz López por formar parte de mi comisión de tesis.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, a la Dra. Raquel Ballesteros, al Dr. Norberto López y al maestro Viktor Romero, por su ayuda en diferentes etapas de la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio del CIBIN: Carlos, Blanca, Perú, Catalina, Maribel y clonito, por hacer de esas horas de trabajo toda una aventura y un momento de diversión.

A mis compañeros de maestría, Carmen, Gloria y Rafa, por los buenos momentos. En especial a Marcos por lo importante que ha sido en mi vida.

A mis amigas, Marisela, América, Lucy, Francis y Lety por que siempre es posible contar con ellas.

Al personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL y al personal del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, por facilitar sus instalaciones para la realización de este trabajo.

INDICE

CONTENIDO

PAGINA

LISTA DE TABLAS

i

LISTA DE FIGURAS

ii

NOMENCLATURA

iii

RESUMEN

iv

CAPITULO 1. INTRODUCCION

1.1	Superfamilia de receptores nucleares	3
1.2	Subfamilia Nurr	3
1.3	Nurr1 (Nur relacionado al factor 1)	5
1.3.1	Organización estructural del gen Nurr1	6
1.3.2	Knock-out Nurr1	7
1.4	Justificación	11
1.5	Objetivos	12
1.5.1	Objetivo general	12
1.5.2	Objetivos específicos	12
1.6	Estrategia experimental	13

CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS

2.1	Material	14
2.1.1	Origen de los reactivos	14
2.1.2	Material biológico.	15
2.2	Equipo	15
2.3	Métodos.	16
2.3.1	Obtención del material histológico	16
2.3.1.1	Diseción de cerebros de ratones RN	16

2.3.1.2	Obtención de embriones CD1	16
2.3.1.3	Inclusión en parafina	17
2.3.1.4	Obtención de cortes histológicos	17
2.3.1.5	Desparafinación de secciones histológicas	18
2.3.2	Obtención y cuantificación del DNA	18
2.3.2.1	Extracción de DNA genómico	18
2.3.2.2	Extracción de DNA plasmídico	19
2.3.2.2.1	Pequeña escala (Mini-preparación de plásmidos)	19
2.3.2.2.2	Gran escala (Maxi-preparación de plásmidos)	20
2.3.2.3	Análisis electroforético y cuantificación de DNA	21
2.3.3	Obtención del genotipo	22
2.3.3.1	PCR	22
2.3.4	Subclonación	23
2.3.4.1	Digestión con enzimas de restricción	23
2.3.4.2	Purificación de fragmentos	23
2.3.4.3	Ligación	24
2.3.4.4	Transformación	24
2.3.5	Síntesis de sondas para los ensayos de hibridación <i>in situ</i>	25
2.3.5.1	Síntesis y marcaje de la sonda OS40	25
2.3.5.2	Síntesis y marcaje de la sonda Nurr1	26
2.3.6	Hibridación <i>in situ</i>	26
2.3.6.1	Hibridación <i>in situ</i>	26
2.3.6.2	Autorradiografía	27
2.3.6.3	Emulsión de Kodak	27
2.3.6.4	Revelado y fijación de las secciones histológicas	27
2.3.6.5	Tinción de las secciones	28
2.3.7	Obtención del material fotográfico	28

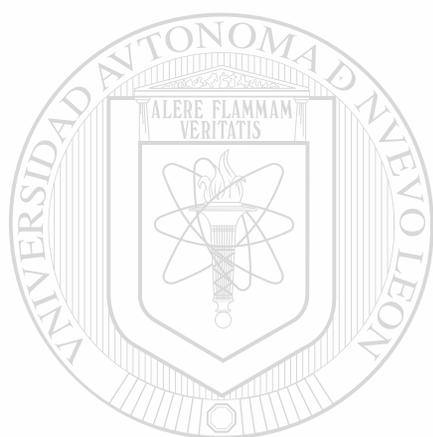
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

CAPITULO III. RESULTADOS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.1	Obtención del genotipo de ratones recién nacidos	29
3.2	Subclonación de la secuencia OS40 en el vector pCRII	30
3.3	Hibridación <i>in situ</i>	31
3.3.1	Comparación de la expresión de OS40 en cerebros de ratones knock-out y silvestres	32
3.3.1.1	Expresión de OS40 en cerebros de ratones silvestres	32
3.3.1.2	Expresión de OS40 en cerebros de ratones knock-out Nurr1.	32
3.3.2	Análisis del patrón de expresión de OS40 en el desarrollo embrionario	33
3.3.2.1	Expresión de OS40 en embriones de 8.5 días de desarrollo	34
3.3.2.2	Expresión de OS40 en embriones de 9.5 días de desarrollo	34
3.3.2.3	Expresión de OS40 en embriones de 10.5 días de desarrollo	35
3.3.2.4	Expresión de OS40 en embriones de 11.5 días de desarrollo	37
3.3.2.5	Expresión de OS40 en embriones de 12.5 días de desarrollo	38
3.3.2.6	Expresión de OS40 en embriones de 13.5 días de desarrollo	39
3.3.2.7	Expresión de OS40 en embriones de 14.5 días de desarrollo	40

3.3.2.8	Expresión de OS40 en embriones de 16.5 días de desarrollo .	42
3.3.2.9	Expresión de OS40 en embriones de 18.5 días de desarrollo .	44
CAPITULO IV. DISCUSION DE RESULTADOS		47
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIONES		
5.1	Conclusiones	53
5.2	Contribuciones	54
CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA		55



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



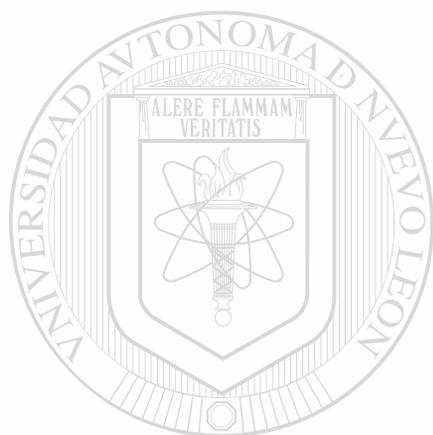
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

PAGINA

Tabla 1. Genotipificación: condiciones de reacción22

Tabla 2. Patrón de expresión de OS40 durante el desarrollo embrionario46



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS**PAGINA**

Figura 1. Organización estructural del gen Nurr1	6
Figura 2. Estrategia experimental	13
Figura 3. Determinación del genotipo de ratones recién nacidos	30
Figura 4. Subclonación	31
Figura 5. Expresión de la sonda OS40 en cerebros de ratones silvestres	32
Figura 6. Confirmación de la ausencia de expresión de la sonda OS40 en cerebros de ratones recién nacidos knock-out Nurr1	33
Figura 7. Expresión de OS40 en un embrión de 8.5 días	34
Figura 8. Expresión de OS40 en un embrión de 9.5 días	35
Figura 9. Expresión de OS40 en un embrión de 10.5 días	36
Figura 10. Expresión de OS40 en embriones de 11.5 días	37
Figura 11. Expresión de OS40 en embriones de 12.5 días	38
Figura 12. Expresión de OS40 en un embrión de 13.5 días	39
Figura 13. Expresión de OS40 en un embrión de 14.5 días	41
Figura 14. Expresión de OS40 en un embrión de 16.5 días	43
Figura 15. Expresión de OS40 en un embrión de 18.5 días	45

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

DNA	Acido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario al RNA mensajero
EDTA	Acido etilen diamino tetracético
RNA	Acido ribonucleico
a.a.	Amino ácidos
KCl	Cloruro de potasio
μ M	Concentración micromolar
mM	Concentración milimolar
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato
ddPCR	Despliegue diferencial de RNAs mensajeros
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
μ g	Microgramo
Kb	Kilobases
KO	Knock-out
<hr/>	
UV	Luz ultravioleta
μ Ci	Micro curie
μ L	Micro litro
mL	Mililitro
mQ	MiliQ
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RNA _t	RNA de transferencia
RNA _m	RNA mensajero
SNC	Sistema nervioso central
TH	Tirosina hidroxilasa

RESUMEN

Diana Laura Castillo Carranza
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Febrero de 2002

**Título del estudio: ANALISIS DEL PATRON DE EXPRESION DE UN GEN CUYA
EXPRESION ES AFECTADA POR LA INACTIVACION DEL
FACTOR DE TRANSCRIPCION NURR1**

Número de páginas: 59

**Candidata para el grado de Maestría en
Ciencias con Especialidad en Morfología**

Area de estudio: Morfología

Objetivo y Método del estudio: La inactivación del factor de transcripción Nurr1, generó un modelo animal carente de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, mismas que fracasan en la enfermedad de Parkinson. En el presente estudio se trabajó con una secuencia de cDNA (OS40) que fue obtenida mediante la técnica del despliegue diferencial de RNAs mensajeros (ddPCR), al comparar los patrones de expresión entre ratones recién nacidos silvestres y mutantes para el gen Nurr1 (Knockout). La secuencia OS40 de interés, ausente en los ratones Knockout Nurr1, se aisló a partir de la región mesencefálica de ratones silvestres recién nacidos. La secuencia OS40 posee una alta homología con la secuencia de un gen humano de función desconocida. La secuencia OS40 se utilizó como sonda para nuestros análisis de expresión mediante hibridación in situ. El objetivo del presente trabajo consistió en la confirmación de la ausencia de expresión de la secuencia OS40 en el knockout Nurr1 y la obtención de su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario del ratón.

Contribuciones y conclusiones: Nosotros confirmamos la ausencia de este gen nuevo en la región ventral mesencefálica de ratones recién nacidos knockout Nurr1 y obtuvimos su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario del ratón. La expresión de este nuevo gen, comienza a partir del día 8.5 a lo largo del neuroepitelio. Su expresión se mantiene en el cerebro hasta el estado de recién nacido, no así en los otros órganos como el hígado, riñón, timo, pulmón e intestino, donde la expresión de OS40 se asocia con el inicio de la diferenciación celular de estos órganos y termina cuando están en su etapa de maduración. Entre otros órganos donde encontramos expresión para OS40 se encuentran, el epitelio nasal, la lengua, y pulpa dental. Nuestros estudios de expresión demuestran que este gen nuevo podría estar involucrado en los procesos de proliferación y/o diferenciación celular. Y aún lo más interesante es que pudiera tener un papel importante en la diferenciación y/o mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en conjunto con el gen Nurr1. Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan conocimiento nuevo en el área de investigación básica.



Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Asesor

CAPITULO I

INTRODUCCION

El tejido nervioso es uno de los más complejos en cuanto a función y composición celular. Mientras que otros tejidos están constituidos por algunos diferentes tipos de células, el sistema nervioso está constituido por billones de neuronas conectadas unas a otras en una compleja red, que es sustentada metabólicamente por las células gliales. Gracias a la red de conexiones existentes entre neurona y neurona así como la relación con cada uno de los órganos que constituyen a un individuo, el sistema nervioso, tiene la capacidad de recibir, transmitir, elaborar y almacenar una gran cantidad de información. Cuando existe alguna alteración metabólica o física que interrumpa esa comunicación de manera anormal, se pueden producir alteraciones muy severas.

En la actualidad existe un considerable número de enfermedades del sistema nervioso que atañen al hombre y aún se desconoce la etiología de la mayoría de ellas. Entre ellas podemos encontrar desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington. En la enfermedad de Parkinson actualmente no se conoce cual es el mecanismo molecular que conlleva a la

Análisis del patrón de expresión de un gen cuya expresión es afectada por la inactivación del factor de transcripción Nurr1 en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Ni existen alternativas efectivas para los individuos que la padecen.

Sin embargo, gracias al avance de la biología molecular se han podido utilizar modelos animales de éste y otros desórdenes neurodegenerativos, con la finalidad de buscar alternativas desde un punto de vista molecular que pudieran ayudar al entendimiento de los mecanismos moleculares de estos padecimientos y a la solución de ellos, en un futuro no muy lejano. En ellos se está investigando una serie de proteínas relacionadas con la funcionalidad de las neuronas, como son factores de crecimiento, de diferenciación, de migración, de transcripción, entre otros. Mediante la inactivación del factor de transcripción Nurr1¹⁻⁴ se generó un modelo animal murino carente de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, mismas que degeneran en la enfermedad de Parkinson. Este modelo animal generado se ha utilizado en análisis de expresión comparativas con ratones silvestres, para encontrar genes candidatos involucrados en la patología de la enfermedad de Parkinson. Recientemente, se aislaron mediante un despliegue diferencial de RNAs mensajeros (ddPCR), algunas clonas conteniendo secuencias de genes de la región mesencefálica que pudieran estar afectados por la ausencia del factor de transcripción Nurr1. Se piensa que estas secuencias alteradas, pueden ser parte de genes que están relacionados con el mantenimiento y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. En el presente trabajo, se obtuvo el patrón de expresión durante el desarrollo embrionario del ratón por hibridación *in situ*, de uno de estos genes aislados mediante ddPCR.

1.1 Superfamilia de receptores nucleares

Los receptores nucleares constituyen una gran familia de factores de transcripción, inducidos por ligando, entre los que se incluyen, receptores para hormonas esteroideas (estrógenos, progesterona, glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos), tiroideas y ciertas vitaminas liposolubles (vitamina D, ácido retinoico, 9-cis ácido retinoico y ecdisona). Están relacionados con procesos fisiológicos y del desarrollo, como respuesta a una gran variedad de señales químicas.⁵⁻⁷

Estos receptores nucleares han sido agrupados en subfamilias de genes hermanos con base en su homología estructural mediante la generación de sondas elaboradas, explotando el alto grado de conservación dentro del dominio de unión al DNA. En la actualidad se han identificado más de 30 subfamilias.^{8,9}

1.2 Subfamilia Nurr

Una de estas subfamilias es la subfamilia Nurr constituida por Nurr77¹⁰ (NGFI-B y NAK-1¹¹⁻¹³), NOR1 (MINOR y TEC¹⁴⁻¹⁶) y Nurr1 (RNR-1¹⁷ y NOT¹⁸). Estructuralmente estos receptores nucleares poseen dos dominios importantes. Un dominio de unión al DNA (cercano al extremo amino terminal) donde poseen una similitud en más del 90% de los aminoácidos de su secuencia, región muy conservada¹⁹. En ese dominio existen dos dedos de zinc, característica de los miembros de esta subfamilia, y un segundo dominio cercano al carboxilo terminal, el dominio de unión al

Análisis del patrón de expresión de un gen cuya expresión es afectada por la inactivación del factor de transcripción Nurr1

ligando. En este dominio la proteína contiene secuencias requeridas para la dimerización,^{20,21} para la transrepresión y activación dependiente de ligando.²²⁻²⁴ Además de las regiones AF1 situada en el amino terminal y la AF2 situada en el carboxilo terminal. La región AF2, contiene una α -hélice anfipática, de gran importancia para la actividad transcripcional, que resulta en un cambio conformacional una vez que el receptor nuclear se une a su ligando²⁵⁻²⁷.

Si bien, a la mayoría de los receptores nucleares se les ha identificado un ligando, hay algunos otros cuyo ligando aún se desconoce. A estos receptores nucleares se les ha designado, receptores nucleares huérfanos²⁸. La familia Nurr pertenece a esta clase de receptores nucleares. Debido a que no se conoce una señal química o ligando que module la actividad transcripcional de los miembros de la familia Nurr, se piensa que al igual que otros receptores nucleares, son activados por un ligando hidrofóbico que difunde a través de la célula, el cual activa al receptor nuclear para que pueda iniciar la transcripción de algún gen blanco. Estos factores pueden iniciar la transcripción en forma de monómeros^{29,30} o bien como dímeros.²²⁻²⁴ Nurr1 y Nurr77 forman heterodímeros con un receptor del ácido retinoico, el 9-cis (RXR)³¹. Los miembros de la subfamilia Nurr se unen a secuencias de DNA llamada elementos de respuesta hormonales (HREs), de las cuales se conocen AAACGTG y AAAGAACA.³²⁻³⁵

Nurr77 fue el primer receptor nuclear conocido de esta familia y se identificó como un factor de crecimiento neuronal (NGF), por esta razón también se le llamó NGFI-B.

Su expresión es inducida por una gran variedad de estímulos, incluyendo factores de crecimiento³⁶⁻³⁷ despolarización de membrana por neurotransmisores³⁸ y KCl. Se expresa en sistema nervioso, células T en apoptosis, testículo, ovario y músculo.³⁹ El otro miembro de la subfamilia, NOR-1, fue identificado como un gen fuertemente expresado en células neuronales en apoptosis del cerebro anterior⁴⁰; en corteza adrenal, medula espinal y núcleo caudado/putámen en el cerebro⁴¹. Mientras que Nurr1, ha sido identificado como un gen específico del Sistema Nervioso Central, es decir se expresa en cerebro, medula espinal y bulbo olfatorio, con excepción de los labios donde también se expresa durante el desarrollo embrionario. También se ha identificado expresión de Nurr1 en hígado en regeneración¹⁷ y en la corteza suprarrenal en respuesta a la estimulación por la hormona adrenocorticotropina¹⁸. Recientemente se indujo la expresión de Nurr1 en células de hueso mediante la estimulación por la hormona paratiroides.⁴⁴

Nurr1 comienza a expresarse a partir del día 10.5 del desarrollo embrionario en el cerebro del ratón. Se expresa en las principales divisiones del cerebro, tanto en poblaciones de neuronas motoras, como sensoriales. Con una intensa expresión en la región ventral mesencefálica, donde es requerido para la generación del fenotipo dopaminérgico de las neuronas de este sitio. Si bien, no es esencial para la determinación del fenotipo neuronal, si lo es en etapas posteriores de diferenciación para fenotipos específicos de neuronas. Lo anterior fue demostrado al hacer un marcaje con

Análisis del patrón de expresión de un gen cuya expresión es afectada por la inactivación del factor de transcripción Nurr1 con BrdU y Nestina, marcadores de proliferación celular. La expresión de Nurr1 se localizó en la zona intermedia del tubo neural, fuera de la región ventricular o de proliferación, donde se localizaron la expresión de los marcadores Nestina y BrdU, es decir, Nurr1 se expresa células postmitóticas (neuroblastos).⁴⁴

1.3.1 Organización estructural del gen Nurr1

El cDNA del gen Nurr1 fue aislado de una biblioteca de DNA de cerebro de ratón. Mide 7.6 kb y esta organizado en 8 exones. En el exón 3 se encuentra el codón de inicio. El exón 5, codifica para un dominio no conservado, que se piensa funciona como dominio de unión al DNA. Los exones 6 y 7 codifican para secuencias involucradas en la dimerización y un supuesto dominio de unión al ligando. En el exón 8, esta el codón de terminación. El dominio conservado de unión al DNA esta en los exones 3 y 4. Este gen codifica para una proteína de 598 a.a. de longitud con un peso calculado de 66 kDa.

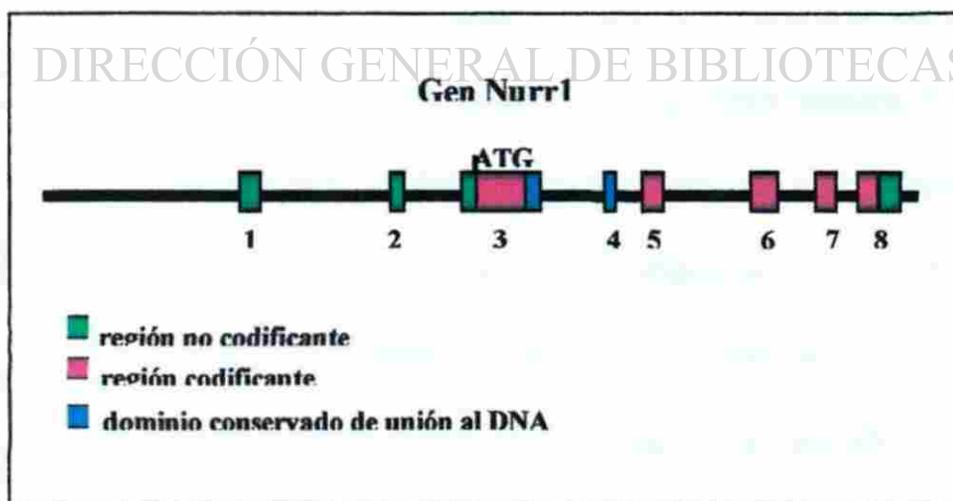


Figura 1. Organización estructural del gen Nurr1

1.3.2 Knock-out Nurr1

Una vez conocida la organización del gen Nurr1, se crearon ratones carentes de la función de este gen mediante recombinación homóloga. Los ratones recién nacidos homocigotos mutados (-/-) o knock-out, fisiológicamente son hipoactivos, carecen de la capacidad de succión ya que no se observa leche en su estómago, y mueren durante las primeras 12 horas de vida. Para descartar que la muerte de estos ratones era debida a una deficiencia respiratoria y no a problemas de alimentación, a los knock-out Nurr1 recién nacidos, se les administraron 50 μ L de glucosa al 10% en solución salina, cada 8 horas. Los ratones lograron sobrevivir de 30 a 50 horas. Estos resultados indicaron que la muerte no se debió a problemas respiratorios y que la falta de alimento ocasionada por la incapacidad de succión era la responsable de la muerte del ratón knock-out Nurr1.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Al hacer un análisis microscópico de cortes histológicos de los cerebros de esos ratones, encontraron que la inactivación del gen Nurr1 había afectado la Sustancia negra y el área ventral tegmentaria, es decir la región ventral del mesencéfalo, en el cerebro medio. Región que es rica en neuronas dopaminérgicas. En este sitio se observó la presencia de cuerpos apoptóticos, mientras que otras poblaciones de neuronas dopaminérgicas donde también se expresa Nurr1, no estaban alteradas^{1,3,4}.

Los análisis de TUNEL mostraron apoptosis al día 18.5 del desarrollo embrionario en la zona intermedia del tubo neural. Se piensa que las células neuronales no tuvieron la capacidad de migrar hacia la zona marginal del tubo neural, sitio normal de migración de los cuerpos neuronales. Al no poder migrar, las células no pudieron recibir soporte neurotrófico necesario para la supervivencia y mantenimiento de las mismas⁴³.

Con base en el efecto que la inactivación del gen Nurr1 había tenido sobre el mesencéfalo ventral, se hizo un análisis de la expresión de marcadores genéticos, específicos de esta región. Para ello se utilizaron los marcadores TH (tirosina hidroxilasa) y PTX-3. La TH es una enzima que interviene en el metabolismo del neurotransmisor dopamina. En el que la tirosina es convertida a DOPA por la TH, y la DOPA a dopamina por una descarboxilasa. La TH comienza a expresarse al día 11.5 del desarrollo embrionario en el ratón, es decir posterior a la expresión del gen Nurr1. El marcador PTX-3, producto de un gen homeótico, es fuertemente expresado en células dopaminérgicas en diferenciación de la parte ventral del cerebro medio, lo que sugiere que puede estar relacionado con la determinación del linaje dopaminérgico mesencefálico⁴⁴. Cuya expresión inicia al día 11.5 del desarrollo embrionario en el ratón. En el embrión de ratón knock-out Nurr1 se observó expresión de Ptx-3 al día 11.5. Esto significa que en la etapa de diferenciación temprana, estas neuronas no son afectadas por la inactivación de Nurr1. Mientras que en el recién nacido, en el mesencéfalo ventral no hubo expresión de PTX-3. Sin embargo, no se encontró expresión de TH ni durante el

Análisis del patrón de expresión de un gen cuya expresión es afectada por la inactivación del factor de transcripción Nurr1

desarrollo embrionario ni en el recién nacido, lo que sugiere que las células de la región ventral del mesencéfalo no lograron adquirir el fenotipo dopaminérgico.

Las neuronas del mesencéfalo ventral son las principales productoras de dopamina. Intervienen en el control de movimientos voluntarios y participan en actividades cognitivas y emocionales. Su degeneración ha sido asociada con la enfermedad de Parkinson, enfermedad en la que degeneran el mismo tipo de neuronas que en el ratón knock-out Nurr1.

Actualmente, las posibilidades terapéuticas con las que cuentan los pacientes con enfermedad de Parkinson, están relacionadas con la administración de la droga L-Dopa. Este fármaco es transformado en el tejido cerebral a Dopamina. Sin embargo este tratamiento solo es efectivo por un tiempo limitado, ya que los pacientes con Parkinson, requieren cada vez una dosis más alta y experimentan efectos motores adversos⁴⁵. Otra estrategia terapéutica que se ha empleado, es el trasplante de células progenitoras neurales multipotenciales. La desventaja de este tratamiento radica en que las células no logran adquirir completamente el fenotipo dopaminérgico.

En estudios recientes, en cultivos celulares de células progenitoras neuronales multipotenciales con sobre expresión de Nurr1, que fueron tratadas con diferentes factores de crecimiento, de supervivencia, de mantenimiento, etc., se observó que ninguno logró inducir la expresión de TH. Sin embargo, cuando se co-cultivaron las

Análisis del patrón de expresión de un gen cuya expresión es afectada por la inactivación del factor de transcripción Nurr1

células con astrocitos de la región ventral mesencefálica, se logró que las células neuronales adquirieran el fenotipo dopaminérgico, únicamente fue en presencia de Nurr1. Lo que sugiere que los astrocitos producen alguna proteína, que actúa sobre el receptor nuclear Nurr1 para que realice la transcripción de TH⁴⁵.

Lo anterior demuestra la importancia del factor de transcripción Nurr1, quien ha adquirido una gran importancia como posible fuente de terapia para este desorden neurodegenerativo. Sin embargo, para poder entender como es que la inactivación de este factor de transcripción condujo a la muerte neuronal, es importante conocer los genes blanco, regulados por él. Actualmente, en estudios comparativos entre ratones knock-out y ratones silvestres, y utilizando la técnica del despliegue diferencial de RNAs, se aislaron algunas secuencias génicas afectadas por la inactivación del factor de transcripción Nurr1. Algunas de ellas estaban sobre expresadas mientras que otras no se expresaban.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

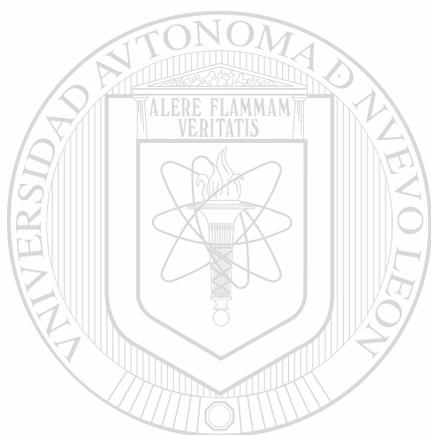
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Una de esas secuencias consta de 294 p.b. (se le ha nombrado OS40) y posee una gran similitud con una secuencia reportada en el genoma humano, cuya función se desconoce. Sin duda alguna estos hallazgos, son una fuente importante de conocimiento, acerca del factor de transcripción Nurr1 y de los genes blanco regulados por él.

1.4 Justificación

Este trabajo forma parte de un proyecto que tiene como meta esclarecer la función de Nurr1 en la región ventral mesencefálica. Nuestros estudios de expresión generarán información sobre un gen posiblemente regulado por Nurr1.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Comparar la expresión de un gen afectado por la inactivación del factor de transcripción Nurr1 en cerebros de ratones recién nacidos knock-out y silvestres. Y obtener su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario.

1.5.2 Objetivos específicos

- 1.- Obtener el genotipo de ratones recién nacidos producto de cruza de ratones heterocigotos para la mutación del gen Nurr1
- 2.- Obtener cortes histológicos de cerebros de ratones recién nacidos knock-out y silvestres.
- 3.- Obtener cortes histológicos de embriones de ratones cepa CD1
- 4.- Subclonar la secuencias de interés en el vector pCRII.
- 5.- Sintetizar sondas de RNA
- 6.- Analizar el patrón de expresión de un gen afectado por la inactivación de Nurr1 mediante hibridación *in situ*.

1.6 Estrategia experimental

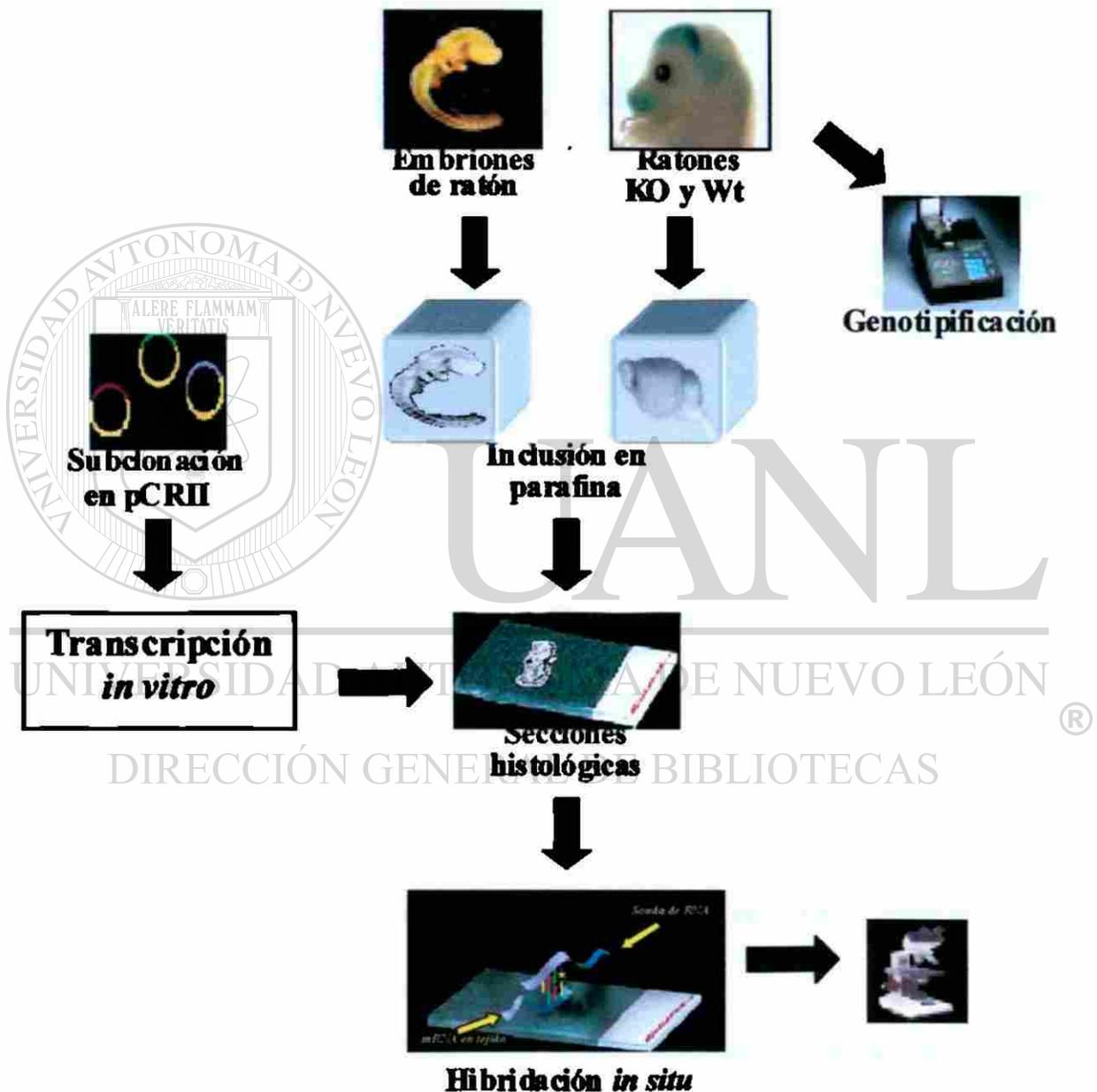


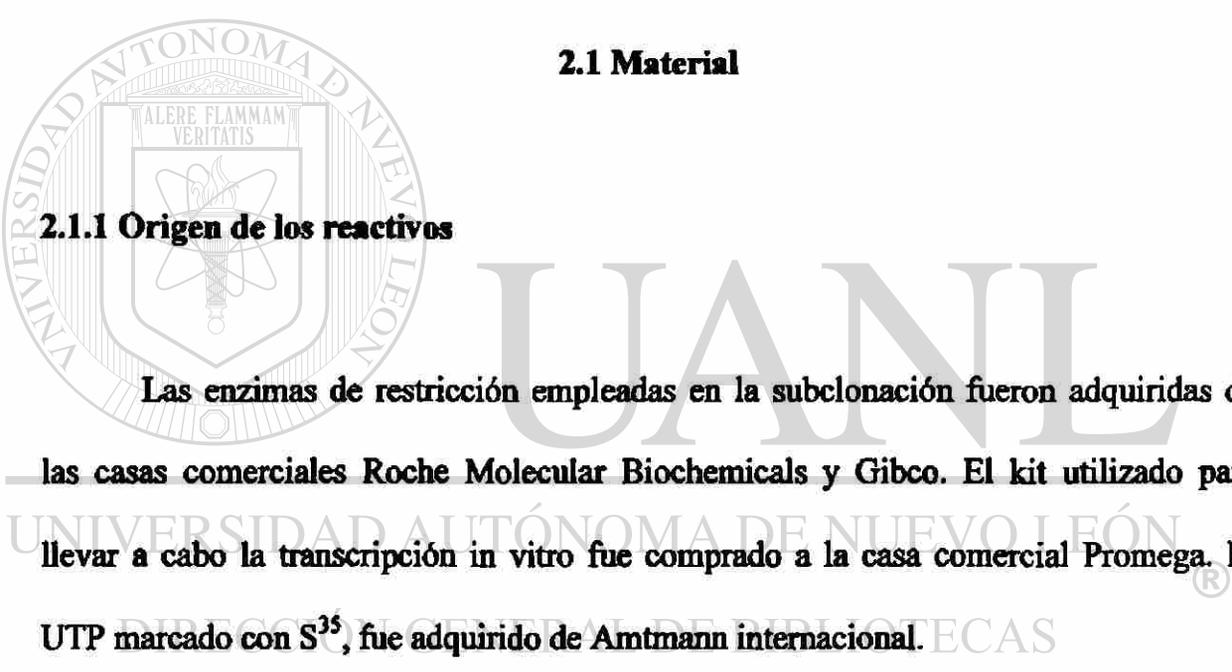
Figura 2. Estrategia Experimental. Se muestran las etapas involucradas en el desarrollo de la investigación: disección de embriones CDI y de cerebros de ratones recién nacidos KO y silvestres; inclusión en parafina, obtención de secciones histológicas e hibridación in situ con sondas de RNA sintetizadas por transcripción in vitro y análisis microscópico de las secciones.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

2.1 Material

2.1.1 Origen de los reactivos



Las enzimas de restricción empleadas en la subclonación fueron adquiridas de las casas comerciales Roche Molecular Biochemicals y Gibco. El kit utilizado para llevar a cabo la transcripción *in vitro* fue comprado a la casa comercial Promega. El UTP marcado con S³⁵, fue adquirido de Ammann internacional.

Los reactivos empleados para la preparación de geles como: agarosa, bromuro de etidio, azul de bromofenol se adquirieron de las casas comerciales DIFCO Laboratories, Sigma Chemical y Merk, respectivamente.

Para los ensayos de hibridación *in situ* se utilizó citrato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, fosfato de sodio, p-formaldehído, trizma, trietanolamina todos ellos de Sigma-Aldrich. Así como cloruro de magnesio, ditioneitol, acetato de amonio, anhídrido acético, de Promega. Para la deshidratación y tinción de las laminillas se utilizó etanol, xilol y hematoxilina, adquiridos de CTR distribuidores.

Los reactivos utilizados para proteger el RNA: RNasa zap se compró a la casa comercial Ambion, y el dietil pirocarbonato (DEPC) a Sigma Aldrich. El RNA₄ es de Boheringer así como la formamida.

2.1.2 Material biológico

Los ratones KO recién nacidos, fueron proporcionados por el departamento de Biología Celular del Baylor College of Medicine de Houston, Texas, E.U.A.

Los ratones de la cepa CD1 son del bioterio del departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL.

Los plásmidos utilizados así como la cepa de bacterias de *Escherichia coli* DH5 α pertenecen al departamento de Genética molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste IMSS.

2.2 Equipo

Para la realización de este trabajo se utilizaron: placa de calentamiento con agitador magnético TROEMNER, horno de temperatura con rango de 30 a 100°C, potenciómetro, balanza analítica, transiluminador UV/luz Bio-vision Spectroline, espectrofotómetro, centrifugas refrigeradas Sorvall y Damon, termociclador (Minicycler Beckman), vortex marca Lab-line, incubadora Caisa, centrifuga Hermle de 1000 a 14000 r.p.m., fuente de poder EC 105, mini cámara para electroforesis horizontal, juego de pipetas calibradas Gilson de 20, 200 y 1000 μ L, microscopio Axiophot con triple

filtro, balanza analítica de 100 gr OHAUS, microtomo, criostato, baños de agua con control de temperatura, incubadora con agitación mecánica marca New Brunswick Scientific.

El equipo utilizado para el análisis de datos esta formado por computadoras ACER y LANIX. Los procesadores de texto utilizados fueron: Microsoft word 2000, procesadores gráficos Microsoft Power Point, Microsoft Photo Editor y Scanner Visioner.

2.3 Métodos

2.3.1 Obtención del material histológico

2.3.1.1 Disección de cerebros de ratones recién nacidos

Se hicieron cruza de ratones heterocigotos Nurr1. Los ratones recién nacidos producto de esas cruza, se sacrificaron por decapitación y se aisló DNA genómico a partir de un fragmento de tejido para obtener su genotipo (silvestres y knock-out Nurr1) mediante PCR. Se hizo la disección de los cerebros, se lavaron con PBS 1X, y se procesaron para su inclusión en parafina.

2.3.1.2 Obtención de embriones CD1

Para la obtención de embriones de la cepa CD1, se hicieron cruza de ratones macho y hembra CD1. Se introdujeron ratones machos CD1 en jaulas conteniendo 4 ratonas CD1, a las 20:00 horas. Machos y hembras permanecieron juntos toda la noche en condiciones de oscuridad a una temperatura de 25°C. Los ratonas se inspeccionaron

a las 8:00 horas del siguiente día. Aquellas que tenían un tapón de semen vaginal fueron separadas del resto y colocadas en jaulas aisladas. En el momento en que se les identificaba el tapón vaginal se consideraba como día 0.5 de gestación. Las hembras preñadas de 9.5 a 16.5 días de gestación se sacrificaron por dislocación cervical. Los embriones extraídos, fueron liberados de decidua, se lavaron en PBS 1X frío para eliminar el exceso de sangre. Posteriormente los embriones se procesaron para su inclusión en parafina.

2.3.1.3 Inclusión en parafina

Los tejidos embrionarios y cerebral, se fijaron en formaldehído al 4% en PBS a 4°C durante cuatro horas con cambios de una hora. Posteriormente, el tejido fue deshidratado en una serie creciente de etanol desde 60% hasta 100%. El tejido deshidratado se incubó con xilol durante 60 minutos. Finalmente se incluyó en parafina durante cuatro horas con cambios de 30 minutos a 60°C.

2.3.1.4 Obtención de cortes histológicos

El tejido incluido, se desmontó y procesó por Microtomía para obtener cortes histológicos de 6 μm de grosor. Las secciones obtenidas se colocaron en baño de agua estéril a 50°C y fueron recolectadas en portaobjetos especiales que aseguran la adherencia permanente del tejido. Las laminillas conteniendo las secciones se dejaron secar toda la noche libres de polvo, antes de realizar la hibridación.

2.3.1.5 Desparafinación de secciones histológicas

A las laminillas antes de ser procesadas para hibridación *in situ*, se les eliminó la parafina con Xilol mediante dos cambios de 5 minutos cada uno, y dos cambios de 5 minutos cada uno con etanol absoluto. Posteriormente se dejaron secar 30 minutos antes de iniciar la hibridación.

2.3.2 Obtención y cuantificación del DNA

2.3.2.1 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de un fragmento de tejido procedente de la cola de los ratones, como se describe:

A la muestra de tejido se le agregaron 750 μ l de buffer de lisis conteniendo proteinasa K. Se incubó durante toda la noche a 55°C en baño maría. Al día siguiente se añadieron 350 μ l de fenol y 350 μ l de sebage. Se agitó moderadamente en un vortex y se centrifugó a 12000 r.p.m. en una microcentrífuga durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo eppendorf limpio, se le adicionó 1/10 de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se agitó suavemente por inversión.

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 1X. 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.

2.3.2.2 Extracción de DNA plasmídico

2.3.2.2.1 Pequeña escala (Mini-preparación de plásmidos)

Las clonas recombinantes obtenidas de las ligaciones fueron procesadas para la obtención de DNA plasmídico utilizando el método de lisis alcalina.

Se inoculó una colonia bacteriana en 5 mL de caldo LB (bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L, pH 6.5-7.0) con 5 µL de ampicilina y se incubó a 37°C a 150 r.p.m. toda la noche. El cultivo se centrifugó a 14,000 r.p.m. por 3 minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla se incubó a -20°C por 5 minutos. Se añadieron 100 µL de solución de lisis I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, pH 8), se resuspendió la pastilla por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Entonces se adicionaron 200 µL de solución de lisis II (0.2 mL de NaOH 10N, 1.0 mL de SDS 10% y 8.8 mL de agua), se incubó en hielo 5 minutos y se añadieron 150 µL de solución de lisis III (acetato de sodio 3M), se incubó en hielo 10 minutos y se centrifugó a 14,000 r.p.m. 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorff de 2 mL, se añadieron 450 µL de isopropanol, se mezcló e incubó a -20°C durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14,000 r.p.m. por 15 minutos, se desechó el sobrenadante, se agregaron 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 r.p.m. por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 50 µL de TE IX.

2.3.2.2.2 Gran escala (Maxi-preparación de plásmidos)

La clona recombinante obtenida fue procesada para la obtención de DNA plasmídico a gran escala utilizando el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y cols.

Se inoculó una colonia bacteriana en 5 ml de caldo de cultivo LB con 5 μ L de ampicilina (400 μ g), incubando a 37°C a 150 r.p.m., durante toda la noche. Enseguida, el cultivo se inoculó en 25 ml de caldo LB con 25 μ L de ampicilina, se incubó a 150 r.p.m. y 37°C durante toda la noche. Posteriormente los 30 mL de cultivo se inocularon a 500 mL de caldo LB con 500 μ L de ampicilina (50 μ g/mL), nuevamente a 37°C y a 150 r.p.m. toda la noche. Después el medio de cultivo se centrifugó a 3000 r.p.m. a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó completamente, y se procedió a utilizar el kit de extracción de DNA de QIAGEN. La pastilla bacteriana se resuspendió en 10 mL de solución de lisis I. Entonces se añadieron 10 mL de solución de lisis II (0.2 mL de NaOH 10M, 1.0 mL de SDS 10% y 8.8. mL de agua), se mezcló por inversión y se incubó a TA durante 5 minutos. Pasada la incubación se agregaron 10 mL de solución de lisis III (acetato de Sodio 3M), se agitó vigorosamente e incubó en hielo por 20 minutos, siguiendo con 30 minutos de centrifugación a 4°C. El sobrenadante se colocó en un tubo Falcon de 50 mL limpio y se centrifugó a 13,000 r.p.m. a 4°C durante 15 minutos. Al mismo tiempo, se equilibró una columna de intercambio iónico con 10 mL de buffer QBT. Enseguida se filtró el sobrenadante y se lavó dos veces la columna con 30 mL de buffer QC. Entonces se despegó el DNA retenido en la columna con 15 mL de buffer QF, a un tubo limpio. Se removió la columna y se precipitó el DNA con 10.5 mL de Isopropanol. Se centrifugó a 13,000 r.p.m. a 4°C por 30 minutos. El

sobrenadante se desechó y la pastilla de DNA se lavó con 15 mL de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugó a 13,000 r.p.m. a 4°C por 15 minutos. El sobrenadante se decantó, se dejó secar la pastilla de DNA y resuspendió en 500 µL de TE 1X.

2.3.2.3 Análisis electroforético y cuantificación de DNA

Las muestras de DNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa a concentraciones variables, dependiendo del tamaño del fragmento y de la resolución requerida. Los geles de agarosa se prepararon al porcentaje requerido en buffer TAE 1X (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.001M pH 8.0). Las muestras se mezclaron con jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25%, Xilencianol al 0.25% y glicerol al 30%), y se depositaron respectivamente en los carriles del gel preparado.

La electroforesis se llevó a 100V, concluida esta, los geles fueron visualizados en un transiluminador de UV. Utilizando un marcador de peso molecular adecuado se pudo determinar el tamaño del fragmento de DNA.

Adicionalmente se pudo cuantificar el DNA por la intensidad de fluorescencia de la banda teñida con bromuro de etidio. Este compuesto se intercala entre las bases del DNA y emite fluorescencia al ser excitado por la luz UV. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de bromuro de etidio intercalado en el DNA y al tamaño del fragmento.

2.3.3 Obtención del genotipo

2.3.3.1 PCR

Para la detección de los alelos normales y mutados, el DNA genómico previamente extraído de tejido de ratones recién nacidos, fue amplificado bajo las siguientes condiciones de reacción:

Componentes del PCR	Concentración final
Buffer 10 X	1X
MgCl ₂ 30 mM	1.5 mM
dNTPs 25mM	2.5 mM
Iniciador Nurr1 5' (GGCACTCCTGTGTCTAGCTGCC)	4 ng/μL
Iniciador Nurr1 3' (CAGCCCTCACAAGTGCGAACAC)	4 ng/μL
Iniciador Nurr1-Neo 3' (CTGCCTTGGGAAAAGCGCCTCC)	4 ng/μL
DNA polimerasa Taq	0.05 U/μL
DNA 1 μg/μL	10 ng/μL
H ₂ O mQ estéril	15μL

Tabla 1. Genotipificación: condiciones de reacción.

El programa de amplificación que se utilizó, consiste en los siguientes pasos:

- 1.- Desnaturalización previa 95°C por 2 segundos
- 2.- 35 ciclos:
 - Desnaturalización 95°C por 45 segundos
 - Alineamiento 58°C por 45 segundos
 - Elongación 72°C por 60 segundos
- 3.- Extensión prolongada 72°C por 5 minutos

Los productos de PCR obtenidos se analizaron en gel de agarosa al 1.0%.

2.3.4 Subclonación

2.3.4.1 Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones fueron realizadas bajo condiciones óptimas sugeridas por las casas comerciales. Se utilizaron 10 μg del vector pTAdv conteniendo la secuencia OS40 así como 10 μg del vector pCRII, ambos fueron digeridos con las enzimas BamHI y XhoI utilizando una unidad de enzima por cada μg de DNA plasmídico, y 5 μL de buffer multicorte en un volumen total de 50 μL . Los tiempos de incubación fueron de 2-12 horas a 37°C.

2.3.4.2 Purificación de fragmentos

Para purificar los fragmentos a partir de los DNAs digeridos, éstos se resolvieron por electroforesis en un gel preparativo de agarosa al 0.8%, la migración se efectuó a 40 volts, durante 3 horas aproximadamente. Las bandas de DNA de interés se cortaron del gel y se purificaron mediante el kit de purificación de DNA por columna de Qiagen de la siguiente manera:

El fragmento del gel es colocado en un tubo eppendorff de 2000 μL . Posteriormente se añaden tres volúmenes de la solución QG y se incuba a 50°C durante 10 minutos, mezclando por inversión ligera cada 2 minutos. Enseguida se adicionó un volumen de isopropanol para precipitar el DNA. La muestra fue entonces colocada en una columna de intercambio del mismo kit, que tiene una capacidad de 750 μL . Y se centrifugó 1 minuto a 12,000 r.p.m., se eliminó el eluido y se añadieron 500 μL de la solución QG, se centrifugó 1 minuto a 12,000 r.p.m, se eliminó el eluido. Se

adicionaron 750 μL de una solución de lavado y se centrifugó nuevamente 1 minuto a 12,000 r.p.m. Posteriormente la columna fue colocada en un tubo nuevo y entonces se añadieron 10 μL de buffer PE para recuperar el DNA. Se centrifugó 1 minuto a 12 000 r.p.m. Los fragmentos purificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8%.

2.3.4.3 Ligación

Una vez purificado el vector linearizado pCRII, y el fragmento OS40 (294 pb), se hizo la ligación de los fragmentos, empleando para ello 100 ng de DNA, una unidad de la enzima DNA ligasa y 4 μL de Buffer de ligación 5X en un volumen total de 20 μL . La ligación se incubó a 15°C durante toda la noche.

2.3.4.4 Transformación

La transformación se realizó con 20 μL de células calcio competentes de la cepa DH5 α . Las células se colocaron en hielo, se les añadió 1 μL de ligación y se incubaron en hielo durante 1 hora. Inmediatamente después se sometieron a choque térmico al incubarlas un minuto a 42°C, seguido de una incubación en hielo por 2 minutos. Posteriormente se añadieron 100 μL de medio de cultivo LB sin antibiótico. Entonces se incubaron a 37°C en agitación mecánica a 250 r.p.m. durante 1 hora. Finalmente se inocularon 100 μL del cultivo a placas de LB conteniendo Ampicilina y Kanamicina. Las placas se incubaron invertidas, durante toda la noche a 37°C. Las colonias obtenidas fueron analizadas mediante mini-preparaciones plasmídicas.

2.3.5 Síntesis de sondas para los ensayos de hibridación *in situ*

2.3.5.1 Síntesis y marcaje de la Sonda OS40

Se sintetizaron sondas de RNA, a partir de 1 µg del plásmido pCRII conteniendo la secuencia de interés. Las sondas de RNA antisentido y sentido fueron sintetizadas con RNA polimerasa SP6 y T7, respectivamente, empleando además 5 µL de H₂O DEPC, 3 µL de DTT 100 mM, 6 µL de Buffer de transcripción 5X, 3 µL de una mezcla conteniendo los ribonucleótidos fosforilados 10mM(rATP, rCTP, rGTP), 1 µL de RNAsin y 7 µL (³⁵S) UTP.

Se incubaron a 37°C durante 1 hora. Enseguida se destruyó el templete de DNA utilizando para ello 17.9 µL de H₂O DEPC, 1.7 µL de MgCl₂ 0.3 M, 2.2 µL de DTT (100 mM) y 2.0 µL de DNAsa I (1 U/µL). Se incubaron a 37°C durante 20 minutos, enseguida se colocaron en hielo y se añadió 100 µL de H₂O DEPC, 100 µL de RNA de transferencia de levadura y 250 µL de acetato de amonio 4M. Entonces se precipitó el RNA con 1ml de etanol 100% durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 r.p.m., se desechó el sobrenadante y el botón de RNA se resuspendió en 200 µL de H₂O DEPC, más 200 µL de acetato de amonio 4M. Se precipitó nuevamente con etanol absoluto y centrifugó nuevamente. El RNA precipitado se resuspendió en 200 µL H₂O DEPC. Posteriormente las sondas fueron hidrolizadas mediante lisis alcalina con 8 µL de NaHCO₃ 1M y 12 µL de Na₂CO₃, se incubaron a 60°C durante 29 minutos. Finalmente se neutralizaron con 7.33 µL de acetato de sodio 3M y 11 µL ácido acético glacial 10%. Una tercera precipitación con etanol absoluto a temperatura ambiente, seguida de una centrifugada a 12,000 r.p.m. por 5 minutos. EL precipitado se

resuspendió en buffer de hibridación conteniendo DTT 0.1M, formamida 50%, dextrán sulfato 10%, SSC 4X, solución Denhardt's 1X. La sonda antisentido fue la que reconoció el RNA del tejido y partir de la que se analizó el patrón de expresión. La sonda sentido por ser el equivalente al RNAm del tejido, se utilizó como sonda control negativo.

2.3.5.2 Síntesis y marcaje de la sonda Nurr1

La sonda Nurr1 antisentido, se sintetizó utilizando la enzima T7 RNA polimerasa. La hidrólisis alcalina fue de 38 minutos. Esta sonda se utilizó como control positivo de que el material histológico fue utilizado adecuadamente y por lo cual el RNA no fue degradado. Además nos sirvió para comparar los sitios de expresión entre el gen nuevo y Nurr1.

2.3.6 Hibridación *in situ*

2.3.6.1 Hibridación *in situ*

Los cortes histológicos fueron fijados con paraformaldehído al 4% y permeabilizados con proteinasa K (20 µg/mL, en 1.25 ml de Tris-HCl pH 8, 250 µL de EDTA 0.5M, y 23.5 ml de H₂O DEPC) durante 8 minutos a 37°C. Entonces fueron lavados en PBS 1X, 5 minutos; post-fijados en formaldehído al 4%, tratados con anhídrido acético, trietanolamina 0.1M, pH 8.0 y deshidratados en etanol. Las laminillas fueron hibridadas con 70 µL de cada una de las sonda de RNA en buffer de hibridación a 54°C durante 18 horas dentro de una cámara húmeda (formamida 50% y SSC 2X). Posteriormente, las preparaciones fueron lavadas en condiciones de fuerza iónica alta.

Se incubaron durante 30 minutos a 55°C en SSC 5X y 142 µL de β-mercaptoetanol. Enseguida, se incubaron durante 30 minutos a 65°C con formamida 50%, SSC 2X, y 142 µL de β-mercaptoetanol. Lavadas en solución de: NaCl₂ 0.5M, Tris-HCl pH 10mM, EDTA 5mM durante 30 minutos a 37°C con cambios de 10 minutos. Posteriormente se hizo una digestión con RNAsa A para eliminar toda la sonda que no se haya unido al RNA del tejido. Lavadas nuevamente, colocadas en Formamida 50%, SSC 2X y 142 µL de β-mercaptoetanol a 65°C durante 30 minutos. Finalmente lavadas a una fuerza iónica baja final de 0.1X SSC a temperatura ambiente por 15 minutos. Las preparaciones fueron deshidratadas y secadas a temperatura ambiente.

2.3.6.2 Autorradiografía

La localización autorradiográfica de la sonda unida se llevó a cabo por aposición de las preparaciones a una película de rayos X durante 5 días a temperatura ambiente.

2.3.6.3 Emulsión de Kodak

Para obtener mejor resolución los cortes fueron inmersos en una emulsión autorradiográfica NTB2 (Eastman Kodak) durante 6 segundos. Las laminillas se dejaron secar durante dos horas a temperatura ambiente, libres de luz. Posteriormente fueron incubadas a 4°C durante 2 semanas en la oscuridad.

2.3.6.4 Revelado y fijación de las secciones histológicas

Después del período de exposición en la emulsión, las preparaciones se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente. Fueron reveladas, sumergiéndolas en el revelador

Kodak D-19, durante 2 minutos, posteriormente, se enjuagaron con agua destilada, dos minutos a temperatura ambiente y sumergidas en fijador de Kodak durante dos minutos.

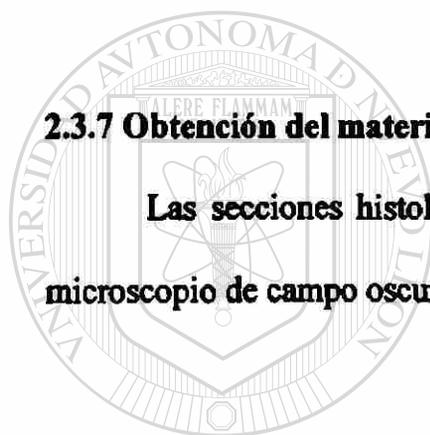
Finalmente se enjuagaron en agua corriente durante 10 minutos.

2.3.6.5 Tinción de las secciones histológicas

Las laminillas fueron teñidas de la siguiente manera: 2 minutos en Hematoxilina de Harris, enjuagadas, deshidratadas en etanol (70%, 95%, 100%, 100%), xilol 2 minutos, montadas y secadas.

2.3.7 Obtención del material fotográfico

Las secciones histológicas hibridadas fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de campo oscuro y campo claro.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Obtención del genotipo de ratones recién nacidos

A partir de cruces de ratones heterocigotos para la función del gen Nurr1, se obtuvieron dos camadas de ratones, a los cuales se les extrajo DNA y se amplificó mediante PCR.

La identificación de los alelos normales y mutados se logró mediante el uso de iniciadores que reconocen parte del exón 3 del gen Nurr1 normal y Nurr1 mutado. Como se muestra en la figura 3, se obtuvieron 4 ratones knock-out Nurr1, identificados por un producto de PCR de 200 pb, los cuales se localizan en los carriles 6 , 9, 15 y 16. En los carriles 1, 4, 5, 7, 10, 11 y 12, el producto de PCR obtenido fue de 300 pb, y corresponde a ratones normales o silvestres. El resto de los carriles corresponden a ratones heterocigotos, los cuales son identificados por la obtención de dos bandas de DNA de 200 y 300 pb (alelo mutado y alelo normal, respectivamente).

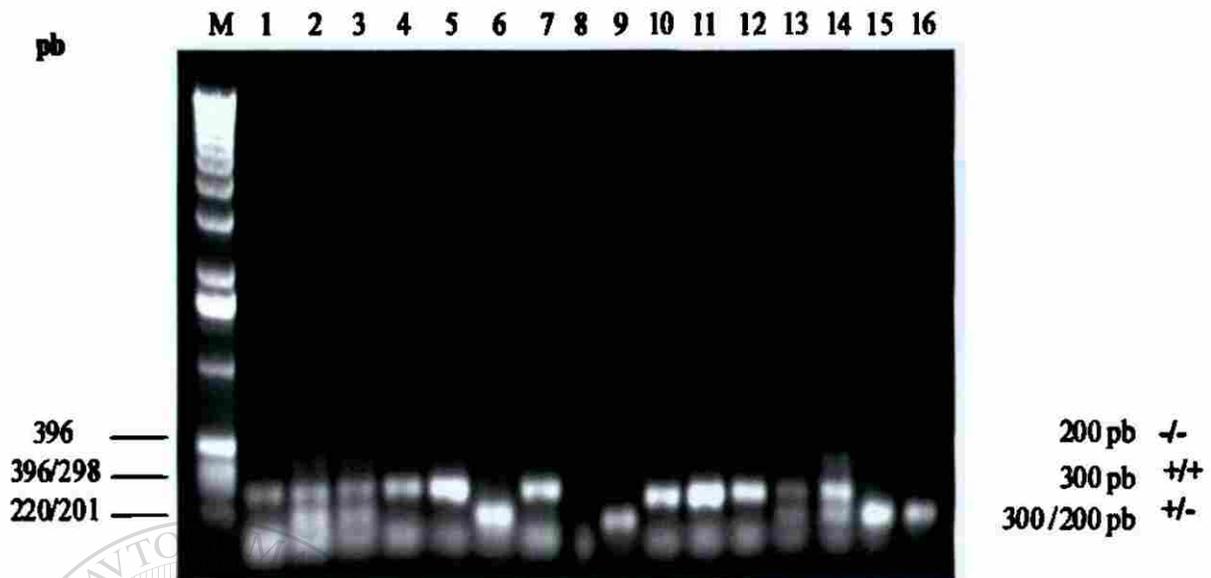


Figura 3. Determinación del genotipo de ratones recién nacidos. Se muestran las amplificaciones obtenidas por PCR a partir de DNA genómico de ratones. El marcador de peso molecular utilizado fue de 1 kb. Los productos fueron resueltos en un gel de agarosa al 0.8%

3.2 Subclonación de la secuencias OS40 en el vector pCRII

La secuencia OS40 obtenida mediante ddPCR fue clonada en el vector pTAdv. Este vector posee un solo promotor en su estructura, por lo que fue necesario realizar una subclonación utilizando para ello el vector pCRII.

La clona recombinante obtenida fue seleccionada al verificar la presencia y tamaño del fragmento, al hacer una digestión con la enzima de restricción Eco RI. El sitio de corte de esta enzima en el vector pCRII esta situado a ambos lados del fragmento, por lo que el tamaño del fragmento esperado era de 270 pb.



Figura 4. Subclonación. Se muestra el DNA plasmídico extraído de bacterias transformadas con el vector pCRII y digerido con la enzima EcoRI . En el carril número tres se muestra un fragmento de entre 300 y 200 pb, que corresponde a una clona recombinante. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb. Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1.0 %.

3.3 Hibridación *in situ*

Para los estudios de hibridación *in situ* se utilizaron cortes histológicos sagitales tanto de cerebros de ratones recién nacidos como de embriones de ratón CD1, con un grosor de 6 μm de diámetro. Así mismo se sintetizaron sondas de RNA sentido y antisentido.

3.3.1 Comparación de la expresión de OS40 en cerebros de ratón KO y silvestres

3.3.1.1 Expresión de OS40 en cerebros de ratones silvestres

Los estudios de hibridación *in situ* revelaron que la secuencia OS40 se expresa en la región mesencefálica de cerebros de ratones recién nacidos de tipo silvestre. La señal a este nivel es muy baja comparada con la intensidad de la señal del gen Nurr1. En la figura 5 se muestran imágenes de campo oscuro de los resultados obtenidos de las hibridaciones *in situ* utilizando las sondas OS40 antisentido, OS40 sentido y Nurr1.

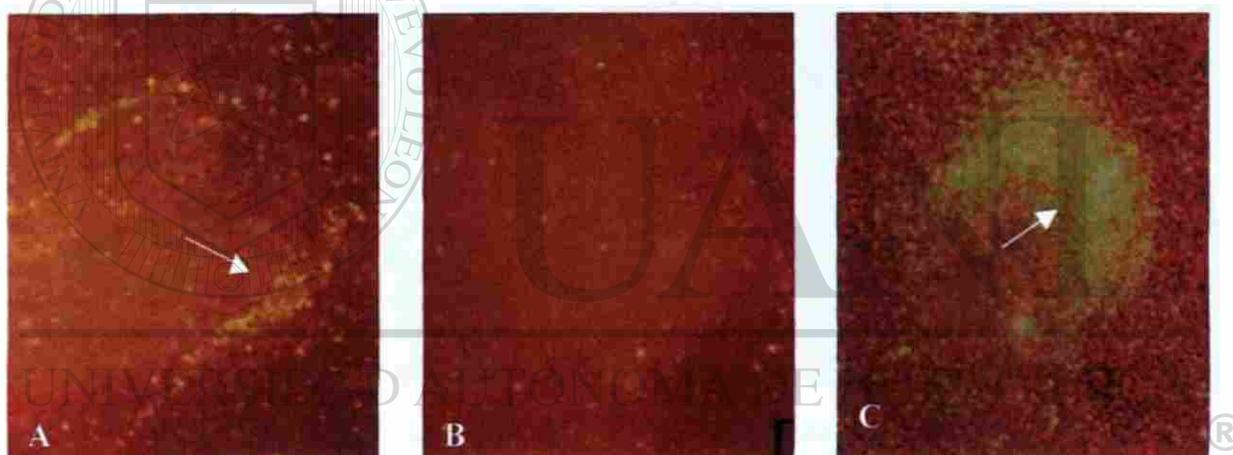


Figura 5. Expresión de la sonda OS40 en cerebros de ratones silvestres. En A se muestra la expresión de la secuencia OS40 a nivel de la flexura mesencefálica (Región ventral mesencefálica), mediante hibridación *in situ*, empleando la sonda OS40 antisentido. La imagen B, corresponde a una imagen tomada de la región ventral mesencefálica, en la que se utilizó la sonda OS40 sentido (control negativo). La imagen C muestra la expresión del gen Nurr1 en la región mesencefálica. Amplificación 8X.

3.3.1.2 Expresión de OS40 en cerebros de ratones knock-out Nurr1

Uno de los puntos importantes de este trabajo, consistió en confirmar la ausencia de expresión de la secuencia OS40 en la región ventral mesencefálica de cerebros de ratones recién nacidos, carentes de la función del gen Nurr1. En estos ratones Knock-

Análisis del patrón de expresión de un gen cuya expresión es afectada por la inactivación del factor de transcripción Nurr1

out, a diferencia de los ratones silvestres, no observamos expresión de OS40 en la región mesencefálica, la cual sabemos, fue afectada en los ratones knock-out Nurr1.

En la figura 6 se muestran imágenes de hibridaciones *in situ* de cortes histológicos de cerebros de ratones recién nacidos Knock-out Nurr1. Las sondas utilizadas son: sonda antisentido OS40, sonda sentido OS40 y la sonda Nurr1. En las imágenes, la flecha señala la región ventral mesencefálica.

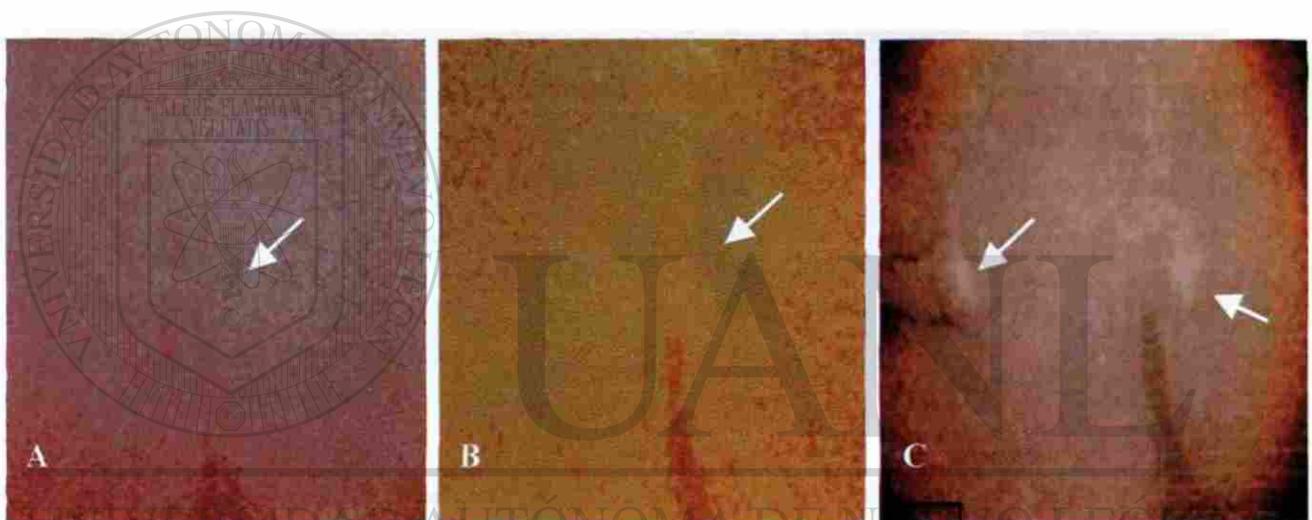


Figura 6. Confirmación de la ausencia de expresión de la sonda OS40 en cerebros de ratones recién nacidos knock-out Nurr1. Las figuras A, B y C son imágenes de campo oscuro, tomadas de la región ventral mesencefálica. La imagen A fue hibridada con la sonda OS40 antisentido. La flecha indica el sitio donde OS40 se expresa normalmente en ratones silvestres. La imagen B corresponde a nuestro control negativo, hibridado con OS40 sentido. En C las flechas indican la expresión del gen Nurr1 en un cerebro de ratón silvestre. Amplificación 8X.

3.3.2 Análisis del patrón de expresión de OS40 en el desarrollo embrionario

Para determinar el patrón de expresión de OS40 durante el desarrollo embrionario de ratones, se utilizaron secciones histológicas de embriones de ratón desde 7.5 días de gestación. En esa etapa del desarrollo no hubo expresión de OS40.

3.3.2.1 Expresión de OS40 en embriones de 8.5 días de desarrollo

La secuencia OS40 comienza a expresarse a los 8.5 días del desarrollo embrionario en el ratón. La expresión fue localizada a lo largo de todo el neuroepitelio. En la figura 7 se muestra la expresión de OS40 en un embrión de 8.5 días.

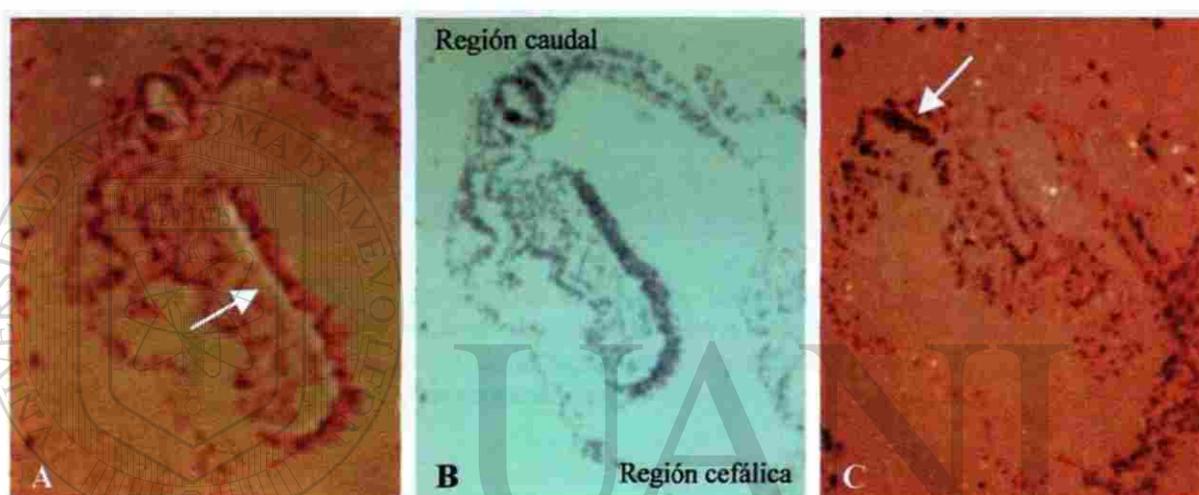


Figura 7. Expresión de OS40 en un embrión de 8.5 días. A y C son imágenes de campo oscuro, B es una imagen de campo claro. En A, la flecha indica el sitio de expresión de OS40 en el neuroepitelio del embrión. C corresponde al control negativo de la expresión de OS40. Amplificación 8X.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.3.2.2 Expresión de OS40 en embriones de 9.5 días de desarrollo

En un embrión de 9.5 días de desarrollo, la expresión de OS40 se localizó a lo largo de todo el tubo neural. En ese momento del desarrollo embrionario el tubo neural está casi cerrado y comienzan a formarse las dilataciones encefálicas. En la figura 8 se muestra la expresión de OS40 en imágenes de campo oscuro, utilizando la sonda OS40 antisentido y sentido.

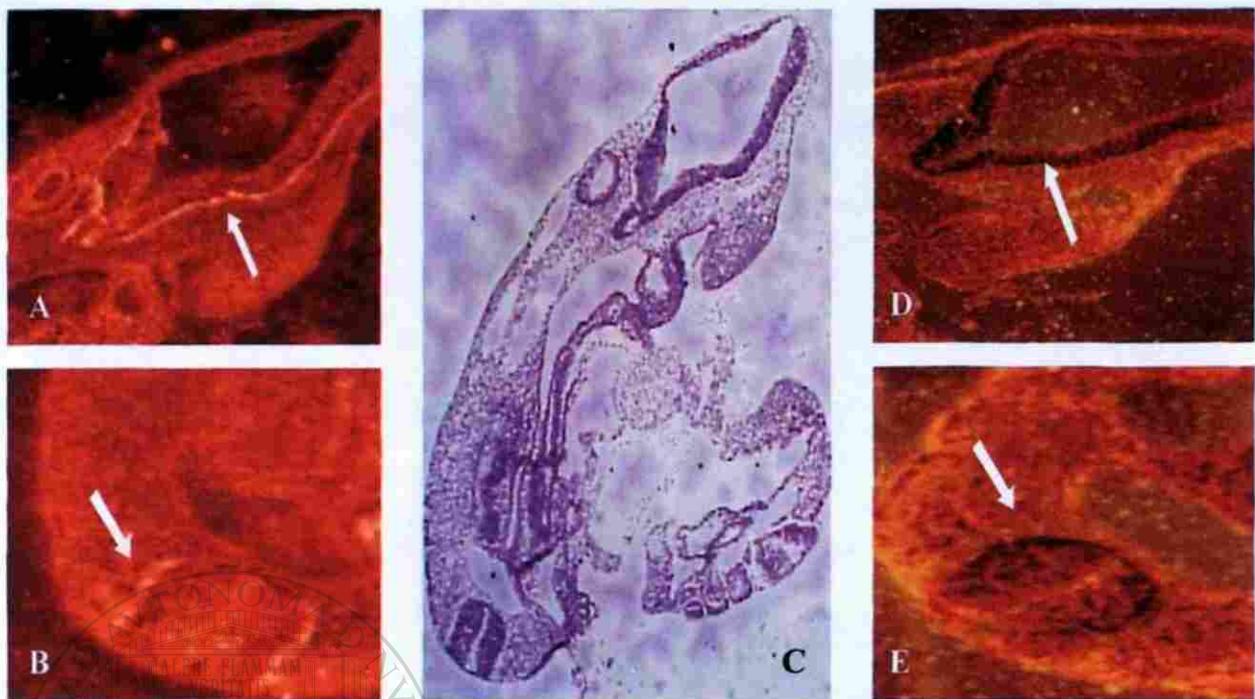


Figura 8. Expresión de OS40 en un embrión de 9.5 días. Las imágenes A, B, D y E son imágenes de campo oscuro (8X), C es una imagen de campo claro (4X). En A y B se muestra la expresión de OS40 en el tubo neural de la región cefálica y de la región caudal respectivamente. Mientras que D y E son hibridaciones de la sonda OS40 sentido (controles negativos).

3.3.2.3 Expresión de OS40 en embriones de 10.5 días de desarrollo

En el embrión de 10.5 días, ocurren diversos cambios como son: la expansión de las vesículas cerebrales, el inicio del plegamiento de la curvatura ventral de la cabeza con el mesencéfalo en formación, el inicio de la formación de algunos órganos como el hígado, el corazón, el pulmón y el mesonefros.

Mientras ocurren esos cambios, la expresión de OS40 se localiza a nivel cerebral, en la región ventral mesencefálica y en cerebro posterior (Figura 9). Por otro lado, la expresión de OS40 aparece en el hígado en desarrollo (Figura 9).

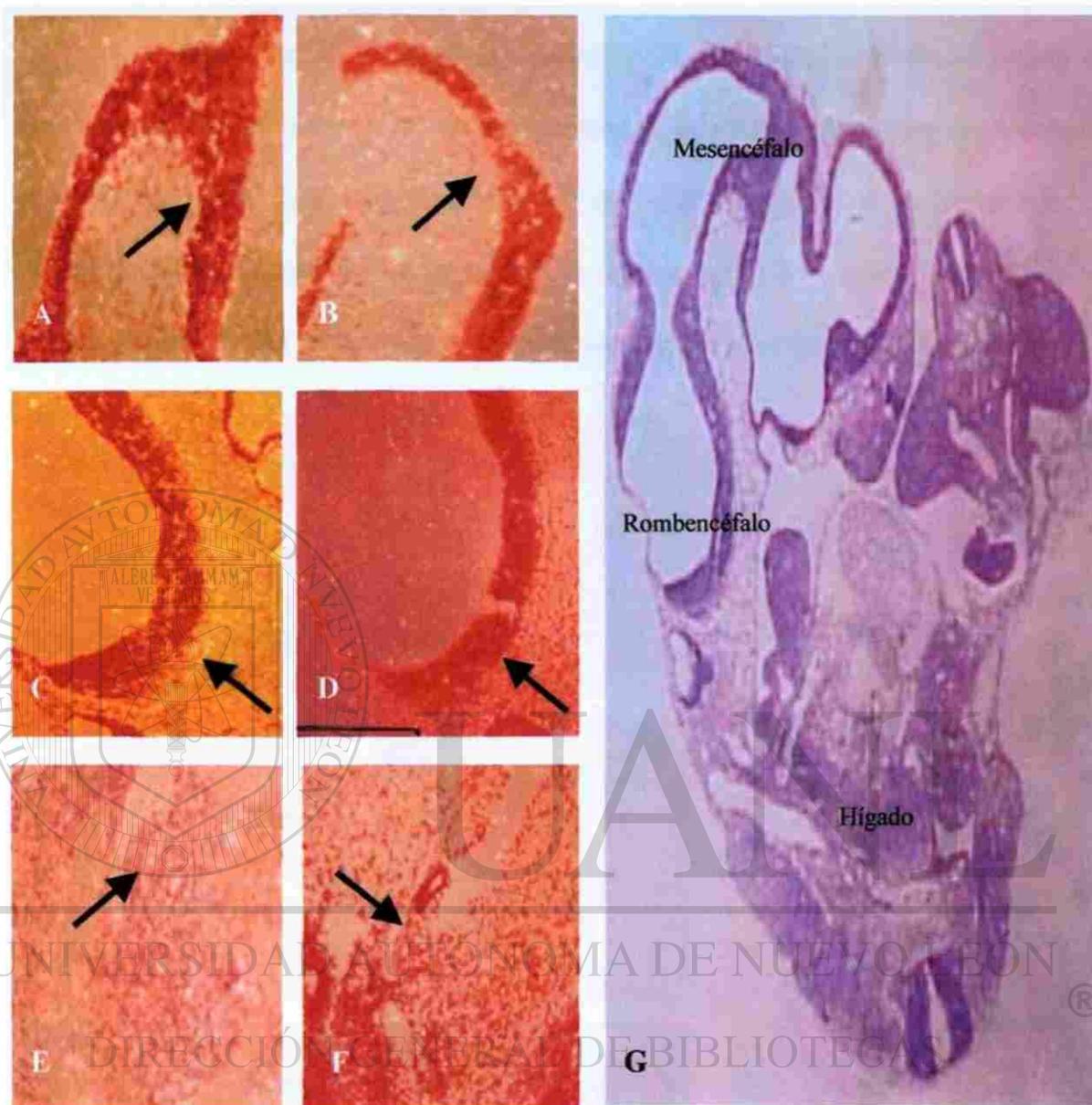


Figura 9. Expresión de OS40 en un embrión de 10.5 días. Las fotos A, C y E corresponden a fotografías de campo oscuro hibridadas con la sonda OS40 antisentido. B, D y F son imágenes de campo oscuro (8X) hibridadas con OS40 sentido (controles negativos). En G se muestra el campo claro de un embrión completo de 10.5 días (4x). En A se muestra la expresión de OS40 en la región ventral del mesencéfalo indicada por la flecha. En C se muestra la señal de OS40 antisentido en el rombencéfalo o cerebro posterior. En E se observa señal positiva para OS40 en el hígado.

3.3.2.4 Expresión de OS40 en embriones de 11.5 días de desarrollo

Conforme avanza el desarrollo embrionario, en el embrión de 11.5 días el cerebro continúa en desarrollo, los neuroblastos que permanecen están en constante proliferación. El hígado, corazón y mesonefros siguen desarrollándose. En esta etapa del desarrollo embrionario, la expresión de la secuencia OS40 aparece en otros órganos y tejidos aparte de los ya mencionados, ellos son: riñón y epitelio nasal (Figura 10).

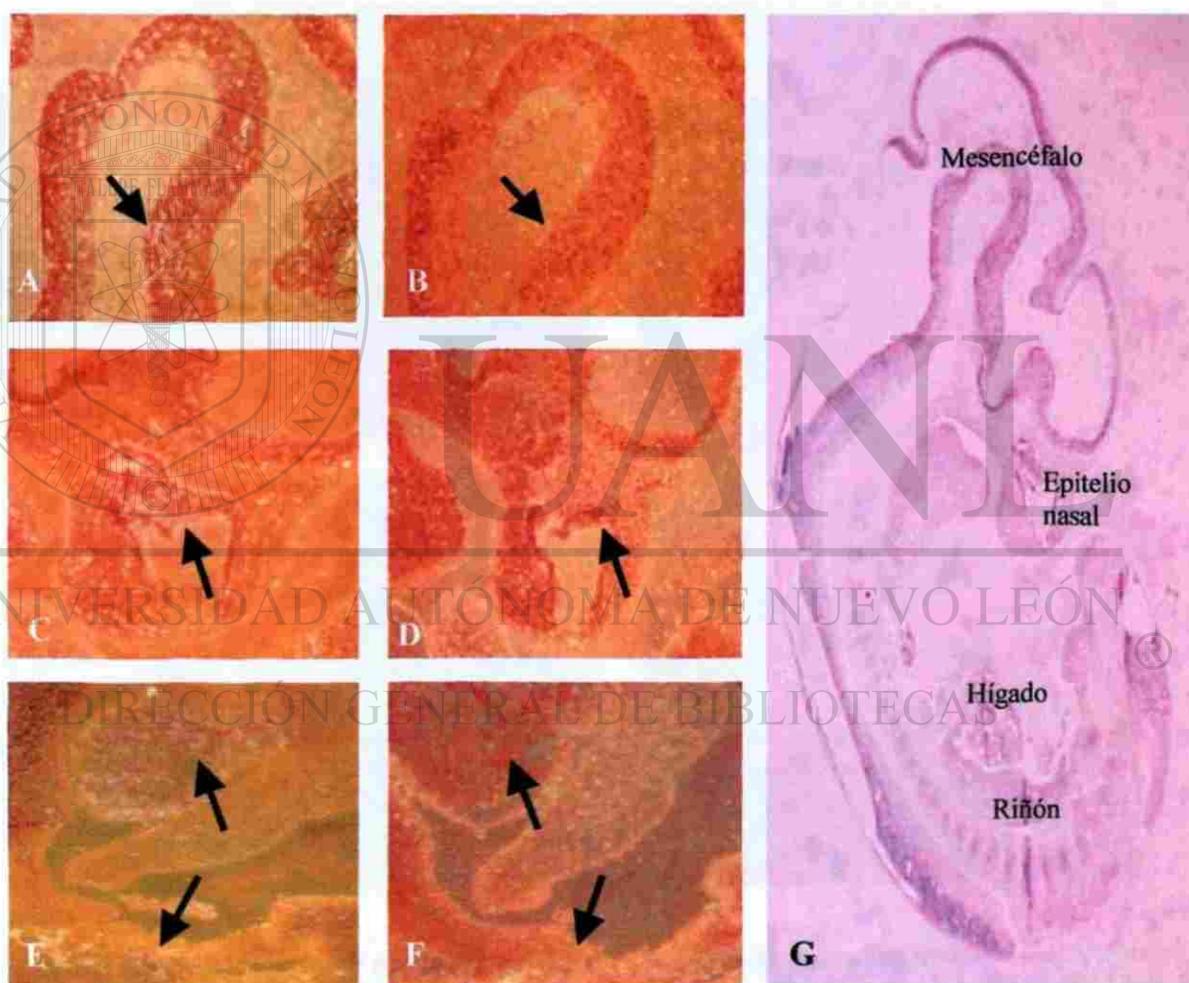


Figura 10. Expresión de OS40 en embriones de 11.5 días. Las figuras de A-F son imágenes de campo oscuro (8X). La figura G corresponde a un embrión completo de 11.5 días visto en campo claro (4X), en el que se muestra la localización de los órganos y tejidos amplificados en campo oscuro. En la figura A la flecha indica la expresión de OS40 en la región ventral mesencefálica. B es una imagen del control negativo (sonda sentido). La imagen C muestra la expresión de OS40 en el epitelio nasal (señalado por la flecha). D es el control negativo de la imagen C. Las fotografías E y F fueron tomadas de la región media inferior del cuerpo del embrión. La figura E muestra la hibridación de la sonda antisentido, las flechas señalan la expresión de OS40 en el hígado (flecha superior) y el riñón (flecha inferior). En F se muestra la localización del hígado y del riñón, hibridados con la sonda sentido OS40.

3.3.2.5 Expresión de OS40 en embriones de 12.5 días de desarrollo

Siguiendo el desarrollo embrionario, a los 12.5 días de gestación continúa la organogénesis. El hígado es más grande y más vascularizado. Con respecto al desarrollo del riñón, degenera el pronefros, hay regresión de los túbulos mesonéfricos y aparecen masas celulares metanéfricas. La expresión de la secuencia OS40 continúa en mesencéfalo, hígado, riñón, epitelio nasal y comienza en pulmón (Figura 11).

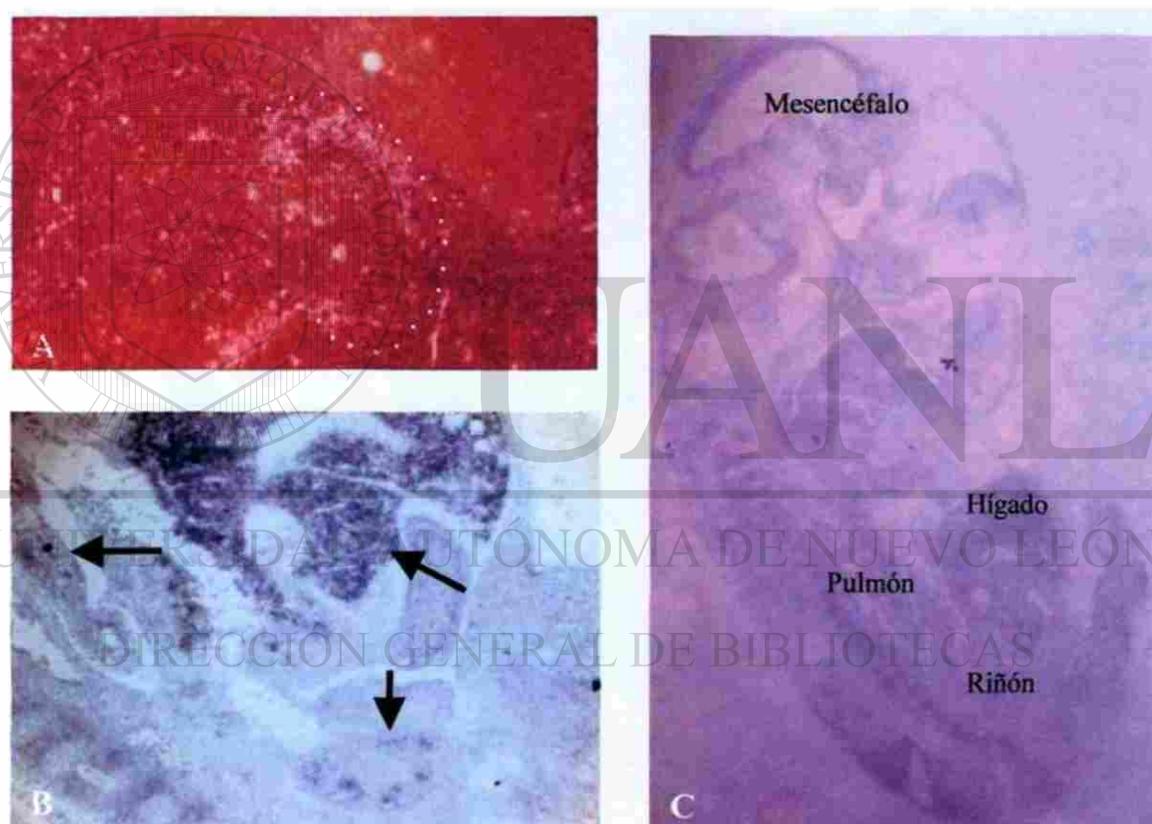


Figura 11. Expresión de OS40 en embriones de 12.5 días. La figura A es una imagen de campo oscuro de la región ventral mesencefálica (8X). La línea punteada en color blanco indica la expresión de OS40 a lo largo de toda la flexura mesencefálica. La figura B corresponde al campo claro de la parte media de un embrión de 12.5 días (8X), que muestra la expresión de OS40 en el hígado (flecha superior derecha), pulmón (flecha superior izquierda) y riñón (flecha inferior). La imagen C corresponde a un embrión de 12.5 días en el que se señalan los órganos antes mencionados (4X).

3.3.2.6 Expresión de OS40 en embriones de 13.5 días de desarrollo

En un embrión de 13.5 días de desarrollo, el hígado y el pulmón se han agrandado, este último muestra desarrollo lobular. El metanefros es prominente y aún permanecen los ductos mesonéfricos y pronéfricos (presentes de acuerdo al sexo).

En este embrión, la expresión de OS40 se mantiene en los mismos órganos: riñón, hígado, pulmón, y mesencéfalo (Figura 12).

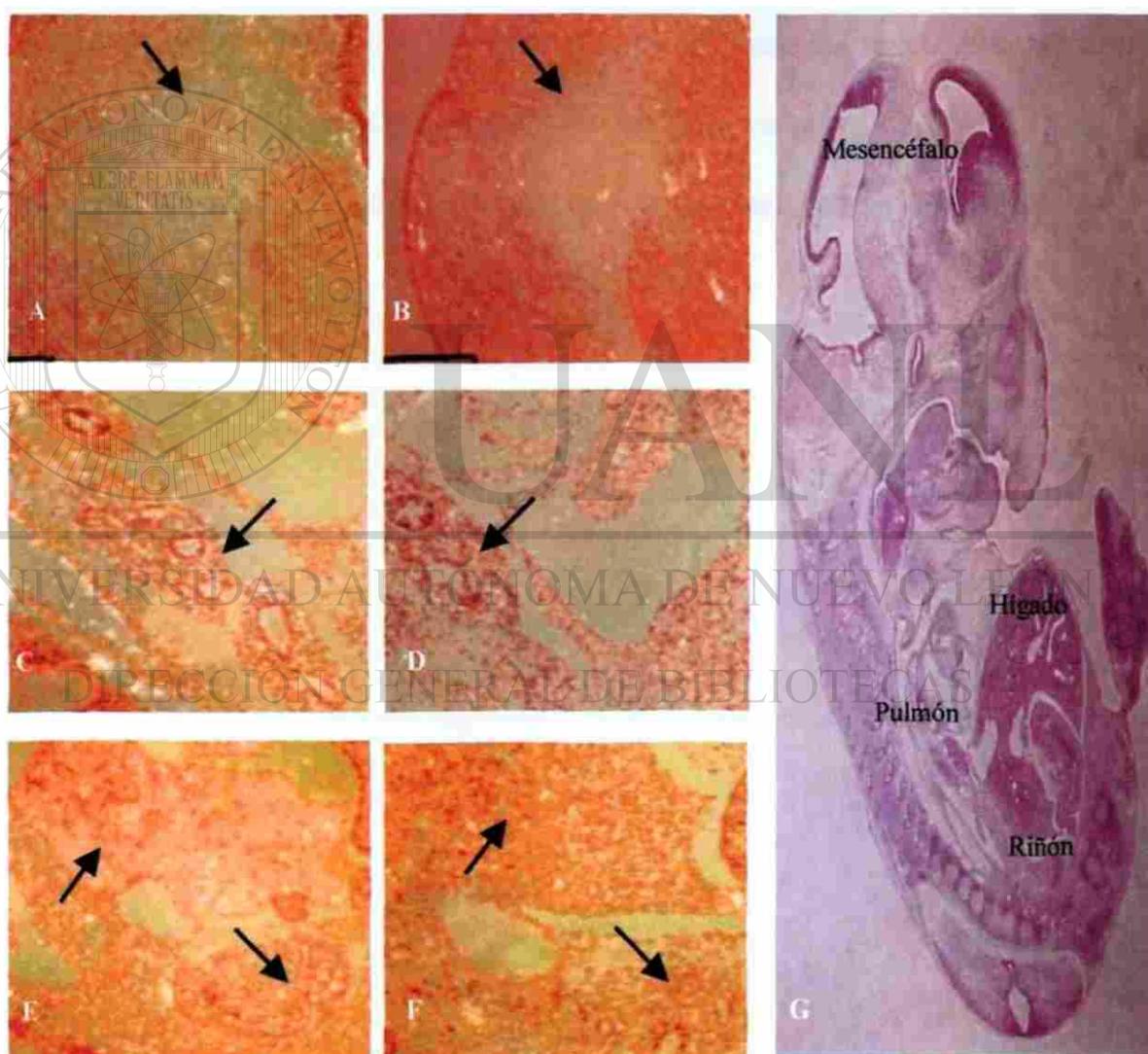
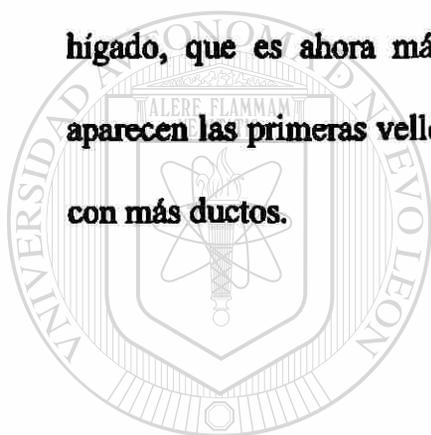


Figura 12. Expresión de OS40 en un embrión de 13.5 días. Las imágenes de campo oscuro en A, C y E corresponden a hibridaciones *in situ* con la sonda antisentido OS40 y B, D y F a sus respectivos controles negativos con la sonda sentido OS40 (8X). A y B corresponden a la región ventral mesencefálica, las flechas indican la flexura mesencefálica. Las figuras C y D corresponden al pulmón, las flechas indican estructuras del pulmón. E y F son imágenes del hígado (indicado por la flecha izquierda) y del riñón (flecha derecha). En G se indican los órganos y tejidos mostrados en campo claro (4X).

3.3.2.7 Expresión de OS40 en embriones de 14.5 días de desarrollo

En un embrión de 14.5 días, la expresión de la secuencia OS40 continúa presente en la región ventral mesencéfala, en el epitelio nasal y en el hígado. Por otro lado comienza a expresarse en el plexo coroideo y en el epitelio intestinal. Mientras tanto los principales cambios que ocurren en el embrión, se sitúan en la región cefálica. En ella, el cerebro ya está bien definido con todas sus estructuras, e inicia el desarrollo de los dientes incisivos, de la papila dental y del esmalte. El primer molar es visible en ambos lados del rostro del embrión. Algunos órganos continúan desarrollándose, entre ellos el hígado, que es ahora más grande y mucho más vascular. En las asas intestinales, aparecen las primeras vellosidades y el metanefros aparece más reducido, más celular y con más ductos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Análisis del patrón de expresión de un gen cuya expresión es afectada por la inactivación del factor de transcripción Nurr1

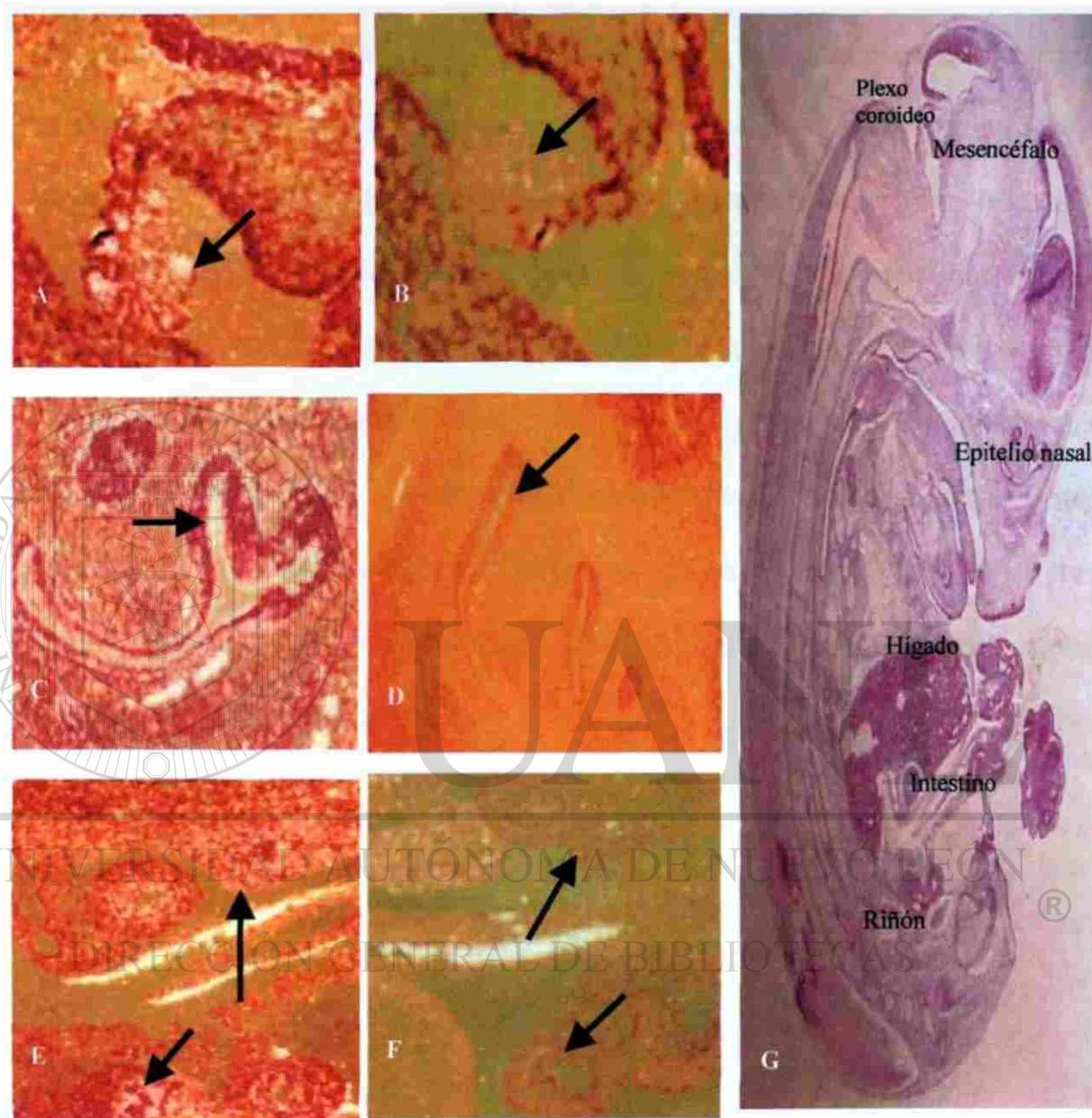
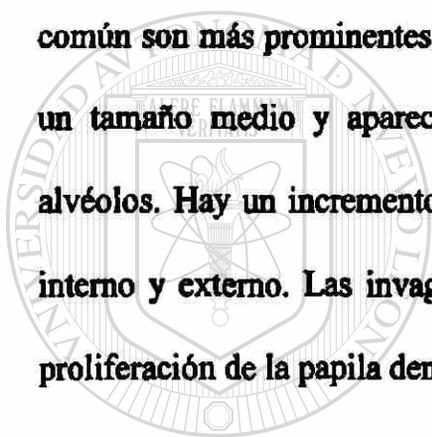


Figura 13. Expresión de OS40 en un embrión de 14.5 días. Las fotografías de A-F son imágenes de campo oscuro (8X). En A se muestra la expresión de OS40 en el plexo coroideo del cerebro posterior. B corresponde al control negativo de esta región hibridada con OS40 sentido. C y D son imágenes del epitelio nasal. En C la flecha indica la expresión de la secuencia OS40. D muestra el control negativo con OS40 sentido. En E se muestra la expresión de OS40 en el hígado (flecha superior) e intestino (flecha inferior). La imagen F fue hibridada con OS40 sentido, las flechas indican la ausencia de expresión en hígado e intestino. En G se muestra un embrión de 14.5 días teñido con hematoxilina. En él se señalan los órganos y tejidos mostrados en campo oscuro (4X).

3.3.2.8 Expresión de OS40 en embriones de 16.5 días de desarrollo

A los 16.5 días del desarrollo embrionario, la expresión de OS40 comienza a disminuir e incluso desaparece en algunos órganos. En la región mesencefálica continúa la expresión de la secuencia OS40 en muy bajo nivel. En el plexo coroideo la señal disminuye. Tanto en el hígado como en el riñón la expresión desaparece. Mientras que en el desarrollo del embrión, los cambios más importantes están relacionados con los músculos estriados y el esqueleto. Los músculos de la lengua y de la masa muscular común son más prominentes. El timo es muy grande, la mayoría de los timocitos tienen un tamaño medio y aparecen algunas células maduras. En los pulmones aparecen alvéolos. Hay un incremento en la proliferación de las células del epitelio del esmalte interno y externo. Las invaginaciones del esmalte continúan llenándose de células en proliferación de la papila dental.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Análisis del patrón de expresión de un gen cuya expresión es afectada por la inactivación del factor de transcripción Nurr1

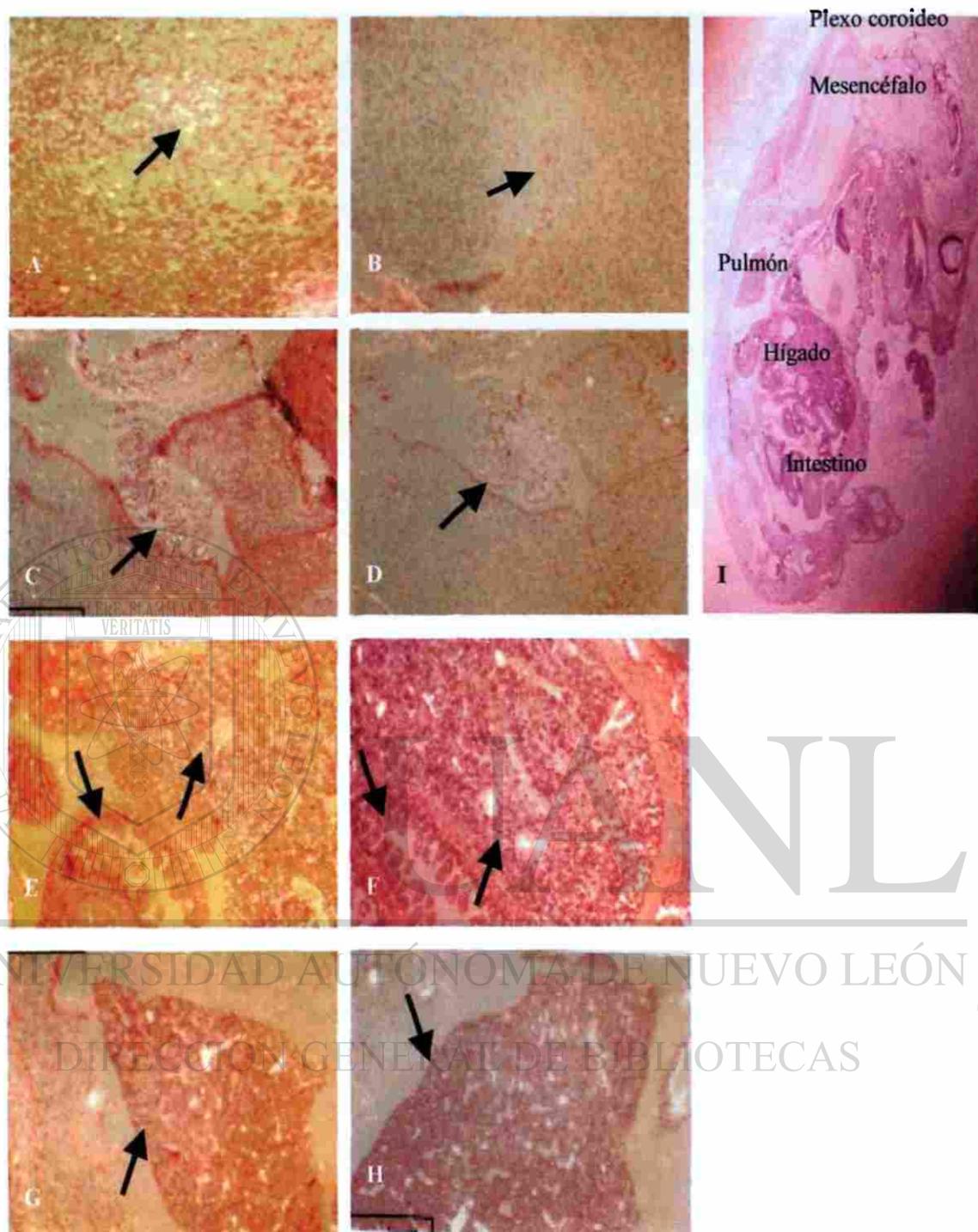


Figura 14. Expresión de OS40 en un embrión de 16.5 días. Las imágenes de A-H fueron tomadas en campo oscuro (8X). A, C, E y G son hibridaciones de la sonda OS40 antisentido, mientras que B, D, F y H fueron hibridadas con OS40 sentido (control negativo). En A se muestra la expresión de OS40 en el mesencéfalo, B es la misma región con ausencia de señal. La expresión de OS40 en el plexo coroideo del cerebro posterior es mostrado en C. D es el control negativo. En E y F las flechas señalan el hígado (flecha del lado derecho) e intestino (flecha izquierda), donde la secuencia OS40 deja de expresarse. F es el control negativo de hibridación. Las imágenes G y H corresponden a cortes histológicos de pulmón. En ambos casos la señal ya no está presente. En I se muestra un embrión de 16.5 días teñido con hematoxilina y visualizado en microscopía de luz (4X).

3.3.2.9 Expresión de OS40 en embriones de 18.5 días de desarrollo

En un embrión de 18.5 días de desarrollo la secuencia OS40 se expresa en mesencéfalo, ya no hay expresión en hígado ni en pulmón, pero comienza a expresarse en el timo, en el tercio posterior de la lengua y en la pulpa de los incisivos en formación. El cerebro esta completamente formado. El timo comienza a tener funciones endocrinas. El hígado es más hematopoyético que endocrino, con muchas células sanguíneas en diferentes etapas de formación. El riñón esta completamente diferenciado y puede iniciar su función.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Análisis del patrón de expresión de un gen cuya expresión es afectada por la inactivación del factor de transcripción Nurrl

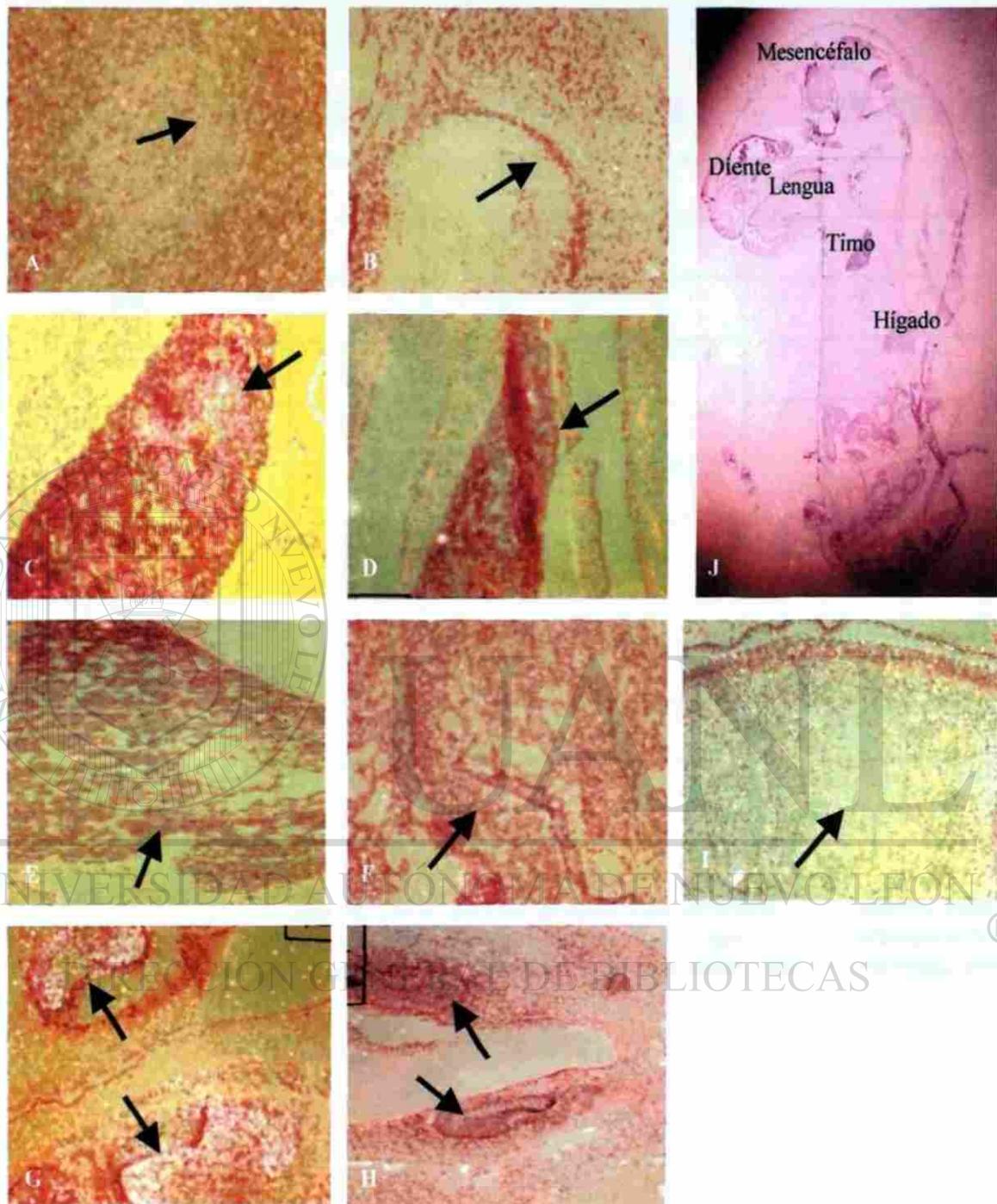


Figura 15. Expresión de OS40 en un embrión de 18.5 días. Las imágenes de A-I fueron tomadas en campo oscuro (8X). En A se señala la región mesencefálica. En ella la señal de la expresión de OS40 es muy escasa. B fue hibridada con OS40 sentido. C y D son imágenes de timo en campo oscuro. En C la flecha señala la expresión de OS40. D es también una imagen de timo pero hibridada con OS40 sentido. Las fotografías E y F fueron hibridadas con las sondas OS40 antisentido y sentido respectivamente. Las flechas señalan el hígado, órgano donde la expresión de OS40 ya no se observa. En G se indica la expresión de OS40 en la pulpa de los dientes en formación. H es el control negativo de G. La imagen I muestra la expresión de OS40 en el tercio posterior de la lengua del ratón. La imagen J corresponde a un embrión de 18.5 días, teñido con hematoxilina y fotografiado en campo claro (4X).

La siguiente tabla corresponde a un resumen cronológico del patrón de expresión de la secuencia OS40.

Tejido/ órgano	E 7.5	E 8.5	E 9.5	E 10.5	E 11.5	E 12.5	E 13.5	E 14.5	E 16.5	E 18.5
Neuroepitelio	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tubo neural	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Cerebro	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Hígado	-	-	-	+	++	++	++	+	-	-
Riñón	-	-	-	-	+	++	++	+	-	-
Pulmón	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Intestino	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Epitelio nasal	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-
Yema dental	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Plexo coroideo	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-
Lengua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabla 2. Patrón de expresión de OS40 durante el desarrollo embrionario. La primera columna corresponde al órgano o tejido donde se expresa OS40. La primera fila indica la etapa embrionaria donde aparece esa expresión. La intensidad de la expresión se representa como: débil (+), moderada (++) y fuerte (+++).

CAPITULO IV

DISCUSION

Nurr1 es un factor de transcripción cuya inactivación en un modelo animal, ocasiona la pérdida de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, mismas que degeneran en los enfermos de Parkinson. Estas células no logran adquirir el fenotipo dopaminérgico y entran en proceso de apoptosis¹⁻⁴. A partir de estas observaciones, se pensó que debido a la inactivación del factor de transcripción Nurr1 se dejaron de transcribir genes importantes para la proliferación, maduración y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo.

Como un primer paso para conocer la vía regulatoria de Nurr1, se identificaron mediante ddPCR varios genes al hacer una comparación de RNA proveniente de la región ventral mesencefálica de cerebros de ratones recién nacidos silvestres y knock-out Nurr1. Una de las secuencias de cDNA aislada, fue la sonda OS40 de aproximadamente 300 pb. La expresión del gen correspondiente a esta secuencia de DNA aislada, aparentemente estaba ausente de acuerdo a los resultados por ddPCR, en los ratones knock-out Nurr1. Cuando esta secuencia de DNA se comparó con el programa Blast del Genebank, se descubrió que era muy similar a una secuencia génica humana, cuya función se desconoce. La secuencia OS40, resultó potencialmente

Análisis del patrón de expresión de un gen cuya expresión es afectada por la inactivación del factor de transcripción Nurr1

atractiva por ser un gen nuevo presente en el humano o al menos no conocido hasta el momento.

Por otro lado, el hecho de que en el ratón Knock-out Nurr1 no haya expresión de la secuencia OS40 en el mesencéfalo, sugiere que debido a la inactivación del factor de transcripción Nurr1 la secuencia OS40 no pudo ser transcrita. Para comprobar lo anterior, se hizo una comparación de la expresión de OS40 en secciones sagitales de cerebros de ratones recién nacidos knock-out y silvestres, mediante hibridación *in situ*. Las hibridaciones revelaron que en los ratones silvestres la expresión de OS40, esta presente en la región ventral mesencefálica, pero en muy bajo nivel. Mientras que en el mutante Nurr1 se comprobó que la expresión de OS40 no esta presente. Lo cual de alguna manera nos lleva a pensar que el factor de transcripción Nurr1 podría estar involucrado en la regulación de OS40 al menos en esta región del cerebro, ya que fue únicamente en el cerebro donde hubo ausencia de expresión de la secuencia OS40.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Esta posibilidad es muy grande si tomamos en cuenta que actualmente se sabe que uno de los genes afectados por la inactivación de Nurr1 en la región ventral mesencefálica, es la TH o tirosina hidroxilasa. Esta enzima es un marcador importante de neuronas dopaminérgicas, que en el KO no se expresa en el mesencéfalo ventral. Sin embargo, su expresión esta presente en otras regiones del cerebro¹⁻⁴. Recientemente se comprobó que Nurr1 regula la expresión de la TH, al unirse a su región promotora^{47,48}.

Por otro lado, cuando se analizó el patrón de expresión de la secuencia OS40 durante el desarrollo embrionario del ratón, se descubrió que su expresión inicia desde

Análisis del patrón de expresión de un gen cuya expresión es afectada por la inactivación del factor de transcripción Nurr1

etapas muy tempranas, específicamente a los 8.5 días en el neuroepitelio del embrión. Cabe mencionar que Nurr1 comienza a expresarse a los 10.5 días del desarrollo embrionario en el mesencéfalo del ratón. Esto indica que OS40 también posee una expresión independiente de Nurr1. Mientras que Nurr1 se expresa en células postmitóticas antes de su diferenciación, es decir en neuroblastos, la secuencia OS40 comienza a expresarse cuando el tejido neural aún está en su etapa más proliferativa, mucho antes de que el mesencéfalo se forme.

Esto sugiere que OS40 en un inicio de su expresión en etapas tempranas, no requiere regulación génica por parte del factor de transcripción Nurr1. Pero cabe la posibilidad de que a nivel mesencefálico, si se requiera de la presencia del factor de transcripción Nurr1 para que la expresión de OS40 pueda ser inducida.

Siguiendo la expresión de OS40 en el desarrollo embrionario, a los 9.5 días de gestación ya se ha formado el tubo neural y OS40 se expresa a lo largo de él. Cuando el embrión alcanza los 10.5 días, en el tubo neural aparecen las dilataciones cerebrales. En ese momento, en el mesencéfalo y rombencéfalo comienza la expresión de OS40, así como en algunos órganos periféricos: hígado y pulmón. A los 11.5 días OS40 comienza a expresarse también en riñón. A los 12.5 y 13.5 días del desarrollo embrionario no se observan cambios en la expresión de OS40. En un embrión de 14.5 días aparece expresión de OS40 ahora en el epitelio nasal, intestino y plexo coroideo del cerebro posterior. A los 16.5 días comienza a decrecer la señal en el plexo coroideo, mientras que en el hígado, pulmón e intestino la señal desaparece. A los 18.5 días comienza la expresión de OS40 en diente en formación, lengua y timo.

La intensidad de la expresión de OS40 en los diferentes órganos y tejidos es mayor que la expresión encontrada en la región mesencefálica.

Sin embargo, de acuerdo a los resultados mostrados en el presente estudio, la expresión del gen OS40 en la región ventral mesencefálica de los ratones mutantes Nurr1, fue completamente nula. Mientras que en órganos periféricos y tejidos positivos para la sonda antisentido OS40, no hubo alteración alguna.

Una observación interesante, es el momento en que comienza a expresarse OS40 en esos órganos. En el hígado por ejemplo, la primera indicación de desarrollo aparece a los 9.5 días del desarrollo embrionario, pero de los 10 a los 14 días es el momento en que el órgano está en constante proliferación celular y antes del nacimiento termina su maduración. En el hígado, la señal de OS40 es detectada a los 10.5 días de gestación y se mantiene hasta los 14.5 días, mientras que de los 16.5 días en adelante, la señal desaparece.

En el pulmón, aunque su desarrollo inicia desde los 10 días, éste continúa su maduración hasta al momento del nacimiento sin embargo la expresión de OS40 se presenta en el embrión de 12.5 días y desaparece en el embrión de 16.5 días.

El desarrollo del riñón comienza en el embrión de 10 días. La expresión de OS40 aparece a los 11.5 días y desaparece a los 16.5 días, cuando degeneran pronefros y metanefros.

En el intestino, OS40 se expresa a los 14.5 días de desarrollo embrionario y desaparece a los 16.5 días. En el embrión de 18.5 días la expresión de OS40 es muy intensa en la pulpa dental de los incisores. En ella, las células están en intensa proliferación.

El hecho de que OS40 se expresa en diferentes órganos y tejidos, pero sobre todo que se exprese en las primeras etapas de la formación de ellos, sugiere que la secuencia OS40 podría estar relacionada con proliferación celular y/o con diferenciación celular.

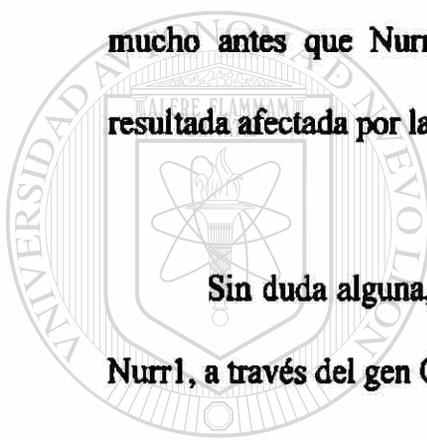
Cabe mencionar que los órganos y tejidos donde encontramos la expresión de la secuencia OS40, no expresan normalmente Nurr1. Sin embargo, se ha reportado que la expresión de Nurr1 es inducida en el hígado en regeneración¹⁷. Lo cual apoya la idea de que ambos genes pueden estar involucrados en los procesos de proliferación y diferenciación celular.

Esta posibilidad resulta más lógica, que pensar en una probable relación en la expresión de OS40, entre los diversos órganos y tejidos. A menos de que estén involucrados con algún tipo de regulación hormonal. Lo anterior es sugerido por el hecho de que Nurr1 interviene en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis¹⁻³. Sin embargo es difícil pensarlo, ya que la expresión de OS40 va de cerebro, hígado, timo hasta epitelio nasal y diente en formación.

Sin embargo es difícil predecir la función de OS40 y su posible relación con Nurr1. Probablemente radique en que al inactivar la función del factor de transcripción Nurr1 en ratones, no fue posible transcribir al gen OS40, quien podría estar relacionado con la proliferación o bien con la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas de la región ventral mesencefálica.

Y más difícil de entender aún es el hecho de que OS40 inicia su expresión mucho antes que Nurr1 y que sin embargo su expresión en el mesencéfalo haya resultado afectada por la inactivación de él.

Sin duda alguna, el presente trabajo abrió una nueva puerta sobre la función de Nurr1, a través del gen OS40 y con ello un gran número de preguntas por contestar.



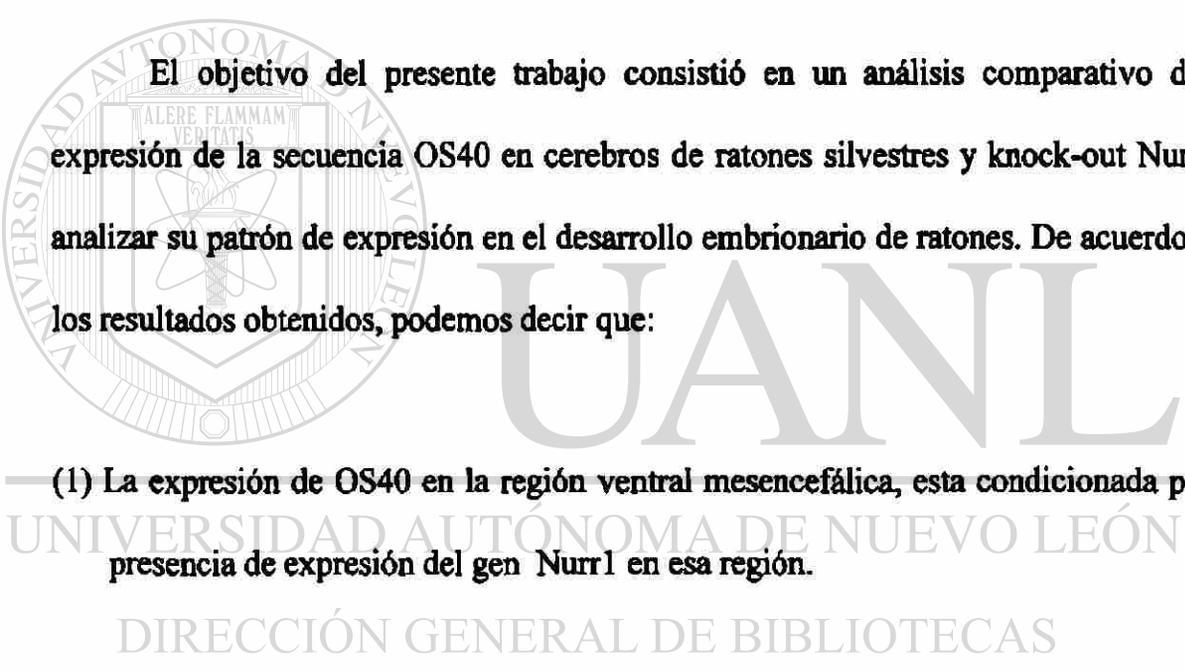
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIONES

5.1 CONCLUSIONES



El objetivo del presente trabajo consistió en un análisis comparativo de la expresión de la secuencia OS40 en cerebros de ratones silvestres y knock-out Nurr1 y analizar su patrón de expresión en el desarrollo embrionario de ratones. De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos decir que:

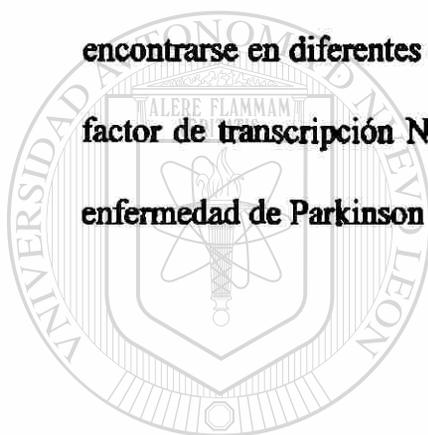
(1) La expresión de OS40 en la región ventral mesencefálica, esta condicionada por la presencia de expresión del gen Nurr1 en esa región.

(2) OS40 inicia su expresión al día 8.5 del desarrollo embrionario en el ratón.

(3) Se expresa durante el desarrollo embrionario del ratón, en diferentes órganos y tejidos.

5.2 CONTRIBUCIONES

Este trabajo proporciona información importante en el área de investigación básica, sobre un nuevo gen cuya función se desconoce y que es muy similar a una secuencia génica humana. El patrón de expresión que posee OS40 es de gran relevancia por presentarse en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. Además, por encontrarse en diferentes órganos de vital función. Así como su posible relación con el factor de transcripción Nurr1 al ser afectada su expresión en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson (knock-out Nurr1).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

1. **Saucedo-Cardenas and Conneely. O.M.** Comparative distribution of Nurr1 and Nur77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *Mol. Neurosci.* 7: 51-63. (1996).
2. **Saucedo-Cardenas, Kardon R., Ediger, R. T., Lydon J.P., Conneely, O.M.** Cloning and structural organization of the gene encoding the murine nuclear receptor transcription factor, Nurr1. *Gene* 187: 135-139. (1997).
3. **Saucedo-Cardenas, Quintana-Hau J.D., Le W.D., Smidt, M.P., Cox, J.J., De Mayo F., Burbach J.P., and Conneely O.M.** Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 4013-4018. (1998).
4. **Zetterstrom R. Williams, T. Perlmann, L. Olson.** Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamina system. *Mol Brain Res* 41(1996)111-120
5. **Evans, R.M.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-892)
6. **Beato, M.** Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 56: 335-344. (1989)
7. **Tsai, M.J. And B.W.. O'Malley.** MBIU: Mechanism of steroid Hormone Regulation of gene Transcription. R.G. Landes Company. Autin. (1994)
8. **Conneely, O.M. and B.W. O'Malley.** Orphan receptors: Structure and Function relationships. M.-J. Tsai and B.W. O'Malley, editors R:G: Landes Company, Austin. 111-133. (1994).

Análisis de la expresión de un gen afectado por la inactivación del factor de transcripción Nurrl

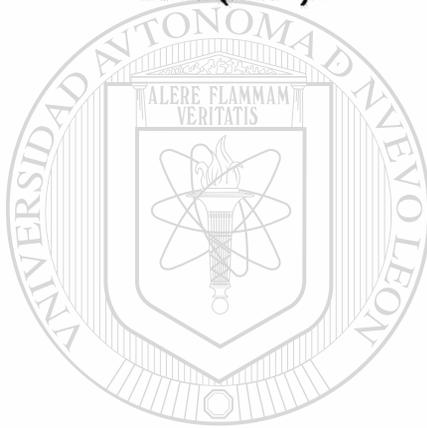
9. **Wilson, T.E., Fahrner, T.J. and Milbrandt, J.** The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol. Cell Biol.* 13: 5794-5804. (1993)
10. **Hazel, T.G., Nathans, D. And Lau, L.F.** A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8444-8448. (1988).
11. **Arenander, A.T., de Vellis, J., and Herschman H.R.** Induction of c-fos and TIS gene in cultured rat astrocytes by neurotransmitters. *J. Neurosci.* 24: 107-114. (1989).
12. **Ryseck, R.P., MacDonald-Bravo, H., Mattei, M.G., Rupperts, 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).
13. **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).
14. **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 Lett* 96: 117-122. (1995).
15. **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).
16. **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. (1995).
17. **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).
18. **Mages, H.W., Rilke, O., Bravo, R., Senger, G. and Kroczeck, 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).
19. **Wilson, T.T., 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).
20. **O'Malley, B.W. and Conneely, O.M.** Minireview: Orphan Receptors: In search of a unifying hypothesis for activation. *Mol.Endocrinol.* 6: 1359-1361. (1992)

Análisis de la expresión de un gen afectado por la inactivación del factor de transcripción Nurr1

21. **Cooney, 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 responses 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).
22. **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).
23. **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).
24. **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).
25. **Moras, D., and Gronemeyes, H.** *Curr. Opin. Cell Biol* 10:384-391 (1998).
26. **Nolte, R.T., Wisely, G.B. Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G. Willson, T.M., Glass, C.K., and Milburn, M.V.** *Nature* 395:137-143. (1998).
27. **Darimont B.D., Wagner, R.L. Apriletti, J.W., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., Baxter, J.D., Fletterick, R.J., and Yamamoto, K.,** *Genes Dev.* 12:3343-3356. (1998)
28. **Tsai, M.J. And O'Malley, B.W.** Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 451-486. (1994).
29. **Wilson, T.E., Fahrner, T.J. and Milbrandt, J.** 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. (1993)
30. **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)
31. **Perlmann, T., and Jasson, L.** A novel pathway for vitamin A signalling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and Nurr1. *Genes Dev.* 9:769-782. (1995).
32. **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).

Análisis de la expresión de un gen afectado por la inactivación del factor de transcripción Nurr1

45. **Marsden C.**, Problems with long term-levodopa therapy for Parkinson's disease. *Clinical Neuropharmacology*, 17: S32-S44. (1994).
46. **Wagner J.**, Peter Akerud, Diogo S. Castro, Pontus C. Holm, Joseph M. Canals, Evan Y. Snyder, Thomas Perlmann and Ernest Arenas. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nature Biotechnol.* 17:653-659. (1999).
47. **Baffi J.S.**, Palkovits. S., Castillo O., Mezey E., and Nikodem V.M. Differential expression of tyrosine hydroxylase in catecholaminergic neurons of neonatal wild-type and Nurr1- deficient mice. *Neurosc.* 93: 6331-642. (1999).
48. **Sakurada K.**, Ohshima-Sakudara M., Palmer T.D., and Gage F.H. Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Dev.* 126: 4017-4026. (1999).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

