

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
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

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

1.3 Nurr1 (Nurr relacionado al factor 1)

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.

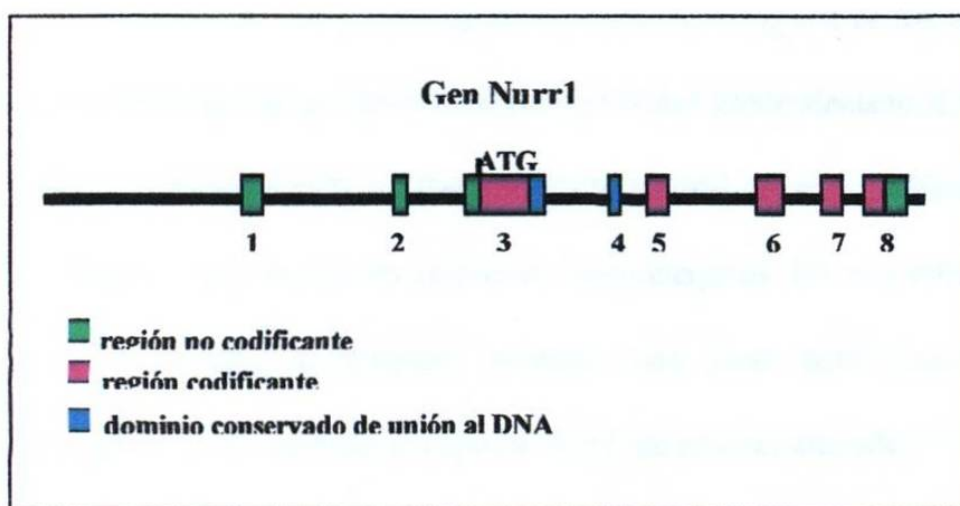


Figura 1. Organización estructural del gen Nurr1

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.

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 mas alta y experimentan efectos motores adversos⁴⁵. Otra estrategia terapéutica que se ha empleado, es el transplante 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 en 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.

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.

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 cruces 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

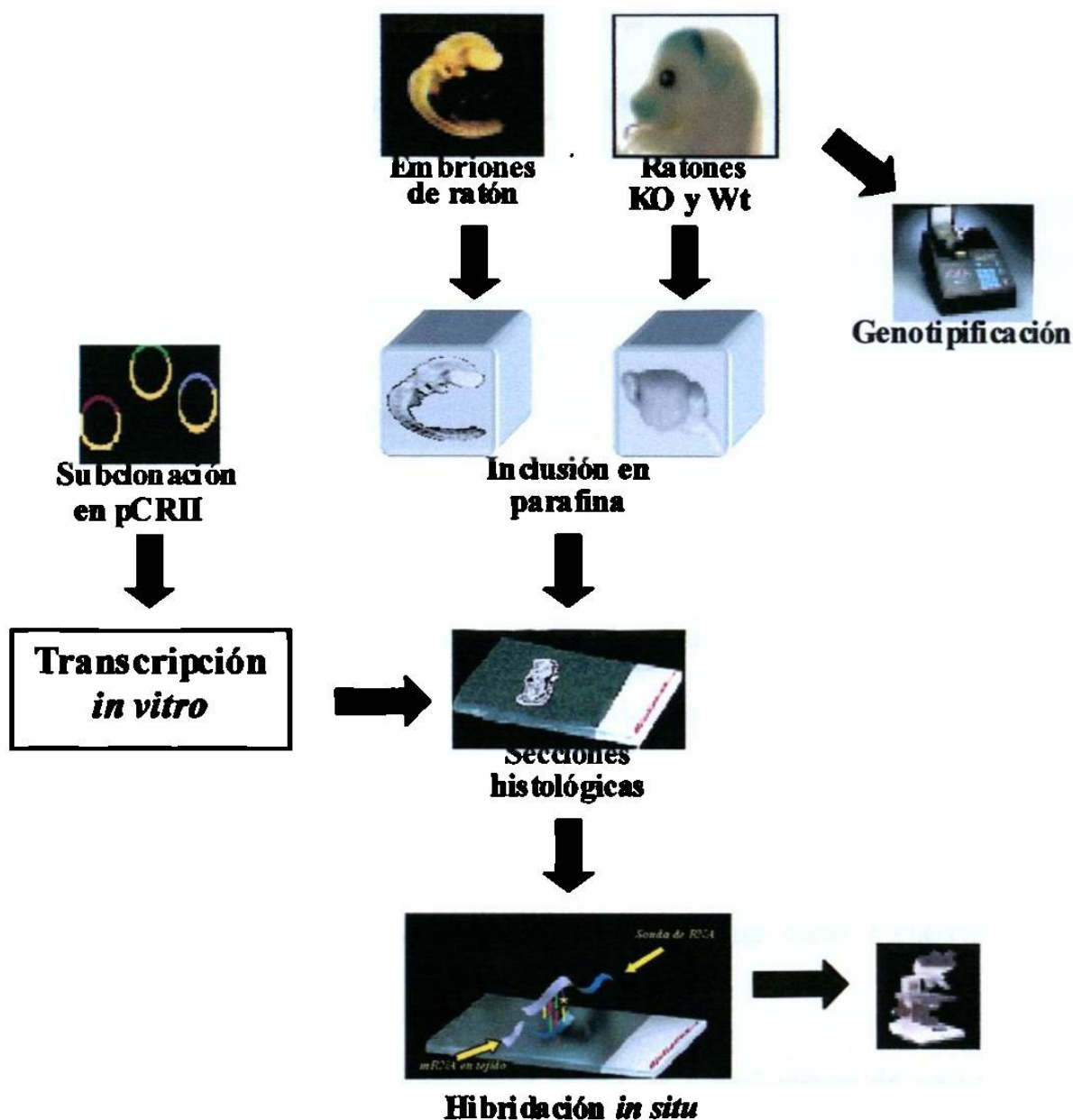


Figura 2. Estrategia Experimental. Se muestran las etapas involucradas en el desarrollo de la investigación: disección de embriones CDI y de cerebros de ratones recién nacidos KO y silvestres; inclusión en parafina, obtención de secciones histológicas e hibridación *in situ* con sondas de RNA sintetizadas 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 S^{35} , 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, ditiotreitól, 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 cruzas de ratones heterocigotos Nurr1. Los ratones recién nacidos producto de esas cruzas, 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 cruzas 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 seváge. 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L de solución de lisis III (acetato de sodio 3M), se incubó en hielo 10 minutos y centrifugó a 14,000 r.p.m. 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorff de 2 mL, se añadieron 450 μ L 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 μ L 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 μ L 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, concluída 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 nM
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 5µL 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 2000µL. 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.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Obtención del genotipo de ratones recién nacidos

A partir de cruzas 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).

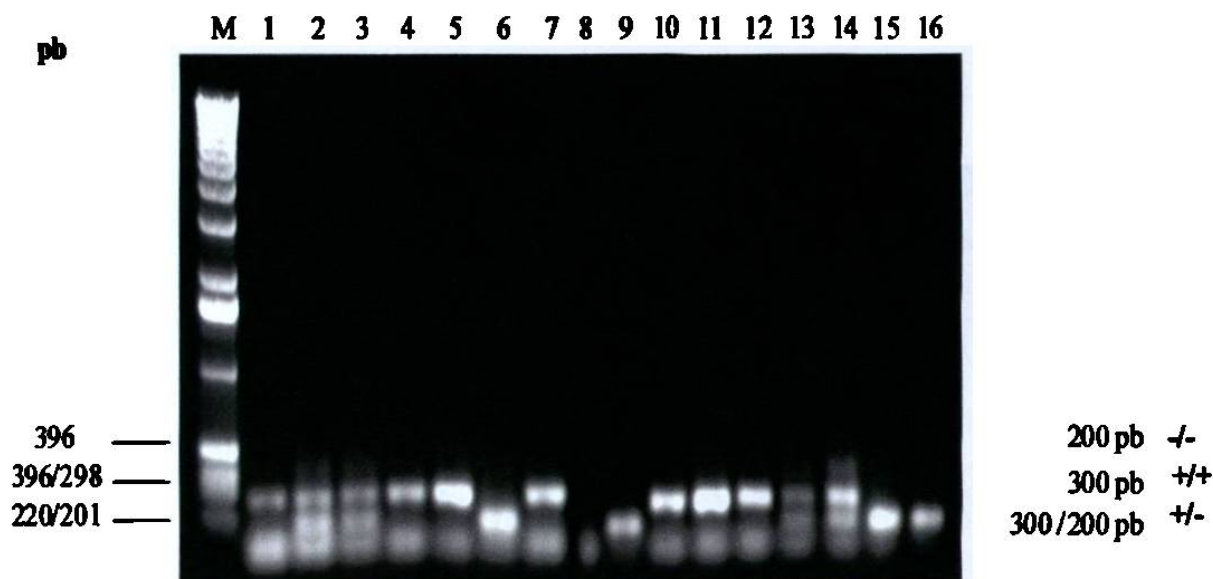


Figura 3. Determinación del genotipo de ratones recién nacidos. Se muestran las amplificaciones obtenidas por PCR a partir de DNA genómico de ratones. El marcador de peso molecular utilizado fue de 1 kb. Los productos fueron resueltos en un gel de agarosa al 0.8%

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.

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

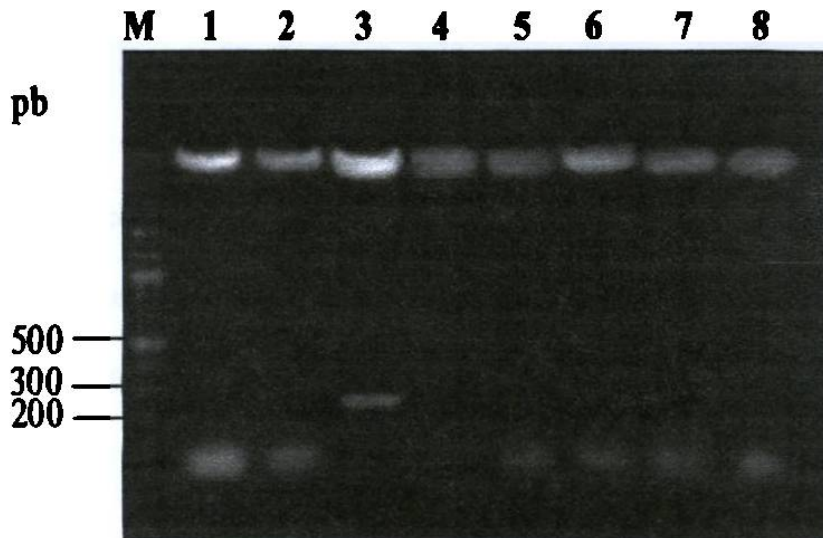


Figura 4. Subclonación. Se muestra el DNA plasmídico extraído de bacterias transformadas con el vector pCRII y digerido con la enzima EcoRI . En el carril número tres se muestra un fragmento de entre 300 y 200 pb, que corresponde a una clona recombinante. El marcador de peso molecular utilizado fue de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

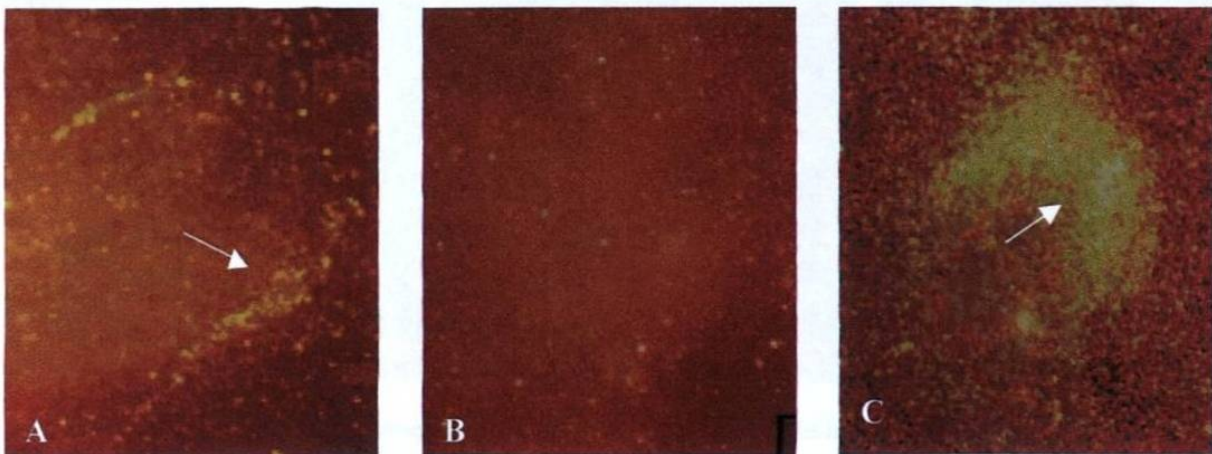


Figura 5. Expresión de la sonda OS40 en cerebros de ratones silvestres. En A se muestra la expresión de la secuencia OS40 a nivel de la flexura mesencefálica (Región ventral mesencefálica), mediante hibridación *in situ*, empleando la sonda OS40 antisentido. La imagen B, corresponde a una imagen tomada 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.

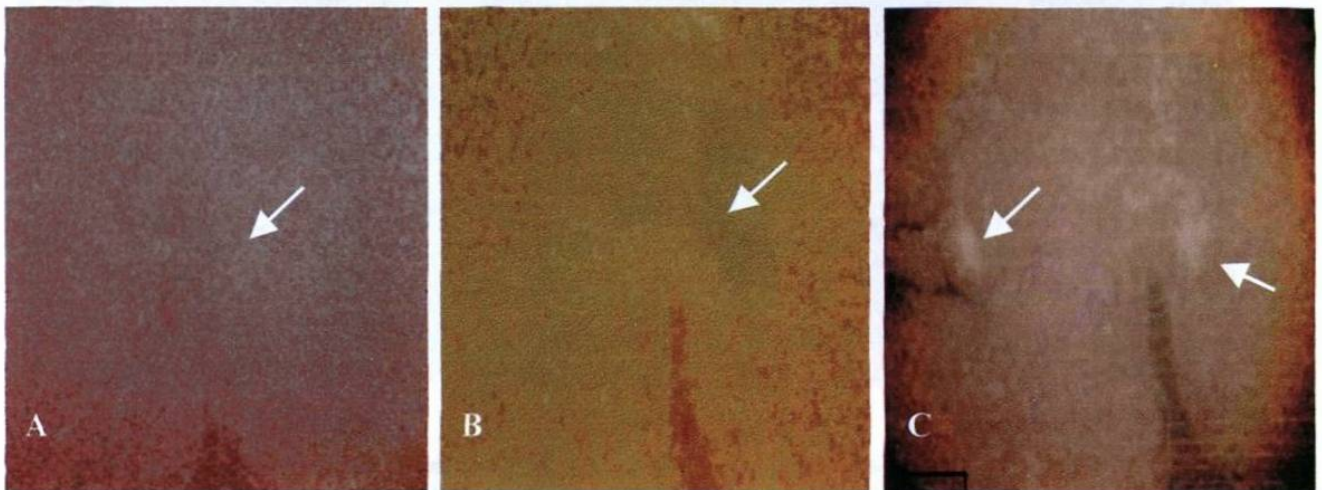


Figura 6. Confirmación de la ausencia de expresión de la sonda OS40 en cerebros de ratones recién nacidos knock-out Nurr1. Las figuras A, B y C son imágenes de campo oscuro, tomadas de la región ventral mesencefálica. La imagen A fue hibridada con la sonda OS40 antisentido. La flecha indica el sitio 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.

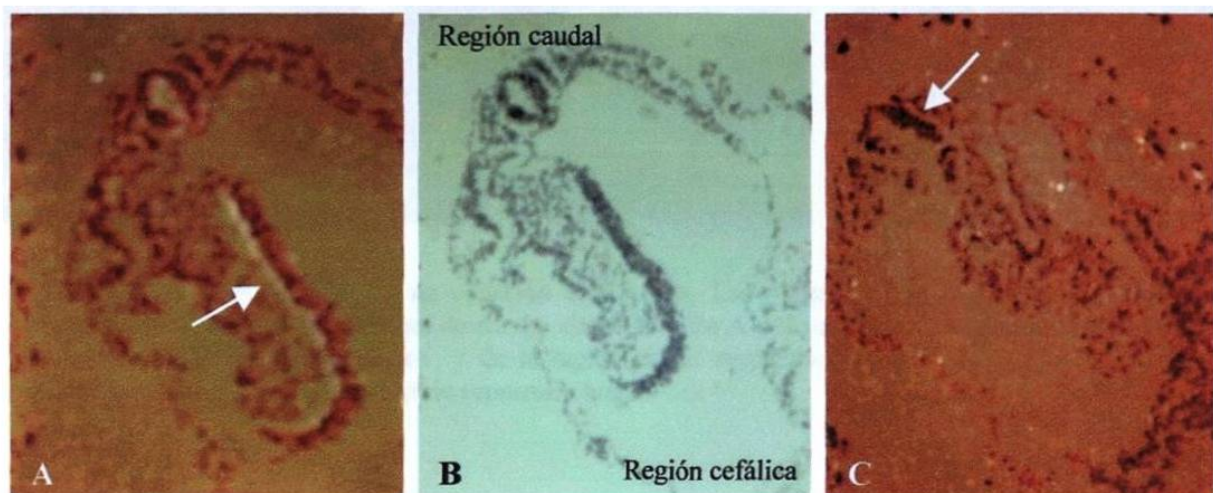


Figura 7. Expresión de OS40 en un embrión de 8.5 días. A y C son imágenes de campo oscuro, B es una imagen de campo claro. En A, la flecha indica el sitio de expresión de OS40 en el neuroepitelio del embrión. C corresponde al control negativo de la expresión de OS40. Amplificación 8X.

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.

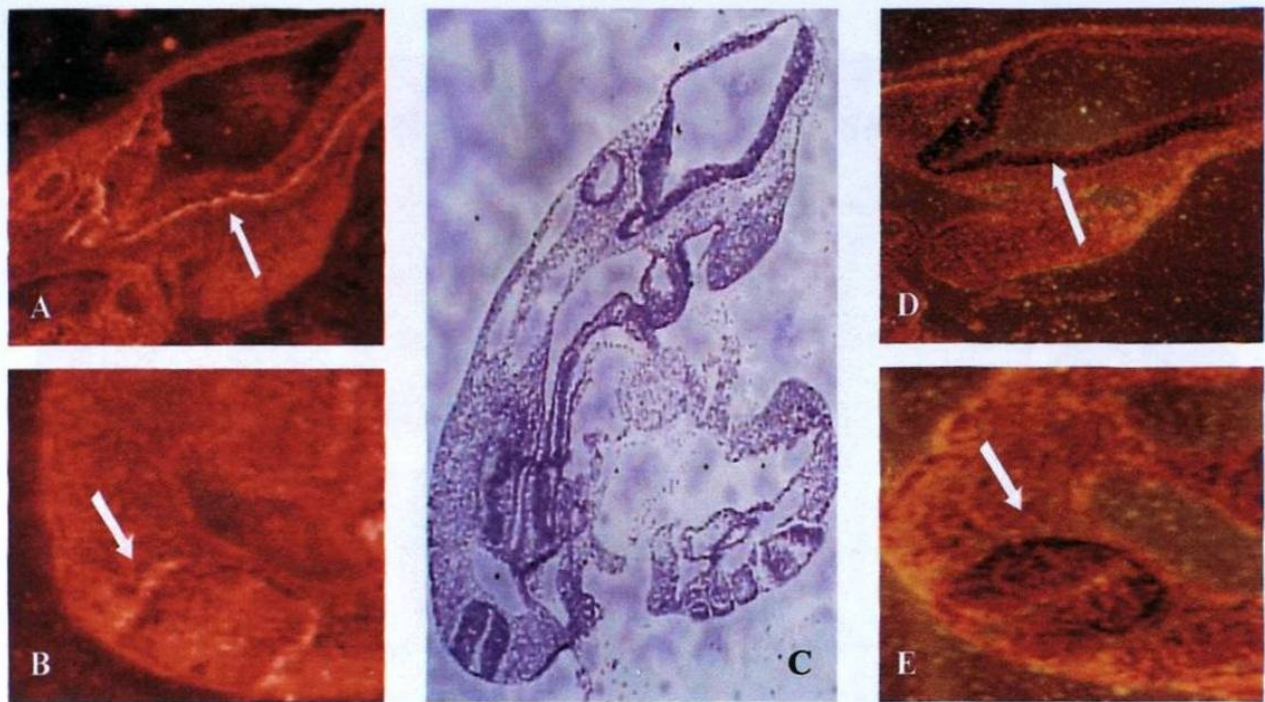


Figura 8. Expresión de OS40 en un embrión de 9.5 días. Las imágenes A, B, D y E son imágenes de campo oscuro (8X), C es una imagen de campo claro (4X). En A y B se muestra la expresión de OS40 en el tubo neural de la región cefálica y de la región caudal respectivamente. Mientras que D y E son hibridaciones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

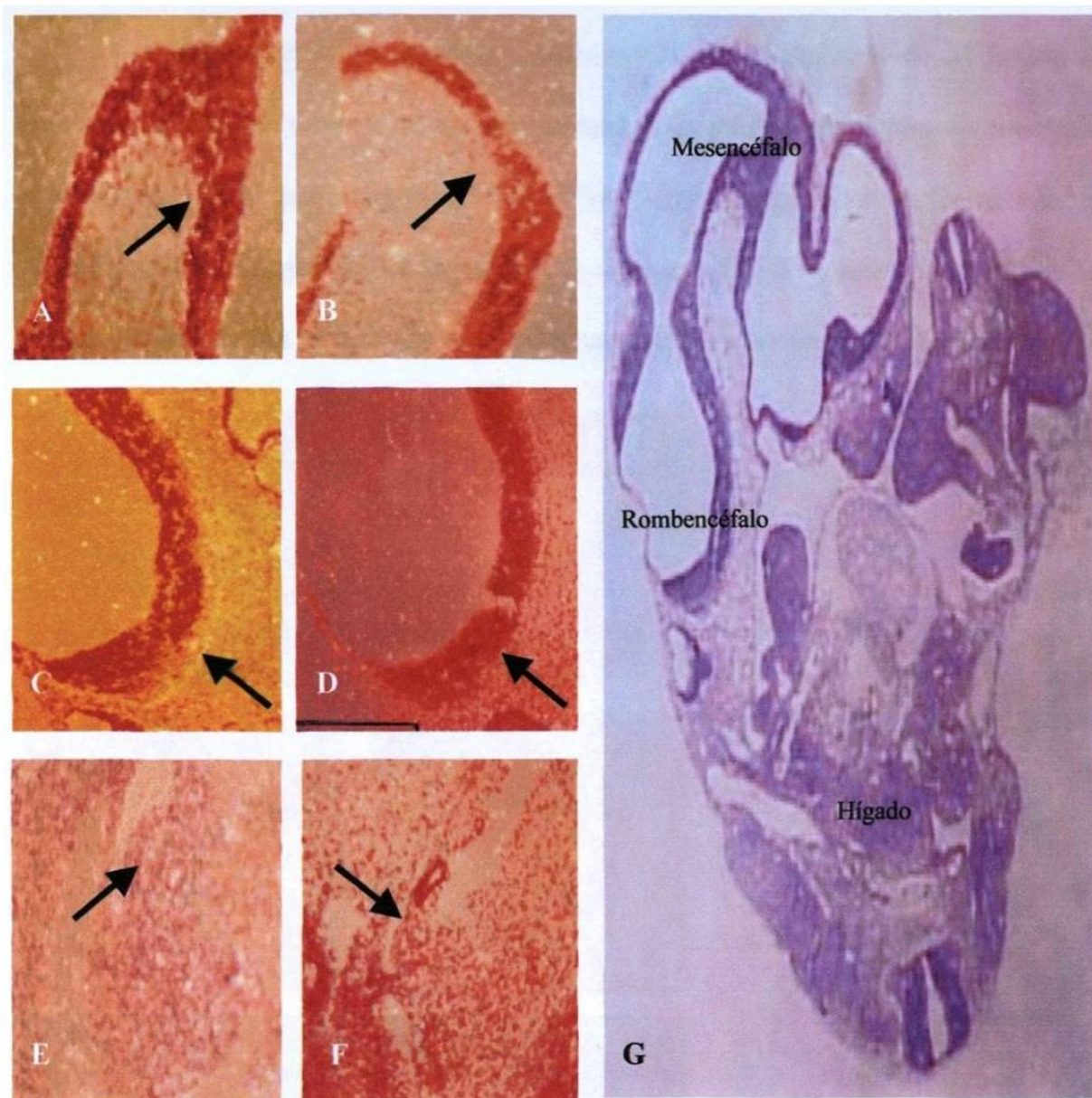


Figura 9. Expresión de OS40 en un embrión de 10.5 días. Las fotos A, C y E corresponden a fotografías de campo oscuro hibridadas con la sonda OS40 antisentido. B, D y F son imágenes de campo oscuro (8X) hibridadas con OS40 sentido (controles negativos). En G se muestra el campo claro de un embrión completo 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.