

Pérdida de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas por la inactivación del gen *Nurr1* □

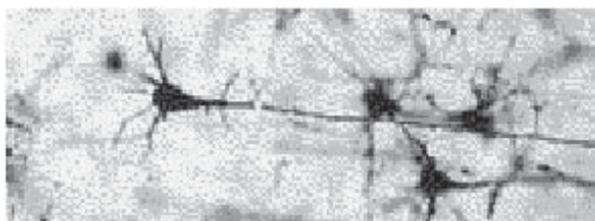
Odila Saucedo Cárdenas,* Roberto Montes de Oca Luna**



La dopamina es un neurotransmisor de gran importancia clínica. Es importante en el control motor, en la función cognoscitiva y en el comportamiento emocional.¹ La mayoría de las neuronas dopaminérgicas se localizan en las regiones de la sustancia negra (A9) y región ventral tegmentaria (A10) dentro del cerebro

medio.² Las neuronas de la sustancia negra se proyectan al cuerpo estriado dorsal para formar la ruta negro-estriada que regula el control motor. La degeneración o pérdida de la función de estas neuronas produce los síntomas característicos de la enfermedad de Parkinson.^{1,3-4} Las neuronas del área ventral tegmentaria envían sus proyecciones al sistema límbico y corteza cerebral para regular el comportamiento emocional,⁵ y las alteraciones de esta vía de dopamina se relacionan con problemas emocionales y esquizofrenia.⁶⁻⁸

Aunque se cuenta con gran información acerca de la importancia fisiológica y clínica de las neuronas dopaminérgicas es escaso el conocimiento acerca de los mecanismos básicos de su desarrollo. El entendimiento de estos sistemas dopaminérgicos y los desórdenes asociados a ellos requiere de una gran comprensión de las características moleculares y de los mecanismos del desarrollo de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, especialmente en aquellas terapias donde se utilicen principalmente



Neuronas humanas.

células y genes para el tratamiento futuro de desórdenes neurológicos.⁹ A la fecha se han identificado diferentes genes necesarios para el funcionamiento y el desarrollo de dichas neuronas dopaminérgicas, y en el presente trabajo se demuestra la importancia del gen *nurr1* en su sobrevivencia.

Nurr1 es un factor de transcripción que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares. El DNAC (DNA complementario al RNA mensajero) que codifica para este receptor huérfano *Nurr1* fue aislado de una biblioteca de DNAC de cerebro de ratón.¹⁰ Los homólogos de *Nurr1* se conocen como RNR-1 en la rata¹¹ y NOT en el humano.¹² La expresión constitutiva de este gen está restringida al tejido cerebral en el adulto, pero su expresión puede ser inducida en otros tejidos en respuesta a estímulos extracelulares. Por ejemplo, se ha encontrado expresión de *Nurr1* en la corteza suprarrenal en respuesta a la estimulación por adrenocorticotropina y en células de hígado en regeneración.¹¹

En este trabajo se analizó la expresión del gen *nurr1* en el cerebro durante el desarrollo embrionario y durante la etapa adulta en la región ventral mesencefálica. Además, mediante la tecnología de

□ El presente artículo está basado en la investigación «Pérdida de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas por la inactivación del gen *nurr1*: Desarrollo de un modelo animal para la enfermedad de Parkinson», galardonada con el Premio de Investigación UANL 1999, en la categoría de Ciencias de la Salud, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2000.

* Depto. de Histología, Facultad de Medicina y Centro de Investigación Biomédicas del IMSS.

** Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

inactivación de genes por recombinación homóloga en células madre embrionarias, generamos un modelo animal murino carente de Nurr1, que nos ayudó a esclarecer una función más específica de este gen (figura 1). La inactivación de *nurr1* es letal, ya que los ratones homocigotos para esta mutación se murieron en el primer día de vida. Además se demostró que las neuronas dopaminérgicas no sobreviven y mueren por apoptosis, conforme avanza el desarrollo. Hasta la fecha el empleo de la tecnología de inactivación de genes por recombinación homóloga ha proporcionado la mayor cantidad de información acerca de la función de genes de gran importancia clínica. El contar con este tipo de modelos acelera la obtención del conocimiento del mecanismo molecular causante de la manifestación de la enfermedad en el humano. En el presente trabajo, el modelo animal murino generado representa una herramienta valiosa para el estudio de la enfermedad de Parkinson.

Metodología

Clonación y caracterización del gen nurr1

El gen *nurr1* se clonó de bibliotecas genómicas murinas de la cepa 129/SvEv, preparadas en el vector Dash II (Stratagene) y P1 (Genome Systems Inc), usando como sonda el DNAC de *nurr1* de acuerdo a la metodología previamente reportada¹³. La estructura del gen *nurr1* se determinó a partir de las clonas genómicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando oligonucleótidos específicos del DNAC de *nurr1*. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis y secuenciados directamente.¹⁴⁻¹⁶

Análisis del patrón de expresión del gen nurr1

El análisis del patrón de expresión en el adulto se realizó en cerebros de ratones de la cepa 129SvEv de 6 semanas de edad, y el análisis de la expresión durante el desarrollo embrionario se realizó en embriones de 7 a 18 días de gestación, mediante hibridación *in situ*. Tanto los cerebros como los embriones fueron procesados para obtener cortes histológicos de 10mm. La hibridación se realizó usando dos sondas de RNA, antisentido y sentido, específicas para Nurr1, preparadas con un estuche de

transcripción *in vitro* (Promega). Los cortes fueron permeabilizados con proteinasa K (20mg/ml), fijados en paraformaldehído al 4%, tratados con ácido acético anhidro preparado en trietanolamina 0.1M pH8.0 y deshidratados con etanol.

La hibridación fue llevada a cabo en una cámara húmeda con 6x10⁶cpm de sonda de RNA en un volumen de 70 ml de buffer de hibridación (DTT 0.1M, formamida 50%, sulfato de dextran 10%, SSC 4X, solución de Denhardt 1X, y 250 mg/ml de RNAt de levadura), durante 18 horas a 58°C. Posteriormente, las preparaciones fueron lavadas en condiciones de fuerza iónica alta con DTT 0.1M, SSC 2X y formamida al 50% a 60°C, digeridas con RNAsa A (20mg/ml) a 37°C, durante 30 minutos, y entonces lavadas a una fuerza iónica baja de 0.1X SSC a temperatura ambiente por 15 minutos. Las preparaciones fueron deshidratadas y secadas a temperatura ambiente.^{17,18} La localización autoradiográfica de la sonda unida fue llevada a cabo por aposición de las preparaciones a una película de rayos X, durante 3 días.

Inactivación del gen nurr1

Para la construcción del vector recombinante portando el gen *nurr1* mutado se utilizó un fragmento genómico, de aproximadamente 7.6 kb, obtenido de la biblioteca genómica antes mencionada. El vector de clonación utilizado fue el plásmido PSP72. El fragmento genómico *nurr1* contenía los exones del 2 al 8. El gen *neo*^r PGKNEObpA¹⁹ se insertó en el sitio único de restricción *Nco*I localizado entre el codón de iniciación ATG, dentro del exón 3, y el dominio de unión al DNA.¹⁴ La inserción del gen *neo*^r dentro del exón 3 divide el fragmento genómico *nurr1* de 7.6 kb en dos fragmentos 5´ y 3´ de homología *nurr1* que tienen un tamaño de 1.9 y 5.7 kb respectivamente (figura 1A). El gen de la timidin cinasa del virus herpes simple²⁰ se clonó en el extremo 5´ del exón 3 con una orientación transcripcional opuesta a los genes *nurr1* y *neo*. El DNA del vector recombinante *nurr1* mutado se linearizó en el sitio de corte para la enzima de restricción *Not*I localizado en un linker sintético en el extremo 3´ del brazo largo de homología.

Obtención de Células Madre Embrionarias (CME) con la mutación nurr1

Se utilizaron procedimientos previamente reporta-

dos²¹ para cultivar y manipular las CME, antes y después de la electroporación. El DNA del vector recombinante fue linearizado con la enzima de restricción *NotI*, y se electroporó en células CME, creciendo activamente (AB-1). Las CME fueron resuspendidas en PBS a una densidad celular de 1.1×10^7 células/ml. Se mezclaron 25 mg del vector recombinante *Nurr1* linearizado con 0.9 ml de la suspensión de CME (10^7 células), dentro de una cubeta especial para electroporación. Se electroporaron las CME en un aparato Biorad gene Pulsar a 230 mV y 500 mFD. Las CME electroporadas se cultivaron en medios selectivos conteniendo las drogas G418 (180 mg/ml) y 1-(2-deoxy-2-fluoro-b-D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil (FIAU) a una concentración de 0.2 mM durante 11 días. Las colonias de CME (G418^R y FIAU^R) fueron recogidas y expandidas en placas de 96 pozos. Cada una de estas clonas se analizaron por minisouthern²² para identificar aquellas con la recombinación homóloga y por lo tanto con la introducción de la mutación en el gen *nurr1*.

Obtención de ratones con el gen *nurr1* inactivado

Las CME con el gen *nurr1* mutado se microinyectaron dentro de la cavidad de embriones de ratón en estado de blastocisto de 3.5 días de desarrollo. Los embriones se transfirieron adentro de las trompas uterinas (de 6-8 embriones por trompa) de ratonas nodrizas falsamente preñadas. Se obtuvieron ratones quiméricos, los cuales transmitieron el alelo mutado obteniéndose ratones heterocigotos, y posteriormente éstos se cruzaron para obtener los ratones homocigotos para la mutación del gen. Nuevamente se utilizó el procedimiento de Southern y PCR para demostrar la presencia de la mutación en el gen *nurr1* en los ratones.

Inmunohistoquímica y detección de apoptosis

Para los estudios inmunohistoquímicos y de apoptosis se prepararon cortes histológicos de embriones y cerebros de ratones recién nacidos, de tipo silvestre y mutantes. Para la detección de TH y AADC se utilizaron anticuerpos específicos, en combinación con un estuche de avidina-biotina (Vector Laboratories). Para la detección de apoptosis se utilizó un estuche específico de la misma (Trevigen).

Resultados

Organización estructural del gen *nurr1*

Encontramos que el gen *nurr1* está compuesto de 8 exones y 7 intrones distribuidos en aproximadamente 7.8 kb. El rango de los exones va desde 130 a 866 pb y en el tercer exón se encuentra el codón de iniciación (ATG). Todas las uniones exón/intrón presentaron la secuencia consenso GT-AG, de acuerdo con la regla de splicing donador-aceptor.²³

Patrón de expresión del gen *nurr1*

La expresión del gen *nurr1* durante el desarrollo

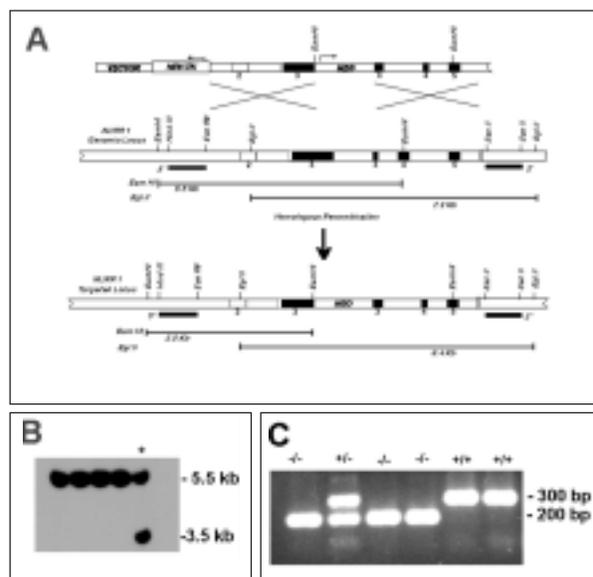


Figura 1. Inactivación del gen *nurr1* en CME y detección del genotipo. En A se representan el diseño del vector recombinante *nurr1*, el gen silvestre *nurr1* y el gen *nurr1* mutado, respectivamente. Además se muestra el tamaño de los fragmentos Bam H1 y Bgl II que se obtienen al analizar el DNA genómico de las clonas de CME con las enzimas de restricción Bam H1 y Bgl II, respectivamente. Las flechas horizontales indican la dirección de la transcripción. En B se muestra un análisis tipo Southern blot del DNA de CME resistentes a neomicina. El DNA se digirió con BamH1 y se hibridó con una sonda genómica de *nurr1* de 900 pb localizada corriente arriba de la región 5' involucrada en la recombinación homóloga. Esta sonda detectó un fragmento de 5.5 kb y otro de 3.5 kb de los alelos silvestre y mutante, respectivamente. En C se muestra un análisis mediante PCR de los ratones obtenidos entre cruces de heterocigotos para *nurr1*. Se observan dos productos de PCR, uno de 300 pb y otro de 200 pb, que corresponden al alelo silvestre y mutante, respectivamente.

embrionario comienza a partir del día 10.5. Esta expresión está restringida al sistema nervioso central durante toda la gestación del ratón, a excepción de los labios que mostraron señal positiva a partir del día 12.5 del desarrollo embrionario. Durante el desarrollo del cerebro en la etapa embrionaria, la expresión del gen *nurr1* se encontró en la capa intermedia del neuroepitelio de las vesículas telencefálicas, diencefálicas, mesencefálicas y rombencefálicas, incluyendo médula espinal. La expresión de *nurr1* en estas vesículas se mantuvo hasta la etapa adulta. Los sistemas olfatorio, límbico, algunas áreas de la corteza cerebral, capa granular del cerebelo y cerebro medio, incluyendo las neuronas dopaminérgicas, mostraron una fuerte expresión del gen *nurr1*.

Inactivación del gen nurr 1

Se identificaron, mediante análisis tipo Southern, un total de 12 clonas con la mutación en el gen *nurr1*. Con estas clonas se obtuvieron los ratones mutantes cuyo genotipo se demostró mediante Southern blot (figura 1B) y PCR (figura 1C). De acuerdo con este resultado, se demostró que el evento de recombinación homóloga había ocurrido en el locus correcto. De los genotipos, obtenidos mediante estos análisis, se observó que los ratones homocigotos mutantes *nurr1* (*nurr1*^{-/-}) nacieron con la frecuencia esperada de acuerdo a la primera ley de Mendel.

Datos generales del fenotipo

Los ratones homocigotos para la mutación del gen *nurr1* eran hipoactivos y morían durante el transcurso de las primeras 12 horas de vida. Es decir que la carencia de *Nurr1* es letal para el organismo.

Análisis del tejido de cerebro de ratones mutantes

Los resultados de hibridación *in situ* en el cerebro mostraron que *Nurr1* se expresa intensamente en la región ventral mesencefálica. Esta región es rica en neuronas dopaminérgicas, cuya función en el cerebro es sumamente importante. Para examinar el papel de *Nurr1* en el desarrollo del sistema dopaminérgico se analizó mediante inmunohistoquímica la expresión de dos marcadores celulares dopaminérgicos (las enzimas TH y AADC, responsa-

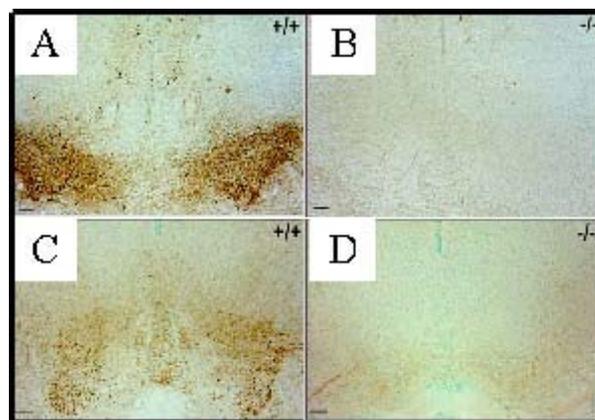


Figura 2. Análisis Inmunohistoquímico de TH y AADC en ratones silvestres y mutantes para *nurr1*. A-D son cortes frontales del cerebro medio de ratón recién nacido. A y C muestran tinción positiva contra los anticuerpos TH y AADC respectivamente, en la sustancia negra y área ventral tegmentaria de un cerebro de ratón silvestre. B y D muestran la pérdida de ambos marcadores en las mismas regiones de un cerebro de ratón mutante *nurr1*. La barra representa 100mm.

bles de la síntesis de dopamina). Se obtuvieron cortes frontales de la región mesencefálica de ratones recién nacidos de tipo silvestre y mutante y se incubaron con anticuerpos específicos para estas enzimas. Los resultados en la figura 2 muestran que ambas enzimas están ausentes en los ratones homocigotos para *nurr1*, es decir que la carencia de *Nurr1* ocasiona la pérdida de ambas enzimas.

Muerte celular por apoptosis de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas

Para determinar si la pérdida de las enzimas TH y AADC se debía a una degeneración de las neuronas dopaminérgicas, se analizaron y cuantificaron las células en apoptosis en la sustancia negra y en el área ventral tegmentaria del cerebro medio. Los resultados de apoptosis mostrados en la figura 3 indican que en los ratones mutantes *nurr1* existe un incremento en el número de células apoptóticas, de un 0.5% encontrado en el tipo silvestre a un 7% observado en los ratones mutantes *nurr1*. Estos datos indican que *Nurr1* se requiere para la supervivencia de las células dopaminérgicas mesencefálicas.

Conclusiones y discusiones

El gen *nurr1* es esencial para la supervivencia de

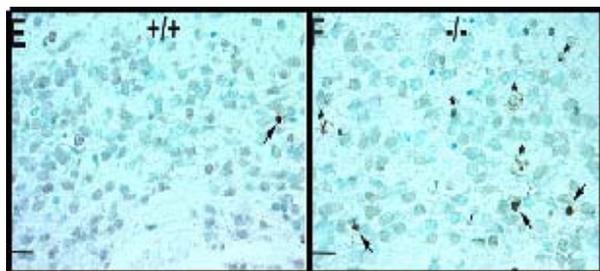


Figura 3. Detección de apoptosis en la Región Ventral Mesencefálica. E y F, cortes frontales del cerebro de ratón recién nacido tipo silvestre y mutante *Nurr1*, respectivamente. Las flechas indican los cuerpos apoptóticos, y los triángulos células muertas. La barra representa 20mm.

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

La carencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, en nuestro modelo animal, representa un excelente modelo para el estudio de la enfermedad de Parkinson en su etapa tardía. En la actualidad para estudiar la enfermedad de Parkinson se inyectan drogas directamente en la región ventral mesencefálica con el fin de destruir las neuronas dopaminérgicas, pero esta técnica presenta un problema de selectividad, en tanto que el modelo murino generado nos garantiza que carecemos específicamente de este tipo neuronal, y que los estudios posteriores que se lleven a cabo con este modelo nos podrán ayudar para la obtención de mejores tratamientos para la enfermedad de Parkinson.

Un papel asignado a *Nurr1* en la regulación de la supervivencia de células dopaminérgicas, tanto precursoras como diferenciadas, al menos en parte a través de la regulación de estos factores y/o sus receptores, es apoyado por la observación de que la ausencia de *Nurr1* resulta en una pérdida de la expresión del receptor para el factor neurotrófico GDNF y c-ret,²⁴ y además por la identificación de sitios de unión para *Nurr1* en la región promotora del gene BDNF.²⁵ De esta manera, es posible que

Nurr1 pueda ser un regulador transcripcional de varios de estos genes. Los estudios futuros, que se lleven a cabo para dilucidar el papel de *Nurr1* en la regulación de factores neurotróficos y sus receptores, aportarán hallazgos importantes acerca del papel de este gen durante el desarrollo de las células dopaminérgicas y su supervivencia.

Aún no se conoce la función exacta de *Nurr1* que explique el fenotipo obtenido, y son varias las preguntas que aún están por resolverse, tales como: ¿Fueron las estructuras implicadas en el proceso de mamar afectadas o es *Nurr1* un factor de transcripción importante en la regulación de la ingestión de alimento? ¿Qué genes activan *Nurr1* directamente? ¿Participa *Nurr1* en procesos neuroendócrinos? ¿Qué induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas?. Son sin duda, nuevos objetivos que ayudarán a conocer más acerca de las rutas fisiológicas en las que participa *Nurr1*.

Resumen

Nurr1 es un factor de transcripción que se expresa predominantemente en el cerebro. En el presente trabajo se clonó y caracterizó el gen murino *nurr1* y se determinó mediante hibridación *in situ* su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario y en el cerebro del ratón adulto. Además, utilizando la tecnología de inactivación de genes mediante recombinación homóloga, se generó un modelo animal murino carente de *nurr1*. La inactivación de este gen es letal y resulta en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la región ventral mesencefálica, y como consecuencia se pierde la síntesis del neurotransmisor dopamina.

Palabras claves: *nurr1*, neuronas dopaminérgicas, enfermedad de Parkinson, recombinación homóloga, dopamina.

Abstract

Nurr1 is a neuronal transcription factor. In this work the *nurr1* gene was cloned and characterized, its expression was determined by *in situ* hybridization during mouse embryonic development and adult brain. In addition, this gene was inactivated by homologous recombination in embryonic stem cells. The deficiency of *Nurr1* is lethal, and causes cell death of ventral mesencephalic dopaminergic neu-

rons which results in lack of dopamine in this region.

Keywords: *nurr1*, dopaminergic neurons, Parkinson disease, homologous recombination, dopamine.

Referencias

1. Bjorklund A and Lindvall O. In Handbook of Chemical Neuroanatomy, eds. Bjorklund, A. & Hokfelt, T. (Elsevier, Amsterdam) 1984; pp. 55-122.
2. Lindvall O and Bjorklund A. In Chemical Neuroanatomy, eds. Emson, P. C. (Raven Press, New York) 1983; pp. 229-255.
3. Hirsch EC, Graybiel AM, and Agid YA. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 1988; 334: 345-348.
4. Self DW and Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18: 463-495.
5. Seeman P, Guan HC, and Van Tol HHM. Dopamine D4 receptors elevated in schizophrenia. *Nature* 1997; 365:441-445.
6. Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR and Kuhar, MJ. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 1987; 237:1219-1223.
7. Koob G F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 13:177-184.
8. Brustle O and McKay RD. Neuronal progenitors as tools for cell replacement in the nervous system. *Curr Op Neurobiol* 1996; 5: 688-692.
9. Svendsen CN and Smith AG. New prospect for human stem-cell therapy in the nervous system. *Trends Neurosci* 1999; 8: 357-366.
10. Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ and O'Malley BW. Identification of a new brain specific transcription factor, *Nurr1*. *Mol Endocrinol* 1992; 6:2129-2135.
11. Scarce LM, Laz TM, Hazel TG, Lau LF and Taub R. RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in degenerating liver. *J Biol Chem* 1993; 268:8855-8861.
12. Mages HW, Rilke O, Bravo R, Senger G and Kroczeck RA. NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol Endocrinol* 1994; 8:1583-1591
13. Grunstein M and Hogness DS. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:3961-3965.
14. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ and Higuchi R. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
15. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
16. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
17. Simmons DM, Arriza JL and Swanson LW. A complete Protocol for In Situ Hybridization of Messenger RNAs in Brain and Other Tissues With Radiolabeled Single-Stranded RNA Probes. *J of Histotechnol* 1989; 12: 169-181.
18. Saucedo-Cardenas O and Conneely OM. Comparative Distribution of *Nurr1* and *Nur77* Nuclear Receptors in the Mouse Central Nervous System. *J Mol Neurosci* 1996; 7:1-11.
19. Soriano P, Montgomery C, Geske R and Bradley A. Targeted disruption of the *c-src* proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 1991; 64: 693-702.
20. Mansour SL, Thomas KR and Capecchi MR. Disruption of the protooncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 1988; 336: 348-352.
21. Robertson EJ. In *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, ed. Robertson E.J. (IRL, Oxford, U.K.), 1987; pp. 71-112.
22. Ramírez-Solis R, Rivera-Pérez J, Wallace JD, Wims M, Zheng H. and Bradley A. Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. *Anal Biochem* 1993; 201: 331-335.
23. Mount SM. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 459-472.
24. Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer B, Olson L and Perlmann T. Dopamine Neuron Agenesis in *Nurr1*-Deficient Mice. *Science* 1997; 276: 248-250.
25. Shintani A, Ono Y, Kaisho Y and Igarashi K. Characterization of the 5'-flanking region of the human brain-derived neurotrophic factor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182: 325-332.