

MUTAGENESIS DIRIGIDA Y OBTENCIÓN DE CONSTRUCCIONES PARA TRANSGÉNESIS CON EL GEN DE LA κ -CASEÍNA CAPRINA.

COLL A.¹, LEGRAIN S.², PRINTZ C.², PERSUY M.A.², FOLCH J.M.¹ Y SÀNCHEZ A.¹

¹Unitat de Genètica i Millora. Departament de Patologia i Producció Animals. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193-Bellaterra.

²Laboratoire de Génétique Biochimique et Cytogénétique. Département de Génétique Animale. I.N.R.A. 78352 Jouy-en-Josas, France.

INTRODUCCIÓN

La κ -caseína (κ -Cn) es esencial para la formación y estabilización de las micelas de la leche y su proteólisis específica conduce a la coagulación de la leche. El tamaño de las micelas es inversamente proporcional al contenido en κ -Cn. El objetivo del trabajo es la utilización de construcciones del gen de la κ -Cn caprina para la obtención de ratones transgénicos con los que evaluar el efecto de la alteración en contenidos de κ -Cn sobre las propiedades tecnológicas de la leche.

Se conoce la estructura del gen que codifica la κ -Cn en las especies bovina (1) y caprina (2), disponiendo del clon $\mu\kappa\text{Cnc}1$, plásmido pTZ 18U que contiene como inserto el ADNc de la κ -Cn caprina (3) y de dos clones genómicos de cabra en λ EMBL3, $\lambda\text{c}15$ y $\lambda\text{c}27$, que contienen la unidad de transcripción del gen junto con 4.5 Kb y 13.5 Kb de región 5' y 3' flanqueante (fig. 1).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para cálculos del punto isoeléctrico se ha utilizado el programa CHARGPRO del paquete de programas PCGENE.

Se han realizado varias PCRs con los pares de primers posicionados en la figura 1 basados en las secuencias del ADNc y del gen de la κ -Cn caprina (2 y 3).

La mutación dirigida se ha basado en la técnica propuesta por Landt et al (4) mediante dos PCR consecutivas sobre el clon $\mu\kappa\text{Cnc}1$.

Las delecciones se realizan con el kit "double-stranded nested deletion" (Pharmacia) y las digestiones parciales a concentraciones decrecientes de endonucleasa (5). En ambos casos el ADN se hace de extremos romos con la Klenow para la posterior ligación de adaptadores NotI (New England Biolabs).

Las diferentes construcciones del gen de la κ -Cn caprina se clonan en λ DASH II (Stratagene), utilizando los extractos de empaquetamiento Gigapack II XL (Stratagene).

Las calvas obtenidas se transfieren a filtros Hybon-N⁺ (Amersham), obteniendo dos réplicas por placa que se hibridan con sonda marcada con ³²P.

La secuenciación se ha realizado utilizando el secuenciador automático ABI 373A.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mutagénesis dirigida

El objetivo final de este trabajo es el de obtener cabras con un gen supernumerario de la κ -Cn, siendo necesario que el transgén y los productos de éste sean distinguibles del gen, del ARNm

y de la proteína correspondientes a la κ -Cn endógena. Utilizando el programa CHARPRO, se ha testado como afectaban al punto isoeléctrico de la proteína diversos cambios aminoacídicos. Se ha escogido la sustitución de la alanina en posición 150 (no polar) por un ácido aspártico (polar negativo), que a nivel nucleotídico implica el cambio del nucleótido C en la posición 565 pb del ADNc (3) por A. Tenemos garantías de que esta variante artificial será funcional y detectable a nivel proteico pues es precisamente un cambio como éste el que permite diferenciar las dos variantes mayoritarias de la κ -Cn bovina en una electroforesis. La mutación nucleotídica modifica el patrón de restricción HindIII/HinfI del gen y además permite la utilización de una estrategia de mutación dirigida muy simple. Con los oligonucleótidos κ 1m y κ 2m se realiza una primera PCR sobre el clon $\rho\kappa$ Cnc1. Debido a que el primer κ 2m contiene la mutación, su producto (κ 3m) también la tendrá. Con una segunda PCR sobre $\rho\kappa$ Cnc1, utilizando como primers κ 3m y κ 4m obtenemos el fragmento esperado de 335 pb con la mutación deseada, según indican resultados de clonación y secuenciación.

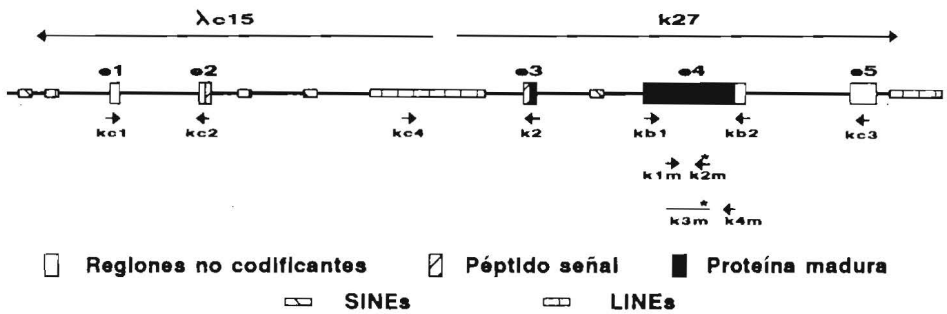


Figura 1. Representación esquemática de la estructura del gen de la κ -Cn caprina, indicando la posición de cada exón (e) así como de cada una de las regiones del ARNm. Se señala la posición de los elementos repetitivos detectados (LINEs y SINEs). Las flechas en la parte superior del dibujo indican los insertos que contienen los clones genómicos $\lambda c15$ y $\kappa 27$. Los dos clones no solapan, faltando un fragmento de 585 pb que corresponde a un LINE 5' defectivo y reordenado no presente en bovino. Con las flechas de la parte inferior indicamos la posición y orientación de los primers utilizados.

Preparación de subclones para la reconstrucción del gen de la κ -Cn caprina

Se obtienen los subclones $\rho\lambda c15.9$ y 2709 , plásmidos que contienen en Sall el inserto de 13Kb de $\lambda c15$ (4.5 Kb de promotor, del exón 1 al exón 2 y 5.5 Kb de intrón 2) y el fragmento de 10 Kb Sall de $\kappa 27$ (0.75 Kb de intrón 2, del exón 3 al 5 y 4.8 Kb de la región 3' flanqueante del gen), respectivamente. Sobre estos plásmidos, mediante deleciones o digestiones parciales seguidas de ligación de adaptadores NotI, se obtienen nuevos subclones que se analizan por mapa de restricción y secuenciación de sus extremos. Los que se utilizarán posteriormente son:

p5: $\rho\lambda c15.9$, pero ahora el inserto de 13Kb está flanqueado en 5' por NotI y en 3' por Sall.

p33: como el anterior pero con solo 2.2 Kb de región promotora.

p60: como el anterior pero con solo 0.7 Kb de región promotora.

p1: 2709 , con el inserto flanqueado por Sall en 5' y NotI en 3' y conteniendo como región 3' flanqueante del gen 3.1 Kb. En este clon se substituye el fragmento BstII/ClaI por el fragmento equivalente del clon obtenido en el apartado anterior. El nuevo subclon **p1m**, según verificamos por mapa de restricción, es como **p1** con la mutación deseada en el exón 4.

Obtención de diversas construcciones del gen de la κ -Cn caprina

Se realizan digestiones NotI/SalI de cada uno de los subclones obtenidos en el apartado anterior y con los productos generados se realizan las siguientes ligaciones; p5 con p1m, p33 con p1m y finalmente p60 con p1m. El resultado de cada una de las ligaciones se digiere con NotI y electroforesis preparativas permiten purificar en cada caso el fragmento de ADN de tamaño correspondiente a la unión de los dos insertos ([5'NotI-3'SalI] + [5'SalI-3'NotI]). Cada uno de los fragmentos purificados se clona en NotI de λ DASHII. Para cada construcción se realiza un análisis de las calvas obtenidas por hibridación en placa. De cada placa se han obtenido dos réplicas en filtro, y las sondas utilizadas han sido el producto de la PCR con los primers κ c1 y κ c2 (para detectar los clones que contienen el intrón 1 y por tanto el fragmento que proviene del clon λ c15) y el producto de la PCR con los primers κ b1 y κ b2 (para detectar los clones que contienen exón 4 y por tanto el fragmento que proviene de κ 27). Se aíslan las calvas positivas para las dos sondas y se verifica el resultado con varias PCRs sobre la suspensión de fago, utilizando los primers κ c1 y κ c2, κ c4 y κ c2, κ b1 y κ b2, y también κ b1 y κ c3. Se obtiene ADN de los clones positivos verificándolos por mapa de restricción y por la secuenciación de la región de unión utilizando los primers κ c4 y κ c2. Actualmente disponemos de:

λ 20: λ DASHII que contiene en NotI la unión de los insertos p5 y p1m. El inserto de este clon contiene por lo tanto la unidad de transcripción del gen de la κ -Cn caprina, flanqueada por 4.5 Kb de promotor y 3.1 Kb de región 5' flanqueante, sin los 585 pb del intrón 2 correspondientes a un LINE y con una mutación en el exón 4 que provoca un cambio aminoacídico en posición 150 de la proteína madura (Alanina→Aspartico).

λ 16: λ DASHII que contiene en NotI la unión de los insertos p33 y p1m, por lo que el inserto es como el de λ 20, pero aquí la región promotora es de 2.2 Kb.

Se ha aislado el inserto de λ 20 y con este material se han iniciado las experiencias de transgénesis en ratón. El estudio de la expresión de estas y otras construcciones en las diferentes líneas de ratones transgénicos permitirá conocer el tamaño mínimo necesario de las regiones flanqueantes del gen para la expresión correcta de un transgén de κ -Cn en glándula mamaria, así como estudiar el efecto de un gen supernumerario de la κ -Cn en la leche. En las leches proporcionalmente más ricas en κ -Cn (como es el caso de la humana) el tamaño de las micelas es más reducido y a priori son más estables y digeribles. Si se obtiene una reducción en el tamaño de las micelas de los animales transgénicos, este modelo podría aplicarse a especies domésticas con el objetivo de alterar las propiedades tecnológicas de la leche (termoestabilidad, digestibilidad...) o para la obtención de leches maternizadas.

BIBLIOGRAFIA

- 1-Alexander et al. 1988. Eur. J. Biochem. 178:395.
- 2-Coll et al. 1994. 29 Jornadas de Genética Luso-Españolas. II-50.
- 3-Coll et al. 1993. J. Anim. Sci. 71:2833.
- 4-Landt et al. 1990. Gene. 96:125.
- 5-Ausubel et al. 1988. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley-Interscience.