

LA DISRUPCIÓN DEL GEN DE LA PLC- β 1 EN UNA LÍNEA DE RATONES TRANSGÉNICOS PARA LA β LG CAPRINA AFECTA A SU CRECIMIENTO Y FERTILIDAD

Maria Ballester, Elena Ibáñez*, Josep Santaló*, Armand Sánchez y Josep M Folch
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària y

*Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Ciències,
Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra

INTRODUCCIÓN

Se estima que entre un 5-10% de los ratones fundadores creados por microinyección de ADN presentan mutaciones producidas por la inserción del transgén (Palmiter y Brinster 1986).

En nuestro grupo, se obtuvieron mediante microinyección, un total de 10 líneas de ratones transgénicos para el gen de la β -Lactoglobulina caprina (β LG) con el fin de analizar el efecto del tamaño del promotor sobre la expresión del transgén (Pena *et al.*, 2001). Ocho de las líneas expresaron el transgén a niveles elevados, con independencia del lugar de integración y dependiendo del número de copias integradas del mismo. Los animales fundadores fueron normales y fértiles, pero al obtenerse la F2, los ratones homocigotos de la línea Tg56 presentaron un fenotipo conspicuo, que se caracterizó por: un tamaño y peso inferior al de sus hermanos transgénicos heterocigotos debido a un crecimiento retardado, una elevada mortalidad después del nacimiento y una reducción de la fertilidad. Esta línea contiene 22 copias del transgén integradas en una única posición del genoma y expresa la β LG caprina a niveles elevados en la glándula mamaria.

En el presente estudio se ha caracterizado el lugar de integración del transgén de la β LG caprina en la línea de ratones transgénicos Tg56 para determinar si el fenotipo presentado por estos animales se debe a la disrupción de un gen endógeno del ratón. Las 22 copias del transgén se encuentran integradas en un intrón del gen Fosfolipasa C- β 1 (PLC- β 1) del ratón. Este gen juega un papel muy importante en las vías de traducción de las señales transmembranales ya que cataliza la hidrólisis del fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato dando lugar a segundos mensajeros intracelulares (Bahk *et al.*, 1994).

MATERIAL Y MÉTODOS

Ratones transgénicos:

Los ratones transgénicos fueron previamente generados por microinyección de la construcción pPX(7.0). Dicha construcción contenía, además de la unidad de transcripción de la β -LG caprina, 410 pb de región promotora proximal y 1,9 Kb de región 3' flanqueante.

La línea de ratones transgénicos Tg56 se mantiene mediante el cruce de animales heterocigotos entre sí debido a la baja fertilidad de los ratones homocigotos.

Caracterización del lugar de integración del transgén:

Se realizó una hibridación in situ fluorescente (FISH) sobre linfocitos, usando el transgén como sonda, para localizar el lugar de inserción del transgén. Posteriormente, se utilizó la técnica *Vectorette* (Genosys), basada en una Anchored

PCR, para secuenciar e identificar el ADN genómico adyacente al lugar de integración del mismo. Se realizó una comparación de secuencias con la base de datos del GenBank para identificar el lugar de integración del transgén, finalizando su caracterización mediante amplificación por PCR, clonación y secuenciación.

Aislamiento y análisis del ARN:

El ARN se extrajo de diferentes tejidos (hígado, pulmón, bazo, corazón, riñón, médula espinal, cerebro, útero, vesícula seminal, testículo y músculo) de ratones transgénicos y ratones normales siguiendo las instrucciones del producto comercial Trizol (Invitrogen).

Para la síntesis del ADNc a partir de ARN se utilizó el Kit *ThermoScript RT-PCR System* (Invitrogen) siguiendo sus instrucciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del lugar de integración del transgén.

Mediante la técnica FISH se determinó la localización cromosómica del transgén, el cual estaba insertado en la banda citogenética G1 del cromosoma 2 del ratón.

La secuenciación de una de las bandas obtenidas mediante la técnica Vectorscope permitió identificar con precisión la posición del transgén en el genoma del ratón, observándose que estaba integrado en el gen PLC- β 1. Debido a que en el ratón sólo se conoce el mRNA de la PLC- β 1, se extrapoló la estructura del gen humano y se dedujo que el transgén se había integrado en el intrón 30 de este gen (figura 1). Con cebadores específicos, se amplificaron y secuenciaron las regiones 5' y 3' flanqueantes al transgén, observándose una pérdida de 30 nucleótidos en el intrón 30 del gen PLC- β 1 del ratón.

En 1997, Kim *et al.* obtuvieron un ratón knockout para el gen PLC- β 1 con el fin de investigar el papel que jugaba dicho gen en el cerebro, donde se expresa de forma abundante. Los ratones heterocigotos eran normales y fértiles mientras que los homocigotos presentaban un crecimiento retardado y una viabilidad baja después del nacimiento. Muchos de estos ratones morían repentinamente a partir de la tercera semana de vida y su muerte venía precedida por ataques epilépticos. Este grupo observó que la PLC- β 1 era esencial para el funcionamiento normal del circuito inhibitorio neuronal, al acoplarse con los receptores acetilcolina muscarínicos.

Los ratones transgénicos analizados en el presente trabajo pueden ser utilizados como un modelo de disrupción del gen PLC- β 1. Cuando comparamos el fenotipo de nuestros ratones con los ratones knockout generados por Kim *et al.* (1997) observamos que a pesar de tener un crecimiento retardado, la viabilidad después del nacimiento no se ve tan afectada y no se han observado ataques epilépticos antes de morir. Esto podría ser explicado por una cierta funcionalidad del gen PLC- β 1 en los ratones de la línea Tg56.

Estudio de la expresión del transgén en los animales homocigotos.

A partir de 1 μ g de ARN extraído del cerebro y mediante la técnica RT-PCR, se caracterizó el ARNm de la PLC- β 1 en la línea de ratones transgénicos Tg56. Se escogió el cerebro debido a la elevada expresión del gen PLC- β 1 en este tejido (Bahk *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1998). La secuenciación de un fragmento de 657 pb mostró que se estaba transcribiendo un ARNm híbrido entre el gen de la PLC- β 1

y el de la β LG (figura 1). Posteriormente, se amplificaron y secuenciaron más fragmentos de este ARNm para verificar su integridad, concluyendo que este ARNm híbrido contenía el gen truncado PLC- β 1 del ratón (del exón 1 al 30) unido a los 7 exones del gen de la β LG caprina (incluyendo la señal de poliadenilación) y una cola de poli A.

A continuación se realizó el análisis de expresión de este ARNm en otros tejidos, mostrándose la existencia de un ARNm híbrido en todos los tejidos analizados.

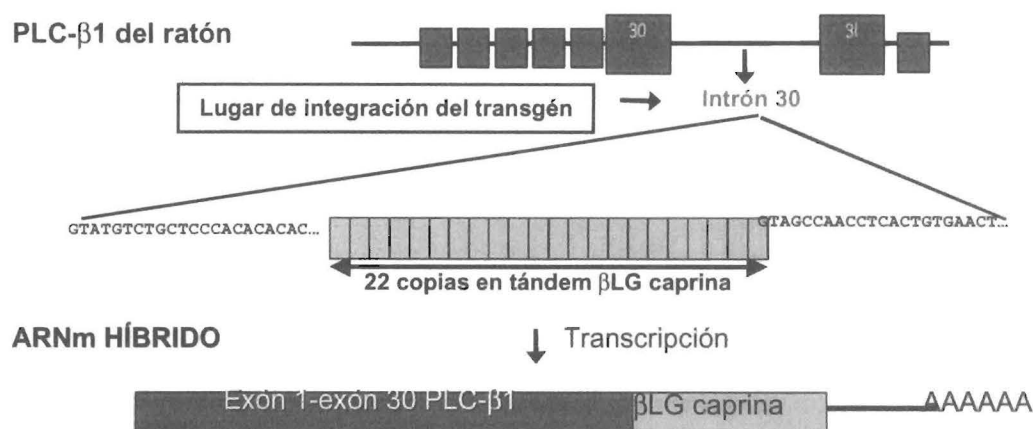


Figura 1: Lugar de integración de las 22 copias de la β LG caprina en la línea Tg56 de ratones transgénicos y caracterización de un mensajero híbrido entre el gen de la PLC- β 1 del ratón y el gen de la β LG caprina.

Para acabar de verificar la hipótesis de una cierta funcionalidad del gen de la PLC- β 1 en la línea de ratones transgénicos Tg56, se están realizando estudios sobre la expresión de la proteína híbrida en estos animales, mediante la técnica Western.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Pena, R.N., Ibáñez, E., Folch, J.M., Vidal, F., Sánchez, A. y Santaló, J. (2001) *Transgenics*, 3:175-182.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L. (1986) *Annu. Rev. Genet.* 78: 263-266.
- Bahk, Y.Y., Lee, Y.H., Lee, T.G., Seo, J., Ryu, S.H., y Suh, P-G. (1994) *J. Biol. Chemistry*, 269:8240-8245.
- Kim, D., Jun, K.S., Lee, S.B., Kang, N-G., Min, D.S., Kim, Y-H., Ryu, S.H., Suh, P-G., y Shin H-S. (1997) *Nature*, 389: 290-293.
- Watanabe, M., Nakamura, M., Sato, K., Kano, M., Simon, M.I., y Inoue, Y. (1998) *Eur. J. Neurosci.* 10: 2016-2025.

Trabajo financiado con el proyecto CICYT (AGF99/1232-CO-O2) y con beca F.I. a Maria Ballester (DGU, Generalitat de Catalunya).