

INTRODUCCIÓN EN EL MANEJO Y OBTENCIÓN DE EMBRIONES DE RATÓN PARA SU MODIFICACIÓN GENÉTICA

Manipulating the Mouse Embryo to Edit the Genome: Introduction and «Gold Standard» Techniques

M. Yolanda GARCÍA

Servicio de Transgénesis, Centro de Investigación del Cáncer, sótano -3, Campus Miguel de Unamuno 37007, Salamanca, Teléf.: 3015

Correo-e: omg@usal.es

Manuel A. SÁNCHEZ

Servicio de Transgénesis, Centro de Investigación del Cáncer, sótano -3, Campus Miguel de Unamuno 37007, Salamanca.

Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Campus Miguel de Unamuno 37007, Salamanca, Teléf.: 3015

Correo-e: adolsan@usal.es

RESUMEN: Los avances en el campo de la biología molecular y la tecnología del DNA recombinante, así como los conocimientos necesarios para modificar el genoma (edición génica) han permitido el desarrollo de organismos animales modificados genéticamente (OMGs), los cuales juegan un papel fundamental en la investigación biomédica. Una de las innumerables áreas de investigación donde se utilizan es en el estudio de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), enfermedades producidas por partículas proteicas pequeñas derivadas del propio huésped que sufren un cambio conformacional transformándose en proteínas infectivas que denominamos priones.

El presente trabajo describe las principales técnicas utilizadas en la obtención y manipulación de embriones de ratón con el objeto de lograr

un nuevo organismo transgénico que se utilizará en el estudio de las EETs. En este caso el nuevo OMG incorporará a su genoma las secuencias de la proteína priónica humana (PrP^c) mediante microinyección de DNA desnudo en embriones en fase de una célula. Entre otras aplicaciones, el modelo generado será utilizado para ensayar la capacidad infectiva de distintos priones de otras especies potencialmente peligrosas para el hombre, y descubrir qué versiones polimórficas de la PrP^c son más susceptibles a la infección.

Palabras clave: prion; ratón; transgénesis; encefalopatías espongiformes transmisibles.

ABSTRACT: The progresses in molecular biology and recombinant DNA technology as well as the knowledge to edit the genome have allowed the development of genetically engineered animal organisms (GMOs) that nowadays are a key factor in biomedical research. There are innumerable research fields where the use of GMOs is common, one of them being the study of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), diseases caused by small protein particles derived from the host; these particles suffer a conformational change which results in their transformation into infectious proteins which are called prions.

The following study describes the main techniques used in the handling and harvesting of mouse embryos for their genetic modification resulting in the generation of a new transgenic organism that will be used in the study of TSEs. In this particular case, the new GMOs will incorporate in its genome the sequences of the human prionic protein (PrP^c) through the microinjection of naked DNA in mouse embryos at unicellular phase. Among other applications, the model generated will be used to test the infectious capacity of different prions from other species potentially dangerous to human beings, as well as discovering what polymorphic versions of PrP^c are more susceptible to infection.

Key words: Prion; Mouse; Transgenesis; Transmissible spongiform encephalopathies.

INTRODUCCIÓN

En la práctica farmacéutica, para comprobar las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de un medicamento, los ensayos celulares «in vitro» son muy valiosos, pero informan de forma limitada y en un contexto aislado. Por este motivo, se hace necesario realizar los ensayos en el contexto de organismos completos, conocidos como «sistemas modelo».

El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y de la transgénesis animal han posibilitado la generación de modelos modificados genéticamente (OMGs) que hoy son esenciales en la investigación biomédica.

Uno de los innumerables campos donde se utilizan es en el estudio de las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET), enfermedades neurodegenerativas tanto de animales como de humanos. Algunas de estas son el scrapie, la encefalopatía espongiiforme bovina, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) o el insomnio familiar fatal. Estas EETs son producidas por priones, partículas proteicas pequeñas e infecciosas derivadas del propio huésped (PrP^c) que sufren un cambio conformacional transformándose en proteínas infectivas (PrP^{sc}).

En este campo, los OMGs «humanizados», es decir, que contienen genes humanos (PrP humana), juegan un papel crucial, ya que en ellos podemos comprobar qué priones podrían infectarnos, qué versiones polimórficas de la PrP humana son más susceptibles de infección y también qué terapias serían efectivas. El modelo más utilizado es el ratón y su manipulación y modificación genética para incorporar en el mismo las secuencias de la PrP^c humana es el objetivo de este trabajo.

En este sentido, la transgénesis aditiva es la técnica más utilizada y consiste en introducir el gen foráneo (transgén) mediante microinyección en embriones en fase de una célula. Esto nos permite integrar DNA exógeno en el genoma de manera estable, asegurando así que esa nueva secuencia pueda ser heredada por la descendencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cuantificación y preparación del DNA exógeno que se integrará en el genoma del ratón

Para comprobar la pureza del DNA recombinante utilizamos el espectrofotómetro Nanodrop® y comprobamos el tamaño molecular realizando electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Como muestra de referencia utilizamos un marcador de tamaños moleculares y concentraciones conocidas (High DNA mass ladder-Invitrogen).

Manejo reproductivo de ratones para la obtención de embriones

- La superovulación

Esta técnica nos permite obtener por hembra de 3 a 5 veces más óvulos de los que se obtienen de forma natural, minimizando el número de animales utilizados por experimento.

El método consiste en la inyección intraperitoneal de dos hormonas gonadotropinas que aumentan el número de folículos estimulados y por tanto el número de óvulos susceptibles de ser fecundados (PMSG, acción folículo estimulante y HCG, acción luteinizante). Estas deben administrarse con dos días de diferencia y entre las 13-15 horas. La edad ideal de las hembras para realizar la superovulación es de 3-4 semanas.

Se administran 5 U.I. de cada una de las hormonas por hembra, disueltas en 100 µl de suero fisiológico vía intraperitoneal. Una vez administrada la segunda hormona, cruzaremos a la hembra con un macho reproductor.

El proceso se realiza en la zona libre de patógenos (SPF) del animalario OMG de la Universidad de Salamanca, para lo cual se necesita vestir indumentaria estéril.

La administración de estas hormonas despertará el celo en la hembra y provocará el interés del macho por la cópula. Si esta se produce, podremos visualizar a la mañana siguiente el tapón vaginal, formado por proteínas coaguladas provenientes de los fluidos seminales del macho. Las hembras que lo presentan serán las donadoras de los embriones a manipular genéticamente.

El sacrificio del ratón, obtención de oviductos y embriones

Las hembras con tapón vaginal serán sacrificadas mediante dislocación cervical entre las 11-12 de la mañana.

A continuación, aislamos el oviducto, sección comprendida entre el cuerno uterino y el ovario, y localizamos el ámpula, lugar donde se encuentran los embriones en fase 0.5 de gestación.

Desgarramos el ámpula con ayuda de unas pinzas y liberamos los embriones sobre el medio M2. Una vez extraídos todos los embriones, añadimos 500 µl hialuronidasa (1 mg/ml) y la dejamos actuar a temperatura ambiente 5 minutos. Esta enzima libera los embriones de las células foliculares que los rodean formando el cúmulo. En ese momento los embriones fecundados poseen dos pronúcleos.

Posteriormente, recogemos los embriones con una pipeta de cristal y se lavan sucesivamente con medio M2 y posteriormente con medio de cultivo embrionario KSOM. A continuación, se recogen de nuevo los embriones y se reparten en grupos de 25 en microgotas (50 µl) de medio KSOM (Nagy *et al.*) recubiertas de aceite mineral. Permanecerán en estas durante 2-3 horas, momento en el cual los dos pronúcleos alcanzan su mayor tamaño y pueden ser inyectados con el DNA exógeno.

La microinyección de DNA en embriones en fase de una célula

Aproximadamente sobre las 15:00 horas comienza el proceso de microinyección de DNA en los embriones de ratón. Este consiste en tomarlos de una microgota

de KSOM y lavarlos en medio M2 para a continuación depositarlos sobre un porta excavado con medio M2 cubierto con aceite mineral.

El DNA purificado y disuelto en Tris-EDTA 0,25 mM (5 ng/ μ l) se introduce en las agujas de inyección, las cuales se generan utilizando un estirador de capilares de cristal borosilicato.

La aguja cargada con DNA la colocaremos en el brazo derecho de la estación de microinyección, el cual está conectado a un sistema de aire a presión.

Con el brazo izquierdo de la estación de microinyección, el cual contiene la pipeta de sujeción, inmovilizamos el embrión y con el derecho inyectaremos el DNA en uno de los pronúcleos.

Una vez inyectados todos los embriones los depositamos sobre las microgotas de KSOM de donde partían. Permanecerán en estas en el incubador hasta el día siguiente, momento en el cual estarán ya en fase de dos células y podrán ser transferidos a las hembras pseudo-gestantes.

La generación de hembras pseudo-gestantes

Las hembras pseudo-gestantes presentan un estado fisiológico denominado pseudo-preñez, en el que su organismo está preparado física y hormonalmente para la implantación de sus óvulos fecundados incluso en ausencia de los mismos. En ratones, para inducir este estado se necesita el estímulo de la cópula. Para lograr estas pseudo-gestantes y que los embriones que se implanten en ellas sean exclusivamente los manipulados en el laboratorio, cruzamos las mismas con machos vasectomizados, a los que hemos cauterizado su conducto deferente.

Utilizamos las hembras de la cepa CD1 (Swiss), de entre 6 y 9 semanas de edad en estado pro-estro. Seleccionaremos aquellas que presenten una apertura vaginal más amplia, tejidos de color rosa-rojizo y numerosos pliegues longitudinales en los labios dorsal y ventral.

Al día siguiente, las hembras que presenten tapón vaginal, pseudo-preñadas, serán las elegidas para aceptar la transferencia de los embriones microinyectados y se convertirán en «vientres de alquiler» para los mismos.

La transferencia embrionaria, gestación y el parto

Los embriones microinyectados con el DNA exógeno y ya en fase de dos células son recogidos en una pipeta de cristal con medio M2 en grupos de 20-25 y se introducen en el interior del oviducto a través del infundíbulo. Prestaremos mucha atención al desarrollo del embarazo, el parto y el posterior amamantamiento.

Destete, sexado, corte de colitas y obtención del DNA genómico

A los 20 días post-parto procedemos al destete y sexado de las crías, momento en el cual se realiza el corte de colitas (1-2 mm) y su procesamiento para extraer el DNA genómico y determinar cuáles son los ratones que contienen el transgén.

El sexado lo realizamos por simple observación de la distancia existente entre la papila genital y la apertura anal, la cual en machos es de hasta casi el doble que en hembras.

Cada cola se coloca en un eppendorff con 450 µl buffer de lisis celular y 50 µl proteinasa K (10 mg/ml) y se incuba toda la noche a 55°C.

Al día siguiente, realizamos una extracción fenol/cloroformo/IAA de ácidos nucleicos típica, precipitando los mismos con etanol y resuspendiéndolos en 50-70 µl agua ultrapura. Finalmente medimos la concentración en el NanoDrop®.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La detección de los ratones transgénicos la realizamos utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la misma utilizamos oligonucleótidos que hibridan con una zona específica del transgén (PrP humana) y que difiere de la endógena de ratón. Los oligos utilizados fueron:

Oligo forward (F): 5'-ATGGCGAACCTTGGCTACTGG-3'

Oligo backward (B): 5'-GATTATGGGTACCCCCTCCTT-3'

La mezcla de reacción utilizada en la PCR para cada DNA consta de 1 µl Oligo F (50 ng/µl), 1 µl Oligo B (50 ng/µl), 1 µl DNTps (10 mM), 5 µl Buffer (VWR 10xExtraBuffer MgCl₂ 15 mM) 0,2 µl enzima polimerasa (VWR Taq Polymerase 500 units), 1-2 µl DNA 100-200 ng/µl y hasta 50 µl agua ultrapura.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- 1 ciclo de 95°C 120s
- 35 ciclos de
 - 95°C 20s
 - 60°C 45s
 - 72°C 30s
- 1 ciclo de 72°C 300s

A continuación chequeamos cada muestra mediante electroforesis en gel agarosa 1%.

RESULTADOS

DNA recombinante utilizado

Se comprobó la pureza del DNA recombinante en el Nanodrop®. La curva de absorbancia mostró un DNA puro libre de contaminantes celulares y una concentración de 0,027 µg.

Para visualizar la integridad del DNA y su tamaño molecular se realizaron distintas diluciones del mismo y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (figura 1).

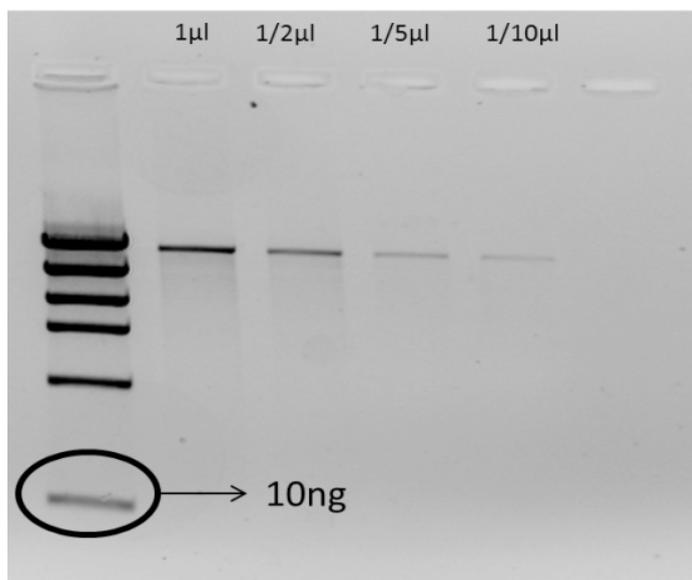


FIGURA 1: Electroforesis en gel de agarosa de las distintas diluciones de DNA recombinante. Primer pocillo: marcador de peso molecular.

Se utilizó una dilución 1+5 para llevar a cabo las sesiones de microinyección de embriones.

Sesiones de microinyección de DNA realizadas y resultados de PCR

TABLA 1: Sesiones de microinyección y resultados de PCR.

	TOTAL	PORCENTAJE
SESIONES REALIZADAS	4	-
EMBRIONES PINCHADOS	194	-
EMBRIONES EN DOS CÉLULAS	157	80,93% (dos células vs pinchados)
TRANSFERENCIAS EMBRIONARIAS	7	-
ANIMALES NACIDOS	25	39,25% (transferidos vs nacidos)
ANIMALES POSITIVOS	4	16% (positivos vs nacidos)

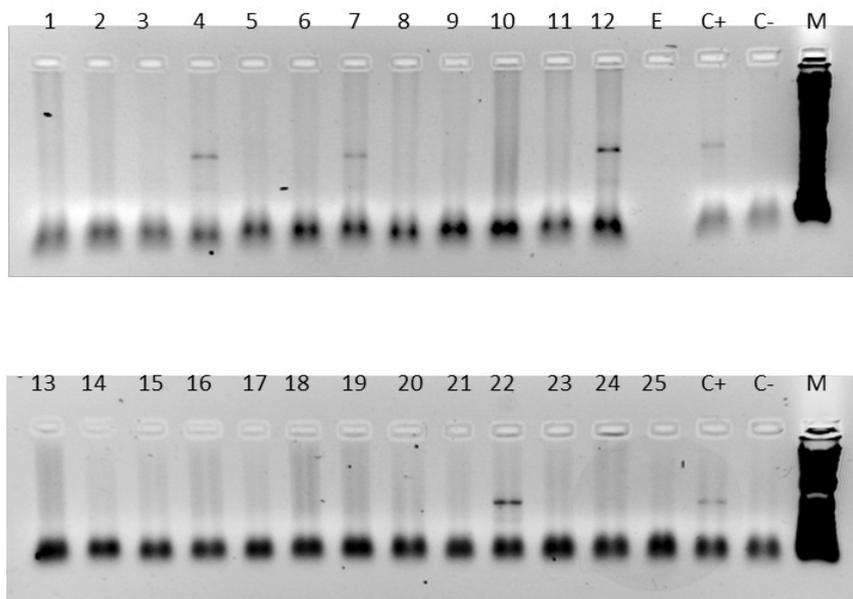


FIGURA 2: Resultados de PCR del DNA de los 25 animales nacidos frente a control positivo, negativo y muestra del gen.

Repetimos la PCR para confirmar los resultados obtenidos utilizando las mismas condiciones.

Se confirmó que los DNAs nº 4, 7, 12, 22 presentan el amplicon para la proteína priónica humana PrP, por lo tanto tenemos 4 nuevos ratones fundadores transgénicos para la PrP humana.

DISCUSIÓN Y APLICABILIDAD DE LOS MODELOS CREADOS

La causa de las EET es una concentración elevada de PrP, que aparece en una conformación anormal, insoluble y resistente a la digestión por proteasas, por lo que se acumula en el cerebro y provoca las lesiones características de estas enfermedades.

La sintomatología clínica asociada a estas enfermedades incluye descoordinación en los movimientos, ceguera, debilidad progresiva, alteraciones mentales y demencia, siendo su pronóstico infausto.

El origen de las EETs puede ser diverso:

- 1) *Esporádico*: adquisición de una mutación que produzca la enfermedad priónica esporádica.
- 2) *Hereditario*: adquisición vía germinal de mutaciones en el gen de la PrP que le confieren ese carácter infeccioso.
- 3) *Adquirido*: ingesta de especies infectadas con la enfermedad. Es el más difícil de afrontar ya que no hay muchos métodos para testar qué especies infectadas podrían afectarnos.

Nosotros hemos generado un ratón que expresa la PrP humana y que será utilizado para conocer qué priones de otras especies podrían afectarnos. Por otro lado, podría ser utilizado también para llevar a cabo infecciones por priones que nos afectan y testar en ellos nuevos fármacos para tratar esta enfermedad. Los posibles tratamientos podrían ir dirigidos a la supresión de la acción de la isoforma anormal PrP^{sc}, mediante fármacos que se unieran a las regiones de la PrP^c estabilizando la conformación alfa de la proteína y evitando la unión de las isoformas anormales PrP^{sc} que la transformarían en láminas β . También fármacos que pudieran inhibir la expresión del gen susceptible a la enfermedad.

CONCLUSIONES

Gracias a las habilidades adquiridas en este trabajo se ha conseguido llegar a la generación de un modelo de ratón transgénico mediante transgénesis aditiva. Este nuevo OMG expresa el gen humano de la proteína priónica PrP^c y en él se

podrá ensayar la capacidad infectiva de distintos priones así como testar distintos fármacos para revertir el fenotipo patológico.

BIBLIOGRAFÍA

Fernández-Borges N et al. Animal models for prion-like diseases. *Virus Research (Virus Res)*; 2015; 207:5-24.

Nagy A et al. *Manipulating the Mouse Embryo, a laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003; Chapter 4: 161-208.

Pacífico C, Galotta JM. Enfermedades por priones. Artículo de Revisión de *Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos*. 2002; 20:3-40.