ITEA (2002), Vol. 98A N.° 2, 239-242

GENERACIÓN EN CÉLULAS *ES* MURINAS DE UN ALELO DEL GEN DE LA MIOSTATINA SUSCEPTIBLE DE ACTIVACIÓN BAJO LA DEPENDENCIA DE CRE

C. Fernández*, M. Georges, L. Grobet**, J. Cañón*, S. Dunner***

* Laboratorio de Genética Molecular, Dpto. Producción animal, Facultad de Veterinaria, UCM, 28040 Madrid, España

** Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège (B43), 20 Bd de Colonster, 4000-Liège, Belgium

Introducción

La miostatina es un miembro de los TGFβ implicada en la regulación negativa del desarrollo del músculo esquelético en distintas especies; así, en los individuos, tanto de la especie bovina como murina, que no poseen una miostatina funcional, se ha observado un patente aumento de la masa muscular (McPherron *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 1997). Esta proteína se expresa en ratón desde el día 10 *p.c.* en los somitos y continúa haciéndolo en el estado adulto en todos los músculos esqueléticos (McPherron *et al.*, 1997). Aunque la expresión es mayor durante el período fetal (Ji *et al.*, 1998; Bass *et al.*, 1999) la diferencia de expresión en casos de desgaste o de regeneración muscular en el adulto hace pensar en un papel regulador tras el nacimiento (González-Cadavid *et al.*,1998; Sharma *et al.*, 2001).

Nuestro objetivo es el de aportar algún conocimiento sobre el patrón temporal de acción de la miostatina utilizando una estrategia de activación condicional del gen de la miostatina basado en el sistema Cre-*loxP* (Abremski y Hoess, 1984). Por ello, se ha creado un alelo en el que el tercer exón de la miostatina está invertido (y por lo tanto el gen estará inactivo) pero permanece susceptible de inversión para volver a su orientación correcta (en la que el gen recupera su actividad).

La construcción plasmídica utilizada ha sido previamente testada para evaluar su capacidad de efectuar la recombinación Cre-dependiente con los *lox* mutados utilizados, y de permanecer tras ello bloqueada.

Tras ello, y como paso preliminar a la creación de un ratón modelo del estudio deseado, se ha procedido a la generación de una línea estable de células madre embrionarias (*ES*) portadoras del alelo mencionado del gen de la miostatina susceptible de activación bajo la dependencia de la Cre-recombinasa.

Materiales y métodos

Para la creación de un alelo activable condicionalmente (estrategia "OFF to ON") se ha recurrido a la propiedad que posee la

recombinasa Cre de recombinación entre dos regiones *loxP*. Con el fin de evitar la introducción de elementos extraños entre el promotor y la zona codificante que pudieran alterar la funcionalidad de la expresión, se ha optado por colocar dos sitios *lox* en posición inversa uno con respecto al otro flanqueando el tercer exón del gen que está dispuesto a su vez en orientación inversa, lo que acarrea la inversión de la zona flanqueada cuando actúa Cre. Sin embargo, esta inversión es reversible y la posibilidad de recombinación (fenómeno "flip-flop") persiste tanto tiempo como la Cre esté presente, lo que generaría una cantidad equivalente de las dos formas recombinadas. Para favorecer la producción de la orientación "ON" se han utilizado *loxP* mutados (ALBERT *et al.*, 1995), bien en el extremo izquierdo de la secuencia del *loxP* (*lox66*), bien en su extremo derecho (*lox71*); la reacción entre ambos tipos de *lox* provoca la aparición de un *lox* doble mutante, por el que la Cre presenta tan baja afinidad que la nueva orientación se encuentra prácticamente bloqueada (fig.1).

La construcción representada en la figura 1 ha sido clonada en una versión del plásmido pNEB193 (Biolabs) mediante técnicas de digestión y ligado habituales (fig. 2A), y dada su capacidad de revertir de un alelo inactivo en uno activo, se la ha denominado "OFF to ON". A la versión recombinada de "OFF to ON", que sería el alelo activo y ya supuestamente bloqueado, se la ha definido como "ON bloqueada" (fig.1).

Para evaluar la eficacia de recombinación de este plásmido se transformó una cepa de *E.coli*, MM294 (BUCHHOLZ *et al.*, 1996), en cuyo genoma lleva incorporado el gen de Cre, con la construcción plasmídica "OFF to ON". Paralelamente esta cepa se transformó con un plásmido control "ON to OFF" (plásmido análogo al evaluado pero en el que el tercer exón aparece en orientación "ON" y flanqueado por dos *loxP* convencionales –cuya eficacia de recombinación está ampliamente documentada– en orientación directa, por lo que su recombinación originará la deleción del exón) (Fig. 2B). Además se llevó a cabo una tercera transformación con el propio plásmido "OFF to ON" una vez en posición "ON" bloqueada. Los clones resultantes se analizaron por digestión de los plásmidos correspondientes con EcoRI, que aportaba un patrón de bandas distinto según hubiera o no recombinación, y los productos de digestión se resolvieron en un gel de agarosa. La figura 3 muestra el patrón de bandas de varios clones en los que hay recombinación (inversión) frente al control de la derecha en el que no se produce dicha inversión.

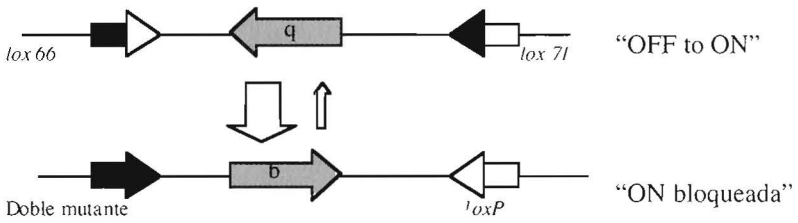


Figura 1. Esquema de la reacción de Cre entre dos *lox* invertidos. Al ser *lox* mutantes el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la conformación del doble mutante

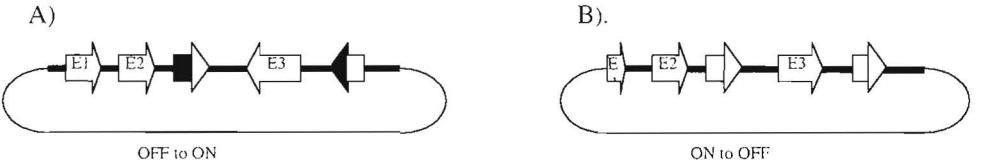


Figura 2. Representación esquemática de la construcción evaluada (A) y del control utilizado (B)

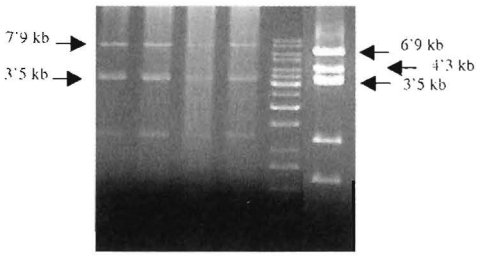


Figura 3. Patrón diferencial de bandas de varios clones de la construcción "OFF to ON" transformados en la cepa MM294-Cre. A la derecha, como control, el mismo plásmido transformado en AG-1 (sin Cre)

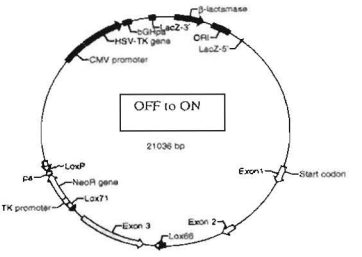


Figura 4. Representación esquemática del plásmido final utilizado para electroporación en células ES

Posteriormente, una versión previamente linearizada de la construcción "OFF to ON", a la que se adicionó una serie de genes de selección (fig. 4), se introdujo por electroporación en una línea R1 de células madre embrionarias de ratón (A. Nagy, Mount Sinai Hospital, Toronto). De las 10^7 células electroporadas se obtuvo un total de 7 clones recombinantes homólogos, que fueron discriminados mediante PCR y Southern blot. Tras ello, el gen Neo fue eliminado con ayuda de un plásmido pMC-Cre.

Resultados y discusión

Tras la transformación de las tres construcciones en MM294-Cre se obtuvieron las recombinaciones que se muestran en el cuadro 1.

Los resultados de los experimentos *in vitro* muestran que la construcción "OFF to ON" con sus *lox* mutantes tiene una capacidad de recombinación análoga a la de una construcción flanqueada de *loxP* convencionales. Es más, la capacidad de permanecer

Cuadro 1. Número de clones resultantes para las distintas construcciones evaluadas en MM294-Cre

	Recombinantes	No recombinantes	Totales
"OFF to ON"	30	0	30
"ON to OFF"	24	0	24
"ON bloqueada"	1	38	39

bloqueada aún en presencia de Cre es prácticamente total (38/39 clones).

Por otro lado, los sucesivos cultivos de las construcciones durante su generación y amplificación en ausencia de Cre no han hecho aparecer un solo clon recombinante espontáneamente, lo que demuestra que la recombinación entre dos *lox* (*loxP* o *lox* mutantes) es específica y dependiente de la recombinasa.

Esta estrategia pretende sustituir a otra, más comúnmente utilizada, y que consiste en la introducción de una secuencia "STOP" flanqueada de dos *loxP* entre el promotor y el codon inicio. Con la estrategia "OFF to ON" utilizada se consigue el mismo objetivo de activación condicional e inducible pero evitando el riesgo de introducir un elemento exógeno (un *loxP*) directamente en 5' del codon de inicio de la transcripción, lo que podría interferir con una expresión apropiada de la miostatina.

Todo ello hace de esta estrategia Cre-*lox* una candidata óptima para su utilización en el estudio de la expresión de la miostatina en un modelo animal.

Por ello, se ha establecido una línea de células ES portadoras del alelo "OFF to ON", que se prevé utilizar para la creación de ratones quimeras previa agregación de dichas células *ES* a mórulas embrionarias. El objetivo de este trabajo será el de estudiar el efecto de la activación del gen de la miostatina en diferentes momentos del desarrollo embrionario.

Agradecimientos

A D. Pirottin y a D. Poncelet por su inestimable ayuda en la realización del trabajo. Al Dr. Francis Stewart, por proporcionarnos la cepa MM294-Cre. Este trabajo has sido financiado por CICYT (AGF981087).

Bibliografía

ABREMSKI K., HOESS R., 1984. "Bacteriophage P1 site-specific recombination". J. Biol. Chem. 259: 1509-14.

ALBERT H., DALE E.C., LEE E., OW D.W., 1995. "Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome". Plant J. 7: 649-659.

BASS J., OLDHAM J., SHARMA M., KAMBADUR R., 1999. "Growth factors controlling muscle development". Domestic Animal Endocrinology 17: 191-197.

BUCHHOLZ F., ANGRAND P.-O., STEWART A.F., 1996. "A simple assay to determine the functionability of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs". Nucleic Acids Res. 15: 3118- 3119.

GONZÁLEZ-CADAVID N.F., TAYLOR W.E., YARASHESKI K., SINHA-HIKIM I., MA K., EZZAT S., SHEN R., LALANI R., ASA S., MAMITA M., NAIR G., ARVER S., BHASIN S., 1998. "Organization of the human myostatin gene expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 14938-14943.

GROBET L., ROYO L., PONCELET D., PIROTTIN D., BROUWERS B., RIQUET J., SCHOEBERLEIN A., DUNNER S., MÉNISSIER F., MASSABANDA J., FRIES R., HANSET R., GEORGES M., 1997. "A deletion in the bovine myostatine gene causes the double-muscled phenotype in cattle". Nat. Genet. 17: 71-74.

JI S., LOSINSKI R.L., CORNELIUS S.G., FRANK G.R., WILLIS G.M., GERRARD D.E., DEPREUX F.F., SPURLOCK M.E., 1998. "Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation". Am J Physiol. 275: R1265-73.

MCPHERRON A.C., LAWLER A.M., LEE S.J., 1997. "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGFβ superfamily member". Nature 387: 83-90.

SHARMA M., LANGLEY B., BASS J., KAMBADUR R., 2001. "Myostatin in muscle growth and repair". Exerc Sport Sci Rev. 4: 155-8.