EXPRESIÓN ESPECÍFICA DEL GEN DE LA βLG CAPRINA A NIVELES ELEVADOS EN LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATONES TRANSGÉNICOS

Ramona N Pena, Elena Ibáñez*, Josep M Folch, Josep Santaló* y Armand Sánchez
Unitat de Genètica i Millora, Facultat de Veterinària y *Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra

INTRODUCCIÓN

Los genes de las proteínas lacteas son responsables del 80% del ARN mensajero de la glándula mamaria en lactación. Dado este elevado nivel de expresión, ha existido un interés creciente en los últimos años para desarrollar construcciones transgénicas específicas de glándula mamaria, utilizando regiones reguladoras de los genes de la proteínas de la leche. Sin embargo, la mayoría de estos transgenes se expresan de manera dependiente de su lugar de integración.

Una excepción a este fenómeno han sido los transgénicos realizados con el gen de la β-lactoglobulina ovina (βLG; 1). Un experimento de deleción de este promotor concluyó que construcciones con más de 400 pb de región promotora se expresaban en todos los animales transgénicos, independientemente del lugar de integración. Además, la expresión era directamente proporcional al número de copias cuando se utilizaba una región promotora de 406 pb. Sin embargo, la expresión de este transgén no se limitaba exclusivamente a la glándula mamaria, sino que también se expresaba en otros tejidos, aunque a niveles más bajos (2).

Nuestro grupo ha obtenido anteriormente ratones transgénicos para la β-lactoglobulina caprina (3) pero no todas las líneas obtenidas expresaron el transgén y los niveles conseguidos fueron bajos con respecto a los transgenes ovinos.

El gen de la β-lactoglobulina ovina y caprina tienen alrededor de un 95% de similitud (4), pero sin embargo, se comportan de manera diferente cuando son usados como transgén. Estos resultados pueden ser debidos a diferencias en la estructura de la cromatina de la región reguladora entre estos dos genes (5). Pero también se debe tener en cuenta el diferente tamaño de la región 5' y 3' flanqueantes de las dos construcciones comparadas. Para analizar el efecto del tamaño del promotor sobre la expresión de nuestros transgenes hemos obtenido ratones transgénicos para una construcción de βLG caprina conteniendo 410 pb de promotor, es decir, del mismo tamaño que la construcción ovina βLG-ΔDpn.

MATERIAL Y MÉTODOS

Construcciones transgénicas:

La construcción genómica J3 ha sido usada anteriormente en nuestro laboratorio para obtener ratones transgénicos (3) y contenía, además de la unidad de transcripción de la βLG caprina, 6,1 y 3,7 Kb de las regiones 5' y 3' flanqueantes, respectivamente. La nueva construcción pPX(7,0) incluye sólo 410 pb del promotor de la βLG caprina, la unidad de transcripción y 1,9 Kb de la región 3' flanqueante.

Generación y análisis de los transgénicos:

Embriones de ratón en estadio de una célula fueron microinyectados con 6 pl de la construcción PX(7,0) y los embriones supervivientes se transfirieron a hembras receptoras pseudogestantes. Los animales fundadores se identificaron por amplificación por PCR del gen de la βLG caprina. Las líneas de transgénicos fueron fijadas mediante retrocruzamiento con ratones B6CBA F1.

Determinación del número de copias en las líneas transgénicas:

El número de copias integradas del transgén se determinó en animales fundadores y hemizigotos G1 por *Southern blotting*. Se utilizó una sonda específica de la βLG caprina situada en el tercer intrón y exón de dicho gen, marcada por random primer con [α^{32}P]dCTP. Posteriormente, las membranas se expusieron a una placa Fuji-X BAS-1000 y se cuantificaron mediante un lector PCBAS reader 2,0.

Aislamiento y análisis de ARN:

La expresión de los transgénicos fue analizada en hembras G1 hemizigotas para el transgén en el día 11 de lactación mediante análisis del ARN extraído de muestras de hígado, riñón, bazo, glándulas salivares y glándula mamaria. El ARN fue fraccionado en geles de agarosa desnaturalizante (MOPS/formaldehído) y transferido por capilaridad a membranas de nilón (*Northern blotting*). Para cuantificar la expresión del transgén se usó como sonda un clon de ADNc de la βLG caprina (6), marcada y revelada como en el apartado anterior.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de ratones transgénicos para la construcción pPX(7,0):

De los 604 embriones microinyectados, 358 fueron transferidos a hembras receptoras pseudogestantes. Se obtuvieron 67 animales (18,7%), diez de los cuales eran transgénicos (15,4%). Dos de estos diez animales no transmitieron el transgén a la descendencia, impidiendo el establecimiento de estas dos líneas transgénicas.

La βLG caprina se expresa a niveles elevados en la glándula mamaria de ratones transgénicos:

El nivel de expresión de βLG fue analizado en glándula mamaria de ratones transgénicos para las dos construcciones caprinas. Sólo en dos de las cuatro líneas para la construcción genómica (J3) se detectó la presencia de ARN mensajero de la βLG a niveles bajos (9,54% y 8,84% del nivel de βLG en la glándula mamaria de cabra lactante). Sin embargo, siete de las ocho líneas transgénicas para pPX(7,0) expresaban βLG a niveles superiores a los obtenidos para el clon J3, con un rango de expresión entre 5,44% en la línea 21 y 179,88% en la línea 56 (Tabla 1). Se observó que existía una relación lineal entre número de copias y el nivel de expresión. Se calculó una recta de regresión lineal (y= 0,0797x + 0,00867, coeficiente de regresión r^2=0,9152). Unicamente una de estas líneas transgénicas representaba una excepción (línea 21) ya que el nivel de expresión era menor que la esperada por la recta de regresión. Niveles similares de expresión dependiente del número de copias han sido descritos para la construcción ovina βLG-ΔDp que contenía también 406 pb de región promotora.

Dos líneas para la construcción pPX(7,0) presentaban niveles variables de expresión entre las cuatro hembras analizadas. Este fenómeno de expresión inestable conocido como variegación ha sido bien caracterizado en transgénicos para una construcción genómica de βLG ovina (7,8), relacionándose con la integración del transgén en lugares cercanos a la heterocromatina centromérica que permitía la expresión del transgén sólo en un porcentaje de las células mamarias.

La βLG de cabra se expresa específicamente en la glándula mamaria de ratones transgénicos:

La βLG caprina se expresa exclusivamente en la glándula mamaria de la cabra en lactación. Se analizó por *Northern blotting* el ARN de varios tejidos para comprobar la especificidad tisular de los transgenes. Todas las líneas J3 expresaban βLG en bazo. Además, la línea 23 también expresaba en hígado, pero en ninguna de ellas se detectó βLG en las glándulas salivares o en riñón. En cambio, ninguna de las ocho líneas de ratones transgénicos para la construcción caprina pPX(7,0) se expresó de forma inespecífica en los tejidos analizados. Por tanto, al disminuir la longitud del promotor a 410 pb en las construcciones de βLG caprina, hemos restaurado la expresión de esta proteína específicamente en la glándula mamaria. Por el contrario, la construcción ovina βLG-ΔDp se expresaba también en otros tejidos, aunque a niveles menores que en la glándula mamaria (2).

EXPRESION en LINEAS TRANSGENICAS pPX(7,0)										
	L3	**L19**	**L21**	**L29**	**L32**	**L45**	**L46**	**L54**	**L56**	**L60**
Nº de COPIAS en G0	5	10	5	11	8	<1	1	<1	>20	11
Nº de COPIAS en G1	5	15	6	-	5	-	1	1	22	6
Expresión MAMARIA (*)	36,59 ±3,12	96,5 ±47,08	5,44 ±0,55	-	42,55 ±16,02	-	12,54 ±1,03	ND	179,81 ±12,66	43,75 ±2,42
Expresión ECTOPICA	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND

ND: No Detectado (*) En % respecto a la expresión de βLG en glándula mamaria de cabra lactante

Diferencias en los elementos reguladores pueden explicar las diferencias entre los transgenes de la βLG caprina y ovina:

Así pues, la reducción del tamaño de la región promotora del transgén a 410 pb nos ha permitido aumentar el nivel de expresión de βLG en glándula mamaria a niveles equivalentes a los obtenidos con la construcción ovina βLG-ΔDp. Además, a diferencia de la construcción caprina J3 y el transgén ovino βLG-ΔDp, la nueva construcción pPX(7,0) se expresa específicamente en la glándula mamaria. Las diferencias en el patrón de expresión observadas entre estas dos construcciones de idéntico tamaño deben ser explicadas por diferencias en los elementos reguladores incluidos en sus secuencias. En este sentido se han detectado diferencias en el patrón de hipersensibilidad a la DNasal entre las regiones reguladoras en los genes de la βLG ovina y caprina (4). Aunque ambos genes presentaban una zona de hipersensibilidad en la región promotora proximal, el gen caprino exhibía zonas hipersensibles adicionales en el primer y segundo intrón. En esta región intrónica se ha localizado una región potencial de unión a la matriz nuclear (MAR), que podría ayudar a reprimir la expresión del transgén en tejidos no específicos de la βLG.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Whitelaw CBA, Harris S, McClenaghan M, Simons JP y Clark AJ (1992) J. Biochem. 286:31-39
2. Farini E y Whitelaw CBA (1995) Mol. Gen. Genet. 246(6):734-738
3. Ibáñez E, Folch JM, Coll A, Santaló J, Egozcue J y Sánchez A (1997) Transgenic Res. 6(1):69-74
4. Folch JM, Coll A y Sánchez A (1994) J. Dairy Sci. 77:3493-3497
5. Pena RN, Folch JM, Sánchez A y Whitelaw CBA (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun. 252(3):649-53
6. Folch JM, Coll A y Sánchez (1993) J. Anim Sci. 71(10):2832
7. Simons JP, McClenaghan M y Clark AJ (1987) Nature 328:530-532
8. Dobie KW, Lee M, Fantes JA, Graham E, Clark AJ, Springbett A, Lathe R, McClenaghan M (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:6659-6664