

De cómo es posible obtener un ratón gen fl/fl a partir de un cruce gen $+/+$ X gen fl/fl

La lógica mendeliana dice que no es posible. Sin embargo, durante el mantenimiento de líneas knock-out (ko) condicionales no es infrecuente la aparición de estos genotipos “imposibles”, es decir, genotipos que no pueden ser deducidos a partir de los genotipos parentales siguiendo las leyes de la herencia mendeliana. Por ejemplo, descendencia aparentemente silvestre (wt) procedente de un cruce entre un animal wt y un homocigoto para el alelo floxeado. Con frecuencia, este tipo de resultados se achaca a errores en el genotipado de los progenitores, pero muchas veces el investigador descubre desconcertado que el fenómeno persiste incluso después de descartar un posible error en la asignación del genotipo. Además, en algunas ocasiones estas casos van acompañados de fenotipos inesperados.

En realidad, este tipo de resultados que aparentemente contradicen la lógica son posibles cuando confluyen dos hechos: por un lado, actividad inesperada de Cre en tejido germinal de los progenitores o en las primeras fases de desarrollo embrionario; por otro lado, elección de una estrategia de genotipado que falle en la detección del alelo recombinado.

Las líneas ko condicionales son líneas procedentes del cruce de un ratón con un gen floxeado (con un exón flanqueado por dos sitios loxP) y otro ratón que expresa la recombinasa Cre exclusivamente en un órgano o tipo celular específico. El resultado de este cruce es un animal que presentará una copia del gen floxeado en todas las células del organismo excepto en aquel órgano en el que se esté expresando la recombinasa Cre, en cuyas células se habrá producido la recombinación de los sitios loxP y por lo tanto presentarán la versión deletada del alelo. Puesto que los animales se suelen genotipar mediante PCR a partir de ADN extraído de cola, en el que supuestamente no debería haber recombinación, es una práctica habitual que la PCR se diseñe para poder distinguir solo entre alelos floxeados (fl) y wt (+), pero no detecte la presencia de alelos recombinados (también llamados “del” o alelos nulo). Ver fig 1

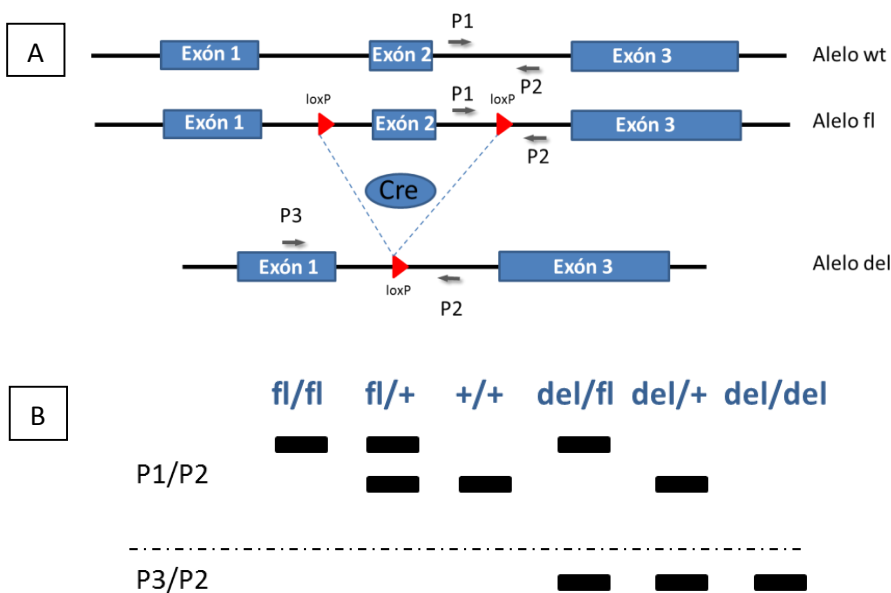


Fig. 1

A Localización de los oligonucleótidos y esquema del resultado de la recombinación por la actividad cre.

B Patrón de bandas obtenidas por PCR con los oligos P1 y P2, o P3 y P2 según genotipo.

La PCR con P1/P2 permite distinguir el alelo wt del alelo floxeado por diferencia en el tamaño del producto amplificado (mayor en el alelo fl), pero no amplifica el alelo del. La PCR con P3/P2 sólo amplifica el alelo del (generalmente el fragmento deletado es grande y no hay amplificación de los alelos fl y wt)

Sin embargo, la expresión de Cre no siempre es la esperada. Incluso en líneas Cre de uso habitual se ha comprobado que puede existir recombinación en tejidos distintos al diana. De hecho, esta falta de especificidad es relativamente frecuente tal y como los laboratorios Jackson pusieron de manifiesto en 2012

(Heffner et al). Si esta actividad inesperada de Cre tiene lugar en el tejido germinal del progenitor en el que coexisten el alelo floxeado y cre, afectará a la carga genética de los gametos, que presentarán un alelo deleciónado en lugar del alelo floxeado. La progenie resultante serán individuos que contendrán en todas sus células el alelo deleciónado heredado de este progenitor. A este fenómeno se le llama deleción germinal. Además, es necesario hacer hincapié en que la deleción puede producirse en el precursor germinal antes de completar la primera meiosis y posteriormente segregarse los alelos recombinados y cre, de tal manera que el fenómeno puede afectar a la descendencia independientemente de si las crías han heredado o no el gen cre.

La situación puede ser incluso más compleja, ya que la deleción germinal puede que no afecte a la totalidad de las células germinales. En ese caso tendremos camadas en las que pueden coexistir animales ko condicionales verdaderos que sí muestran la especificidad esperada, junto con animales ko constitutivos, en los que el alelo flox heredado está deleciónado en todas las células del organismo.

Esta recombinación global puede pasar desapercibida si la estrategia de genotipado no es la correcta. Tal y como se puede ver en la fig 1B, usando solo los oligos P1/P2 es fácil llegar a conclusiones erróneas porque no es posible distinguir un animal fl/fl de uno del/fl, ni tampoco uno +/+ de uno del/+. Sólo cuando se tiene en cuenta el resultado de la PCR con los oligos P3/P2 (en reacciones separadas o combinando en la misma reacción como multiplex PCR) podemos detectar los genotipos reales. Deducir el genotipo solo con la información proporcionada por P1/P2 dará lugar a una asignación incorrecta en el 50% de las crías, tal como se muestra en la tabla 1.

Cruce gen^{fl/+}: cre^{+/0} X gen^{fl/+}

| Genotipo | fl/fl | fl/+ | +/+ | del/fl | del/+ |
|--------------------|-------|------|-----|--------|-------|
| Teórico | 25% | 50% | 25% | | |
| Real ¹ | 0% | 25% | 25% | 25% | 25% |
| Asignado con P1/P2 | | fl/+ | +/+ | fl/fl | +/+ |

¹ Suponiendo deleción en el 100% de los precursores germinales

Tabla. 1 Porcentaje de los posibles genotipos en la descendencia de progenitores heterocigotos para un gen floxeado cuando existe actividad recombinasa inesperada en tejido germinal. El genotipo teórico es el que cabría esperar a partir del ADN de cola si la actividad de la Cre fuese específica. En la última línea se muestra el genotipo asignado (erróneamente) cuando la estrategia de genotipado no detecta el alelo recombinado.

Una consecuencia del genotipado erróneo (no la más grave, pero sí muy llamativa) es la aparición de genotipos inesperados, tal y como se muestra en la tabla 2.

Cruce $gen^{fl/+}: cre^{+/0} \times gen^{supuesto\ fl/fl\ (real\ fl/del)}$

| Genotipo | fl/fl | fl/+ | +/+ | del/fl | del/+ | del/del |
|--------------------|-------|------|-----|--------|-------|---------|
| Teórico | 50% | 50% | | | | |
| Real ¹ | 0% | 25% | 0% | 25% | 25% | 25% |
| Asignado con P1/P2 | | fl/+ | | fl/fl | +/+ | - |

¹ Suponiendo delección en el 100% de los precursores germinales

Tabla 2. Ejemplo de uno de los posibles escenarios de genotipos inesperados. Se muestran los porcentajes esperados en el caso teórico de actividad Cre específica y en la situación real asumiendo un 100% de delección germinal. En la última fila se muestra el genotipo erróneo asignado cuando sólo se utilizan los oligos P1/P2

En el ejemplo propuesto en la tabla 2, un 25 % de las crías serían asignadas sorprendentemente como +/+ y en otro 25% ni siquiera habría amplificación. En el caso de que los del/del no fueran viables, podría ocurrir que hasta un 33% de las crías nacidas fueran genotipadas como +/+ (imposible a partir de los genotipos supuestos de los progenitores).

La delección constitutiva en todas las células del organismo debido a expresión inesperada de Cre no es un hecho tan infrecuente como se podría pensar. En los últimos años se han multiplicado los artículos y notas técnicas reportando este tipo de efecto en líneas Cre ampliamente utilizadas. De hecho, algunos autores opinan que podríamos estar ante la punta del iceberg (Kobayash, 2013). Además, algunas de las líneas cre que presentan este fenómeno son de uso muy frecuente (nestin-cre, TH-ires-cre, CamKII-cre...).

En algunos casos se trata de una expresión ectópica del transgén y por eso líneas procedentes de distintos fundadores con el mismo transgén pueden comportarse de manera diferente (dependiendo del punto concreto de inserción del transgén en cada fundador). En otras ocasiones, sin embargo, la expresión de Cre reproduce fielmente la expresión fisiológica del promotor elegido. Se podría pensar que el problema se puede solucionar con facilidad evitando utilizar promotores con actividad conocida en tejido germinal. Sin embargo, no siempre se dispone de esta información, sobre todo cuando la activación del promotor es pasajera. No hay que olvidar que la recombinación entre los dos sitios loxP es un fenómeno irreversible. Debido a ello, aunque la expresión de Cre en los precursores germinales o en los primeros estadios embrionarios sea fugaz, el efecto permanece.

Aparte del hecho anecdótico de que aparezcan genotipos difíciles de explicar, la presencia no detectada de un alelo delecionado puede tener consecuencias catastróficas en la interpretación de los resultados experimentales, sobre todo cuando afecta a genes que presentan haploinsuficiencia. Como se puede ver en la tabla 2, si la estrategia de genotipado no detecta el alelo delecionado, sería posible tomar como controles +/+ animales que en realidad son heterocigotos para el alelo delecionado (del/+), o como condicionales animales que en realidad son fl/del.

La necesidad de incorporar en la estrategia de genotipado la detección del alelo recombinado ya fue recalada por Zhang et al en 2007. Pese a ello, no todos los laboratorios que utilizan el sistema cre-loxP la incluyen. En los casos más graves el problema se detecta mucho tiempo después, cuando empiezan a aparecer genotipos imposibles o fenotipos inesperados y cuando la existencia de animales genotipados erróneamente puede haber distorsionado los resultados experimentales durante meses de trabajo.

Como conclusión, es necesario implementar una estrategia de genotipado que permita distinguir no solo el alelo wt y el alelo floxeado, sino también el alelo deleciónado resultante de una recombinación no esperada.

Ref

Heffner CS, Herbert Pratt C, Babiuk RP, Sharma Y, Rockwood SF, Donahue LR, Eppig JT, Murray SA. Supporting conditional mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource. Nat Commun. 2012;3:1218 doi:10.1038/ncomms2186

Kobayashi Y, Hensch TK. Germline recombination by conditional gene targeting with Parvalbumin-Cre lines. Frontiers in Neural Circuits 2013;7 doi:3389/fncir.2013.00168

Zhang J, Liu W, Ye P, D'Ercole AJ. Pitfalls of PCR-based strategy for genotyping cre-loxP mice Biotechniques 2007 Vol42(3) pag281-283