

Autores: Salvador Escobar Luján, Pablo Vivancos Ayala y Ana Sánchez del Campo Amorós

Tutores: Victoriano Mulero¹, Isabel Cabas Sánchez¹, Ana Belén Pérez Oliva¹, Diana García Moreno¹ y José María Caballero².

¹Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia/IMIB; ²IES Juan Carlos I, Murcia



Facultad de Biología
Universidad de Murcia

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

- ❑ Hemos realizado este trabajo con el departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia.
- ❑ El estudio se ha realizado usando el pez cebra, *Danio rerio* (Figura 1), como modelo animal. Es un ciprínido originario de las aguas dulces de la India, Pakistán y Bangladesh. Las ventajas que ofrece frente a otros hacen que se haya convertido en los últimos años en uno de los organismos modelo más utilizados en experimentación biomédica (1-4). Tales ventajas son: el pequeño tamaño y fácil manejo, la sencilla manipulación genética (como la inactivación de genes mediante el sistema CRISPR-Cas9), la transparencia, el desarrollo embrionario rápido y extrauterino, y la disponibilidad del genoma completamente secuenciado con gran homología al de humano.
- ❑ Se sabe que los estrógenos modulan la respuesta inmunitaria, pero su actuación a través del receptor de estrógenos asociado a proteína G (GPER1) es bastante desconocida (5). Por tanto, nos propusimos los siguientes objetivos: provocar la disrupción génica de *gper1* en pez cebra mediante el sistema CRISPR/Cas9 y su validación in vivo; analizar la expresión proteica de Gper1; y evaluar el papel de Gper1 en un modelo de inflamación aguda.



Figura 1. *Danio rerio* (pez cebra): hembra (arriba) y macho (abajo)

METODOLOGÍA

- (1) Para provocar la disrupción génica de *gper1*, y comprobar in vivo** que se había producido, se microinyectaron dos grupos de huevos recién fecundados: el primero con la proteína Cas9 y sgRNA-*gper1*, que se une al exón 2 de *gper1*, y el segundo con Cas9 y una guía estándar que no se une a ninguna parte del genoma. Después se hizo una PCR para amplificar una región del exón 2 de *gper1*, y el producto se sometió a electroforesis en un gel de agarosa para comprobar que había funcionado. Finalmente se realizó el ensayo de la T7 endonucleasa, para saber si la Cas9 había cortado in vivo por donde habíamos predicho.
- (2) Para analizar la expresión proteica de Gper1 en larvas de pez cebra**, se llevó a cabo un Western Blot. En primer lugar, se microinyectaron huevos de 0 dpf (días post fecundación), un grupo con vector vacío, y otro grupo con Gper1 unido a epítopo Flag. Se dejaron crecer, y a los 3 dpf se lisaron, se obtuvieron las proteínas y se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, seguida de transferencia semiseca. Se incubó la membrana con anticuerpo anti-Flag toda la noche a 4 °C; al día siguiente se lavó el anticuerpo 4 veces y por último se reveló.
- (3) Para evaluar el papel de Gper1 en un modelo de inflamación aguda**, se cruzaron peces de la línea lyz:DsRED que tienen marcados los neutrófilos en rojo (6). Larvas de 3 dpf fueron divididas en dos grupos; el primero se trató durante tres horas con G1, un agonista específico de GPER1 (7); las del segundo grupo fueron tratadas con DMSO (grupo control). A continuación, se les cortó la parte final de la aleta caudal y se tomaron imágenes en una lupa de fluorescencia a 1 hph (1 hora después de la herida) y a 3 hph. Por último, se realizó un recuento de neutrófilos que se habían reclutado a la herida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- ❑ En cuanto a la pregunta de si la guía diseñada para *gper1* corta in vivo, la respuesta es afirmativa. Como se puede observar en la Figura 2, los resultados de los peces mutantes tienen dos bandas, lo que quiere decir que Cas9 ha cortado y, en los resultados de los wild type se puede ver sólo una.
- ❑ El resultado del western blot (Figura 3) indica una buena expresión de Gper1 en larvas de pez cebra frente al control negativo donde no obtenemos banda. La proteína se expresa según el peso molecular esperado.
- ❑ Después de hacer el recuento de neutrófilos (Figuras 4, 5 y 6) que habían acudido a la herida después de 1 y 3 horas nos dimos cuenta de que habían acudido más neutrófilos a las heridas de los peces previamente tratados con G1. Este resultado no era el esperado, pues en experimentos anteriores eran los peces sin tratar los que presentaban más neutrófilos, esto probablemente se deba a la poca cantidad de individuos en la muestra.

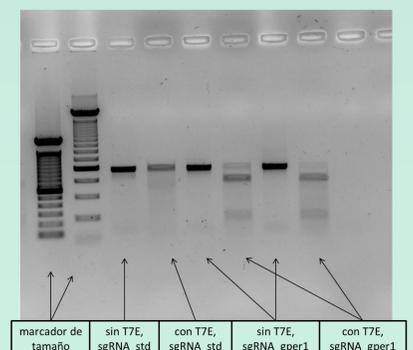


Figura 2. Resultados del ensayo de la T7. sgRNAstd: ARN guía estándar. sgRNAgper1: ARN guía diseñado para *gper1*

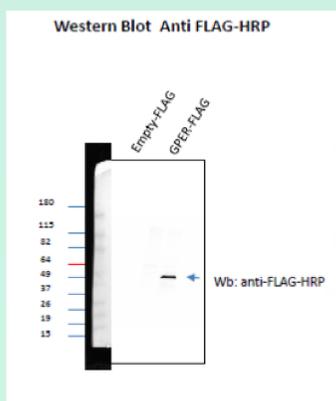


Figura 3. Resultados del Western Blot

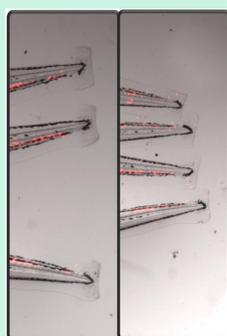


Figura 4. Detalle de cola de las larvas control, 1 hph (dcha) y 3 hph (izda)

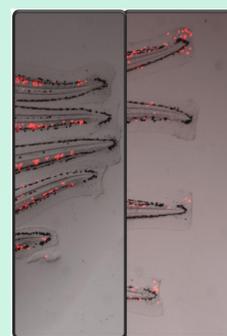


Figura 5. Detalle de cola: larvas tratadas con G1, 1 hph (dcha) y 3 hph (izda)

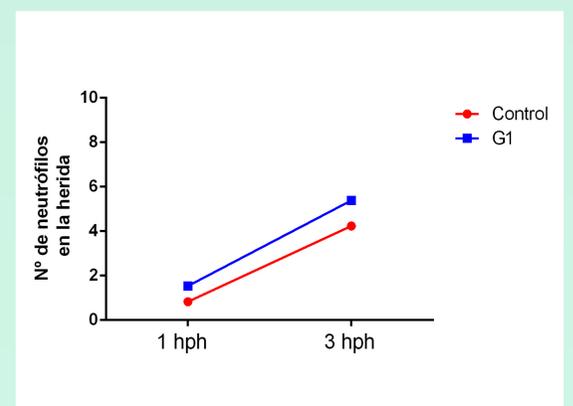


Figura 6. Número de neutrófilos en la herida: larvas control y larvas tratadas con G1

CONCLUSIONES

- ❑ Se ha provocado la disrupción génica de *gper1* de pez cebra mediante el sistema CRISPR-Cas9.
- ❑ Gper1 se expresa en larvas de pez cebra.
- ❑ La activación farmacológica de Gper1 en larvas no afecta al reclutamiento de neutrófilos a una herida.

BIBLIOGRAFÍA

- J. L. de Jong, L. I. Zon, Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis. *Annu Rev Genet* **39**, 481-501 (2005).
- R. White, K. Rose, L. Zon, Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nat Rev Cancer* **13**, 624-636 (2013).
- R. M. White *et al.*, Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell* **2**, 183-189 (2008).
- S. A. Renshaw, N. S. Trede, A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Dis Model Mech* **5**, 38-47 (2012).
- E. R. Prossnitz, M. Barton, Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol Cell Endocrinol* **389**, 71-83 (2014).
- C. Hall, M. V. Flores, T. Storm, K. Crosier, P. Crosier, The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC Dev Biol* **7**, 42 (2007).
- C. G. Bologna *et al.*, Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol* **2**, 207-212 (2006).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad de Murcia y al instituto Juan Carlos I su colaboración en la realización de este proyecto, especialmente a Victoriano Mulero, Isabel Cabas Sánchez, Ana Belén Pérez Oliva, Diana García Moreno y José María Caballero.