

Microinyección de la proteína Cre recombinasa para el trazado de linajes celulares durante el desarrollo embrionario

Sendra M^{1*}, Hourcade JdD^{2*}, Ocaña OH¹, Domínguez JN³⁺, Torres M¹⁺. juandedios.hourcade@cnic.es

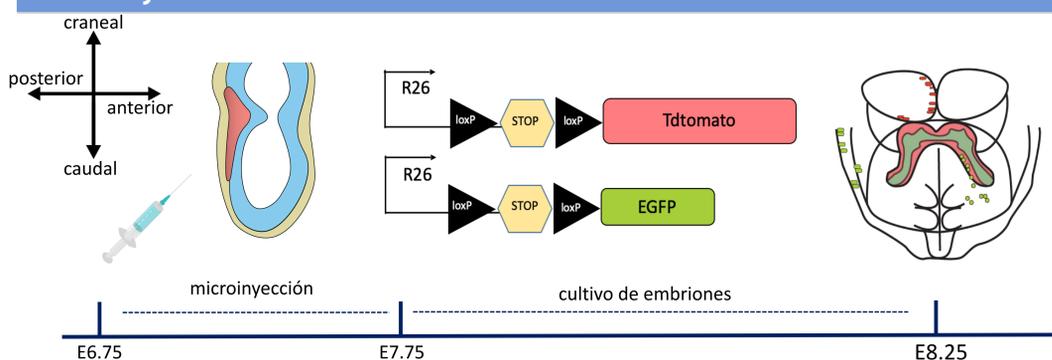
1. Laboratorio de Control Genético del Desarrollo de Órganos y Regeneración. Centro Nacional de investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid. 2. Unidad de Transgénesis. Centro Nacional de investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid. 3. Departamento de Biología Experimental. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén, Jaén. * Contribución similar. +Autores de correspondencia

Introducción

Durante las últimas décadas, los datos obtenidos a partir de la microinyección de colorantes lipofílicos, iontoforesis e infección por virus modificados han permitido trazar linajes embrionarios de forma prospectiva (Parameswaran and Tam, 1995; Lawson et al., 1991; Mikawa et al., 1992). En los últimos años, este tipo de análisis se ha basado principalmente en técnicas de carácter retrospectivo (sistema Cre-loxP). Estos permiten el marcaje sistemático de poblaciones celulares que expresan un determinado gen en una ventana temporal concreta (Sauer et al., 1988). No obstante, estas técnicas presentan inconvenientes: el marcaje con colorantes de membrana queda "diluido" en cada división celular; el uso de vectores virales requiere instalaciones inaccesibles para algunos laboratorios y los análisis retrospectivos no aportan información sobre la localización o temporalidad del precursor marcado. En nuestro laboratorio, hemos generado una metodología basada en la microinyección de TAT-Cre recombinasa en embriones portadores de los genes *reporters* floxeados Tomato y GFP, la cual nos permite el diseño de "mapas de destino celular", así como también el análisis de linajes celulares a partir de una sola célula.

Material y métodos

Estrategia para el "mapeo" de progenitores embrionarios mediante la microinyección de TAT-Cre recombinasa



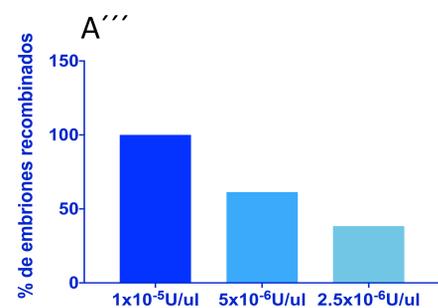
Embriones con un doble *reporter* floxeado (Tomato y GFP) (E6.75-E7.75), fueron microinyectados con TAT-Cre recombinasa en epiblasto y/o mesodermo. Posteriormente, los embriones fueron cultivados en condiciones estáticas (37°C, 5% O₂, 7% de CO₂). El análisis posterior se llevó a cabo mediante microscopía confocal.

Equipos utilizados para la microinyección de TAT-Cre recombinasa



Zeiss Observer D1, micromanipulador Transferman Nk2, bomba de inyección FemtoJet (Eppendorf) (A-A'). Ejemplo de agujas utilizadas en nuestros ensayos (A'').

(A''') Concentraciones de TAT-Cre recombinasa (Millipore) testadas. Teniendo en cuenta el número de embriones recombinados en cada condición, número de *clusters* generados y el tamaño de éstos por embrión, estimamos 5×10^{-5} U/ul ($\approx 60\%$ embriones recombinados; ≈ 8 células recombinadas por embrión) como la condición óptima para llevar a cabo nuestros ensayos.



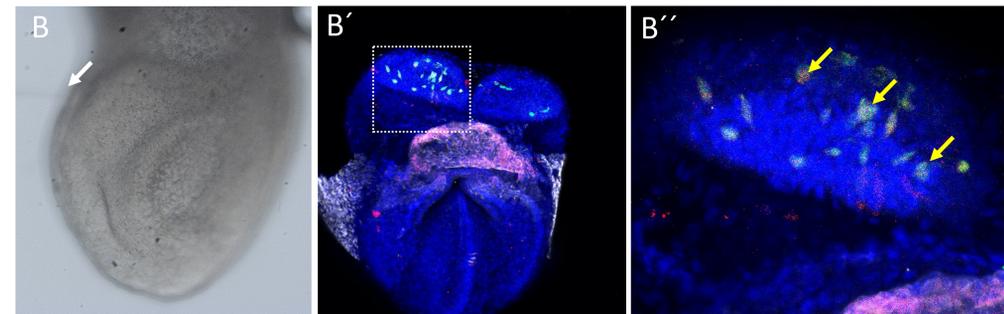
Condiciones para la microinyección de TAT-Cre recombinasa (5×10^{-6} U/ul en IDTE 1X buffer): presión de inyección=800hPa; presión de compensación=100hPa; t=2''.

Conclusiones

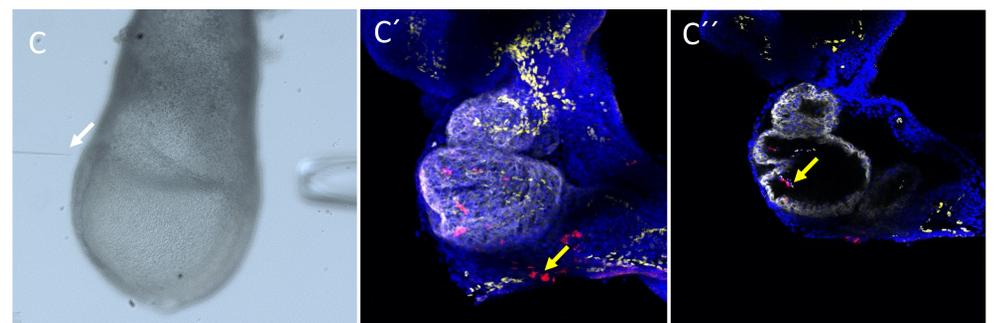
Esta nueva estrategia para el análisis de linajes celulares se muestra más accesible a los laboratorios dedicados al estudio del desarrollo, presentando además numerosas ventajas con respecto a las herramientas utilizadas previamente: es un sistema de trazado de linaje celular sensible, específico y eficiente, posibilitando la elaboración de "mapas de destino celular" a partir de una sola célula precursora.

Resultados

La microinyección de TAT-Cre recombinasa nos permite el diseño de "mapas" de destino celular

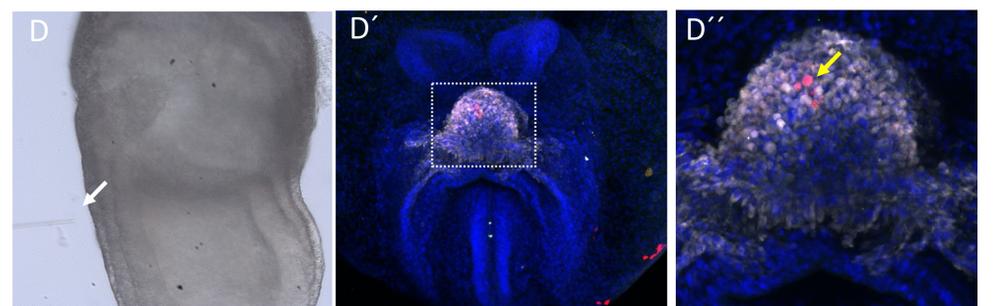


Embrión en un estadio E7 (B) microinyectado en la región craneal del mesodermo embrionario (flecha). Después de cultivo, podemos observar células recombinadas en la región cefálica del embrión (B', B''); células recombinadas indicadas con flechas amarillas.



Embrión en un estadio E7.75 (C) microinyectado en la denominada región yuxtacardiaca (YCF, región anterior y rostral del embrión) (Tyser et al., 2021; Zhang et al., 2021). Tal y como ha sido demostrado previamente, en la YCF residen progenitores del proepicardio (flecha amarilla en C'), miocardio y endocardio (C''); células recombinadas indicadas con flecha amarillas.

Una baja titulación de TAT-Cre recombinasa permite el análisis de linajes celulares a partir de una sola célula



Embrión en un estadio E6.75 (D) microinyectado en la región craneal del mesodermo embrionario (flecha blanca). Después de cultivo, podemos observar células recombinadas en la región cardiaca del embrión (D', D''). Siguiendo la estrategia del doble *reporter* (Padrón-Barthe et al., 2017), la probabilidad de que en nuestra colección el *cluster* (células Tomato+; flecha amarilla) proceda de un único evento de recombinación es del 81%.

Referencias

- Lawson, K. A., Meneses, J. J. and Pedersen, R. A. (1991). Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*.
- Mikawa, T., Borisov, A., Brown, A. M. C. and Fischman, D. A. (1992). Clonal analysis of cardiac morphogenesis in the chicken embryo using a replication-defective retrovirus: I. Formation of the ventricular myocardium. *Developmental Dynamics*.
- Padrón-Barthe, L., Temiño, S., Villa Del Campo, C., Carramolino, L., Isern, J. and Torres, M. (2014). Clonal analysis identifies hemogenic endothelium as the source of the blood-endothelial common lineage in the mouse embryo. *Blood*.
- Parameswaran, M. and Tam, P. P. L. (1995). Regionalisation of cell fate and morphogenetic movement of the mesoderm during mouse gastrulation. *Developmental Genetics*.
- Tyser, R. C. V., Ibarra-Soria, X., McDole, K., Jayaram, S. A., Godwin, J., Brand, T. A. H. V. Den, Miranda, A. M. A., Scialdone, A., Keller, Zhang, Q., Carlin, D., Zhu, F., Cattaneo, P., Ideker, T., Evans, S. M., Bloomekatz, J. and Chi, N. C. (2021). Unveiling Complexity and Multipotentiality of Early Heart Fields. *Circulation Research*.