

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Veterinària

# **La $\beta$ -Lactoglobulina y su aplicación en transgénesis**

**Maria Ballester Devis**

**Bellaterra 2005**

El Dr. **Armand Sánchez i Bonastre**, Catedràtic del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

i

el Dr. **Josep M. Folch i Albareda**, Professor Titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

### **CERTIFIQUEN:**

Que na **Maria Ballester Devis** ha realitzat sota la seva direcció el treball de recerca "*La  $\beta$ -Lactoglobulina y su aplicaci3n en transg3nesis*" per a obtenir el grau de doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme al Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 4 de febrer de 2005

Dr. Armand Sánchez i Bonastre

Dr. Josep M. Folch i Albareda

“La experiencia más hermosa que tenemos a nuestro alcance es el misterio. Es la emoción fundamental que está en la cuna del verdadero arte y de la verdadera ciencia. El que no la conozca y no pueda ya admirarse, y no pueda ya asombrarse ni maravillarse, está como muerto y tiene los ojos nublados”

Albert Einstein

Tot va començar amb una classe de Genètica Molecular...

“S’ha estimat que en el nostre cos existeixen unes  $3 \times 10^{12}$  cèl·lules, i com que hi ha uns dos metres de DNA en cada cèl·lula, el DNA present en un ésser humà podria tenir uns  $6 \times 10^{12}$  metres de longitud. Si s’uniren totes aquestes molècules de DNA, podrien anar i tornar de la lluna uns 8.000 cops!”

i ara els agraïments són nombrosos!

En primer lloc gràcies al Dr Armand Sánchez, que abans del que es pensa, em va obrir les portes al camp de la biologia molecular, gràcies també per donar-me l’oportunitat de treballar amb el seu grup.

Al Dr Josep Maria Folch, que ha estat un bon director però també un bon amic, gràcies perquè amb tu he après moltíssimes coses, gràcies per la teva paciència i comprensió.

A l’Olga, que des del principi l’he atabalat amb mil històries, per donar-me una bona base durant el meu inici al laboratori i per les xerrades matutines sobre “literatura”.

Al Marcel, que sempre té temps per respondre preguntes i per donar consells, moltes gràcies.

A l’Anna C, ha sigut un plaer treballar amb tu, m’has ensenyat moltíssimes coses, sobretot a confiar amb un mateix, gràcies per la teva amistat.

A tota la gent que forma part del Departament de Ciència Animal i dels Aliments, especialment als meus companys: a la Laura, que em va “adoptar” durant els primers dies al laboratori; a l’Elisenda (“Paquito el xocolatero...”, espero que mai m’oblidis!); a la M<sup>a</sup> del Mar, per les estones a genòmic; a la Betlem, dóna gust treballar amb tanta alegria; a la “Maribeli”, gràcies per tenir sempre algun detall; a l’Anna M, per tots els consells i per la seva amistat; a l’Anna T, perquè sense dir-li res sap el que penso; a la Neus, perquè sempre hi és quan la necessites, per escoltar-me...!; als meus nens: Oscar i Oriol, sou uns soletes! (i uns marxosos!); a

la Yolanda; als més joves del departament: al David i al Jordi; als nous fitxatges: el Josep Marmi i l'Abid, i als que ja han marxat, especialment al Habid.

Al Quim C i a la Marta F, per les estones divertides que hem passat! I a la resta dels membres del Departament, el Dr Miguel Pérez-Enciso, el Dr Jesús Piedrafita, el Dr Jordi Jordana, la Txiqui...

Gràcies també per la seva amistat a les noies del pis de sota, a l'Alhelí, a la Fina i a l'Ana O; i aprofitant que estic al pis de sota, gràcies també als Bioquímics que m'han ajudat sempre que ho he necessitat, atabalant-los amb mil històries diferents, especialment a l'Edu, moltes gràcies també per la teva amistat, i a la Laia.

A la gent de Bioquímica però aquest cop de la Facultat de Ciències, a la Susanna que em va ensenyar a treballar amb proteïnes, gràcies per donar-me ànims quan les coses no rutllaven be!

I com estic a Ciències, marxo cap a la Unitat de Biologia Cel·lular on està l'Elena, gràcies al projecte hem pogut treballar juntes i ha sigut un plaer, moltes gràcies per la teva ajuda i els teus consells, i sobretot per la teva comprensió.

També vull donar les gràcies als meus companys de pis, al Kimito i al Toni, per aguantar-me durant aquests darrers anys i a la Lejla.

Al Toni i a la Mariona per la seva amistat, per totes les *batalletes* que hem passat junts i tot el suport, consells i ànims que m'han donat.

A tots els meus amics de Benicarló, que encara que no entenguin bé el que faig sempre estan ahí, animant-me.

A la meva família, als meus pares, Ramon i Vicentica, i als meus germans, gràcies perquè sempre m'heu animat i per que m'heu donat força!. Sense vosaltres aquest treball no existiria, gràcies per fer pinya quan us necessito. Som un gran equip!!!

Als meus nebots, especialment al meu fillol, un petó!

Al meu tiet Fernando, que li fa tanta il·lusió com a mi aquest treball.

I per últim, al Sergi, per que sempre està ahí, sempre donant ànims, sempre ajudant, sempre escoltant, sempre estimant..., moltes gràcies.

<b>RESUMEN / SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b><i>I PARTE: LA <math>\beta</math>-LACTOGLOBULINA</i></b>	
1. Las Proteínas Lácteas	<b>3</b>
1.1. Las Caseínas	<b>5</b>
1.2. La $\alpha$ -Lactoalbúmina	<b>7</b>
1.3. La $\beta$ -Lactoglobulina	<b>7</b>
2. Estructura y origen de la $\beta$ -Lactoglobulina	<b>8</b>
2.1. La familia de las $\beta$ -Lactoglobulinas	<b>10</b>
3. La función de la $\beta$ -Lactoglobulina	<b>12</b>
4. Estructura y expresión del ARNm y del gen de la $\beta$ -Lactoglobulina	<b>13</b>
5. Polimorfismo genético de la $\beta$ -Lactoglobulina	<b>16</b>
<b><i>II PARTE: LA APLICACIÓN EN TRANSGÉNESIS DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS</i></b>	
6. Técnicas de obtención de animales transgénicos	<b>20</b>
7. Aplicaciones de los animales transgénicos	<b>24</b>
8. Sistemas biológicos para la producción de proteínas recombinantes: interés de la producción de FSH humana en animales transgénicos	<b>30</b>
9. La glándula mamaria como <i>bioreactor</i>	<b>31</b>
9.1. Utilización de los genes de las proteínas lácteas en transgénesis: el <i>cassette</i> de expresión del gen de la $\beta$ LG	<b>33</b>
10. Línea Tg 56 para la construcción pPX(7.0) de la $\beta$ LG caprina	<b>40</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
<b>RESULTADOS</b>	
1. <b><i>Disruption of the mouse Phospholipase C-<math>\beta</math>1 gene in a <math>\beta</math>-Lactoglobulin transgenic line affects viability, growth and fertility in mice</i></b> en <i>Gene</i> (2004) <b>341:279-289</b>	<b>44</b>

2. ***A Real-Time Quantitative PCR-Based System for Determining Transgene Copy Number in Transgenic Animals*** en *BioTechniques* (2004) **37**:610-613 **71**
3. ***Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone in the mammary gland of transgenic mice***, enviado a *Theriogenology* **83**
4. ***Polymorphisms in the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene***, aceptado en *Journal of Dairy Research* **101**

## **DISCUSIÓN**

1. Disrupción del gen PLC- $\beta$ 1 en el ratón **118**
2. PCR cuantitativa a tiempo real **126**
3. Expresión de la Hormona Estimulante del Folículo en ratones transgénicos **130**
  - 3.1. Construcciones para las dos subunidades de la hormona FSHh **131**
  - 3.2. Obtención de ratones transgénicos para la FSH humana **132**
  - 3.3. Expresión del ARNm de las subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de la hormona FSH humana en la glándula mamaria **137**
  - 3.4. Expresión de la hormona FSH humana en la leche de los ratones transgénicos **139**
4. Polimorfismo en el gen de la  $\beta$ -Lactoglobulina caprina **141**

## **CONCLUSIONES** **148**

## **BIBLIOGRAFÍA** **151**

## **ANEXO** **174**

## **INTRODUCCIÓN**

Figura 1: Organización estructural de las unidades de transcripción de las cuatro caseínas y la $\alpha$ -lactoalbúmina bovinas	<b>6</b>
Figura 2: Estructura terciaria de la $\beta$ LG	<b>8</b>
Figura 3: Árbol filogenético de la familia de las $\beta$ LGs	<b>10</b>
Figura 4: Estructura del gen, ARNm y proteína de la $\beta$ LG	<b>15</b>
Figura 5: Mecanismos que regulan la expresión de los genes de las proteínas lácteas	<b>16</b>
Figura 6: Construcciones para la $\beta$ LG-caprina	<b>38</b>
Figura 7: Ratones de la línea transgénica 56	<b>40</b>
Tabla 1: Composición de la leche de diferentes especies	<b>4</b>
Tabla 2: Variantes de la $\beta$ LG en bovino	<b>19</b>
Tabla 3: Variantes de la $\beta$ LG en ovino	<b>19</b>
Tabla 4: Ventajas e inconvenientes de la microinyección y la transferencia nuclear	<b>22</b>
Tabla 5: Animales transgénicos bajo estudio para mejorar la producción animal	<b>25</b>
Tabla 6: Proyectos comerciales para la producción de proteínas biomédicas en animales transgénicos	<b>29</b>
Tabla 7: Proteínas recombinantes obtenidas en la leche de distintas especies	<b>35</b>

## **DISCUSIÓN**

Figura 1: Señal hormonal a través del sistema <i>fosfatidil-inositol</i>	<b>120</b>
Figura 2: Procesamiento alternativo del gen PLC- $\beta$ 1	<b>124</b>



Figura 3: Alineamiento del exón 4 del gen glucagón de diferentes especies	<b>127</b>
Figura 4: Cabra Girgentana	<b>145</b>
Tabla 1: Características productivas de especies domésticas utilizadas como <i>bioreactores</i>	<b>131</b>
Tabla 2: Líneas transgénicas para las dos subunidades ( $\alpha$ y $\beta$ ) de la $\beta$ lg/FSH humana	<b>136</b>
Tabla 3: Niveles obtenidos en la leche de ratones transgénicos de distintas proteínas de interés farmacéutico	<b>141</b>
Tabla 4: Frecuencia de los haplotipos observados en las 11 razas de cabra analizadas	<b>146</b>
Tabla 5: Polimorfismos detectados en los 6 primeros exones del gen de la $\beta$ -lactoglobulina caprina	<b>146</b>

## **RESUMEN**

El objetivo final de nuestro trabajo es la obtención de proteínas recombinantes de interés farmacológico en la leche de animales transgénicos de producción. En nuestro grupo, previamente a este trabajo, se han llevado a cabo distintos proyectos con el fin de estudiar las regiones reguladoras del gen de la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ LG) caprina y obtener así un *cassette* de expresión que pueda dirigir la expresión del transgén de forma específica y eficaz a la glándula mamaria de los animales transgénicos. Todas las construcciones han sido testadas previamente en el ratón al ser un modelo animal más barato ya que presenta un menor coste de mantenimiento y su ciclo reproductivo e intervalo generacional es más corto con respecto a los animales de producción.

En el presente trabajo se ha utilizado un *cassette* de expresión que contiene 410 pb de región promotora proximal y 2,5 kb de región 3' flanqueante del gen de la  $\beta$ LG caprina para dirigir la expresión de las dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de la Hormona Estimulante del Folículo (FSH) humana a la glándula mamaria de ratones transgénicos. Se han obtenido 4 líneas transgénicas que son capaces de expresar los dos transgenes en su glándula mamaria.

Por otra parte, en la obtención de ratones transgénicos para el transgén de la  $\beta$ LG caprina, con el fin de testar las regiones reguladoras del gen, se observó un fenotipo conspicuo en los ratones homocigotos de la línea tg56; en el presente trabajo se ha caracterizado el lugar de integración de este transgén, el cual provocó una mutación por inserción en el gen de la Fosfolipasa C- $\beta$ 1 (PLC- $\beta$ 1) del ratón.

Asimismo, se ha desarrollado un nuevo protocolo basado en la PCR cuantitativa a tiempo real para determinar el número de copias integradas del transgén en las distintas líneas transgénicas. Este método puede ser utilizado en todas aquellas líneas transgénicas que contengan *cassettes* de expresión pertenecientes a genes de especies rumiantes.

Por último se han identificado y caracterizado un total de 15 polimorfismos en el gen de la  $\beta$ LG caprina, 9 de los cuales se encuentran localizados en la región promotora proximal, con el fin de encontrar mutaciones en las regiones reguladoras que puedan ser importantes en la expresión del gen.

**SUMMARY**

The final aim of this project is to produce pharmaceutical recombinant proteins in milk of farm animals. Previous works of our group have been performed to study the caprine  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ LG) regulatory sequences resulting in a expression cassette that is able to target the expression of the transgene to the mammary gland of transgenic mice in an integration-site dependent manner, independently of the number of copies in the array. All the constructions have been previously tested in a mouse model due to their short generation intervals and ease of genetic manipulation being cheaper than farm animals.

In the present work, a goat  $\beta$ LG expression cassette which contained 410 bp of proximal promoter region and 2.5 kb of 3' flanking region has been used to target the expression of the two subunits ( $\alpha$  and  $\beta$ ) of human Follicle Stimulating Hormone (hFSH) to the mammary gland of transgenic mice. Four established transgenic lines that express both hFSH transgenes ( $\alpha$  and  $\beta$ ) to their mammary gland have been obtained.

On the other hand, homozygous mice from one (tg56) of the different transgenic lines, that have been previously obtained for the goat  $\beta$ LG gene to study the regulatory sequences, displayed a distinct phenotype. Here, we present the identification and characterization of the transgene-induced insertional mutation at the *PLC- $\beta$ 1* locus (*PLC- $\beta$ 1 $_{\beta$ LG*) in line tg56 of  $\beta$ LG transgenic mice.

Furthermore, a rapid and accurate real-time quantitative PCR-based system to determine transgene copy number in transgenic animals has been developed. This method can be used directly for the analysis of transgenic mice for transgenes with different ruminant sequences without the requirement of control sample previously quantified by blotting techniques.

Finally, fifteen polymorphisms, nine in the promoter region, of the caprine  $\beta$ LG gene have been identified and characterized. The main aim of this study has been identified mutations in the proximal promoter region that could be important in the expression of the gene.

# **INTRODUCCIÓN**

## **I PARTE: LA $\beta$ -LACTOGLOBULINA**

La leche es un fluido biológico que se forma en la glándula mamaria de las hembras de los mamíferos constituyendo la única fuente de nutrición de los recién nacidos. Contiene casi todos los principios inmediatos necesarios en la dieta normal de un ser vivo, siendo uno de los alimentos más importantes para el hombre.

Está constituida principalmente por: agua, grasa, proteínas, lactosa, y sales minerales. También contiene trazas de otras sustancias como pigmentos, enzimas, vitaminas, fosfolípidos y gases. Los componentes de la leche varían según las especies y las necesidades calóricas del animal, así por ejemplo, la proporción de grasas en los animales que viven en los mares polares es muy superior a la de glúcidos y prótidos.

Debido a su gran importancia, los diferentes componentes de la leche han sido objeto de numerosos estudios durante décadas. Actualmente son muchos los genes caracterizados que codifican para las proteínas lácteas mayoritarias de numerosas especies. Con el desarrollo de la biología molecular y la demostración que una construcción génica puede transferirse y ser expresada en los mamíferos, algunas de las secuencias reguladoras de estos genes han sido utilizadas para modificar, cualitativamente y cuantitativamente, la composición de la leche en animales de producción. También se ha estudiado la función de los promotores y se han identificado las regiones del ADN necesarias para la expresión de estos genes, utilizándolas para dirigir la síntesis de proteínas heterólogas de interés farmacológico en la glándula mamaria.

### **1. Las Proteínas Lácteas**

Aunque la composición de la leche varía cuantitativamente y cualitativamente entre las diferentes especies, las proteínas de la leche de los mamíferos pueden dividirse en dos grandes grupos: las caseínas y las proteínas del suero (tabla 1).

El 95% del contenido proteico de la leche de rumiantes se debe a 6 proteínas principales (4 caseínas y 2 proteínas séricas) codificadas por 6 genes estructurales bien caracterizados (Groenen y van der Poel, 1994).

Estos dos grandes grupos de proteínas son fácilmente separables mediante métodos clásicos como la precipitación isoelectrica. A pH 4.6 y 20°C las caseínas precipitan mientras que las proteínas séricas permanecen en disolución.

**Tabla 1.** Composición (%) de la leche de diferentes especies. La leche es un fluido biológico muy variable dependiendo de la especie, también puede variar dependiendo de la raza, salud, estado nutricional etc. del animal.

<i>Especies</i>	<i>Sólidos totales</i>	<i>Grasa</i>	<i>Proteína</i>	<i>Lactosa</i>	<i>Cenizas</i>
Vaca	12,7	3,7	3,2	4,8	0,7
Oveja	19,3	7,4	4,6	4,8	1,0
Cabra	12,6	4,5	3,2	4,1	0,8
Humana	12,2	3,8	1,1	7,0	0,2
Búfalo	16,8	7,4	3,8	4,8	0,8
Cerdo	18,8	6,8	4,8	5,5	
Caballo	11,2	1,9	2,5	6,2	0,5
Burro	11,7	1,4	2,0	7,4	0,5
Reno	33,1	16,9	11,5	2,8	
Conejo	32,8	18,3	11,9	2,1	1,8
Elefante Indio	31,9	11,6	4,9	4,7	0,7
Oso Polar	47,6	33,1	10,9	0,3	1,4
Foca Gris	67,7	53,1	11,2	0,7	

<i>Composición Láctea (g/L)</i>	<i>Vaca</i>	<i>Oveja</i>	<i>Cabra</i>	<i>Humana</i>
Proteína	32	46	32	11
Prot. Caseínicas	26	39	26	5
Prot. Séricas	6	7	6	6
αS <sub>1</sub> -Caseína	10	7	0-7	TRAZAS
αS <sub>2</sub> -Caseína	3,7	7	4	?
β-Caseína	10	28	10	3
κ-Caseína	3,5	3,5	6	1
α-Lactoalbúmina	1,2	0,8-2,4	1,2	1,6
β-Lactoglobulina	3,3	2,8-5	2,3	-

(Modificado de Fox y McSweeney, 1998; Martin y Glosclaude, 1993)

Las caseínas, las cuales representan el 80% del contenido proteico total de la leche, se pueden dividir en:  $\alpha$ s<sub>1</sub>-caseína,  $\alpha$ s<sub>2</sub>-caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína.

Las proteínas séricas mayoritarias en rumiantes se dividen en  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina. En menor cantidad se pueden encontrar otras proteínas como la seroalbúmina, la proteasa peptona, la lisozima y las inmunoglobulinas.

### **1.1. Las Caseínas**

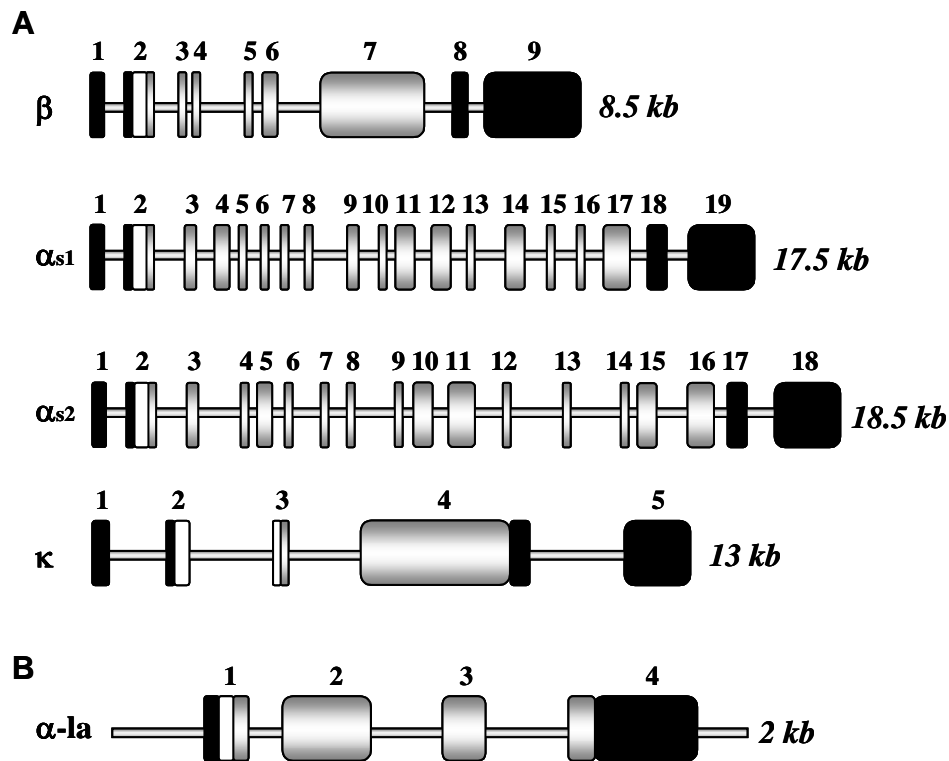
En la leche, las caseínas forman agregados coloidales llamadas micelas. Un 93% de la micela es proteína mientras que el 7% restante son minerales (mayoritariamente fósforo, calcio, magnesio y citrato) (Mercier *et al.*, 1985). La  $\kappa$ -caseína (única caseína no sensible al calcio) se encarga de estabilizar el complejo caseínico impidiendo su precipitación. Gracias a esto, el calcio y el fosfato pueden ser secretados por la glándula mamaria y pasar al recién nacido. En el estómago del recién nacido, la enzima quimosina desestabiliza las micelas al hidrolizar la  $\kappa$ -caseína facilitando su digestión.

La principal función de las caseínas es la de nutrir al recién nacido, constituyendo una fuente importante de aminoácidos (contiene aminoácidos esenciales), calcio y fosfato inorgánico. Asimismo constituyen la materia prima para la industria quesera.

Respecto al origen de las caseínas, parece ser que el proceso de duplicación génica ha jugado un papel importante en la evolución de estos genes (Mercier y Vilotte, 1993). Los tres genes que codifican las caseínas sensibles al calcio ( $\alpha$ s<sub>1</sub>,  $\alpha$ s<sub>2</sub> y  $\beta$ ) constituyen una familia de genes relacionados, originados a partir de un gen ancestral común mediante el proceso de duplicación intragénica e intergénica (Rosen, 1986). Por otra parte, la  $\kappa$ -caseína no muestra similitud con el resto de caseínas y parece estar evolutivamente relacionada con la familia génica del fibrinógeno (Jollès *et al.*, 1978).

La estructura (figura 1.A) y organización de los genes que codifican para las caseínas ha sido descrita en rumiantes, el ratón y el hombre (Threadgill y Womack, 1990; Rijnkels *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 1997, respectivamente). Estos cuatro genes se encuentran localizados en una misma región cromosómica que se

extiende aproximadamente 250 kb y en las especies bovina y caprina han sido localizados en el cromosoma 6 (Threadgill y Womack, 1990; Hayes *et al.*, 1993). La conservación de este *cluster* de caseínas en las distintas especies de mamíferos hace pensar en una posible regulación coordinada de la expresión de estos 4 genes (revisado en Martin *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Organización estructural de las unidades de transcripción de las cuatro caseínas (A) y la  $\alpha$ -lactoalbúmina (B) bovinas. Las barras horizontales representan los intrones, las barras verticales representan los exones: en negro (las regiones 5' y 3' no codificantes), en blanco (parte del exón que codifica para el péptido señal) y en gris (los exones o parte de ellos que codifican para la proteína madura) (modificado de Martin *et al.*, 2002)



### **1.2. La $\alpha$ -Lactoalbúmina**

La  $\alpha$ -lactoalbúmina es una proteína sérica globular de bajo peso molecular (14,2 KDa) que pertenece a la familia de las metaloproteínas (Hiroaka *et al.*, 1980).

Su principal función es la de intervenir en la biosíntesis de la lactosa al formar parte junto con el enzima *galactosyltransferasa* del enzima *lactosa sintetasa* (Brew y Grobler, 1992). La lactosa es un componente importante de la leche de numerosas especies al mantener su equilibrio osmótico, generando una parte importante de su fase acuosa. Debido a esto, la síntesis de la  $\alpha$ -lactoalbúmina es necesaria para una correcta secreción láctea (Stacey *et al.*, 1995).

El origen de la  $\alpha$ -lactoalbúmina parece estar relacionado con la duplicación génica del gen ancestral de la lisozima al ser estos dos genes muy similares en su secuencia aminoacídica y conformación proteica (Brew *et al.*, 1967).

La figura 1.B muestra la estructura génica de la  $\alpha$ -lactoalbúmina.

### **1.3 La $\beta$ -Lactoglobulina**

La  $\beta$ -Lactoglobulina es una pequeña proteína globular con un peso molecular de aproximadamente 18,4 KDa. En la leche de los rumiantes la proteína nativa se encuentra formando dímeros lo que le confiere propiedades de unión a diferentes moléculas hidrofóbicas. En el resto de especies la  $\beta$ LG se encuentra en forma de monómeros (Hambling *et al.*, 1992).

La  $\beta$ LG es la proteína sérica más abundante en la leche de los rumiantes y está presente en la leche de diversas especies monogástricas como el perro (Pervaiz y Brew, 1986; Halliday *et al.*, 1993), el gato (Halliday *et al.*, 1991; Halliday *et al.*, 1993), el cerdo (Alexander y Beattie, 1992), el caballo (Godovac-Zimmermann *et al.*, 1985), el burro (Godovac-Zimmermann *et al.*, 1990a) y el delfín (Pervaiz y Brew, 1986).

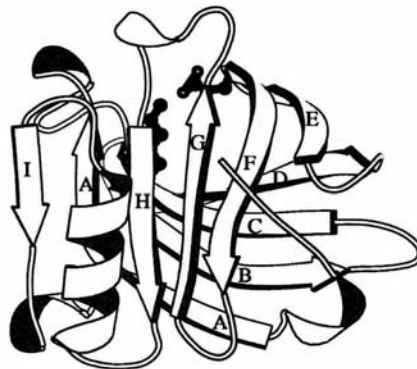
No se ha detectado  $\beta$ LG en la leche de los roedores (rata, ratón y cobaya), lagomorfos (conejo) y camellos, encontrándose otra proteína sérica conocida con el nombre de WAP (*Whey Acidic Protein*) (Thépot y Houdebine, 1999). Esta proteína también está presente en la leche del cerdo (Simpson *et al.*, 1998) existiendo la posibilidad de que tanto en los mamíferos donde sólo hay WAP como

en los que sólo hay  $\beta$ LG pueda existir una copia inactiva de estos genes. Recientemente, se ha publicado la secuencia nucleotídica del gen WAP de rumiantes en la base de datos del GenBank (*Bos taurus*, AY267466; *Ovis aries*, AY267465; *Capra hircus*, AY267464). Este gen que no se expresa en la glándula mamaria de estas especies, está por tanto inactivo, verificando en parte la hipótesis anterior.

La leche humana tampoco presenta  $\beta$ LG aunque si que se ha detectado en la leche de algunos primates como el *Macaca fascicularis*, *Macaca mulata* y el *Papio hamadryas* (Azuma y Yamauchi, 1991; Kunz y Lönnerdal, 1994; Hall *et al.*, 2001).

## 2. Estructura y origen de la $\beta$ -Lactoglobulina

En 1986 Papiz *et al.* determinaron mediante técnicas cristalográficas la estructura terciaria de la  $\beta$ LG bovina (figura 2), la cual mostraba una gran similitud con otra proteína conocida como RBP (proteína transportadora de retinol en sangre). Ambas proteínas pertenecen a la familia de las **lipocalinas**.



**Figura 2.** Estructura terciaria de la  $\beta$ LG (Kraulis, 1991)

Las lipocalinas junto a las avidinas y las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABPs) pertenecen a una superfamilia de proteínas conocida como las calicinas. Estas proteínas se caracterizan por poseer una estructura tridimensional

conservada que les confiere propiedades de unión a moléculas hidrofóbicas (Flower, 1996). Actualmente, existen otras proteínas que forman parte de esta superfamilia como la triabina o el grupo de inhibidores de las metaloproteinasas (MPIs) y que difieren en su función al no transportar moléculas de carácter hidrofóbico (Flower *et al.*, 2000).

La familia de las lipocalinas comprende un gran grupo de pequeñas proteínas extracelulares, con estructuras y funciones diferentes, originadas a partir de una proteína ancestral común que se ha diversificado durante la radiación de los vertebrados (Gutiérrez *et al.*, 2000). Entre los miembros de esta familia podemos encontrar: la RBP (*Retinol Binding Protein*), MUP (*Major Urinary Protein*), OBP (*Odorant-Binding Protein*), OP (*Olfactory-specific Protein*) y la PP14 (*Human Placental Protein*).

Muchas de las lipocalinas actuales muestran una gran divergencia en su secuencia aminoacídica y presentan un elevado nivel de duplicación génica (Gutiérrez *et al.*, 2000). A pesar de la baja similitud aminoacídica, la familia de las lipocalinas se caracteriza por poseer pequeños motivos bien conservados en su secuencia. La familia de las  $\beta$ LGs se agrupa dentro de las 'Kernel' lipocalinas, las cuales se caracterizan por poseer tres motivos en su secuencia correspondientes a las tres principales regiones de estructura conservada de estas proteínas (Flower, 1996).

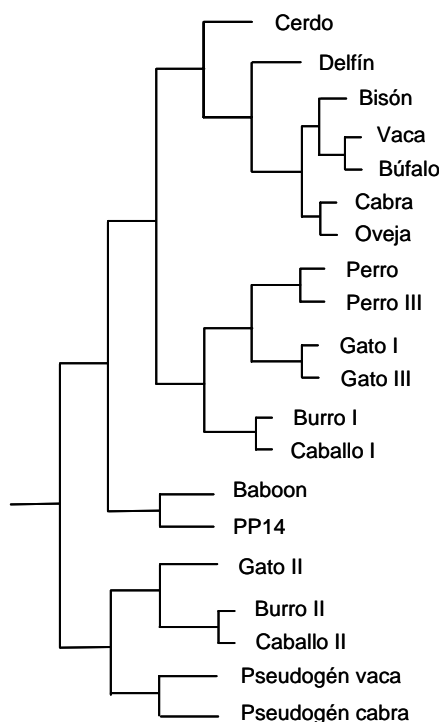
La estructura común de las lipocalinas consiste en un barril aplanado formado por ocho cadenas  $\beta$  antiparalelas (A-H), seguidas por una hélice  $\alpha$  de tres vueltas y por otra cadena  $\beta$  (I) próxima al extremo C terminal (figura 2).

Gracias a esta estructura pueden unir pequeñas moléculas hidrofóbicas participando en numerosas funciones fisiológicas como el transporte de retinol y feromonas, los sentidos olfativo y gustativo, la coloración, y la síntesis de prostaglandina D. También intervienen en la regulación del crecimiento celular, el metabolismo, la respuesta inmune y el desarrollo tisular (Flower, 1996; Akerstrom *et al.*, 2000). Otras propiedades de las lipocalinas son la unión a receptores celulares de membrana y la formación de complejos macromoleculares.

**2.1 La familia de las  $\beta$ -Lactoglobulinas**

Mientras que en la leche del cerdo, los rumiantes y algunos marsupiales se ha identificado un tipo de  $\beta$ LG (tipo I), la leche de animales monogástricos como el perro, delfín, caballo y burro presenta dos tipos diferentes de  $\beta$ LGs. Halliday et al. (1990) llegaron a identificar hasta tres  $\beta$ LGs diferentes en la leche del gato.

Las  $\beta$ LGs de los rumiantes muestran una identidad en su secuencia aminoacídica de más del 95%, disminuyendo este porcentaje cuando se comparan con  $\beta$ LGs monoméricas de otras especies (Godovac-Zimmermann *et al.*, 1990a). No obstante, la comparación de las secuencias aminoacídicas de las  $\beta$ LGs tipo I entre diferentes especies muestra un mayor grado de similitud que el obtenido al comparar las  $\beta$ LGs tipo I y las  $\beta$ LGs tipo II entre sí (figura 3).



**Figura 3.** Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias aminoacídicas (base de datos SwissProt) de las  $\beta$ LGs de diferentes especies y la *glycodelin* o PP14 humana. El árbol muestra la agrupación de los diferentes tipos de  $\beta$ LGs y la PP14 (modificado de Kontopidis *et al.*, 2002).

La comparación de los dos tipos de  $\beta$ LGs (tipo I y II) resulta en una menor similitud aminoacídica de las regiones codificantes correspondientes a los exones III y IV, lo que podría dar lugar a una función diferente de estas dos proteínas (Halliday *et al.*, 1993). Debido a las diferencias existentes en la secuencia

aminoacídica entre los distintos tipos de  $\beta$ LGs, se ha sugerido que estas son el producto de diferentes genes (Pervaiz y Brew, 1986; Halliday *et al.*, 1993).

La existencia de un gen diferente que codifique para las diferentes  $\beta$ LGs podría ser explicado por una duplicación génica. La duplicación de segmentos del ADN es esencial para el desarrollo de genomas complejos y explicaría la generación de familias génicas a partir de un único gen ancestral (Mighell *et al.*, 2000). La caracterización genómica del pseudogén de la  $\beta$ LG bovina (Passey y MacKinlay, 1995) y el de cabra (Folch *et al.*, 1996), los cuales son similares a la  $\beta$ LG tipo II, refuerza la hipótesis de un origen común para este tipo de  $\beta$ LGs.

Mientras que en especies como el gato se han debido producir al menos dos duplicaciones que explicarían la existencia de las tres  $\beta$ LGs presentes en la leche, en especies como los rumiantes, el proceso de duplicación a dado lugar a la inactivación de una de las copias. Por el contrario, la duplicación en especies como el perro o el caballo, que poseen dos copias activas de la  $\beta$ LG, podría haber dado lugar a la aparición de una nueva función.

Por otra parte, aunque la leche humana carece de  $\beta$ LG, existe una lipocalina con una estructura génica y secuencia nucleotídica muy similar a la  $\beta$ LG: la PP14 (Vaisse *et al.*, 1990). La PP14 es una glicoproteína que se expresa mayoritariamente en las células endometriales durante el primer trimestre de la gestación. También se ha descrito su expresión en células hematopoyéticas y en la vesícula seminal (Morrow *et al.*, 1994; revisado en Halttunen *et al.*, 2000). Aunque su función no está muy clara, parece estar relacionada con la inmunosupresión y/o la diferenciación celular.

Debido a que la secuencia aminoacídica de la PP14 es muy similar a la  $\beta$ LG del baboon (*Papio hamadryas*) (tipo I), se ha sugerido que la PP14 fue una  $\beta$ LG que, tras la división de la familia Hominidae de los primates, cambió su función y su lugar de expresión, desempeñando funciones reproductivas (Gutiérrez *et al.*, 2000). Sin embargo, tanto la  $\beta$ LG como la PP14 han sido descritas en ovino (Spencer *et al.*, 1999) y en una especie de primates (*Papio anubis*: Hausermann *et al.*, 1998;), no pudiéndose descartar que se trate de dos genes evolutivamente relacionados.

La búsqueda de la  $\beta$ LG en el genoma humano o en el de otros miembros de la familia Hominidae y la detección de proteínas similares a la PP14 en el endometrio de otras especies no primates, nos ayudaría a discernir la relación entre el gen de la PP14 humana y el gen de las  $\beta$ LGs de otras especies.

### **3. La función de la $\beta$ -Lactoglobulina**

Aunque no se le ha atribuido ninguna función biológica definitiva, la composición aminoacídica y la cantidad de  $\beta$ LG presente en la leche de los rumiantes respaldan un posible papel nutricional de esta proteína. Sin embargo, su similitud en secuencia y estructura terciaria con otros miembros de las lipocalinas, sugiere una función de esta proteína en el transporte de moléculas hidrofóbicas.

En 1986, Papiz et al. propusieron que la función de la  $\beta$ LG era el transporte de vitamina A (retinol) desde la glándula mamaria materna hasta el intestino del lactante. Esta hipótesis se veía reforzada por la gran similitud de la  $\beta$ LG con la RBP, la existencia de receptores específicos para el complejo  $\beta$ LG-retinol en el intestino de terneros recién nacidos y la elevada estabilidad de la  $\beta$ LG en medio ácido resistiendo a la proteólisis gástrica. No obstante, estudios realizados *in vitro* muestran una asociación del retinol con otras proteínas lácteas como la seroalbúmina o la  $\alpha$ -lactoalbúmina (Puyol *et al.*, 1991), indicando una posible interacción inespecífica de esta molécula. El retinol está asociado a los glóbulos grasos de la leche, siendo muy probable la transferencia madre-cría a través de esta ruta.

Por otra parte, la  $\beta$ LG ha sido aislada de la leche de los rumiantes unida a diferentes ácidos grasos y triglicéridos, pudiendo tener un papel importante en el transporte de los lípidos de la leche. La composición de ácidos grasos que une la  $\beta$ LG es muy similar a la que se encuentra en la fracción sérica de la leche, indicando que no hay una selección de determinados ácidos grasos en la unión con la  $\beta$ LG (Pérez *et al.*, 1989). Estudios *in vitro* muestran como el ácido palmítico se une en la cavidad central de la  $\beta$ LG, de una forma similar a la unión del retinol con la RBP (Wu *et al.*, 1999).

Gracias a esta capacidad de unión a ácidos grasos, se ha descrito un posible papel modulador de la  $\beta$ LG al facilitar la actividad de la lipasa pregástrica en terneros recién nacidos (Pérez *et al.*, 1992). El papel de la  $\beta$ LG sería secuestrar los ácidos grasos libres que inhiben la actividad de las lipasas, permitiendo así la digestión de los lípidos de la leche en el estómago. Esta lipasa es muy estable a pH bajo y a la degradación de la pepsina y es muy importante en los animales recién nacidos al tener bajas concentraciones de sales biliares y de lipasa pancreática.

Un estudio reciente (Kushibiki *et al.*, 2001) realizado con terneros prerumiantes determina la participación de la  $\beta$ LG en el metabolismo lipídico, incrementando la actividad de la lipasa pregástrica y la absorción intestinal de ácidos grasos de cadena larga y triglicéridos. Asimismo sugiere la participación de la  $\beta$ LG en el transporte de retinol incrementando su absorción intestinal. Este trabajo reforzaría los estudios realizados anteriormente *in vitro* por otros autores. A pesar de esto, las  $\beta$ LGs de las especies monogástricas carecen de las propiedades de unión a los ácidos grasos sugiriendo que, en estas especies, la  $\beta$ LG desempeña una función diferente (Pérez *et al.*, 1993). Esta hipótesis se vería reforzada por la falta de esta proteína en la leche de algunos mamíferos y la existencia de distintos tipos activos de  $\beta$ LG en una misma especie.

#### **4. Estructura y expresión del ARNm y del gen de la $\beta$ -Lactoglobulina**

El ADNc de la  $\beta$ LG ha sido secuenciado en diversas especies de mamíferos incluyendo la vaca (Alexander *et al.*, 1989), la oveja (Gaye *et al.*, 1986), la cabra (Folch *et al.*, 1993), el cerdo (Alexander y Beattie, 1992), el gato (Pena *et al.*, 1999), el caballo (GenBank: U60356, U60978; Masel *et al.*, no publicado), el búfalo (Das *et al.*, 1999) y primates como el mandril amarillo (*Papio hamadryas cynocephalus*; Hall *et al.*, 2001).

El ADNc de la  $\beta$ LG también se conoce en los marsupiales como el tammar (*Macropus eugenii*; Collet y Joseph, 1995) o la zarigüeya australiana de cola de cepillo (*Trichosurus vulpecula*; Piotte *et al.*, 1998).

La estructura del ARNm está muy conservada entre las diferentes especies encontrándose las diferencias más significativas en la región 3' no codificante.

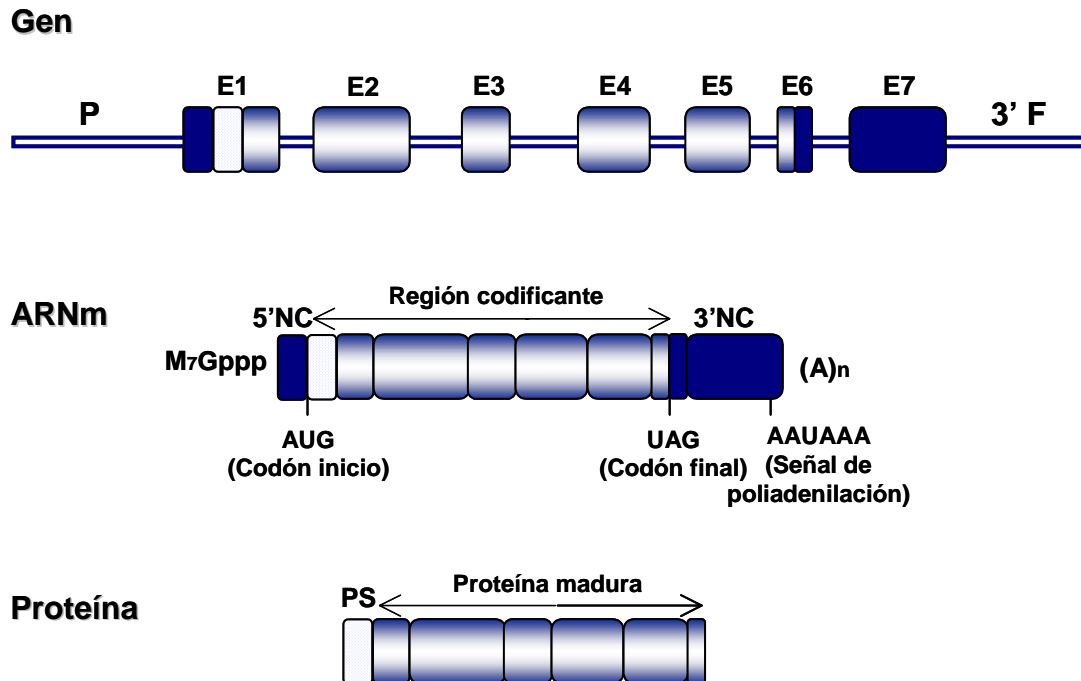
La estructura general de los ARNm que codifican para la  $\beta$ LG se caracteriza por:

- Una región 5' no codificante que parece tener un papel importante en la protección contra la degradación del mensajero, en el extremo 5' contiene una capucha de 7-metil-guanosina esencial para que los ribosomas reconozcan el ARNm e inicien la síntesis proteica.
- Una región 3' no codificante que contiene la señal de poliadenilación a 12-20 pb del lugar de adición de la cola de poli A. Esta región junto a la región 5' determinan la estabilidad del mensajero en el citoplasma.
- Una región codificante delimitada por codones de iniciación y terminación que codifica para la proteína madura (162 aminoácidos en los rumiantes) y para un péptido señal (18 aminoácidos en los pequeños rumiantes y 16 en la vaca), que permite la entrada de la pre-proteína al retículo endoplasmático donde sufrirá una serie de modificaciones covalentes: eliminación del péptido señal y formación de enlaces disulfuro intracatenarios. Posteriormente, tras ser empaquetada en vesículas en el Aparato de Golgi, alcanzará la membrana apical de la célula donde será expulsada al lumen de la glándula mamaria.

El gen que codifica para la  $\beta$ LG es de copia única. Su secuencia completa sólo se ha descrito en vaca (Alexander *et al.*, 1993), oveja (Ali y Clark, 1988; Harris *et al.*, 1988), cabra (Folch *et al.*, 1994). La estructura del gen está muy conservada en las tres especies, está formada por 7 exones de pequeño tamaño (42-183 pb) separados por 6 intrones de tamaño variable (213-1117 pb). La unidad de transcripción se extiende unas 4,7 kb (4724 pb en bovino, 4662 pb en ovino y 4698 pb en caprino). El exón 1 incluye la región 5' no-codificante del ADNc, la secuencia que codifica para el péptido señal y el inicio de la proteína madura; la región codificante de la proteína se extiende hasta el exon 6, donde se encuentra el codón de terminación de la traducción y una parte de la región 3' no-codificante. Por



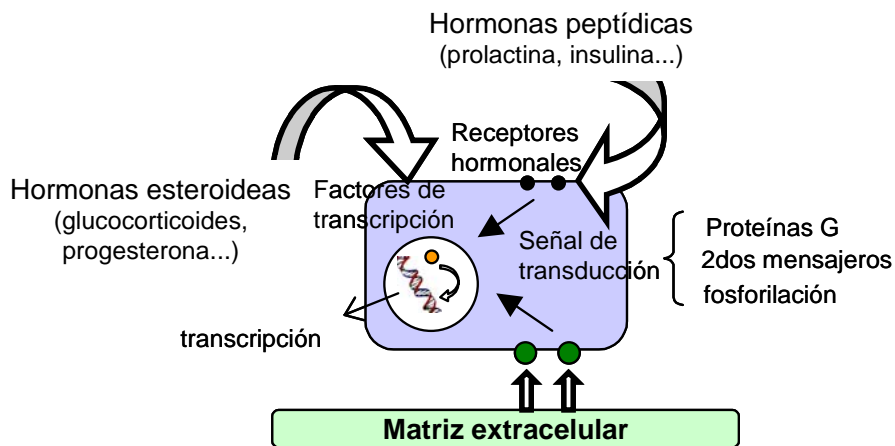
último, el exón 7 contiene el resto de esta región 3' no-codificante y la señal de poliadenilación (figura 4).



**Figura 4.** Estructura del Gen, ARNm y proteína de la β-lactoglobulina. P: región promotora, E: exones, F: región flanqueante, NC: región no-codificante, PS: péptido señal.

Niveles significativos del ARNm de la βLG ovina están presentes en las células epiteliales mamarias durante la mitad de la gestación, incrementando uniformemente durante el final del embarazo y alcanzando su pico máximo a mitad de la lactación (Gaye *et al.*, 1986). Para asegurar una expresión específica y temporal de los genes de las proteínas lácteas en las células epiteliales mamarias, estos genes requieren además de una región conocida como “TATA box”, que señala el inicio de transcripción a la ARN polimerasa II, diferentes motivos de reconocimiento de factores de transcripción relacionados con la especificidad tisular-temporal, inducción y modulación de la expresión.

Por otra parte, la regulación de los genes que codifican para las proteínas lácteas está controlada por una serie de mecanismos (figura 5). Las hormonas lactogénicas (prolactina, glucocorticoides, IGF1 o insulina) inducen la expresión de estos genes mientras que la progesterona ejerce un efecto inhibitorio; asimismo, la interacción de las células epiteliales mamarias entre si y con la matriz extracelular es esencial para la expresión de estos genes (para una mayor revisión: Groenen y van der Poel, 1994; Thépot y Houdebine, 1999; Rosen *et al.*, 1999).



**Figura 5.** La matriz extracelular y las hormonas lactogénicas juegan un papel importante en la regulación de la expresión de los genes de las proteínas lácteas en las células epiteliales mamarias.

## 5. Polimorfismo genético de la $\beta$ -Lactoglobulina

Desde el descubrimiento en los años 50 de las dos variantes A y B de la  $\beta$ -lactoglobulina en la leche de vaca (Aschaffenburg y Drewry, 1955), se ha producido un incremento notable en la búsqueda de polimorfismos en las proteínas lácteas. En la especie bovina se han caracterizado un total de 11 variantes genéticas (tabla 2), encontrándose en la raza "Australian Droughtmaster" la única variante glicosilada (Dr) (Bell *et al.*, 1970).

Las variantes genéticas más comunes son la A y la B estando probablemente distribuidas por todas las poblaciones bovinas y cebúes; la variante

B es la más ancestral debido a su elevada frecuencia (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992). Estas dos variantes se diferencian por la sustitución de dos aminoácidos en las posiciones 64 y 118 (tabla 2) (Eigel *et al.*, 1984). Gracias al progreso en las técnicas de biología molecular se ha podido determinar el genotipo de los animales a partir del ADN. Esto ha permitido desarrollar metodologías para genotipar las variantes A y B, tanto en las terneras como en los toros, por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Lien *et al.*, 1990; Medrano y Aguilar-Cordova, 1990; Wilkins y Kuys, 1992), o por PCR alelo-específica (Lindersson *et al.*, 1995).

El desarrollo de las técnicas de genotipado ha sido importante para conocer la frecuencia de distribución de las variantes genéticas en las distintas razas y poder realizar estudios que determinen como afectan los polimorfismos de las proteínas lácteas a determinados caracteres productivos (revisado en Ng-Kwai-Hang, 1998).

Los polimorfismos de la  $\beta$ LG bovina han sido asociados con un efecto importante en la composición de la leche y en el rendimiento quesero (Schaar *et al.*, 1985; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Aleandri *et al.*, 1990; Hill, 1993; Lundén *et al.*, 1997). La leche de animales con genotipo AA se relaciona con una mayor concentración de proteínas séricas que resulta del incremento en la concentración de  $\beta$ LG (28%) con respecto a los animales de genotipo BB (Hill, 1993). La cuantificación de las proteínas séricas de la leche en los animales heterocigotos AB para la  $\beta$ LG muestra como existe una mayor proporción del alelo A (60%) con respecto al B (40%) (Lum *et al.*, 1997). Este incremento está correlacionado con un incremento en los niveles de ARNm de la variante A con respecto a la variante B (Ford *et al.*, 1993), sugiriendo una expresión diferencial de estos dos alelos. Varios estudios han sido realizados sobre las regiones promotoras de estas dos variantes con el fin de encontrar diferencias que puedan dar lugar a esta expresión diferencial (Wagner *et al.*, 1994; Lum *et al.*, 1997; Folch *et al.*, 1999). Lum *et al.* (1997) describieron nueve polimorfismos alelo específicos dentro de los primeros 733 pb del promotor de la  $\beta$ LG bovina responsables de una transcripción diferencial entre los promotores de la  $\beta$ LG A y B (Folch *et al.*, 1999).

Por otra parte, la variante B ha sido relacionada con un contenido mayor en caseínas y por lo tanto con un mayor rendimiento quesero (Lundén *et al.*, 1997).

Este incremento está asociado con un menor contenido en  $\beta$ LG. Sin embargo, el contenido total de proteínas entre los genotipos AA y BB no difiere, lo que sugiere un mecanismo de compensación en la síntesis de estas proteínas (Hill, 1993; Prosser *et al.*, 2000).

En oveja, la  $\beta$ LG es polimórfica en varias razas analizadas (King, 1969) encontrándose dos variantes, A y B, siendo la variante A la más frecuente. Estas variantes genéticas difieren en la sustitución de un aminoácido en la posición 20, con la presencia de Tyr en la variante A y His en la variante B (Gaye *et al.*, 1986; Ali *et al.*, 1990) (tabla 3). Una tercera variante, llamada C, se ha detectado en las razas Merino alemana y española (Erhardt, 1989; Recio *et al.*, 1995). Esta variante es un subtipo de la variante A, con un único cambio aminoacídico (Arg en A por Gln en C) en la posición 148. La caracterización de las tres variantes en el ADN genómico (Schlee *et al.*, 1993; Prinzenberg y Erhardt, 1999) ha permitido el desarrollo de protocolos de genotipado mediante PCR-RFLP, utilizándose la endonucleasa *RsaI* para diferenciar las variante A y B (Schlee *et al.*, 1993; Feligini *et al.*, 1998), y las endonucleasas *AluI* o *Msp I* para determinar la presencia de la variante C (Prinzenberg y Erhardt, 1999; Anton *et al.*, 1999). Aunque se han realizado diferentes estudios sobre el efecto de estos polimorfismos en la composición y producción láctea (revisado en Moiola *et al.*, 1998), no se ha establecido ninguna asociación como en la especie bovina.

Por último, en la leche de algunas razas de cabra se han descrito varias variantes proteicas de la  $\beta$ LG de distinta movilidad (Machà, 1970; Boulanger, 1976). A nivel del ADN genómico, se han caracterizado varios polimorfismos en la región promotora proximal (Yahyaoui *et al.*, 2000) y en el exón 7 (región 3' no-codificante) (Pena *et al.*, 2000) del gen de la  $\beta$ LG de razas españolas y francesas. Asimismo, se han detectado diferencias en el contenido de  $\beta$ LG en la leche de animales de la raza italiana Girgentana (Chianese *et al.*, 2000), describiéndose un nuevo polimorfismo en la región promotora proximal de esta raza que parece no estar correlacionado con el fenotipo de estos animales (Graciano *et al.*, 2003).

Tabla 2. Variantes de la  $\beta$ LG en bovino

Variante	Posición y aminoácido en la proteína											Referencia	
	28	45	50	56	59	64	78	108	118	126	129/ 130		158
B	Asp	Glu	Pro	Ile	Gln	Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Asp	Glu	Ascheffenburg and Drewry (1955)
A						Asp			Val				Bell (1962)
C				His									Grosclaude et al. (1966)
D		Gln				Asp		Val					Bell et al. (1981)
Dr	Asn												Grosclaude et al. (1982)
E											Tyr		Bell et al. (1981)
F			Ser										Bell et al. (1981)
G							Met						Bell et al. (1981)
W				Leu									Godovac-Zimmermann et al. (1990b)
I								Gly					Godovac-Zimmermann et al. (1996)
J										Pro			Godovac-Zimmermann et al. (1996)

Tabla 3. Variantes de la  $\beta$ LG en ovino

Variante	Posición y aminoácido en la proteína		Referencia
	20	148	
A	Tyr	Arg	King (1969)
B	His		
C		Gln	Erhardt (1989)

## **II PARTE: LA APLICACIÓN EN TRANSGÉNESIS DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS**

En 1980 Gordon et al. describieron por primera vez la obtención de ratones transgénicos por microinyección de ADN exógeno en el pronúcleo de embriones preimplantacionales. Inmediatamente después, otros grupos lograron obtener ratones transgénicos que además de integrar el ADN exógeno en su genoma, eran capaces de expresarlo (Brinster *et al.*, 1981; Wagner EF *et al.*, 1981; Wagner TE *et al.*, 1981) y transmitirlo a su descendencia (Costantini y Lacy, 1981; Wagner TE *et al.*, 1981; Steward *et al.*, 1982). El lanzamiento definitivo de esta nueva tecnología se produjo en 1982 con la obtención de ratones transgénicos para la hormona de crecimiento de rata que mostraban un tamaño corporal de dos a cuatro veces mayor que el normal (Palmiter *et al.*, 1982). De este modo, esta técnica permitía manipular tanto el genotipo como el fenotipo de los animales, pudiéndose aplicar en animales de interés ganadero para mejorar los caracteres productivos.

Un animal transgénico es aquel que posee un fragmento de ADN exógeno integrado de forma estable en su genoma. Este ADN exógeno se conoce con el nombre de transgén y normalmente está formado por regiones promotoras específicas, el gen que codifica para la proteína de interés y elementos reguladores para proteger y incrementar la expresión del gen. Este transgén puede derivar de la misma especie o de especies distintas, conociéndose como proteína recombinante a la proteína codificada por el transgén (revisado en Keefer, 2004).

### **6. Técnicas de obtención de animales transgénicos**

Durante los últimos 20 años, la microinyección pronuclear ha sido la técnica más utilizada para la obtención de animales transgénicos en una gran variedad de especies (desde la murina hasta especies domésticas como la porcina o las rumiantes). Sin embargo, la baja eficiencia (1%) que presenta esta técnica en los animales domésticos unida a las largas gestaciones y elevados costes de mantenimiento, hace que la utilización de la microinyección en algunas de estas especies requiera mucho tiempo y dinero (Pinkert y Murray, 1999). Debido a esto y

a la dificultad de aplicar este método en especies como las avícolas, se han desarrollado otras técnicas como:

- la infección de oocitos o embriones con vectores retrovirales (van der Putten *et al.*, 1985; Haskell y Bowen, 1995). Recientemente se ha descrito la utilización de una clase de retrovirus conocida como lentivirus con una elevada eficiencia en la integración del ADN exógeno en embriones de ratón (Lois *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2002) y en especies domésticas como el cerdo (Hofmann *et al.*, 2003; Whitelaw *et al.*, 2004). Además de su aplicación en transgénesis, estos lentivectores pueden ser utilizados en terapia génica.
- la utilización de espermatozoides como vectores para introducir ADN exógeno en oocitos (Lavitrano *et al.*, 1989, 2003).
- la inyección en embriones en desarrollo de células embrionarias totipotentes (ES) o células germinales primordiales (PG) modificadas genéticamente (Evans y Kaufman, 1981; Galli-Taliadoros *et al.*, 1995)
- la transferencia nuclear (Cibelli *et al.*, 1998; Schnieke *et al.*, 1997; McCreath *et al.*, 2000).

Actualmente, gracias al desarrollo en los campos de la biología molecular y la reproducción, la transferencia nuclear se está convirtiendo en la técnica de elección para la producción de animales transgénicos en especies domésticas. No obstante, aunque esta técnica posee una serie de ventajas (tabla 4) con respecto al método tradicional de microinyección a pronúcleo, este último sigue siendo el método más eficaz y sencillo de obtención de animales transgénicos en especies prolíficas como el ratón, la rata, el conejo o el cerdo.

Habitualmente, los experimentos de microinyección pronuclear se ensayan primero en el ratón debido a las ventajas que presenta esta especie (bajo coste de mantenimiento, ciclo reproductivo e intervalo generacional corto) con respecto a las especies domésticas (Pinkert y Murray, 1999). Este método consiste en microinyectar varias copias del transgén en el pronúcleo masculino de embriones en estadio de una célula y posteriormente transferir estos embriones a hembras receptoras con el fin de completar su desarrollo embrionario (Gordon *et al.*, 1980).

Entre un 10-30% de los ratones nacidos a partir de embriones microinyectados llevan integrado el ADN exógeno de forma estable en su genoma (Hogan *et al.*, 1994). Este ADN exógeno se integra de manera aleatoria, normalmente en forma de múltiples copias en tándem en disposición cabeza-cola (Brinster *et al.*, 1981), pudiéndose encontrar más de un lugar de integración en el genoma de los animales (Lacy *et al.*, 1983).

**Tabla 4.** Ventajas e inconvenientes de las 2 metodologías de transferencia génica más utilizadas

	<i>Microinyección</i>	<i>Transferencia nuclear</i>
<b>Eficiencia de integración</b>	+	+++
<b>Lugar de integración</b>	Aleatorio	Aleatorio o dirigido
<b>Supresión génica</b>	-	+++
<b>Tamaño de la construcción</b>	>50 kb (cromosomas artificiales)	~30-50 kb
<b>Mosaicismo</b>	+++	-
<b>Screening <i>in vitro</i> de la expresión</b>	+	+++
<b>Patrón de expresión</b>	Variable	Controlada, uniforme
<b>Multi-transgénicos</b>	+	+++

Abreviaciones: -, no posible; +, poca ventaja; ++, ventaja moderada; +++, mucha ventaja  
(Modificada de Kues y Niemann, 2004)

La microinyección pronuclear puede generar embriones mosaico con respecto al transgén dependiendo del momento en el que el ADN microinyectado se integre en el genoma del animal (Wilkie *et al.*, 1986). Si se produce después de la primera división celular, el animal será mosaico y por tanto sólo una proporción de sus células será portadora del transgén. Un estudio realizado por Whitelaw *et al.* (1993) determinó como la mayoría de ratones transgénicos de primera generación derivaban de embriones mosaico. Ocasionalmente, algunos de estos ratones no tienen integrado el transgén en las células de la línea germinal, no transmitiéndolo, por tanto, a su descendencia.

Esta primera generación de ratones se conoce con el nombre de fundadores y pueden ser identificados por *Southern blot* o PCR análisis. La técnica de *Southern blot* sirve también para verificar la integridad del transgén y para



determinar el número de copias integradas del mismo. En este compendio de trabajos se presenta un nuevo método de determinación del número de copias en animales transgénicos basado en el método de PCR cuantitativa a tiempo real (véase resultados y discusión) .

Además del mosaicismo, los animales transgénicos obtenidos presentan otra serie de características (Folch, 1997):

- Expresión variable dentro de una línea: variegación (probablemente asociada a la integración del transgén cerca del centrómero; Dobie *et al.*, 1996).
- Expresión variable entre líneas: dependiente del lugar de integración.
- Expresión ectópica del transgén (en tejidos o en momentos del desarrollo no específicos).

Todas estas características vienen condicionadas por la inserción aleatoria del transgén en el genoma del animal transgénico y por la propia secuencia del transgén. Normalmente, la expresión del transgén está influenciada por las secuencias del genoma flanqueantes al lugar de integración del mismo. Su expresión puede verse reducida o eliminada por la acción de elementos reguladores silenciadores o por su inserción en una región del genoma transcripcionalmente inactiva. Asimismo, las secuencias flanqueantes al lugar de integración del transgén pueden contener elementos reguladores de genes próximos que pueden incrementar la transcripción del transgén dando lugar a la expresión ectópica del mismo (revisado en Auerbach, 2004). Por último, la inserción del transgén en secuencias del genoma transcripcionalmente activas puede interrumpir la expresión normal de algún gen endógeno (Friedman *et al.*, 2000; Bialek *et al.*, 2000), produciendo incluso la muerte del animal. Este fenómeno se conoce como mutación por inserción. Se estima que entre un 5-10% de los ratones fundadores creados por microinyección presentan mutaciones por inserción que derivan en fenotipos patológicos en los ratones homocigotos para el transgén (Palmiter y Brinster, 1986). El análisis y caracterización de estos animales es importante ya que permite la identificación de genes implicados en el

crecimiento y desarrollo normal de los ratones (Meisler, 1992).

## **7. Aplicaciones de los animales transgénicos**

El progreso en las técnicas de transgénesis ha permitido la obtención de animales domésticos transgénicos con aplicaciones muy importantes en la agricultura y biomedicina. A continuación se resumen las aportaciones más importantes de los animales transgénicos a la salud humana:

- **Modelo animal para enfermedades humanas.**

Esta aplicación se basa en la generación de modelos para enfermedades genéticas humanas en animales transgénicos. La mutagénesis por inserción causada por la integración aleatoria de un transgén mediante la microinyección a pronúcleo (Woychik y Alagramam, 1998) y la generación de ratones *knockout* gracias a la recombinación homóloga en ES (Capecchi, 1989) son dos herramientas muy útiles para la generación de estos modelos en ratones [*Mouse Knockout and Mutation Database* (MKMD); <http://research.bmn.com/mkmd>]. Por otra parte ya se han desarrollado modelos en animales domésticos como por ejemplo la Retinitis pigmentosa humana (PR) en el cerdo o ovejas con una disrupción del gen *PrP*, que determina la resistencia a las encefalopatías espongiformes (scrapie y BSE) (revisado en Clark y Whitelaw, 2003; Kues y Niemann, 2004).

Por último, también se están utilizando ratones y conejos transgénicos para evaluar los efectos de nuevos fármacos (Houdebine, 2002).

- **Mejora de caracteres productivos.**

En esta área han sido numerosas las aplicaciones propuestas (tabla 5):

**Tabla 5.** Animales transgénicos bajo estudio para mejorar la producción animal

<b>Genes</b>	<b>Animal</b>	<b>Tejido</b>	<b>Efectos Observados</b>
Lisostafina	Ratón Vaca	Glándula mamaria Glándula mamaria	Resistencia a la mastitis ?
Lactoferrina	Vaca	Glándula mamaria	?
Lisozima	Vaca	Glándula mamaria	?
PrP (Knockout)	Oveja	Todos los tejidos	Resistencia a encefalopatías espongiformes
Fitasa	Ratón Cerdo	Glándula salivar Glándula salivar	↓ Liberación de fosfato ↓ Liberación de fosfato
Enzima de digestión de carbohidratos	Conejo Peces	Intestino Intestino	Bajo estudio Bajo estudio
Acetato → glucosa	Oveja		Bajo estudio
Hormona de crecimiento	Cerdo Oveja Peces	Varios tejidos Varios tejidos Varios tejidos	Δ en el crecimiento Δ en el crecimiento Δ en el crecimiento
IGF <sub>1</sub>	Cerdo	Músculo	Crecimiento muscular
Miostatina dominante negativa	Ratón	Músculo	Hipertrofia muscular
Lactasa	Ratón	Glándula mamaria	Contenido bajo en lactosa
Anti α-lactoalbúmina antisentido	Ratón	Glándula mamaria	Sin lactosa/ ↓ producción de leche
α-lactoalbúmina humana sin fenilalanina	Vaca	Glándula mamaria	Proteína sin fenilalanina para pacientes con fenilcetonúria
α-lactoalbúmina	Cerdo	Glándula mamaria	Mejora la alimentación en los lechones
κ-caseína	Ratón	Glándula mamaria	Tamaño inferior de micela
κ-caseína y β-caseína	Vaca	Glándula mamaria	Δ valor nutricional y mejora propiedades funcionales leche
IgG	Ratón	Glándula mamaria	Acción antiviral
Serina → Cisteína	Ratón Oveja	Varios tejidos Varios tejidos	Δ del crecimiento del pelo Muerte de los embriones
Queratinas	Oveja	Piel	Modificación de la composición de la lana

(modificado de Houdebine, 2002)

1. Resistencia a enfermedades: mediante la transferencia de genes de resistencia natural o artificial para inhibir la expresión de genes

esenciales de patógenos. Como se puede ver en la tabla 5, se ha obtenido un ratón transgénico que expresa el gen bacteriano de la lisostafina evitando la infección de la glándula mamaria por *Staphylococcus aureus* (revisado en Houdebine, 2002). Otra aproximación para incrementar la resistencia a enfermedades es la producción de anticuerpos específicos de patógenos en la leche para aumentar la inmunidad pasiva de las crías (revisado en Kerr y Wellnitz, 2003).

Recientemente, se ha desarrollado una nueva metodología basada en el ARN de interferencia (ARNi) que permite suprimir la expresión de genes de virus ARN y por tanto incrementar la resistencia a enfermedades infecciosas (revisado en Clark y Whitelaw, 2003).

2. Optimización de la digestión de los alimentos y cambios en el metabolismo intermediario de los animales: mediante la transferencia de genes que codifican para enzimas digestivos y enzimas que participan en diferentes vías anabólicas y catabólicas. Esto conlleva un incremento del crecimiento y una disminución de la contaminación ambiental (Houdebine, 2002; Kues y Niemann, 2004). En los próximos años, está prevista la entrada en el mercado de los primeros cerdos ecológicos; estos cerdos producen una fitasa bacteriana en su saliva, que les permite digerir los fitatos de las plantas disminuyendo así la excreción de fósforo en un 75% (Golovan *et al.*, 2001).

3. Cambios en la composición de la leche como: la reducción del contenido en lactosa de la leche para permitir su consumo a personas con intolerancia, la maternización de la leche de vaca con un contenido elevado de lactoferrina humana, la variación del contenido de caseínas de la leche para incrementar su valor nutricional y el rendimiento quesero, la obtención de leche hipoalérgica mediante la supresión del gen de la  $\beta$ LG etc. (revisado en Murray y Maga, 1999; Pintado y Gutiérrez-Adán, 1999; Houdebine, 2002). Durante los últimos años, se han realizado estudios preliminares en el ratón que muestran la posibilidad de modificar la composición de la leche para incrementar su

valor nutricional o mejorar sus propiedades funcionales (Kumar *et al.*, 1994; Gutiérrez-Adán *et al.*, 1996; Jost *et al.*, 1999); no obstante, su aplicación en especies domésticas sigue siendo escasa (Bleck *et al.*, 1998; Brophy *et al.*, 2003).

4. El crecimiento y composición corporal, la reproducción, la producción y composición de la lana son caracteres productivos que también pueden ser optimizados por transgénesis. Por ejemplo, un modelo que puede ser aplicado en animales de producción para mejorar la calidad de la carne es el descrito en ratones transgénicos para el gen de la miostatina. Estos ratones expresan en el músculo un gen que codifica un factor-*trans* negativo de la miostatina y que provoca un incremento en el desarrollo muscular después del nacimiento de los animales (revisado en Houdebine, 2002). Por otra parte, ya existen distintas aproximaciones en animales domésticos para mejorar la calidad de la carne, como el desarrollo en Japón de cerdos con una mayor ratio en sus músculos de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados (Kues y Niemann, 2004).

- **La síntesis de órganos, tejidos y células para transplantes.**

Aunque la donación de órganos para transplantes haya incrementado en los últimos años, la demanda sigue siendo mayor. Para solucionar este problema, la utilización de órganos porcinos para transplantes se ha considerado una buena alternativa. El principal obstáculo que presentan estos órganos es la respuesta inmunológica que generan, provocando el rechazo del órgano por parte del paciente receptor. Actualmente, se están produciendo cerdos transgénicos que expresan genes reguladores humanos, o a los que se les suprimen genes endógenos que intervienen en la síntesis de estructuras antigénicas, evitando así la respuesta hiperaguda de rechazo. Por último, la utilización de tejidos y células de animales genéticamente modificados representan también una importante opción terapéutica para el tratamiento de enfermedades humanas (Kues y Niemann, 2004).

- **La síntesis de proteínas industriales.**

Como la producción de fibra de seda de araña (tabla 6) que, gracias a sus propiedades físicas de flexibilidad y resistencia a la tensión, puede ser utilizada en biomedicina (suturas, ligamentos artificiales) o en otros productos que requieran fibras muy elásticas o fuertes (Keefer, 2004).

Por último, la aplicación más importante y la que ha dado mayores éxitos es:

- **La síntesis de proteínas heterólogas de elevado interés farmacológico.**

Los animales transgénicos permiten la obtención de proteínas biomédicas que son difíciles o muy caras de obtener por otros métodos (véase apartado 8).

Gracias a los estudios realizados sobre la regulación y función de diferentes genes en ratones transgénicos se han puesto a punto *cassettes* de expresión para dirigir la síntesis de estas proteínas recombinantes a diferentes tejidos de animales transgénicos. Actualmente, hay un gran número de proteínas y anticuerpos recombinantes que están en fase de experimentación e incluso existen distintas proteínas recombinantes producidas en animales transgénicos que están en fases avanzadas de pruebas clínicas (tabla 6). Un ejemplo es la antitrombina III, obtenida a partir de la leche de cabras transgénicas, que ha superado las pruebas clínicas de fase III. Se espera que en dos o tres años alcance el mercado, convirtiéndose en la primera proteína recombinante producida en animales transgénicos que completa el proceso regulador (Keefer, 2004). Por otra parte, existe una proteína recombinante, la  $\alpha$ -glicosidasa, que ya ha sido utilizada con éxito para el tratamiento de la enfermedad de Pompe. Esta enzima, que se produce en la leche de conejos transgénicos, es el único tratamiento para esta extraña enfermedad que provoca un desorden en el almacenamiento de glicógeno y es mortal en niños menores de 2 años (Kues y Niemann, 2004).

**Tabla 6.** Proyectos comerciales para la producción de proteínas de importancia biomédica con la utilización de animales transgénicos como 'bioreactores' (Powell, 2003; Keefer, 2004; Kues y Niemann, 2004).

<b>Especie productora</b>	<b>Compañía</b>	<b>Proteína</b>	<b>Aplicación terapéutica</b>	<b>Situación</b>
<b>Cabra</b>	GTC Biotherap.(USA)	AT III	Deficiencia de AT III/ Resistencia genética a la heparina	Fase III completa
		MM093 Ac monoclonales	Esclerosis múltiple/ Miastenia grave/ artritis reumatoide	Fase I
		varios Ac monoclonales	Vacuna contra la Malaria	Fase III
	Nexia Biotech.(Canada)	proteína de seda de araña ButiryI-colinesterasa	Biomedicina /Militar	Desarrollo de fibras Experimental
<b>Oveja</b>	Genzyme (UK)	TPA	Ataques de corazón/ Disolución de coágulos coronarios	Fase II/ III
	PPL (UK)	$\alpha$ -AT	Emfisema pulmonar/ Fibrosis cística	Fase II*
<b>Vaca</b>	Hematech (USA)	varios Ac policlonales	Vacunas	Experimental
	GTC Biotherap.(USA)	HSA	Sustituto sanguíneo/ Traumas	Fase I
<b>Conejo</b>	Pharming (Países Bajos)	Inhibidor C1	Angioedema hereditario	Fase III
		Lactoferrina	Infecciones bacterianas/ Hepatitis C	Fase I
	BioProtein Tech. (Francia)	Proteínas recombinantes		Experimental
<b>Gallinas</b>	Vivallis (Francia)			
	Avigenetics, Inc. (USA)			
	TranXenoGen (USA)	Proteínas recombinantes		Experimental
	Virage (USA)			

Abreviaciones: AT III, antitrombina III; Ac, anticuerpo; TPA, activador del plasminógeno tisular;  $\alpha$ -AT,  $\alpha$ -1-antitripsina; HSA, albúmina sérica humana

\* Fases clínicas aplazadas.

## **8. Sistemas biológicos para la producción de proteínas recombinantes: interés de la producción de FSH humana en animales transgénicos**

En los últimos años, la industria biotecnológica ha estado evaluando y utilizando una gran variedad de sistemas biológicos (bacterias, hongos, levaduras, algas, células de insectos, de metazoos y de mamíferos, plantas, animales) para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas (Houdebine, 1994; Dyck *et al.*, 2003). Actualmente, los sistemas biológicos más utilizados son el cultivo de células de mamífero (mayoritariamente células de Ovario de Hámster Chinés (CHO)) o el cultivo bacteriano (*Escherichia coli*) (Andersen y Krummen, 2002). El cultivo en células de mamífero presenta la ventaja de poder realizar modificaciones post-traduccionales complejas, especialmente glicosilación, que no pueden ser realizadas por las bacterias.

Un ejemplo de proteína recombinante humana producida a partir de cultivo en células de mamífero (CHO), y que requiere modificaciones post-traduccionales complejas, es la Hormona Estimulante del Folículo (FSH) (Loumaye *et al.*, 1998).

La FSH es una hormona heterodimérica de la familia de las glicoproteínas, producida en la glándula pituitaria anterior. Está formada por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ), las cuales están codificadas por genes independientes que se encuentran en cromosomas distintos (Boime *et al.*, 1999). Ambas subunidades sufren modificaciones post-traduccionales específicas necesarias para su correcto ensamblaje (Matzuk y Boime, 1988 a,b) y sólo la proteína heterodimérica tendrá actividad biológica.

La FSH es esencial en la regulación de los procesos reproductivos, estimulando el crecimiento de los folículos ováricos en las hembras y la espermatogénesis en los machos, y regulando la síntesis de hormonas esteroideas en ambas gónadas (Pierce y Parsons, 1981).

Actualmente, la hormona recombinante se utiliza en: técnicas de reproducción asistida como la fertilización *in vitro* (IVF) o la inyección intracitoplásmica de esperma (ICSI), para estimular la maduración folicular en mujeres con síndrome anovulatorio crónico y, junto con la LH, para tratar problemas de infertilidad en los hombres (Olijve *et al.*, 1996; Boime *et al.*, 1999).



Aunque la obtención de esta proteína a partir de cultivo en células de mamífero presenta las ventajas de: una fácil purificación y, como ya se ha dicho anteriormente, la capacidad de ser modificada post-traduccionalmente, la cantidad de proteína obtenida es muy baja y los costes de mantenimiento de los fermentadores muy elevados (Dyck *et al.*, 2004). Esta capacidad limitada de producción ha provocado, en los últimos años, una crisis en la industria biotecnológica que hace necesaria la utilización de otros sistemas de producción para la obtención de anticuerpos y otras proteínas recombinantes (Garber, 2001; Powell, 2003). Un sistema alternativo que también posee las mismas ventajas que los cultivos celulares y cuyo coste de mantenimiento es menor son los animales transgénicos. Las células en el animal se encuentran en una situación metabólica ideal pudiendo sintetizar y secretar proteínas de forma eficiente y en cantidades mayores que las producidas por los cultivos celulares (Houdebine, 1994; Houdebine, 2000). Actualmente ya existen animales de varias especies (vacas, ovejas, cabras, cerdos, conejos) modificados genéticamente que están produciendo proteínas recombinantes en distintos tejidos. Gracias a las ventajas que presenta este sistema con respecto a otros sistemas utilizados, se prevé que en un futuro sea el método de elección para la producción de un gran número de proteínas recombinantes.

### **9. La glándula mamaria como *bioreactor***

Aunque existen diferentes sistemas animales para la producción de proteínas recombinantes como el sistema circulatorio, la vejiga de la orina, las glándulas sexuales accesorias de los machos, los huevos o el capullo de seda; el *bioreactor* más ampliamente utilizado para la producción de proteínas recombinantes es la glándula mamaria (Houdebine, 2000; Kues y Niemann, 2004).

La glándula mamaria es un órgano que presenta una serie de ventajas (Wilmot *et al.*, 1991) ya que:

- Presenta una elevada síntesis proteica.
- La proteína puede ser recolectada de forma fácil, frecuente y estéril sin causar estrés al animal.

- Hay un riesgo reducido de afectar a la salud del animal debido a su secreción exocrina.
- Es fácil purificar la proteína recombinante de la leche, existiendo actualmente distintas metodologías desarrolladas por la industria de productos derivados lácteos para separar los componentes de la leche.
- Tiene una gran capacidad para realizar modificaciones post-traduccionales.

Por lo tanto, gracias a la elevada capacidad de síntesis proteica, la glándula mamaria sería capaz de cubrir las cantidades anuales necesarias de distintas proteínas recombinantes heterólogas. Si asumimos un promedio de un 70% de animales en lactación, 5 gramos por litro de leche y un 60% de eficiencia en la purificación de la proteína; para cubrir las necesidades mundiales anuales de: Albúmina sérica humana (100000 Kg) se necesitaría un total de 5400 vacas, un rebaño de 4300 ovejas para producir 5000 kg de  $\alpha$ 1-Antitripsina, 100 cabras para producir 100 Kg de anticuerpos monoclonales, 75 cabras para 75 Kg de Antitrombina III y cuatro cerdos para producir 2 Kg de Factor IX (Rudolph, 1999).

Por otra parte, la obtención de ratones transgénicos que expresan proteínas multiméricas como el *fibrinógeno* humano (Prunkard *et al.*, 1996) o el *procolágeno recombinante* humano (John *et al.*, 1999) pone de manifiesto la capacidad de la glándula mamaria de sintetizar, modificar post-traduccionamente y secretar proteínas extrañas. En el primer caso, se coinyectó una mezcla equimolar de las construcciones transgénicas de las 3 subunidades que constituían la proteína del *fibrinógeno*. Para el *procolágeno recombinante* humano se coinyectó una mezcla equimolar de una construcción que contenía dos genes que codificaban dos subunidades de la proteína y otras dos construcciones que contenían un enzima necesario para modificar la proteína post-traduccionamente. En ambos casos se purificó la proteína de la leche, la cual estaba bien ensamblada y era funcional.

Otro ejemplo de proteína multimérica obtenida en ratones transgénicos es la FSH bovina (Greenberg *et al.*, 1991), la cual ha sido recientemente obtenida en el conejo (Coulibaly *et al.*, 2002) .

**9.1. Utilización de los genes de las proteínas lácteas en transgénesis: el cassette de expresión del gen de la  $\beta$ LG**

Desde que en la década de los 80, el investigador Tom Richardson sugiriera que las técnicas de ingeniería genética podían aplicarse a los genes de las proteínas lácteas, muchos han sido los artículos publicados sobre la capacidad de alterar la leche por transgénesis (Murray y Maga, 1999; Pintado y Gutiérrez-Adán, 1999; Houdebine, 2002). Sin embargo, hasta la fecha, la mayoría de trabajos realizados en transgénesis con los genes de las proteínas lácteas han consistido en:

- dirigir su expresión a la glándula mamaria de animales (mayoritariamente ratones) con el fin de estudiar la función de las regiones promotoras e identificar las secuencias del ADN necesarias para la expresión de estos genes.
- utilizar las regiones promotoras para dirigir la expresión de proteínas recombinantes a la glándula mamaria de diferentes especies.

Las regiones promotoras utilizadas con más frecuencia son: la  $\beta$ -lactoglobulina ovina, la  $\beta$ -caseína caprina y la  $\alpha$ <sub>1</sub>-caseína bovina, las cuales se utilizan en sus respectivas especies, y la WAP que es utilizada en cerdos y conejos (Rudolph, 1999). De estas, las que mejores resultados han dado hasta ahora han sido: la  $\beta$ -lactoglobulina ovina, la  $\beta$ -caseína caprina y la  $\alpha$ <sub>1</sub>-caseína bovina (Murray, 1999).

Desde que en 1987 se obtuvieran la  $\beta$ -lactoglobulina ovina y el *activador del plasminógeno tisular* en la leche de ratones transgénicos (Simons *et al.*, 1987; Gordon *et al.*, 1987, respectivamente), muchas han sido las proteínas recombinantes producidas en la leche de diferentes especies. Un ejemplo de ello se ilustra en la tabla 7.

La producción de todas estas proteínas ha dado lugar a una serie de conclusiones con respecto a las regiones promotoras utilizadas (revisado en Murray y Maga, 1999). La primera es que las regiones promotoras de los genes de las proteínas lácteas pueden dirigir correctamente la expresión tisular y temporal del transgén a la glándula mamaria del animal transgénico. Sin embargo, la expresión varía según la región promotora utilizada, pudiéndose encontrar también

diferencias entre especies. Un ejemplo de ello sería la región promotora del gen WAP; mientras que la utilización del promotor del gen WAP del ratón dio lugar a una expresión baja del gen de la hormona de crecimiento humana, el promotor del conejo fue más potente con el mismo gen (revisado en Houdebine, 1994). Esto podría ser debido a diferencias en la localización de elementos reguladores entre las diferentes especies.

La segunda conclusión es que la expresión de proteínas exógenas en la glándula mamaria y su secreción en la leche, parece no afectar el funcionamiento normal de la glándula mamaria. Sin embargo, existen excepciones como la supresión láctea producida en una cabra transgénica al producir el *activador del plasminógeno tisular* humano (Ebert *et al.*, 1994) o el fenotipo anormal de lactación que presentan los ratones homocigotos productores de la *proteína C* humana (Palmer *et al.*, 2003).

La tercera y última conclusión es que los transgenes dirigidos a la glándula mamaria pueden ser insertados y expresados con éxito en todas las especies de mamíferos estudiadas (ratón, conejo, vaca, oveja, cabra y cerdo).

Por otra parte y como se ha comentado anteriormente, muchos de estos trabajos realizados con ratones transgénicos han servido para caracterizar regiones reguladoras de los genes de las proteínas lácteas necesarias para su expresión en la glándula mamaria.

Existen 3 factores importantes que influyen en la expresión de los transgenes:

1. Los elementos *cis*: incluyen los promotores y *enhancers* (son secuencias localizadas en una orientación y posición independiente en el genoma y su función es la de incrementar la eficiencia de transcripción).
2. Los factores *trans*: interactúan con los genes en las regiones promotoras y estimulan la transcripción.
3. El entorno cromosómico: se debe al contexto cromosómico con el que se encuentra el transgén al insertarse aleatoriamente en el genoma.

Tabla 7. Proteínas obtenidas en la leche de diferentes especies con la utilización de diferentes promotores.

Promotor	Proteína expresada	Animal	Referencia
vWAP del ratón	IPA humana	Ratón / Cabra	Gordon <i>et al.</i> , 1987; Ebert <i>et al.</i> , 1991
	SOD humana	Ratón / Conejo	Hansson <i>et al.</i> , 1994; Strömqvist <i>et al.</i> , 1997
	Proteína C humana	Ratón / Cerdo	Venlader <i>et al.</i> , 1992a,b; Drohan <i>et al.</i> , 1994; Van Cott <i>et al.</i> , 2001
	vWAP ratón	Cerdo / Oveja	Shamay <i>et al.</i> , 1991; Wall <i>et al.</i> , 1991, 1996
	Factor VIII de coagulación humana	Cerdo	Paleyanda <i>et al.</i> , 1997
	TAP bovina	Ratón	Yarus <i>et al.</i> , 1996
vWAP del conejo	$\alpha_1$ AT humana	Ratón	Bischoff <i>et al.</i> , 1992
	Hormona de crecimiento humana	Ratón	Devinsky <i>et al.</i> , 1994
	EPO humana	Ratón / Conejo	Massoud <i>et al.</i> , 1996
	$\alpha$ -lactalbúmina bovina	Ratón	Micotte <i>et al.</i> , 1989; Soulier <i>et al.</i> , 1992; Bleck y Brennet, 1993
$\alpha$ -lactalbúmina caprina	$\alpha$ -lactalbúmina bovina	Ratón	L'Huilier <i>et al.</i> , 1996
	$\alpha$ -lactalbúmina caprina	Ratón	Soulier <i>et al.</i> , 1992
$\beta$ -lactoglobulina ovina	$\beta$ -lactoglobulina ovina	Ratón	Simons <i>et al.</i> , 1987; Shari <i>et al.</i> , 1992
	$\alpha_1$ AT humana	Ratón / Oveja	Archibald <i>et al.</i> , 1990; Wicht <i>et al.</i> , 1991
	Albumina sérica humana	Ratón	Shari <i>et al.</i> , 1992
	SOD humana	Ratón	Hansson <i>et al.</i> , 1994
	Fibrinógeno humano	Ratón	Prunkard <i>et al.</i> , 1996
	Pro-colágeno tipo I	Ratón	John <i>et al.</i> , 1999
	Factor VIII de coagulación humana	Oveja	Neriman <i>et al.</i> , 1999
$\beta$ -lactoglobulina bovina	$\beta$ -lactoglobulina bovina	Ratón	Hytinen <i>et al.</i> , 1998; Gutiérrez-Adán <i>et al.</i> , 1999
	EPO humana	Ratón / Conejo	Korhonen <i>et al.</i> , 1997
$\beta$ -lactoglobulina caprina	$\beta$ -lactoglobulina caprina	Ratón	Ibáñez <i>et al.</i> , 1997; Pena <i>et al.</i> , 2001

<b>Promotor</b>	<b>Proteína expresada</b>	<b>Animal</b>	<b>Referencia</b>
<b><math>\beta</math>-caseína de rata</b>	$\beta$ -caseína de rata	Ratón	Lee <i>et al.</i> , 1988
	CAT bacteriana	Ratón	Lee <i>et al.</i> , 1989
	FSH bovina	Ratón	Greenberg <i>et al.</i> , 1991
<b><math>\beta</math>-caseína de conejo</b>	Interleukina 2 humana	Conejos	Buhler <i>et al.</i> , 1990
	$\beta$ -caseína caprina	Ratón	Persuy <i>et al.</i> , 1992; Roberts <i>et al.</i> , 1992
<b><math>\beta</math>-caseína caprina</b>	CFTR	Ratón	Di Tullio <i>et al.</i> , 1992
	$\kappa$ -caseína bovina	Ratón	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1995
	tPA humana	Cabra	Biert <i>et al.</i> , 1994
	$\alpha$ s+caseína bovina	Ratón	Clarke <i>et al.</i> , 1994
<b><math>\alpha</math><sub>1</sub>-caseína bovina</b>	$\alpha$ s+caseína bovina	Ratón	Rinkels <i>et al.</i> , 1998
	CAT bacteriana	Ratón	Clarke <i>et al.</i> , 1994
	CAT antisentido	Ratón	Sokol <i>et al.</i> , 1998
	GM-CSF humana	Ratón	Uusi-Oukan <i>et al.</i> , 1997
	IGF-1 humana	Conejo	Brem <i>et al.</i> , 1994
	Urokinasa humana	Ratón	Meade <i>et al.</i> , 1990
	Lisozima humana	Ratón	Maia <i>et al.</i> , 1994
	Lactoferrina humana	Ratón / Vaca	Krimpenfort <i>et al.</i> , 1991; Platenburg <i>et al.</i> , 1994; van Berkel <i>et al.</i> , 2002
	Pro-colágeno tipo I	Ratón	Toman <i>et al.</i> , 1999
	FSH bovina	Conejo	Coulibaly <i>et al.</i> , 2002

Abreviaciones: t-PA: activador del plasminógeno tisular; SOD: superóxido dismutasa; WAP: proteína ácida sérica; TAP: péptido antimicrobial traqueal;  $\alpha$ <sub>1</sub> AT: antitripsina  $\alpha$ <sub>1</sub>; EPO: eritropoyetina; CAT: acetiltransferasa cloranfenicol bacteriana; FSH: hormona estimulante del folículo; CFTR: regulador de la conductancia transmembranal; GM-CSF: factor de estimulación colonial de granulocitos-macrófagos; IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo I

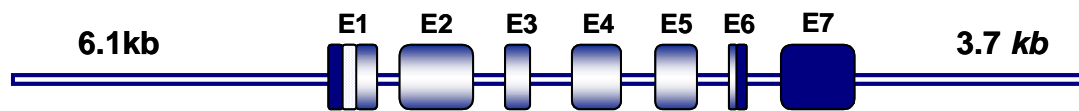
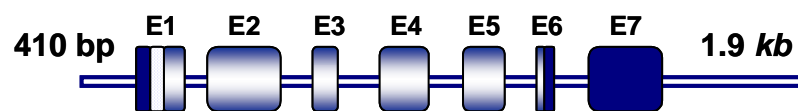
Estos 3 factores son muy importantes en los animales transgénicos porque van a determinar la eficiencia, la distribución tisular y el momento exacto de la expresión del transgén.

La mayoría de los transgenes obtenidos hasta ahora tienen una expresión influenciada por su lugar de integración, no encontrándose claramente una correlación positiva de la expresión del transgén con el número de copias integradas del mismo. En 1987, Simons et al. obtuvieron ratones transgénicos que expresaban  $\beta$ LG ovina de forma independiente al lugar de integración. Cinco años más tarde, este grupo estudió el efecto que causaba la delección de diferentes fragmentos de la región 5' flanqueante de las construcciones de la  $\beta$ LG ovina, observando que las líneas de ratones transgénicos que contenían 406 pb del promotor proximal ( $\beta$ LG- $\Delta$ Dp) tenían un nivel de expresión dependiente del número de copias integradas (Whitelaw *et al.*, 1992).

En nuestro grupo se han elaborado dos construcciones para la  $\beta$ LG caprina (figura 6) que contienen además de la unidad de transcripción:

- Construcción J3: 6,1 y 3,7 kb de las regiones flanqueantes 5' y 3' respectivamente (Ibáñez *et al.*, 1997).
- Construcción pPX(7.0): 410 pb de la región promotora proximal y 1,9 kb de la región 3' flanqueante (Pena *et al.*, 2001).

Ambas construcciones pueden dirigir la expresión de la  $\beta$ LG caprina a la glándula mamaria de ratones transgénicos, lo que sugiere que la construcción de la  $\beta$ LG caprina tiene elementos reguladores *cis* necesarios para ello (Ibáñez *et al.*, 1997). Sin embargo, a diferencia de la construcción J3, las líneas de ratones transgénicos para la pPX(7.0) expresan niveles elevados del transgén con independencia del lugar de integración y la expresión está correlacionada en 7 de las 8 líneas con el número de copias integradas del transgén (Pena *et al.*, 2001). Este resultado es similar al obtenido con la construcción del mismo tamaño de la  $\beta$ LG ovina (Whitelaw *et al.*, 1992).

**J3 (14.5 kb)****PX7.0 (7 kb)**

**Figura 6.** Construcciones para la  $\beta$ LG-caprina

Las diferencias entre las dos construcciones caprinas serían atribuibles a los diferentes tamaños de promotor utilizados, ya que, reducciones de tamaño en la región 3' flanqueante no parecen producir ningún cambio en los niveles de expresión del transgén de la  $\beta$ LG ovina (Simons *et al.*, 1987; Whitelaw *et al.*, 1992). Por otra parte, deleciones en la región 5' proximal, con un promotor de tamaño inferior a los 400 pb, resultan en una disminución espectacular de la frecuencia de expresión del transgén y en un silenciamiento de la expresión del mismo en la mayoría de las líneas (Whitelaw *et al.*, 1992). También ocurre una disminución en la expresión cuando se utilizan construcciones con regiones promotoras mayores de 4 kb (Shani *et al.*, 1992); la presencia de elementos potencialmente inhibidores *cis* en el promotor distal de la  $\beta$ LG ovina podrían ser la causa. La baja expresión de las líneas transgénicas para la construcción caprina J3 (con 6,1 kb de región promotora) podría ser debido al mismo efecto.

Por otra parte, una de las propiedades más relevantes de la construcción pPX(7.0) es su expresión específica en la glándula mamaria de los ratones transgénicos, a diferencia de la construcción J3 y de las diferentes construcciones de la  $\beta$ LG ovina que presentan expresión ectópica en diferentes órganos como: el



bazo, el hígado, el riñón, el pulmón o la glándula salivar (Simons *et al.*, 1987; Whitelaw *et al.*, 1992; Farini y Whitelaw, 1995; Pena *et al.*, 2001). Esta expresión ectópica sería presumiblemente debida a efectos de posición de los transgenes, ya que no todas las líneas presentan expresión ectópica. Farini y Whitelaw (1995) sugirieron que los elementos de ADN presentes en los transgenes de la  $\beta$ LG ovina serían incapaces de aislar estos transgenes de los efectos de la cromatina adyacente en otros tejidos.

La disminución de las regiones flanqueantes del transgén de la  $\beta$ LG caprina limitó su expresión a la glándula mamaria de los animales transgénicos. Por lo tanto, deben existir diferencias entre los elementos reguladores que dirigen esta expresión y los elementos reguladores de la construcción ovina del mismo tamaño (Pena *et al.*, 2001).

La existencia de dos regiones hipersensibles a la ADNasa I ( $HS_{IV}$  y  $HS_V$ ) en el primer y segundo intrón del gen de la  $\beta$ LG caprina, cuando se analiza la cromatina de la glándula mamaria en lactación, podría explicar estas diferencias. Estas regiones hipersensibles a la ADNasa I son regiones donde se ha producido una remodelación de los nucleosomas y, por tanto, facilitan el acceso a los factores de transcripción. Se ha sugerido la existencia de una secuencia MAR (*Matriz Attachment Region*; son secuencias de ADN que interactúan con la matriz nuclear, están implicadas en la regulación de la cromatina abierta y tienen función potenciadora de la transcripción; revisado en Whitelaw *et al.*, 2000) en esta región (del exón 1 al intrón 2), la cual podría ser la responsable de las diferencias de especificidad tisular encontradas entre las construcciones de la  $\beta$ LG ovina y caprina del mismo tamaño (Pena *et al.*, 1998; Pena *et al.*, 2001) al aislar el transgén de la  $\beta$ LG caprina de la cromatina de su entorno.

En conclusión, trabajos realizados en nuestro grupo nos permiten disponer en la actualidad de un *cassette* de expresión que puede dirigir la síntesis de forma eficiente y específica a la glándula mamaria, que se expresa con independencia al lugar de integración y su expresión depende del número de copias integradas del transgén.

## 10 Línea Tg 56 para la construcción pPX(7.0) de la $\beta$ LG caprina

Para el estudio de la construcción pPX(7.0) se generaron un total de 10 líneas transgénicas de las cuales 7 expresaban el transgén (Pena *et al.*, 2001).

Todos los animales fundadores y los heterocigotos de la primera generación fueron fenotípicamente normales y fértiles; sin embargo, los animales homocigotos de la línea transgénica tg56 mostraron un fenotipo conspicuo (figura 7) al resto de líneas que se caracterizó por:



- Tamaño y peso inferior al de sus hermanos heterocigotos debido a un crecimiento retardado.
- Dorso curvado.
- Morro más grueso.
- Pelaje menos liso y brillante.
- Elevada mortalidad después del nacimiento.
- Baja fertilidad tanto en machos como en hembras.

**Figura 7.** Ratones de la línea tg56, el ratón de la izquierda es el animal homocigoto, a la derecha está su hermano normal heterocigoto.

Esta línea contiene 22 copias del transgén integradas en una única posición del genoma y expresa la  $\beta$ LG caprina a niveles elevados en la glándula mamaria (Pena *et al.*, 2001).

Como ya se ha explicado anteriormente, la técnica de microinyección no permite dirigir el lugar de integración del transgén, el cual se integra de manera aleatoria en cualquier posición del genoma del animal. Esta integración aleatoria puede provocar mutagénesis por inserción, alterando o anulando la expresión de genes endógenos. Por otra parte, también pueden producirse deleciones y reorganizaciones tanto en el transgén como en el ADN genómico del ratón próximo

al lugar de integración, que pueden afectar también la expresión de estos genes (Woychik y Alagramam, 1998).

Estas mutaciones son muy importantes ya que pueden ser utilizadas como modelos para enfermedades humanas (Meisler, 1992, Woychik y Alagramam, 1998). El análisis de las líneas transgénicas es necesario para detectar fenotipos causados por la integración del transgén. Mientras que algunos de estos fenotipos son fácilmente identificables (pudiendo ser la mutagénesis por inserción la causa del fenotipo mostrado por la línea tg56), otros requieren un análisis más exhaustivo. Un ejemplo de ello serían las mutaciones recesivas que causan letalidad prenatal; estas mutaciones pueden ser identificadas por la ausencia de animales homocigotos entre la descendencia de ratones transgénicos heterocigotos.

Una vez detectado el fenotipo en los ratones transgénicos, se puede caracterizar la mutación por inserción, utilizando el transgén como una etiqueta (pista) molecular para clonar el gen alterado (Meisler, 1992, Woychik y Alagramam, 1998). Sin embargo, lo más prudente es empezar el análisis determinando el cariotipo de los ratones heterocigotos para el transgén, para identificar posibles alteraciones estructurales cromosómicas como translocaciones, inversiones, o grandes deleciones, que pueden ayudar a establecer la estructura del locus mutado (Woychik y Alagramam, 1998).

En este compendio de trabajos se ha caracterizado el lugar de integración del transgén de la  $\beta$ LG caprina en la línea de ratones transgénicos tg56 (véase resultados y discusión).

# **OBJETIVOS**

El trabajo presentado en esta tesis forma parte de un proyecto más amplio de colaboración multidisciplinar entre los departamentos de Ciencia Animal y de los Alimentos y Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona (CICYT AGL2000-0687). El objetivo final del proyecto es la obtención de cabras transgénicas que secreten proteínas de interés farmacológico en su leche. En nuestro grupo, se han elaborado previamente dos construcciones para la  $\beta$ LG caprina con el fin de estudiar el efecto del tamaño de las regiones reguladoras 5' y 3' en la expresión del transgén (Ibáñez *et al.*, 1997; Pena *et al.*, 2001). Estos estudios nos permiten disponer en la actualidad de un *cassette* de expresión para la  $\beta$ LG caprina. Asimismo, la generación de líneas transgénicas para una de las construcciones de la  $\beta$ LG caprina (Pena *et al.*, 2001) provocó la aparición de ratones homocigotos en la línea tg56 que presentaron un fenotipo conspicuo al resto de líneas.

Los objetivos del presente trabajo han sido los siguientes:

1. Obtención de construcciones genéticas híbridas entre las regiones reguladoras del gen de la  $\beta$ -lactoglobulina caprina ( $\beta$ LG) y los genes que codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la hormona FSH humana.
2. Obtención y análisis de ratones transgénicos para las construcciones híbridas  $\beta$ LG-FSH humana, mediante la técnica de microinyección de ADN en pronúcleo de embriones. Con ello se pretende evaluar la capacidad de dicha construcción genética para dirigir la síntesis de esta proteína exógena en la glándula mamaria.
3. Caracterización del lugar de integración del transgén de la  $\beta$ LG caprina en la línea de ratones transgénicos tg56 para determinar si el fenotipo presentado por estos animales es debido a la interrupción de un gen específico del ratón.

4. Desarrollo de un nuevo sistema, basado en la técnica de PCR cuantitativa a tiempo-real, para la determinación del número de copias integradas del transgén en líneas transgénicas de forma rápida, evitando la utilización de los métodos tradicionales de transferencia.
  
5. Identificación de polimorfismos genéticos en la región promotora proximal (utilizada para la elaboración de las construcciones genéticas híbridas) del gen de la  $\beta$ -lactoglobulina caprina.

# **RESULTADOS**

1. *“Disruption of the mouse Phospholipase C- $\beta$ 1 gene in a  $\beta$ -Lactoglobulin transgenic line affects viability, growth and fertility in mice”*

*Ballester M., Molist J., Lopez-Bejar M., Sánchez A., Santaló J.,  
Folch J.M. and Ibáñez E.*

*Gene (2004) 341: 279-289*



**Disruption of the mouse Phospholipase C- $\beta$ 1 gene in a  $\beta$ -Lactoglobulin transgenic line affects viability, growth and fertility in mice**

*Keywords:* Transgenic mouse; reduced growth; postnatal mortality; infertility; insertional mutant; signal transduction

Maria Ballester<sup>a\*</sup>, Josep Molist<sup>b</sup>, Manel Lopez-Bejar<sup>c</sup>, Armand Sánchez<sup>a</sup>, Josep Santaló<sup>b</sup>, Josep M. Folch<sup>a</sup> and Elena Ibáñez<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain*

<sup>b</sup>*Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain*

<sup>c</sup>*Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain*

*Abbreviations:* BLAST, basic local alignment search tool;  $\beta$ LG,  $\beta$ -Lactoglobulin; cDNA, complementary DNA; DAG, 1,2-diacylglycerol; FISH, fluorescence in situ hybridization; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trisphosphate; mRNA, messenger RNA; PCR, polymerase chain reaction; PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PKC, protein Kinase C; *PLC- $\beta$ 1*, Phospholipase C- $\beta$ 1; RT-PCR, reverse transcription PCR;

\*Corresponding author. Tel.: +34-93-581-4260; fax: +34-93-581-2106. *E-mail address:* [maria.ballester@uab.es](mailto:maria.ballester@uab.es) (M. Ballester).

**ABSTRACT**

A recessive insertional mutation was identified in one line of transgenic mice for the caprine  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ LG) gene. High mortality after birth, a significant reduction in postnatal growth and adult body size, changes in the morphometric features of the head and infertility are the most prominent phenotypic traits of the mutant animals. Molecular cloning and sequencing of the transgene insertion site showed that 22 copies of the  $\beta$ LG transgene are inserted in an intronic region of the Phospholipase C- $\beta$ 1 ( $PLC-\beta$ 1) gene, which plays a pivotal role in modulating different cellular functions. As a result of the insertional mutation ( $PLC-\beta$ 1 $_{\beta$ LG mutation) a hybrid mRNA between the mouse  $PLC-\beta$ 1 and the goat  $\beta$ LG genes is transcribed. The tissue-specific pattern of expression of this hybrid mRNA in  $PLC-\beta$ 1 $_{\beta$ LG homozygotes is equivalent to that of the endogenous  $PLC-\beta$ 1 mRNA in non-transgenic animals, which is reported for the first time in this species, but expression levels are significantly reduced. Although the hybrid  $PLC\beta$ 1- $\beta$ LG mRNA contains all the essential information to produce a  $PLC\beta$ 1 protein that could be activated, this protein was not detected by Western blot. The  $PLC-\beta$ 1 $_{\beta$ LG mouse model described here represents a useful tool to investigate the role of the  $PLC-\beta$ 1 gene in the molecular mechanisms underlying growth and fertility.

## 1. INTRODUCTION

Insertional mutagenesis caused by the transgene integration in the genome of transgenic animals is a relatively common event and it has become a powerful procedure for studying mammalian gene function (Meisler, 1992; Woychik and Alagramann, 1998). The analysis of the transgene-induced insertional mutants has led to the identification and isolation of genes involved in normal growth and development of mice (Meisler, 1992).

In a previous work, we produced several lines of transgenic mice for the goat  $\beta$ -Lactoglobulin ( *$\beta$ LG*) gene showing high levels of mammary gland specific expression of the transgene in a position independent manner (Pena et al., 2001). In one of the transgenic lines, designated Tg56, some of the offspring displayed a distinct phenotype consisting in reduced growth, high mortality after birth and infertility. As we show in the present paper, this transgenic line carries a recessive insertional mutation caused by the integration of the goat  $\beta$ LG transgene in the intron 30 of the murine phospholipase C- $\beta$ 1 (*PLC- $\beta$ 1*) gene.

Twelve distinct mammalian phospholipase (PLC) isoforms have been identified so far and classified into five subfamilies: PLC $\beta$ , PLC $\gamma$ , PLC $\delta$ , PLC $\epsilon$ , and PLC $\zeta$ , that differ in structure, tissue distribution, and activation pathways (Rhee and Bae, 1997; Saunders et al., 2002; Song et al., 2001). PLC plays a pivotal role in the transmembrane signal transduction pathways, catalyzing the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) in response to a variety of extracellular signals including hormones, growth factors, and neurotransmitters. This reaction generates two intracellular second messengers: 1,2-diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>), which induce activation of protein Kinase C (PKC) and mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup>, respectively. These two processes are of central importance for diverse cellular functions, such as cell to cell communication, secretion, proliferation, and differentiation (Rana and Hokin, 1990; Bahk et al., 1994).

In 1997, Kim et al. generated a null mutation for the *PLC- $\beta$ 1* gene in knockout mice to investigate the role of this gene in the brain. Homozygous null mice (*PLC- $\beta$ 1*<sup>-/-</sup>) displayed retarded growth and low viability after birth, and the

study determined the important role of PLC- $\beta$ 1 in the inhibitory neuronal circuitry, by coupling predominantly to the muscarinic acetylcholine receptor activating inhibitory interneurons. More recently, a new PLC- $\beta$ 1 mouse model has been produced, in which an intronic insertion results in a loss of downstream PLC- $\beta$ 1 expression (Böhm et al., 2002). Homozygous animals for this new PLC- $\beta$ 1<sub>TC</sub> mutation showed age-dependent hippocampal mossy fiber sprouting and neurodegeneration. These two studies were focused on the neurological consequences of the PLC- $\beta$ 1 disruption, but its effects on the growth, morphometric features and viability of the mutant animals were not discussed.

In this report, we present the identification and characterization of a transgene-induced insertional mutation at the *PLC- $\beta$ 1* locus (PLC- $\beta$ 1 <sub>$\beta$ LG</sub>) in one line of  $\beta$ LG transgenic mice. We describe the main phenotypic consequences of this recessive mutation as well as the chromosomal mapping and the molecular cloning of the transgene insertion site. In addition, the expression of the mutated and the endogenous *PLC- $\beta$ 1* gene in PLC- $\beta$ 1 <sub>$\beta$ LG</sub> homozygotes and non-transgenic animals, respectively, was studied.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Generation and screening of the $\beta$ LG transgenic mice**

Transgenic mice were previously generated by pronuclear microinjection of the pPX(7.0) construct into one-cell B6CBAF2 embryos. This construct contained 410 bp of the goat  *$\beta$ LG* proximal promoter region, the entire transcription unit of the  *$\beta$ LG* gene and 1.9 Kb of the 3' flanking region. Out of 10 transgenic founder animals identified, 7 transgenic lines that transmitted and expressed the  $\beta$ LG transgene were established (Pena et al., 2001). The transgenic mouse line Tg56 contained 22 copies in tandem of the pPX(7.0) transgene integrated at a single site, as revealed by Southern blot analysis, and expressed the goat  $\beta$ LG at high levels specifically in the mammary gland, as demonstrated by Northern blotting (Pena et al., 2001). The founder animal of transgenic line Tg56 was bred to a B6CBAF1 mouse and the line was maintained by crosses between hemizygous transgenic animals. Transgenic animals were identified by polymerase chain reaction (PCR) analysis of genomic DNA isolated from tail biopsies. The primer pair GoatBLG1m (5'-CTG CAG CCA

TGA AGT GCC TCC TGC-3') and GoatBLG2m (5'-TGG GCT TCA GCT CCT CCA CGT AC-3') were used to amplify a 872-bp long fragment specific to the transgene.

## **2.2. Fluorescence in situ hybridization (FISH)**

FISH was applied on interphase lymphocyte nuclei isolated from whole blood samples, to determine the zygosity of the animals, and on chromosome spreads prepared from cultured blood samples, to identify the chromosomal location of the transgene insertion site. For interphase preparations, blood samples (~200 µl) collected by retro-orbital bleeding were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated at 37°C for 20 min in hypotonic solution (0.075 M KCl). Pellets were fixed with ice-cold methanol/acetic acid (3:1), and slides were prepared according to standard cytogenetic protocols. For cell culture, blood samples were incubated for 43 h at 37°C in RPMI-1640 (Gibco) with 25 mM HEPES supplemented with 2.4 mM L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin, 20% fetal calf serum, 1% heparin, 0.05 mg/ml lipopolysaccharide (Sigma) and 0.06 mg/ml phytohemagglutinin (Sigma). Cultures were treated with colcemid (0.03 µg/ml, Gibco) to obtain metaphase chromosomes, and then harvested as described above for interphase preparations.

For FISH analysis, the entire pTZ18 plasmid containing the pPX(7.0) transgene was nick-translated with biotin-11-dUTP and used as a probe. The FISH technique was performed essentially as previously described (Ibáñez et al., 2001). Hybridization sites were detected with fluorescein isothiocyanate-labeled avidin (FITC-avidin, Oncor), and the signal was amplified by applying biotinylated antiavidin antibody (Oncor) followed by a second round of FITC-avidin. Preparations of interphase nuclei were counterstained with propidium iodide (Oncor), while chromosome preparations were counterstained with DAPI III (Vysis) for chromosome identification. The slides were examined with an Olympus BX-60 epifluorescence microscope and image analysis and karyotyping was performed with Cytovision System (Applied Imaging).

## **2.3. Growth curves**

Weight data for a total of 98 animals resulting from the intercrossing of several hemizygous transgenic animals from line Tg56 were collected from Day 4-6 until Day 49-51 of age. The mice were then genotyped by interphase FISH analysis

on blood lymphocyte nuclei, and weight averages were plotted against time according to sex and genotype of the animals. Differences in growth rate at 3-day intervals among nontransgenic, hemizygous and homozygous transgenic animals were assessed by one-way analyses of variance with Tukey's posttest. All statistical analyses were computed using GraphPad InStat (version 3.01 for Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Differences with a probability value of 0.05 or less were considered significant.

#### **2.4. Bone morphometry and organ weight**

Seven homozygous transgenic mice (two males and five females), resulting from several matings of hemizygous transgenic animals from line Tg56, were euthanized at 2-3 months of age, and their phenotypic features were analyzed. Hemizygous (n=4) or nontransgenic (n=3) littermates of the same sex were also analyzed, and, as no significant differences were detected for any of the parameters analyzed between these animals, they were included in the same experimental control group. Axial and appendicular skeletons were macroscopically examined to assess normality. Body, skull and long bones were measured in length or width, and data compared between littermates as absolute and relative (percentage of body length) values. Body and major organ weights were also recorded and compared between littermates, both as absolute and relative (percentage of body weight) values. Differences in organ size between homozygous transgenic animals and the control group were assessed by means of paired *t* tests (GraphPad InStat), and a probability value of 0.05 or less was considered significant.

#### **2.5. Molecular cloning and sequencing of the transgene insertion site**

The Vectorette system (Genosys), which is based in the anchored PCR approach, was used to amplify and clone the flanking regions of the transgene integration site. Genomic DNA was isolated from the liver of homozygous transgenic and nontransgenic mice, and 1 µg of DNA was digested with the restriction enzymes *EcoRI* and *SmaI*. The specific primers for the goat βLG promoter used in the Vectorette were: BLGPR3 R (5'-TCT GGA CTC TGG GTC AGG CTG GCT GC-3') and BLGPR4 R (5'-GGT TCC CGG AAT CCT ACT TGG

CTC ATC-3'). Amplified DNA was sequenced with an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) and sequences obtained were compared against GenBank database with Blastn. Once the transgene integration site was identified, a different set of primers were used to complete the characterization of the 5' and 3' mouse genomic sequences flanking the transgene, using PCR amplification and DNA sequencing directly or after subcloning (3' flanking region). Region 5': PLCB1-1F (5'-TAT TCA GAA GTT GAC AGA TGT TG-3'), PLCB1-2F (5'-GGA GAA GAC AGA GAT GAT CCG-3'). Region 3': BLGGoatE4R (5'-CTC GGG CTC AGC ACT GTT TTC C-3'), BLGE6R (5'-ACC ACA GAG GCA CCG GCA GG-3'), BLG7 (5'-GCG GAT CCG AGC AGG AGG CCA C-3'), PLCB1-31R (5'-CTT GGG CTT CTC ATC GAG GAT C-3'), PLCB1-3R (5'-CTG CTG GCG GAT CTC ATT GTG-3').

## **2.6. RNA isolation and RT-PCR analysis**

Total RNA was isolated from several tissues (spleen, uterus, liver, heart, brain, hypophysis, lung, spinal cord, kidney, muscle, testicles and seminal vesicle) of homozygous and nontransgenic mice using Trizol (Invitrogen). One microgram of total RNA from each tissue was converted to complementary DNA (cDNA) employing the Thermoscript reverse transcription PCR (RT-PCR) System (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol, and the following primers were used: a modified oligo(dT) [5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC (T)<sub>30</sub> V N-3'], BLGE6R, and GoatBLG2m. PCR reactions were performed with 2 µl of the RT final volume, and the primers used to characterize the hybrid messenger RNA (mRNA) between the mouse *PLC-β1* and the goat *βLG* genes were BLGE6R, PLCB1-5'F (5'-CTC AAG CCC GTG TGC GTG TCC-3'), PLCB1-2F and UAP (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'). Sequencing of the hybrid mRNA was carried out with primers PLCB1-5'F, PLCB1-2F and BLGE6R. Primers used to analyze the expression of the hybrid mRNA and PLC-β1 mRNA were PLCB1-2F, GoatE1R2 (5'-GCC TTT CAT GGT CTG GGT GAC G-3'), and PLCB1E27F (5'-CTG AAC CCA GCA GCC CTG AC-3'), PLCB1E30R (5'-CCA CCT CCT GGA TGT ACG ATC-3'), respectively.

## **2.7. Real-time quantitative PCR (SYBR green I)**

Real-time quantitative PCR analysis of PLC-β1 and β-actin expression was

carried out in the ABI PRISM<sup>®</sup> 7900 HT Sequence Detection System (PE Applied Biosystems). The RT final volume (see Section 2.6) was increased to 200  $\mu$ l, and 2  $\mu$ l was used for each real-time PCR reaction. PCR primers were designed using Primer Express<sup>™</sup> software (PE Applied Biosystems). For PLC- $\beta$ 1 amplification, the primers PLCB1E24F (5'-CCA AGC GAA ACC AGG ACA AC-3') and PLCB1E25R (5'-ACG CTC TGG ATC AGA TCT TCT GT-3') were used to obtain a 149-bp-long product. Primers for  $\beta$ -actin, with a product size of 146 bp, were ActbmE5F (5'-GAC AGG ATG CAG AAG GAG ATT ACT G-3') and ActbmE6R (5'-TTG CTG ATC CAC ATC TGC TG-3'). Each sample was prepared and run in triplicate in a final 20  $\mu$ l reaction volume containing 2x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM primer pairs for  $\beta$ -actin or 900 nM primer pairs for PLC- $\beta$ 1, and 2  $\mu$ l of cDNA. Reaction parameters were 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. The  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (Livak and Schmittgen, 2001) was used for relative quantification using the cDNA sample from the nontransgenic mouse brain as calibrator and  $\beta$ -actin as an endogenous control.

## **2.8. Western blot analysis**

Brain homogenates were prepared from 10 mg of brain of homozygous transgenic and nontransgenic mice using an homogenization buffer (50 mM Tris-HCl, 0.27 M sucrose, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM  $\text{VO}_4$ , 10 mM Na  $\beta$ -glycerolphosphate, 5 mM Ppi, 1% Triton X-100, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol) containing a protease inhibitor cocktail (Roche), and then centrifuged for 30 min at 25,000 $\times g$  at 4°C. A total of 25  $\mu$ g of protein concentrate in collected supernatants was fractionated on a 7.5% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) at constant voltage (100 V) for 1.5 h. The separated proteins were electrophoretically transferred onto a methanol-activated PVDF membrane (Bio-Rad) in a Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) by using 100 V for 1 h. The membrane was then blocked with 3% BSA and incubated with the monoclonal antimouse PLC- $\beta$ 1 antibody (1:1000, Becton Dickinson, Lexington, KY). Detection was performed using the alkaline phosphatase-conjugated goat antimouse IgG (1:1000, Southern Biotech, Birmingham, USA) and the NBT/BCIP staining system (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocols.



### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1. Identification of animals with a $\beta$ LG transgene-induced insertional mutation**

Seven lines of transgenic mice expressing a goat  $\beta$ LG transgene specifically in the mammary gland were previously produced by pronuclear microinjection of the pPX(7.0) construct (Pena et al., 2001). All founder transgenic animals (G0) and hemizygous transgenic G1 animals were phenotypically normal and fertile. However, when hemizygous transgenic mice from line Tg56 were intercrossed to produce G2 transgenic mice, some of the offspring showed a distinct phenotype characterized by high mortality after birth and reduced growth (Fig. 1A). Genotyping the progeny ( $n=133$ ) of several matings of hemizygous mice by interphase FISH on lymphocyte nuclei demonstrated that animals showing the abnormal phenotype were homozygous for the  $\beta$ LG transgene. Hemizygous and nontransgenic animals from the same litters were phenotypically normal, as were homozygotes from the other six lines of pPX(7.0) transgenic mice. As all lines of pPX(7.0) transgenic mice showed a similar pattern of transgene expression, which was restricted to the mammary gland, high-level expression of the goat  $\beta$ LG transgene was unlikely to account for the altered phenotype. Taken together, these results suggested that the abnormal phenotype of homozygous Tg56 transgenic animals resulted from the disruption of an endogenous gene by the transgene insertion. Analysis of segregation indicated that the insertional mutation was autosomal and recessive.

#### **3.2. Chromosomal mapping of the transgene integration site**

To determine the chromosomal location of the transgene integration site, the biotinylated pPX(7.0) transgene was used as a probe for FISH analysis on chromosome preparations obtained from cultured blood samples of one hemizygous and five homozygous transgenic animals. A total of 89 metaphases were analyzed, and the transgene consistently appeared as one spot localized on a single chromosome pair, thus confirming that the transgene array is integrated at a single genomic location. To identify the chromosome pair, digital images of the best quality metaphases were acquired after FISH, and DAPI III fluorescence banding was converted into a G-banding pattern with Cytovision System. After karyotype

analysis, the  $\beta LG$  transgene insertion site was mapped to band F3 of chromosome 2 (Fig. 2A-B). No gross chromosome abnormalities that could account for the altered phenotype were detected.

### **3.3. Molecular analysis of the transgene integration site**

To ascertain that the phenotype displayed by homozygous transgenic mice from line Tg56 resulted from the disruption of a specific endogenous gene, the unknown flanking regions of the transgene insertion site were isolated and sequenced using the “Vectorette system”. Two primers were designed (BLGPR3 and BLGPR4) in the proximal promoter region of the transgene to obtain small DNA fragments. Genomic DNA was digested with restriction enzymes *EcoRI* and *SmaI*, which do not cut the proximal promoter region of the transgene upstream of the hybridization sites of the primers. Afterwards, two different vectorette libraries for each digestion were obtained and amplified by PCR using a forward primer for the vectorette unit and reverse primers for the known DNA sequence (BLGPR3 and BLGPR4). Six different DNA bands were obtained, one from the *SmaI* library and the rest from the *EcoRI* library. Sequencing of these DNA bands and similarity analysis with basic local alignment search tool (BLAST) software in the GenBank database showed that one band was partially complementary to the mRNA of the mouse *PLC- $\beta 1$*  gene. This result is in agreement with the chromosomal mapping of the  $\beta LG$  transgene insertion site, as the *PLC- $\beta 1$*  gene has been previously mapped to band F3 of mouse chromosome 2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>).

Since only the mRNA sequence of the PLC- $\beta 1$  was known in the mouse (GenBank: NM\_019677), we extrapolated the structure of the *PLC- $\beta 1$*  murine gene from the human gene (Caricasole et al., 2000) and deduced that the transgene was integrated in the intron 30 of the mouse *PLC- $\beta 1$*  gene (Fig. 2C). The insertional mutation was designated PLC- $\beta_{\beta LG}$ . Complete characterization of the 5' and 3' mouse genomic sequences flanking the transgene revealed that as a result of the transgene insertion, intron 30 of the *PLC- $\beta 1$*  gene has lost 30 nucleotides, and that there is a deletion spanning from part of exon 4 to the promoter in the last  $\beta LG$  copy.

### **3.4. Growth profile and viability of PLC- $\beta$ <sub>1 $\beta$ LG</sub> mutant animals**

The most prominent features of the abnormal phenotype detected in transgenic line Tg56 were the reduced viability after birth and small size of the homozygous transgenic animals. Approximately 60% of the mutant animals died during the first 2 weeks after birth or during the first week after weaning, when the mice were 3-4 weeks old. Reduced growth and low viability after birth was also reported by Kim et al. (1997) in homozygous mice for a PLC- $\beta$ 1 null mutation. Most of these animals died suddenly, between the third and the sixth week of age, and the death was preceded by epileptic seizures. In our study, in contrast, the death of PLC- $\beta$ 1 <sub>$\beta$ LG</sub> homozygotes occurred at a slightly younger age and without any signs of neurological deficit. To characterize the reduction in size of the PLC- $\beta$ 1 <sub>$\beta$ LG</sub> mutant animals, the growth profile of 46 males and 52 females resulting from the intercross of hemizygous transgenic animals was monitored from Day 4-6 until Day 49-51 of age. Weights of both male ( $n=23$ ) and female ( $n=29$ ) hemizygous animals for the PLC- $\beta$ 1 <sub>$\beta$ LG</sub> mutation were similar to those of their nontransgenic counterparts ( $n=15$  and 14, respectively) during the monitored time period (Fig. 3). However, PLC- $\beta$ 1 <sub>$\beta$ LG</sub> homozygotes (eight males and nine females) were significantly smaller than their hemizygous and nontransgenic littermates; a significant decrease ( $P<0.05$ ) in weight was detected starting at Day 7-9 of age for homozygous males and at Day 13-15 for homozygous females, indicating that growth retardation in PLC- $\beta$ 1 <sub>$\beta$ LG</sub> homozygotes occurs after birth. At Day 49-51 of age, the average weights of PLC- $\beta$ 1 <sub>$\beta$ LG</sub> homozygotes were 20.3 and 17.9 g for males and females, respectively. This corresponds to a reduction of approximately 15% for homozygous females, and 30% for homozygous males, in comparison to their hemizygous (males: 27.9 g; females: 21.4 g) and nontransgenic (males: 28.1 g; females: 21.2 g) littermates.

### **3.5. Morphometric analysis and organ weight of PLC- $\beta$ <sub>1 $\beta$ LG</sub> mutant animals**

At 2-3 months of age, PLC- $\beta$ 1 <sub>$\beta$ LG</sub> homozygotes showed reduced body length and weight when compared to control animals ( $P<0.0001$ ; Tables 1 and 2), and no sex differences in morphometric features were observed into the homozygous transgenic group. Body length and weight of PLC- $\beta$ 1 <sub>$\beta$ LG</sub> homozygotes were 84.1% and 62.9% of those of control mice, respectively. Skull measurements of

homozygous mice were largely different to those of control animals, except for the viscerocranial length (Table 1). In relation both to body and to neck-rump length, the homozygous skull was longer and wider than that of control mice ( $P < 0.05$ ; Fig. 1B). Long bones in homozygous animals were shorter than those of control mice, but in relation to body length, they were significantly longer ( $P < 0.01$ ; Table 1). Although no macroscopical defects in long bones were detected in any of the 7 PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  homozygotes analyzed, three of these mice showed an abnormal curvature of the axial skeleton at the thoracic level, diagnosed as kyphosis (Fig. 1B), but no neurological signs were evident in these animals. In other mutant mice, progressive dwarfism with short limbs, craniofacial anomalies or defects of the spinal cord have been related to defects in cartilage development and delayed bone formation (Williams and Hughes, 1979; Maddox et al., 1997; Watanabe and Yamada, 1999). Therefore, further studies about the extent of ossification would be necessary to understand the skeletal and the temporal aspects of how the phenotype is produced in PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  homozygous animals.

Most major organs of PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  homozygous mice showed a reduction in size (20.1% to 43.2%) proportional to the reduction of body weight (37.1%; Table 2) when compared to control animals. Nonetheless, the weight of the brain was only marginally reduced in PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  homozygotes (5.7%) and constituted 2.27% of the total body weight compared with 1.53% for control mice. As the size of the cranium reflects the size of the brain and is regulated by its contents (Williams and Hughes, 1978), this result may explain the changes in the morphometric features of the head observed in PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  homozygotes. In other mouse models showing dwarfism, it has also been noted that the brain does not decrease proportionally to total body weight. It has been speculated that because the brain grows more rapidly in fetal development than other organs (Bishop and Wahlsten, 1999), it is less impacted by late deficiencies, which could provoke effects on other major organs that enlarge predominantly in the postnatal period (Williams and Hughes, 1979; Lupu et al., 2001). Therefore, a postnatal deficiency caused by the PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  mutation could explain the significant increase in weight of kidneys ( $P < 0.01$ ) and testes ( $P < 0.001$ ) in relation to body weight observed in PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  homozygotes when compared to their control littermates, and it is in accordance with the observation that reduction

in growth of the mutant animals starts a few days after birth.

### 3.6. **Fertility of PLC- $\beta$ <sub>1 $\beta$ LG</sub> homozygous animals**

In addition to growth and viability, fertility was also decreased in those PLC- $\beta$ <sub>1 $\beta$ LG</sub> homozygotes that survived until the age of sexual maturity. All matings between homozygous animals failed to produce any offspring. To determine whether the fertility problem could be attributed to one particular gender, some PLC- $\beta$ <sub>1 $\beta$ LG</sub> homozygotes were mated to nontransgenic B6CBAF1 mice. Only 2 out of 11 (18%) homozygous males and 1 out of 10 (10%) homozygous females produced offspring when mated to nontransgenic animals, indicating that the low reproductive rate of PLC- $\beta$ <sub>1 $\beta$ LG</sub> homozygotes affects both males and females. All the offspring obtained from these matings ( $n=53$ ) were determined to be transgenic and phenotypically normal.

In the report by Kim et al. (1997), no indication about the fertility of PLC- $\beta$ <sub>1<sup>-/-</sup></sub> knockout mice was provided. However, in a later study using the same model, sperm from PLC- $\beta$ <sub>1<sup>-/-</sup></sub> males showed a significant decrease in the spontaneous acrosome reaction and a decrease in the fertilization rate and embryo development in vitro (Choi et al., 2001). The authors concluded that these factors may be responsible for the low reproductive rate of PLC- $\beta$ <sub>1<sup>-/-</sup></sub> knockout mice. Male infertility was also reported in homozygous mice for another transgene-induced insertional mutation in the *PLC- $\beta$ 1* gene (PLC- $\beta$ <sub>1TC</sub>), but only in older animals and due to the absence of coupling (Böhm et al., 2002). On the other hand, other studies suggest that PLC- $\beta$ 1 may also play a role in oocyte maturation (Avazeri et al. 2000) and in oocyte activation after fertilization (Dupont et al., 1996). Although further studies are needed to investigate the fertilization and development capacity of both spermatozoa and oocytes from PLC- $\beta$ <sub>1 $\beta$ LG</sub> homozygotes, preliminary studies revealed that motile sperm can be recovered from the epididymis of PLC- $\beta$ <sub>1 $\beta$ LG</sub> homozygous males. In addition, mature metaphase II oocytes were recovered from the oviducts of a few PLC- $\beta$ <sub>1 $\beta$ LG</sub> homozygous females after standard superovulation treatment (data not shown).

### 3.7. Identification and characterization of a hybrid *PLCβ1-βLG* mRNA

The expression of the *PLC-β1* gene in *PLC-β1<sub>βLG</sub>* homozygotes was first analyzed in the brain, where this gene is highly expressed (Bahk et al., 1994; Watanabe et al., 1998). Several combinations of primers (see Section 2.6) were used to amplify the *PLC-β1* cDNA by RT-PCR. Whereas no amplification was observed using *PLC-β1* primers alone, a 657-bp product was obtained with primers BLGE6R and PLCB1-2F, located in exon 6 of the goat *βLG* gene and exon 30 of the mouse *PLC-β1* gene, respectively. Sequencing of this 657-bp product confirmed that a hybrid mRNA between the mouse *PLC-β1* and the goat *βLG* genes is transcribed in the brain of *PLC-β1<sub>βLG</sub>* homozygotes. Subsequently, a set of primers was designed to further characterize this hybrid mRNA by RT-PCR. We found that it consisted of a truncated mouse *PLC-β1* mRNA (from exon 1 to 30) fused to all goat *βLG* exons and followed by a poly(A) tail. For the production of this fusion transcript, the 410-bp-long goat *βLG* proximal promoter region is spliced out from pre-mRNA. The spliceosome recognizes a potential 3'-acceptor splice site in the exon 1 of caprine *βLG* (CTCCCTGCAG<sup>^</sup>AGCTCAGAAG). This sequence is in accordance with the consensus sequence (T/C)<sub>n</sub>N(C/T)AG<sup>^</sup>G described by Mount (1982). The production of this fusion transcript generates a STOP codon in the goat *βLG* sequence, resulting in 10 amino acids (SSEARPQLQP) fused to the truncated *PLC-β1* protein when this fusion mRNA is translated.

Two different transcripts of the *PLC-β1* gene of 5.4-kb (*PLC-β1a*) and 7.2-kb (*PLC-β1b*), originated by alternative RNA splicing, have been isolated from a rat brain cDNA library (Bahk et al., 1994). These transcripts encode two polypeptides of 150 and 140 Kda, respectively, which differ in the carboxyl-terminal sequence (residues 1142-1173 of *PLC-β1b* and residues 1142-1216 of *PLC-β1a*, corresponding to the predicted exon 32). These two isoforms have also been described in the mouse (GenBank: U85712 and U85713). Nonetheless, we detected a single *PLC-β1* mRNA in homozygous *PLC-β1<sub>βLG</sub>* mice, likely because the transgene integration in the intron 30 of the *PLC-β1* gene prevents the occurrence of the alternative splicing.

### 3.8. Analysis of the expression of the hybrid *PLC $\beta$ 1- $\beta$ LG* gene in several tissues

The expression of the hybrid *PLC $\beta$ 1- $\beta$ LG* gene was analyzed in different tissues using specific primers for the amplification of a 165-bp-long product by RT-PCR. The hybrid mRNA was detected in all tissues tested from *PLC- $\beta$ 1 $\beta$ LG* homozygotes (spleen, uterus, liver, heart, brain, lungs, spinal cord, kidney, and muscle; Fig. 4A). Although expression of the *PLC- $\beta$ 1* gene has previously been described in several tissues in rats and humans, in the mouse, it has only been analyzed in different areas of the brain (Bahk et al., 1994; Watanabe et al., 1998; Caricasole et al., 2000). Therefore, to rule out an alteration in the *PLC- $\beta$ 1* gene expression pattern caused by the  $\beta$ LG regulatory sequences, we next analyzed by RT-PCR the presence of a 367-bp product, expanding from exon 27 to 30 of the mouse *PLC- $\beta$ 1* gene, in several tissues from both *PLC- $\beta$ 1 $\beta$ LG* homozygotes and nontransgenic animals. Expression was detected in the spleen, uterus, liver, heart, brain, lungs, kidney, muscle, testicles and seminal vesicle in all animals analyzed (data not shown). Thus, our results in nontransgenic control mice demonstrate that the endogenous mouse *PLC- $\beta$ 1* gene is normally expressed in several tissues other than the brain, similar to the results previously reported in humans, and that the expression pattern of the hybrid mRNA in *PLC- $\beta$ 1 $\beta$ LG* homozygotes is equivalent to that of the endogenous *PLC- $\beta$ 1* gene in nontransgenic animals, at least for the tissues analyzed in this study. Next, expression levels of *PLC- $\beta$ 1* were analyzed by real-time quantitative PCR in several tissues of *PLC- $\beta$ 1 $\beta$ LG* homozygotes and nontransgenic mice, using SYBR green I. Because of the high levels of *PLC- $\beta$ 1* expression in the brain, a sample of this tissue was used as calibrator. Overall, *PLC- $\beta$ 1* expression levels in nontransgenic animals were higher than the expression of the hybrid mRNA in *PLC- $\beta$ 1 $\beta$ LG* homozygotes for all tissues analyzed (Fig. 4B). These results indicate that expression of *PLC- $\beta$ 1* in *PLC- $\beta$ 1 $\beta$ LG* homozygotes is clearly diminished as a result of the transgene insertion.

*PLC- $\beta$*  isozymes possess a COOH-terminal sequence which is essential for their diverse cellular locations and activation pathways (Park et al., 1993; Kim et al., 1996). While  $\beta$ -type isozymes of PLC at the plasma membrane are activated by  $G\alpha_q$  class of heterotrimeric G proteins, the regulatory mechanism of the nuclear

PLC- $\beta$ 1 is based on phosphorylative events (Xu et al., 2001; Martelli et al., 2001). This COOH-terminal sequence contains three regions (region 1: 911-928; region 2: 1055-1072; region 3: 1109-1126) with a high proportion of basic residues that are highly conserved (Kim et al., 1996). A study performed using cell lines determined that residues 903-1142 were necessary to activate PLC- $\beta$  isozymes, as this was the interaction site for G $\alpha$ q class of G proteins. However, substitution of a basic cluster in region 3 (residues 1109-1126) had no effect in the activation by G $\alpha$ q (Kim et al., 1996). The hybrid mRNA transcribed in PLC- $\beta$ 1 $_{\beta$ LG homozygous animals generates a truncated protein, in which only a portion of PLC- $\beta$ 1 region 3 is missing (from residues 1114 to 1126) and, therefore, this PLC- $\beta$ 1 protein could be activated. On the other hand, differential subcellular localization of the two PLC- $\beta$ 1 isoforms has been reported, although the biological significance of this localization remains unclear (Kim et al., 1996; Bahk et al., 1998). Whereas residues 903-1030 are required for the association of PLC- $\beta$ 1 with the particulate fraction, a cluster of lysine residues between positions 1055-1072 is necessary for nuclear location (Kim et al., 1996). These residues are common to both isoforms and are also present in the truncated PLC $\beta$ 1 protein. Taken together, all these data suggest that the hybrid PLC $\beta$ 1- $\beta$ LG mRNA contains all the essential information to produce a protein that can be located and activated both in the nucleus and the cytosol.

### **3.9. Analysis of the PLC- $\beta$ 1 protein**

Western blot analysis performed with the monoclonal antimouse PLC- $\beta$ 1 antibody resulted in the detection of two bands of 150 and 140 Kda (corresponding to PLC- $\beta$ 1a and PLC- $\beta$ 1b, respectively) in the brain homogenate from a nontransgenic mouse. Moreover, a band of 100 Kda corresponding to the calpain cleavage product of the native 150-Kda PLC- $\beta$ 1 was also observed. None of these bands could be detected in the brain homogenate from the PLC- $\beta$ 1 $_{\beta$ LG homozygous animal. Furthermore, no other bands that could correspond to the PLC- $\beta$ 1 truncated protein were found (data not shown).

Because of the reduced expression levels of the hybrid PLC $\beta$ 1- $\beta$ LG mRNA in PLC- $\beta$ 1 $_{\beta$ LG homozygotes, as found by real-time quantitative PCR, low levels of the



PLC- $\beta 1$  truncated protein likely account for the failure to detect this protein by Western blot. Nonetheless, other possibilities exist, such as the translation of the hybrid mRNA into an unstable protein that is rapidly degraded, or into a protein with a different conformation that the anti-PLC- $\beta 1$  antibody is unable to recognize. In these situations, the phenotypic differences between homozygous PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  mice and previous PLC- $\beta 1$  knockouts (Kim et al., 1997; Böhm et al., 2002) could result from certain level of PLC- $\beta 1$  activity in PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  homozygotes. Alternatively, although much less likely, if no PLC- $\beta 1$  protein is indeed produced, differences in the genetic background could be responsible for the distinct phenotype of PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  homozygotes (B6CBAF1 background) when compared to PLC- $\beta 1_{TC}$  mutants (NMRI background; Böhm et al., 2002) and PLC- $\beta 1^{-/-}$  knockouts (background not reported; Kim et al., 1997).

### **3.10. Conclusions**

We report a new  $\beta LG$  transgene-induced insertional mutation in the mouse *PLC- $\beta 1$*  gene (PLC- $\beta 1_{\beta LG}$ ) that results in high postnatal mortality, reduced growth and adult body size, altered morphometric features of the head, and infertility in homozygous animals. A hybrid mRNA between the mouse *PLC- $\beta 1$*  and the goat  $\beta LG$  genes is transcribed in several tissues of PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  homozygotes, with the same expression pattern as the *PLC- $\beta 1$*  gene but at reduced levels. This transcript could produce a truncated but still active PLC $\beta 1$  protein, but the protein could not be detected by Western blot. Although further studies are needed to understand the skeletal defects and the temporal aspects of how the phenotype is produced in PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  homozygous animals, the PLC- $\beta 1_{\beta LG}$  mutant mouse represents a valuable experimental model to investigate the role of the *PLC- $\beta 1$*  gene in the molecular mechanisms underlying development, growth and fertility.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Dr. Jordi Franch, Department of Animal Medicine and Surgery, Universitat Autònoma de Barcelona, for the radiographic figures and assistance in the clinical analysis of the mutant animals. This work was financially supported by the CICYT project AGL2000-0687. M Ballester received a research scholarship (FI)

from AGAUR (Generalitat de Catalunya).

## **REFERENCES**

- Avazeri, N., Courtot, A-M., Pesty, A., Duquenne, C., Lefèvre, B., 2000. Cytoplasmic and nuclear phospholipase C- $\beta$ 1 relocation: role in resumption of meiosis in the mouse oocyte. *Mol. Biol. Cell* 11, 4369-4380.
- Bahk, Y.Y., Lee, Y.H., Lee, T.G., Seo, J., Ryu, S.H., Suh, P-G., 1994. Two forms of phospholipase C- $\beta$ 1 generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 269, 8240-8245.
- Bahk, Y.Y., Song, H., Baek, S.H., Park, B.Y., Kim, H., Ryu, S.H., Suh, P-G., 1998. Localization of two forms of phospholipase C- $\beta$ 1, a and b, in C6Bu-1 cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1389, 76-80.
- Bishop, K.M., Wahlsten, D., 1999. Sex and species differences in mouse and rat forebrain commissures depend on the method of adjusting for brain size. *Brain Res.* 815, 358-66.
- Böhm, D., Schwegler, H., Kotthaus, L., Nayernia, K., Rickmann, M., Köhler, M., Rosenbusch, J., Engel, W., Flügge, G., Burfeind, P., 2002. Disruption of PLC- $\beta$ 1-mediated signal transduction in mutant mice causes age-dependent hippocampal mossy fiber sprouting and neurodegeneration. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 584-601.
- Caricasole, A., Sala, C., Roncarati, R., Formenti, E., Terstappen, G.C., 2000. Cloning and characterization of the human phosphoinositide-specific phospholipase C-beta 1 (PLC $\beta$ 1). *Biochim.Biophys.Acta* 1517, 63-72.
- Choi, D., Lee, E., Hwang, S., Jun, K., Kim, D., Yoon, B-K., Shin, H-S., Lee, J-H., 2001. The biological significance of phospholipase C  $\beta$ 1 gene mutation in mouse sperm in the acrosome reaction, fertilization, and embryo development. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18, 305-310.
- Dupont, G., McGuinness, O.M., Johnson, M.H., Berridge, M.J., Borgese, F., 1996. Phospholipase C in mouse oocytes: characterization of  $\beta$  and  $\gamma$  isoforms and their possible involvement in sperm-induced  $Ca^{2+}$  spiking. *Biochem. J.* 316, 583-591.

- Ibáñez, E., Molist, J., Vidal, F., Egozcue, J., Santaló, J., 2001. Assessment of the proportion of transgene-bearing sperm by Fluorescence In Situ Hybridization: A novel approach for the detection of germline mosaicism in transgenic male founders. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 166-172.
- Kim, C.G., Park, D., Rhee, S.G., 1996. The role of carboxyl-terminal basic amino acids in  $G_{q\alpha}$ -dependent activation, particulate association, and nuclear localization of Phospholipase C- $\beta$ 1. *J. Biol. Chem* 271, 21187-21192.
- Kim, D., Jun, K.S., Lee, S.B., Kang, N-G., Min, D.S., Kim, Y-H., Ryu, SH., Suh, P-G., Shin, H-S., 1997. Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature* 389, 290-293.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Livak, K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- Lupu, F., Terwilliger, J.D., Lee, K., Segre, G.V., Efstratiadis, A., 2001. Roles of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev. Biol.* 229, 141-62.
- Maddox, B.K, Garofalo, S., Smith, C., Keene, D.R., Horton, W.A., 1997. Skeletal development in transgenic mice expressing a mutation at Gly574Ser of Type II Collagen. *Dev. Dynamics* 208, 170-77.
- Martelli, M.A., Bortul, R., Tabellini, G., Aluigi, M., Peruzzi, D., Bareggi, R., Narducci, P., Cocco, L., 2001. Re-examination of the mechanisms regulating nuclear inositol lipid metabolism. *FEBS Letters* 505, 1-6.
- Meisler, M.H., 1992. Insertional mutation of 'classical' and novel genes in transgenic mice. *Trends Genet.* 8, 341-344.
- Mount, S.M., 1982. A catalogue of splice junction sequences. *Nucl. Acids Res.* 10, 459-472.
- Park, D., Jhon, D-Y., Lee, C-W., Ryu, S.H., Rhee, S.G., 1993. Removal of the carboxyl-terminal region of Phospholipase C- $\beta$ 1 by calpain abolishes activation by  $G_{aq}$ . *J. Biol. Chem.* 268, 3710-3714.
- Pena, R.N., Ibáñez, E., Folch, J.M., Vidal, F., Sánchez, A., Santaló, J., 2001. Expression mammary gland-specific of the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene comprising a 410 bp-long promoter in transgenic mice. *Transgenics* 3, 175-

182.

- Rana, R.S., Hokin, L.E., 1990. Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiol. Rev.* 70, 115-164.
- Rhee, S.G., Bae, Y.S., 1997. Regulation of phosphoinositide-specific Phospholipase C Isozymes. *J. Biol. Chem.* 272, 15045-15048.
- Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.I. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., Lai, F. A., 2002. PLC $\zeta$ : a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129, 3533-3544.
- Song, C., Hu, C-D., Masago, M., Kariya, K., Yamawaki-Kataoka, Y., Shibatohe, M., Wu, D., Satoh, T., Kataoka, T., 2001. Regulation of a novel human Phospholipase C, PLC $\epsilon$ , through membrane targeting by Ras. *J. Biol. Chem.* 276, 2752-2757.
- Watanabe, M., Nakamura, M., Sato, K., Kano, M., Simon, M.I., Inoue, Y., 1998. Patterns of expression for the mRNA corresponding to the four isoforms of phospholipase C beta in mouse brain. *Eur.J.Neurosci.* 10, 2016-2025.
- Watanabe, H., Yamada, Y., 1999. Mice lacking link protein develop dwarfism and craniofacial abnormalities. *Nat. Genet.* 21, 225-229.
- Williams, J.P., Hughes, S.M., 1978. Catch-up growth in the rat skull after retardation during the suckling period. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 45, 229-235.
- Williams, J.P., Hughes, S.M., 1979. Growth of the skull in the mutant dwarf mouse. *Acta Anat.* 105, 461-468.
- Woychik, P.R., Alagramam, K., 1998. Insertional mutagenesis in transgenic mice generated by the pronuclear microinjection procedure. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 1009-1017.
- Xu, A., Suh, P-G., Marmy-Conus, N., Pearson, R.B., Seok, O.Y., Cocco, L., Gilmour, R.S., 2001. Phosphorylation of nuclear Phospholipase C  $\beta$ 1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2981-2990.

**Table 1.** Comparison of body, skull and long bones sizes between animals homozygous for the *PLC-β1<sub>βLG</sub>* mutation (mutants) and control littermates of the same sex.

	Length (cm ± SD)			Percent body length		
	Mutants	Control	Mutants/Control <sup>a</sup>	Mutants	Control	Mutants/Control <sup>a</sup>
Body length <sup>b</sup>	7.8 ± 0.5	9.3 ± 0.5	84.1%*	–	–	–
Neck-rump length	5.8 ± 0.4	7.1 ± 0.4	81.2%*	74.3%	76.8%	96.7%*
Total skull length	2.2 ± 0.1	2.4 ± 0.2	91.0%*	27.6%	25.5%	108.2%*
Neurocranial length	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	90.7%*	18.4%	17.1%	107.8%*
Viscerocranial length	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2	95.8%	10.5%	9.3%	114.3%
Neurocranial width	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	97.1%*	14.0%	12.1%	115.8%*
Bizygomatic width	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	92.3%*	14.8%	13.4%	110.1%*
Humerus length	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	92.0%*	16.1%	14.7%	109.6%*
Ulna-radius length	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	95.7%*	16.8%	14.8%	114.0%*
Femur length	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1	89.9%*	19.8%	18.6%	107.1%*
Tibia length	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	95.0%	21.5%	19.2%	112.9%*

<sup>a</sup> Percentage of values in mutant animals relative to the values in control animals

<sup>b</sup> Crown-rump length values

Asterisks denote values that were significantly different between mutants and controls (P<0.05)

**Table 2.** Comparison of body and organ weights between animals homozygous for the *PLC-β1<sub>βLG</sub>* mutation (mutants) and control littermates of the same sex.

	Weight (mean ± SD)			Percent body weight		
	Mutants	Control	Mutants/Control <sup>a</sup>	Mutants	Control	Mutants/Control <sup>a</sup>
Body weight (g)	21.7 ± 2.0	34.5 ± 2.6	62.9%*	–	–	–
Brain (mg)	495.3 ± 0.4	524.9 ± 0.1	94.3%	2.27%	1.53%	148.3%
Heart (mg)	112.2 ± 0.1	176.8 ± 0.1	63.5%*	0.52%	0.51%	101.8%
Lungs (mg)	126.1 ± 0.1	181.8 ± 0.1	71.0%*	0.58%	0.53%	111.9%
Liver (mg)	1045.1 ± 0.1	1862.3 ± 0.3	56.8%*	4.83%	5.40%	90.6%
Spleen (mg)	68.7 ± 0.1	125.0 ± 0.1	60.5%*	0.32%	0.36%	95.8%
Pancreas (mg)	177.9 ± 0.1	240.1 ± 0.1	74.1%*	0.82%	0.70%	118.4%
Kidneys (mg)	138.8 ± 0.1	195.0 ± 0.1	72.2%*	0.64%	0.56%	114.7%*
Female genital tract (mg) (n=5)	94.1 ± 0.1	198.7 ± 0.1	58.1%	0.44%	0.59%	92.0%
Testis (mg) (n=2)	55.4 ± 0.1	70.6 ± 0.1	79.9%	0.26%	0.21%	121.8%*

<sup>a</sup> Percentage of values in mutant animals relative to the values in control animals

Asterisks denote values that were significantly different between mutants and controls ( $P < 0.05$ )

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** Altered phenotype in line Tg56 of  $\beta$ LG transgenic animals for the pPX(7.0) construct. (A) Two male siblings are shown: one homozygous (left) and one hemizygous (right) transgenic mouse. Note the smaller size of the homozygous animal. (B) Radiographic images of a homozygous (left) and a hemizygous (right) transgenic mouse. Note the abnormal curvature of the axial skeleton at the thoracic level, diagnosed as kyphosis (arrow), and the abnormal skull morphometry of the homozygous transgenic mouse.

**Figure 2.** Chromosomal localization of the  $\beta$ LG transgene insertion site in transgenic line Tg56. (A) Metaphase spread from a homozygous transgenic animal after FISH with a biotinylated transgene probe. The arrows point to the hybridization signals, which appear in a single chromosome pair. (B) Idiogram of mouse chromosome 2 (left) and two pairs of chromosomes 2 with DAPI banding (center) and after conversion to G banding (right). Transgene-specific hybridization signals are localized to band F3 of mouse chromosome 2. Hybridization signals on G-banded chromosomes have been added for better visualization of the localization of the transgene. (C) Schematic view of the  $\beta$ LG transgene integration site in the endogenous *PLC- $\beta$ 1* gene in line Tg56. Black boxes represent *PLC- $\beta$ 1* exons.

**Figure 3.** Growth curves of male (A) and female (B) progeny resulting from matings between hemizygous transgenic mice from line Tg56. Standard errors are indicated as bars in the graphs.

**Figure 4.** Analysis of expression of *PLC- $\beta$ 1* mRNA in mouse tissues. (A) Partial amplification of the cDNA hybrid sequence between the mouse *PLC- $\beta$ 1* gene (exon 30) and the goat  $\beta$ LG gene (exon 1) in several tissues from a  $PLC- $\beta$ 1_{\beta$ LG homozygote. The corresponding band of 165 bp is indicated with an arrow.  $\phi$ X: marker IX (Roche); -: non transgenic mouse. (B) Quantitative analysis of *PLC- $\beta$ 1* mRNA expression in different tissue samples from both homozygous and nontransgenic mice. NTC: negative control sample.

FIGURE 1

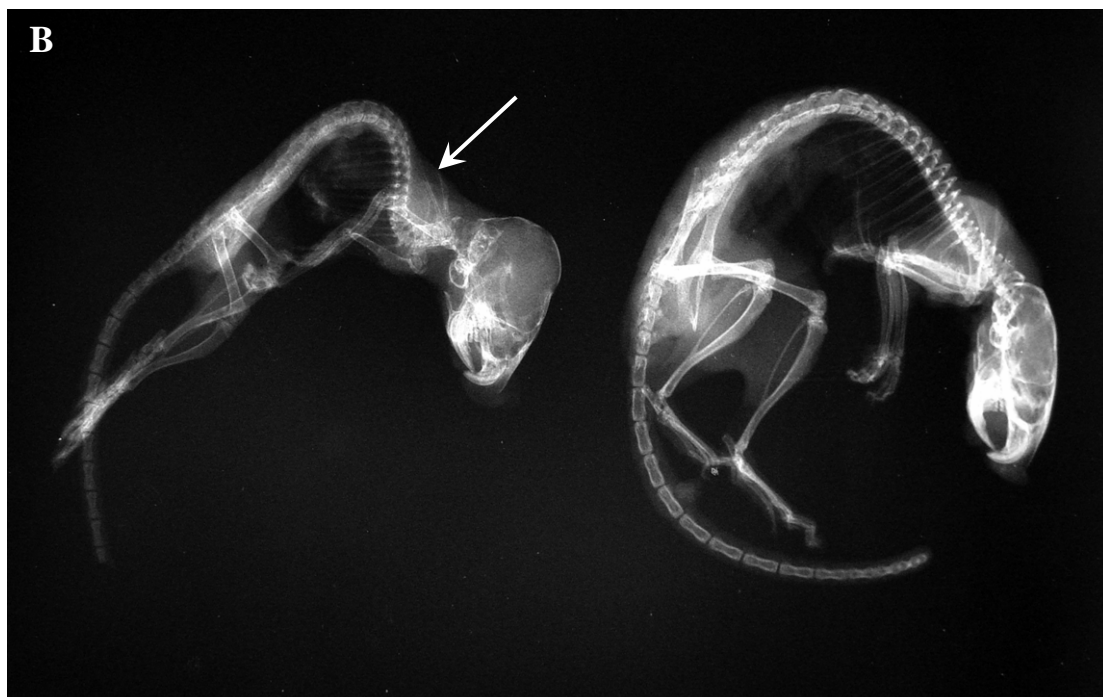
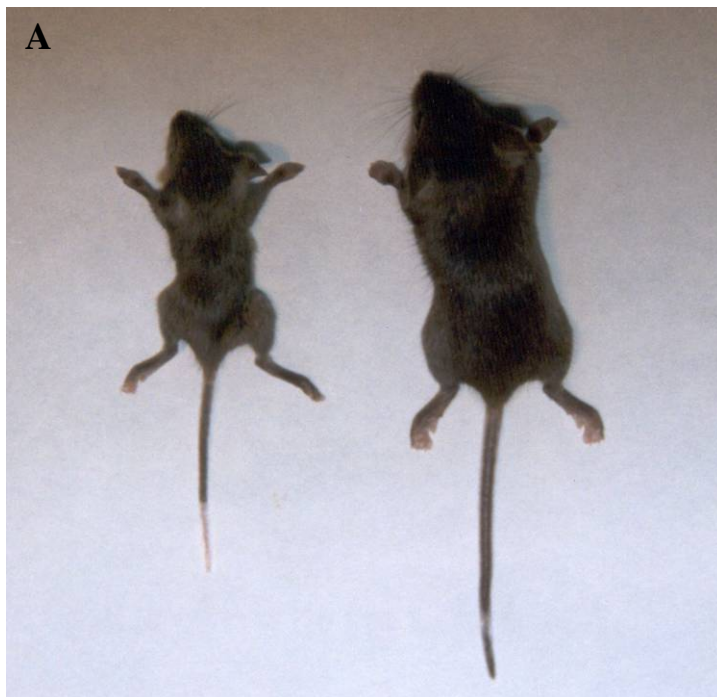




FIGURE 2

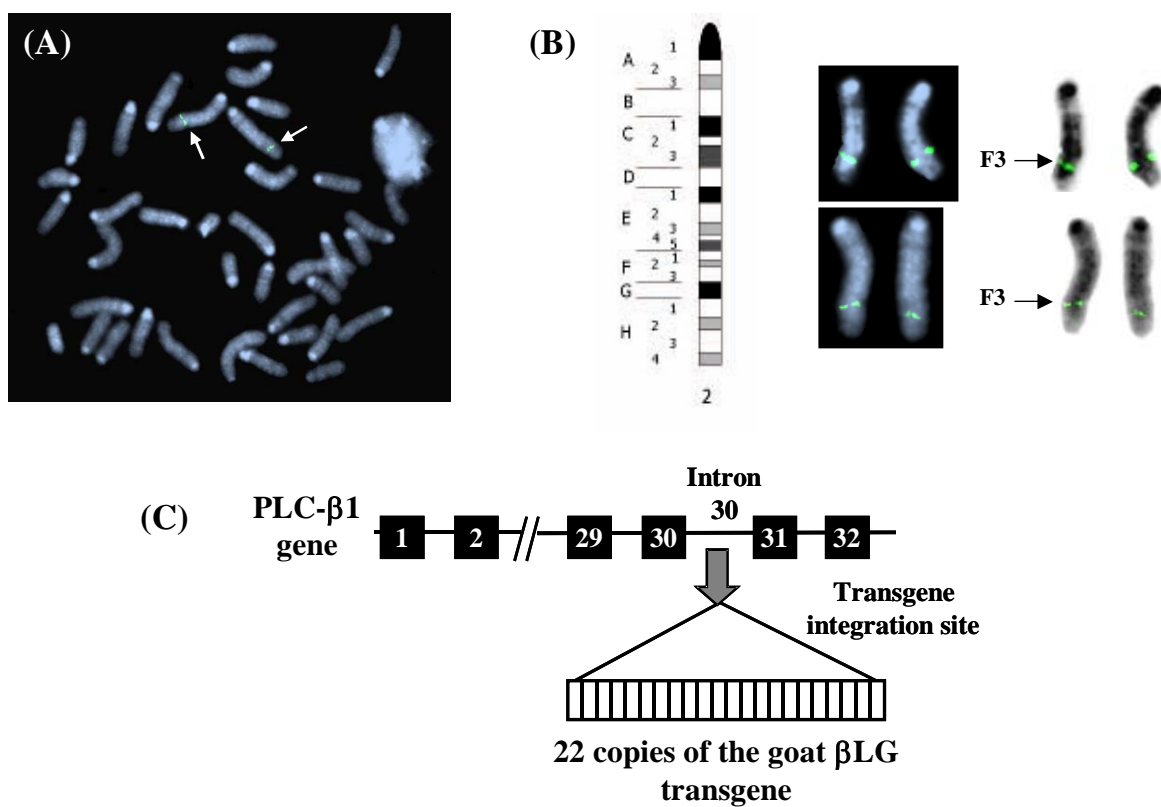


FIGURE 3

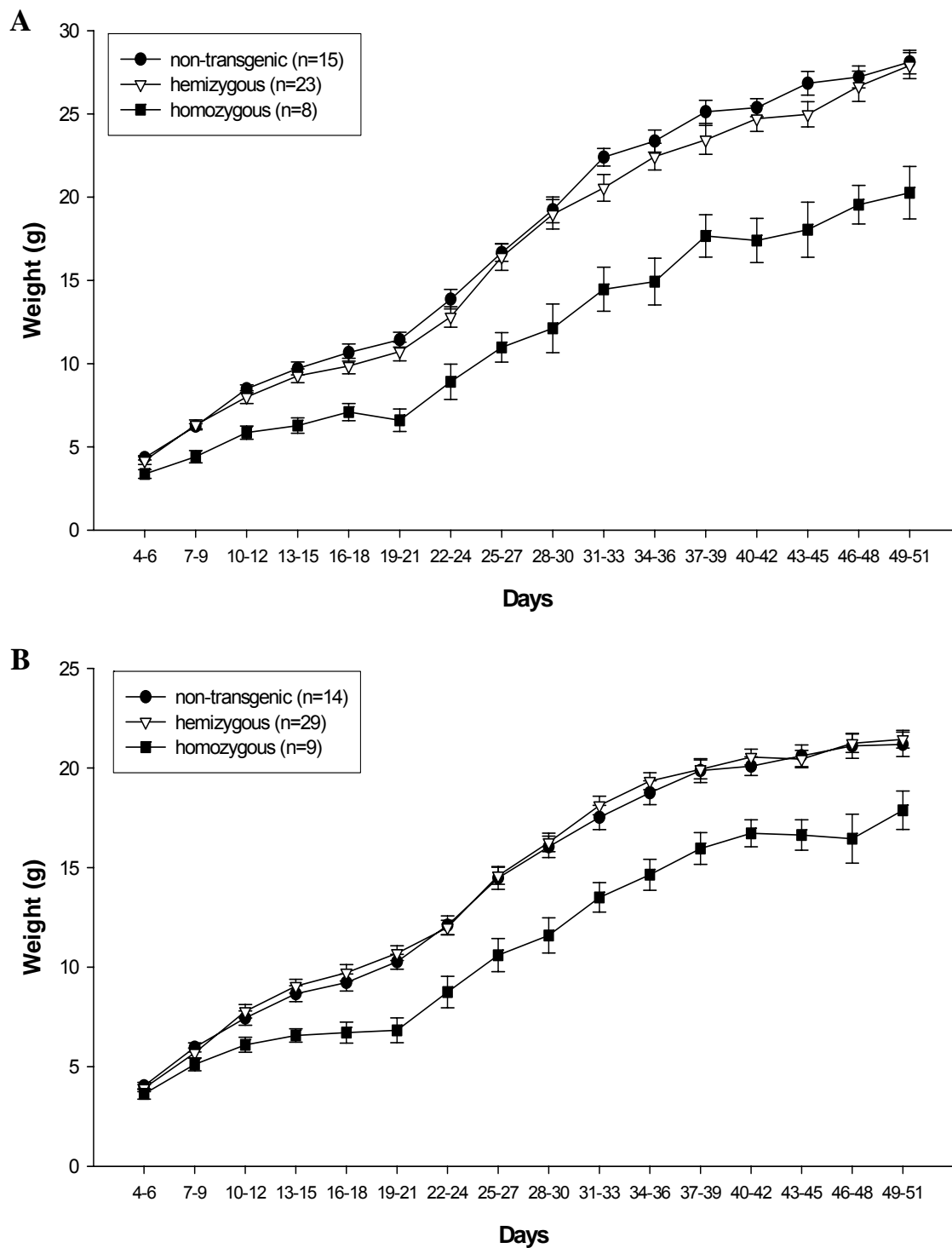
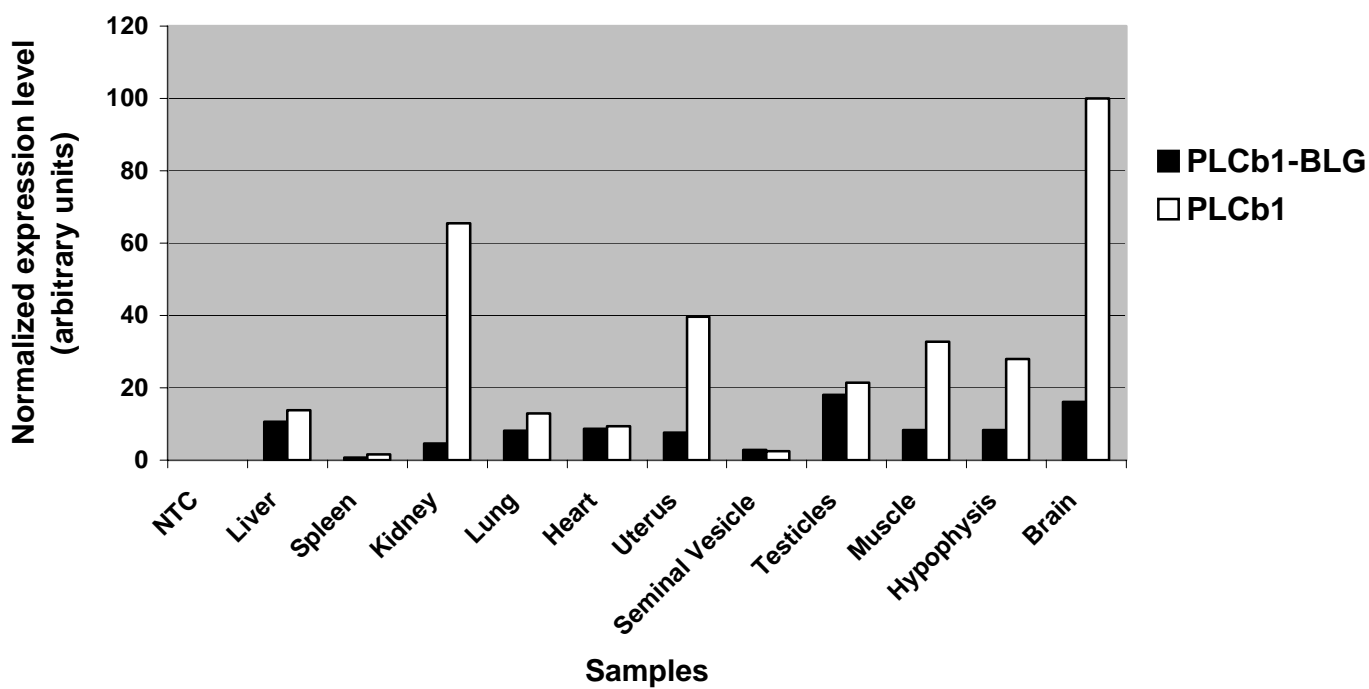
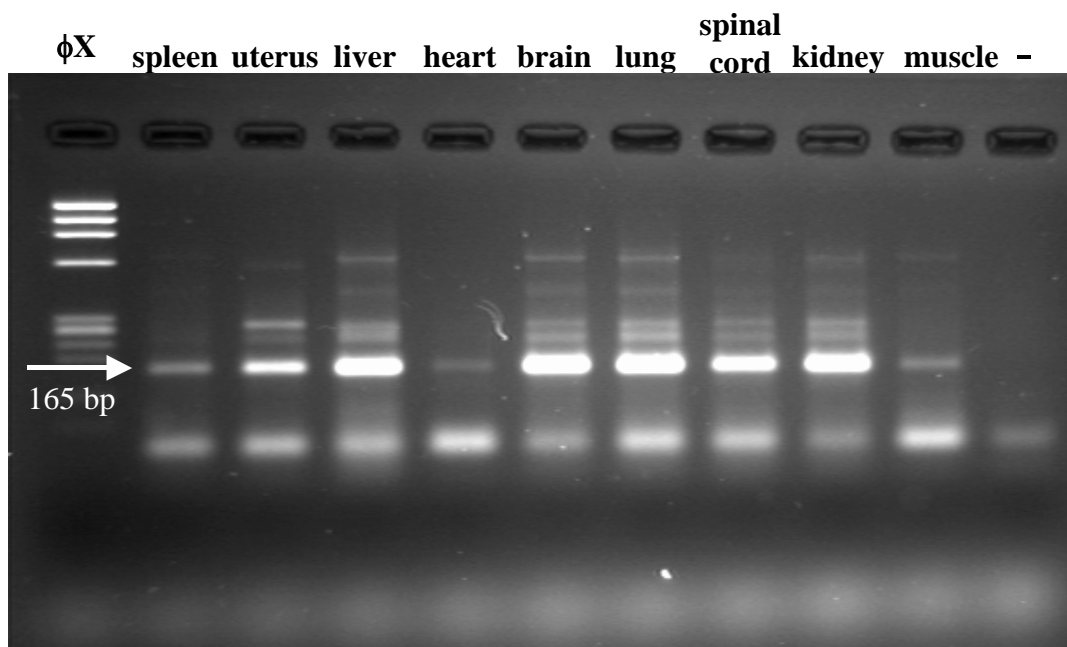


FIGURE 4



2. *“Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals”*

*Ballester M., Castelló A., Ibáñez E., Sánchez A. and Folch J.M.  
Biotechniques (2004) 37: 610-613*

**Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals**

Maria Ballester<sup>1\*</sup>, Anna Castelló<sup>1</sup>, Elena Ibáñez<sup>2</sup>, Armand Sánchez<sup>1</sup> and Josep M. Folch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain

<sup>2</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain

**Keywords:** TaqMan assay, glucagon,  $\beta$ -lactoglobulin, transgenic mouse, goat.

**Word counts:** Abstract: 163; body of the manuscript: 1670

\*Corresponding author. Tel.: +34-93-581-4260; fax: +34-93-581-2106. *E-mail address:* [maria.ballester@uab.es](mailto:maria.ballester@uab.es) (M. Ballester).

**ABSTRACT**

In this paper, we describe a rapid and accurate real-time quantitative PCR-based system to determine transgene copy number in transgenic animals. We used the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method to analyse different transgenic lines without the requirement of a control sample previously determined by Southern blot analysis. To determine the transgene copy number in several mouse lines carrying a goat  $\beta$ -Lactoglobulin transgene, we developed a TaqMan® assay in which a goat genomic DNA sample was used as a calibrator. Moreover, we used the glucanase gene as a reference control because this gene is highly conserved between species and amplifies with the same efficiency and sensitivity in goat as in mouse. With this assay, we provide an alternative simple method to determine the transgene copy number, avoiding the traditional and tedious blotting techniques. The assay's discrimination ability from our results is of at least six copies and, similar to the limitations of the blotting techniques, the accuracy of the quantification diminishes when the transgene copy number is high.

## INTRODUCTION

The pronuclear microinjection technique has been used as an important tool for the production of transgenic animals. However, this procedure is characterized by random integration of the transgene, usually as multiple copies in tandem that vary in number between transgenic lines (1). Traditionally, the transgene copy number in both founders and G1 hemizygous transgenic mice has been analysed by blotting techniques (i.e., Southern blot analysis, dot blot, and slot blot), which are tedious and time-consuming methods that require a large amount of DNA sample for each assay. Moreover, the quantification by those methods is not accurate and gives ambiguous results.

With the emergence of the real-time quantitative PCR technology, different applications have been described for the analysis of transgenic organisms, such as the determination of transgene copy number in transformed plants (2) or the study of zygosity in transgenic animals (3,4).

Here we present a new application of the real-time quantitative PCR for transgene copy number determination in transgenic animals, characterized by the speed, high-throughput, sensitivity and accuracy of the TaqMan® methodology (5,6). For this purpose, we used the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (7) to compare the  $\Delta C_t$  [cycle threshold ( $C_t$ );  $C_t$  of target minus  $C_t$  of control gene] value of transgenic animal samples with unknown transgene copy numbers with the  $\Delta C_t$  of a known calibrator. Unlike the approach used by Tesson et al. (2002), the use of a control sample previously analyzed by Southern blot is not required in the current method. A goat genomic DNA sample, carrying a single copy of the  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta LG$ ) gene, was used as a calibrator to determine the transgene copy number in several caprine  $\beta LG$  transgenic mice lines. Moreover, we describe the primers and Taqman probe design that amplify with the same efficiency and sensitivity a highly conserved sequence of the glucagon gene in goat as in mouse samples that can be used for endogenous control gene amplification in both species.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and DNA Samples

Transgenic mice were previously generated by pronuclear microinjection of the pPX(7.0) construct, which contained 410 bp of the goat  $\beta$ LG proximal promoter region, the entire transcription unit of the  $\beta$ LG gene, and 1.9 kb of the 3' flanking region. Seven transgenic lines were obtained (Tg3, Tg19, Tg21, Tg29, Tg46, Tg60, and Tg56), and the number of transgene copies, ranging from 1 to 22, was estimated in these animals by Southern blot analysis (8).

For TaqMan copy number determination assays, we used genomic DNA isolated by the phenol-chloroform method (9) from the liver of founder and G1 hemizygous transgenic mice from the seven transgenic pPX(7.0) lines and from a goat liver. Prior to the assays, serial dilutions of genomic DNA samples (100, 50, 25, 12.5, and 6.25 ng) from a goat and a transgenic mouse (the founder of line Tg46, carrying one copy of the transgene as previously determined by Southern blot analysis) were prepared and used for the validation of the method.

### Primers and Probes Design

PCR primers and probes were designed using Primer Express<sup>TM</sup> software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and are shown in Table 1. For the transgene amplification, the primers GOATPROF1 and GOATPROR1 were used to obtain an 88-bp-long product of the proximal promoter of the caprine  $\beta$ LG gene (GenBank accession no. Z33881). The TaqMan MGB (minor groove binder; nonfluorescent quencher at the 3' end) probe was GOATPRO-TQ. To normalize the amount of DNA added to the PCRs, we used a highly conserved single copy gene that could be amplified with the same efficiency and sensitivity in goat as in mouse. Nucleotide similarity searches in the GenBank database with Blastn showed that the glucagon gene is highly conserved between different species. However, because little information is available on the goat genome, we sequenced the exon 4 of the goat glucagon gene (GenBank accession no. AY588290) to confirm the conservation of the caprine sequence. We then designed the primers (GLCOE4F and GLCOE4R) that amplified a 130-bp-long product of the exon 4 of the caprine glucagon gene and the TaqMan MGB probe (GLCO-TQ).



### Real-Time PCR Procedure

All samples were run in triplicate in a 25- $\mu$ L reaction volume containing 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), primers at a final concentration of 900 nM each, 250 nM probe, water to a 23- $\mu$ L final volume, and 2 $\mu$ L of the genomic DNA. The PCR was run in the ABI PRISM<sup>®</sup> 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) using the following amplification parameters: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Initial Validation of the Method

The use of the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method for relative quantification, a comparative technique in which a target gene is normalized to an endogenous control and relative to a calibrator, requires the PCR efficiencies of target and control genes to be approximately equal. Moreover, in our case, the use of a goat genomic DNA sample (with a single copy of the  $\beta LG$  gene) as a calibrator for transgenic mouse samples required that the PCR efficiencies and sensitivities of target and control genes in both species were similar. PCR efficiency can be calculated by plotting the  $C_t$  as a function of  $\log_{10}$  concentration of template (see Applied Biosystems user bulletin#2 at <http://www.appliedbiosystems.com>); the slope of the resulting trend line will be a function of the PCR efficiency, with a slope of  $-3.32$  indicating that the PCR reaction is 100% efficient.

To ensure that these requirements were met, prior to performing the TaqMan copy number assay, we generated standard curves for the transgene ( $\beta LG$  gene) and the endogenous control gene (glucagon gene) from both transgenic mouse and goat genomic DNA isolated from liver. We used this tissue because genomic DNA isolated from mouse tail biopsies using a standard proteinase K digestion method caused inhibition of real-time PCR (10). In mouse standard curves, a very efficient amplification was obtained, as indicated by the slope of the linear regression, and good correlation coefficients were observed (Figure 1). Slopes of  $-3.32$  and  $-3.39$  and correlation coefficients of 0.997 and 0.999 for the  $\beta LG$  and glucagon genes, respectively, were obtained in the goat (data not shown). Moreover, an absolute slope of 0.0638 ( $< 0.1$ ) was obtained in the goat when plotting the log input amount

versus  $\Delta C_t$ , permitting the use of the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method for the relative copy number quantification (see Applied Biosystems user bulletin#2).

### Taqman Copy Number Assay

TaqMan copy number determination assay in founder and G1 hemizygous pPX(7.0) transgenic mice was performed by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method using the glucagon gene as an endogenous control and a goat sample as a calibrator. The number of transgene copies had been previously estimated in these animals by Southern blot analysis (8), which permitted the validation of this method. Moreover, to determine the accuracy of the TaqMan assay, four to five G1 mice were analysed for each transgenic line, except for line Tg29 because the founder animal was a mosaic and did not transmit the transgene. In the transgenic samples, evaluation of  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  indicates the fold change in copy number of the goat  $\beta LG$  gene relative to the goat sample used as the calibrator. Because founders and G1 transgenic animals were hemizygous for the transgene while the goat sample (calibrator) was homozygous for the  $\beta LG$  gene, all results obtained were multiplied by a factor of two. The estimation of transgene copy number by the TaqMan assay was similar to the results previously obtained by Southern blot analysis in lines with a low copy number (<10) (Table 2). However, differences in the prediction of the number of copies were detected in transgenic mice from line Tg21 and in the founder of line Tg60 and can be attributed to the limitations of Southern blot quantification. Based on the equation that describes the exponential amplification of PCR,

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

the highest  $C_t$  difference between consecutive copy numbers is between one and two copies ( $\Delta C_t=1$ ). This  $C_t$  difference diminishes as the copy number increases, thus reducing the accuracy of the quantification when the copy number is high. As expected, standard deviation ( $SD$ ) of the copy number between mice of the same transgenic line is higher as the number of copies increases (Table 2). In this study, we demonstrate that the assay's discrimination ability is of at least six copies ( $SD$  of 0.144 in line Tg60). However, difficulties in differentiating between sequential copy numbers are shown in line Tg19, which has 18-20 copies of the transgene and an  $SD$  of almost 1 (0.946). On the other hand, when the copy number is very high (line

Tg56; approximately 40 copies), the  $C_t$ s for the transgene are out of the linear range of quantification, which makes it inaccurate.

In conclusion, here we present a simple method for the determination of the transgene copy number, based on the methodology described by Tesson et al. (2002). In this publication, the authors used a sample of known zygosity previously determined by Southern blot analysis to discriminate between heterozygous and homozygous transgenic animals. In contrast, in the present work, we can determine the transgene copy number in several mouse lines without the requirement of a known copy number mouse sample. We used as calibrator a DNA sample from the species in which the transgene was generated and the glucagon gene as an endogenous control. Although this method has been developed in transgenic mice for a caprine  $\beta LG$  transgene, it can also be applied in transgenic animals from other species and carrying different transgenes. In fact, the glucagon's primers and probe design reported here can be used directly for the analysis of transgenic mice for transgenes with different ruminant sequences because an exact match of primers and probe exists in mouse and ruminants species. However, a single nucleotide mismatch exists both in human and pig glucagon genes for one of the primers used. The real-time quantitative PCR-based system described here represents a rapid, reliable and accurate new tool for transgene copy number determination without the requirement of control sample previously quantified by blotting techniques.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was financially supported by the CICYT project AGL2000-0687. M Ballester received a research scholarship (FI) from AGAUR (Generalitat de Catalunya).

## **REFERENCES**

1. **Niemann, H., and W.A. Kues.** 2000. Transgenic livestock: premises and promises. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 277-293.
2. **Ingham, D.J., S. Beer, S. Money, and G. Hansen.** 2001. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *BioTechniques* 31: 132-140.

3. **Tesson, L., J-M. Heslan, S. Ménoret, and I. Anegon.** 2002. Rapid and accurate determination of zygosity in transgenic animals by real-time quantitative PCR. *Transgenic Res.* 11: 43-48..
4. **Shitara, H., A. Sato, J-i. Hayashi, N. Mizushima, H. Yonekawa, and C. Taya.** 2004. Simple method of zygosity identification in transgenic mice by real-time quantitative PCR. *Transgenic Res.* 13: 191-194
5. **Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson, and D.H. Gelfand.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7276-7280.
6. **Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, and P.M. Williams.** 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.
7. **Livak, K.J., and T.D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25: 402-408.
8. **Pena, R.N., E. Ibáñez, J.M. Folch, F. Vidal, A. Sánchez, and J. Santaló.** 2001. Expression mammary gland-specific of the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene comprising a 410 bp-long promoter in transgenic mice. *Transgenics* 3: 175-182.
9. **Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl.** 1987 *Current protocols in molecular biology.* Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
10. **Burkhart, C.A., M.D. Norris, and M. Haber.** 2002. A simple method for the isolation of genomic DNA from mouse tail free of real-time PCR inhibitors. *J. Biochem. Biophys. Methods* 52: 145-149.

**Table 1.** Primers and Probes.

Target Gene	Primers and Probes	Sequence
$\beta$ LG	GOATPROF1 (Forward)	5'-TGGAAGAAGGCCTCCTATTGTC-3'
	GOATPROR1 (Reverse)	5'-AGGTTCCCGGAATCCTACTTG-3'
	GOATPRO-TQ (TaqMan MGB Probe)	<b>6FAM</b> -5'-TCGTAGAGGAAGCCACC-3'
Glucagon	GLCOE4F (Forward)	5'-AACATTGCCAAACGTCATGATG-3'
	GLCOE4R (Reverse)	5'-GCCTTCCTCGGCCTTTCA-3'
	GLCO-TQ (TaqMan MGB Probe)	<b>VIC</b> -5'-ACATGCTGAAGGGACC-3'

*$\beta$ LG*,  $\beta$ -Lactoglobulin; MGB, minor groove binder; FAM, 6-carboxy-fluorescein.

**Table 2.** Correlation between Taqman and Southern Blot assays for transgene copy number determination.

Transgenic lines	Number of copies by Southern Blot Analysis		Number of copies by Taqman assay		
	G0	G1 (n) <sup>a</sup>	G0	G1 (n) <sup>a</sup>	SD <sup>b</sup>
Tg 46	1	1 (1)	1	1 (5)	0.072
Tg 21	5	6 (1)	3	3 (5)	0.082
Tg 3	5	5 (1)	4	4 (4)	0.142
Tg 60	11	6 (1)	7	6 (5)	0.144
Tg 19	10	15 (1)	16-18	18-20 (5)	0.946
Tg 29	11	N.D.	14	N.D.	N.D.
Tg 56	>20	22 (1)	~40	~45 (4)	5.217

~, approximately; N.D., not determined.

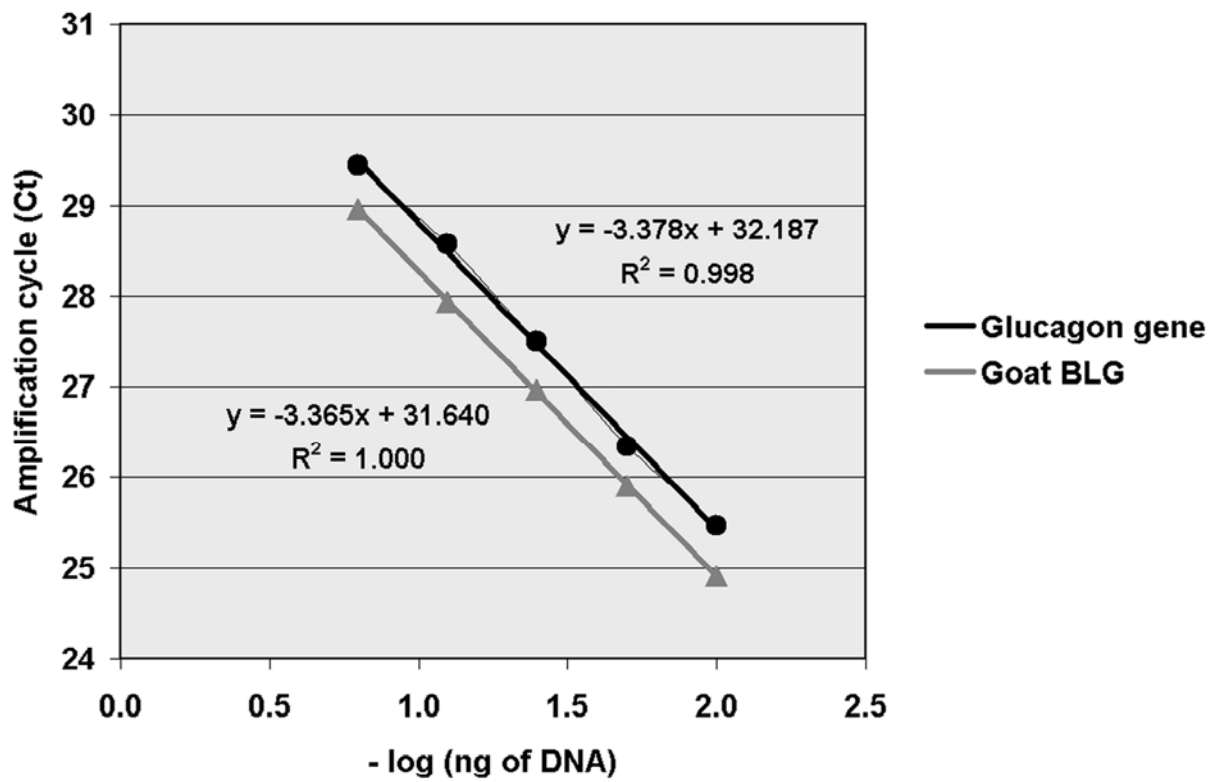
<sup>a</sup> Total number of transgenic mice analysed in different lines by Southern blot analysis and TaqMan assay.

<sup>b</sup> Standard deviation of copy number determined among mice of the same transgenic line.

**FIGURE LEGEND**

**Figure 1.** Standard curves for the  $\beta$ -Lactoglobulin ( *$\beta$ LG*) transgene and the glucagon gene in serially diluted (2-fold) DNA samples from the transgenic founder animal of line Tg46, which carries a single copy of the  *$\beta$ LG* transgene. A very efficient amplification was obtained, as indicated by the slopes of the standards curves.  $C_t$ , cycle threshold.

FIGURE 1





3. *“Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone in the mammary gland of transgenic mice”*

*Ballester M., Sánchez A., Santaló J., Folch J.M. and Ibáñez E.  
Artículo enviado a Theriogenology*

**Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone in the mammary gland of transgenic mice**

Maria Ballester<sup>1\*</sup>, Armand Sánchez<sup>1</sup>, Josep Santaló<sup>2</sup>, Josep M. Folch<sup>1</sup> and Elena Ibáñez<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain*

*<sup>2</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain*

*Keywords:* gonadotropins, human recombinant protein; goat  $\beta$ LG promoter regions; mammary gland; transgenic mice

\*Corresponding author. Tel.: +34-93-581-4260; fax: +34-93-581-2106. *E-mail address:* [maria.ballester@uab.es](mailto:maria.ballester@uab.es) (M. Ballester).

**ABSTRACT**

The human follicle-stimulating hormone (hFSH) is a pituitary glycoprotein composed of two subunits ( $\alpha$  and  $\beta$ ) which are post-translationally modified. These modifications are essential for the proper folding and secretion of the hormone. Nowadays this protein is obtained from mammalian cellular fermentors, and it is extensively used in the treatment of human infertility. We have used a caprine  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ LG) expression cassette that has been previously obtained by our group to target the expression of the two hFSH subunits to the mammary gland of transgenic mice. The use of the mammary gland as a bioreactor offers the possibility to obtain high levels of post-translationally modified protein in a low-cost manner. Four lines of double (hFSH $\alpha/\beta$ ) transgenic mice that stably transmitted the transgenes were obtained and hFSH $\alpha$  and  $\beta$  mRNA was detected by RT-PCR in the mammary gland of lactating females from all four transgenic lines. The hFSH protein was present in the mammary gland of the lactating females but could not be detected in the milk by Western blot, probably due to low levels of transgene expression (under 1  $\mu$ g/ml).

## **INTRODUCTION**

Follicle-stimulating hormone (FSH) is a complex heterodimeric glycoprotein secreted by the pituitary gland. Together with luteinizing hormone (LH), thyroid stimulating hormone (TSH), and the placental protein chorionic gonadotropin (CG), they comprise the glycoprotein hormone family. These hormones share a common  $\alpha$  subunit, whereas a  $\beta$  subunit confers the unique biological specificity for each hormone. Their biological activity is dependent on the presence of intact non-covalently associated dimers (Pierce and Parsons, 1981). The  $\alpha$  subunit has two N-linked oligosaccharides while the  $\beta$  subunits contain either one (LH and TSH) or two (CG and FSH) N-linked units that are implicated in proper folding, subunit assembly and secretion (Matzuk and Boime, 1988 a,b; Feng et al., 1995). FSH is essential for germ cell development and steroid hormone synthesis in the gonads both in males and females (Pierce and Parsons, 1981).

Pharmaceutical preparation of human FSH (hFSH), derived from the urine of postmenopausal women, was used for many years in the treatment of human infertility. However, through the application of recombinant DNA technology, the synthesis of recombinant hFSH has resulted in an increase in the quality and availability of this product for clinical use (Loumaye et al., 1995). Recombinant hFSH is currently produced by genetically engineered Chinese hamster ovary (CHO) cells (Keene et al., 1989; Olijve et al., 1996; Loumaye et al., 1998). It is used clinically in *in vitro* fertilization programs and for the treatment of the chronic anovulatory syndrome or luteal phase deficiency in women (Boime et al., 1999). Although mammalian cells have the advantages of performing the required FSH post-translational modifications, such as N-glycosylation and sialylation, the yield of recombinant protein production is low and the maintenance of fermentors is expensive. Nonetheless, the mammary gland of transgenic animals is able to perform the required modifications (Greenberg et al., 1991; Coulibaly et al., 2002) while allowing the production of a large volume of proteins, at relatively low cost, that are easy of collection and purification (Houdebine et al., 2000; Larrick and Thomas, 2001).

Our group has previously developed a construct (pPX7.0) with the caprine  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -LG) regulatory sequences resulting in high levels of mammary

gland specific expression in a position independent manner in transgenic mice (Pena et al., 2001). The objective of the present study was to use these promoter elements to target the expression of the two gene constructs for the human FSH alpha (hFSH $\alpha$ ) and human FSH beta (hFSH $\beta$ ) subunits, to the mammary gland of transgenic mice.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Construction of the transgenes***

The expression cassette pPX(7.0), which contains the goat  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ LG) regulatory sequences (410 bp of the proximal promoter region and 2540 bp of 3' flanking region) has been previously described (Pena et al., 2001).

The coding regions of human FSH $\alpha$  (GenBank: J00149, M45956, M54956, V00484) and FSH $\beta$  (GenBank: M54912, M38644, M21219, M18536) subunit genes were amplified by PCR using genomic DNA isolated from human blood samples. The  $\alpha$  subunit fragment contained exon II, III, a fragment of exon IV including the stop codon, and the intervening sequences (2488 bp). The  $\beta$  subunit fragment included exon II, the second intron and a fragment of exon III containing the stop codon (1938 bp).

Using adaptor oligonucleotides we introduced *HindIII*, *SnaBI* and *NcoI*, *SalI* sites at the 5'- and 3'-ends, respectively, of the goat  $\beta$ LG proximal promoter regions. Furthermore, new *SalI* and *XbaI*, *SnaBI* cloning sites were introduced at the 5'- and 3'-ends of the goat  $\beta$ LG 3' flanking region, respectively. Subsequently, the two fragments were cloned into the plasmid PTZ19U, joined together at their *SalI* site, generating the expression cassette of the  $\beta$ LG gene. Then, we introduced new cloning sites in the two subunits of the human FSH. *NcoI* and *XhoI* sites were introduced at the 5'- and 3'-ends of the subunit  $\alpha$  and *RcaI* and *SalI* sites were introduced at the 5'- and 3'-ends of the subunit  $\beta$ . As the intron 3 of the subunit  $\alpha$  contains a *NcoI* site in its sequence, we generated two fragments cutting with this restriction enzyme (FSH  $\alpha$ : *NcoI*-*NcoI*, 2019 bp and *NcoI*-*XhoI*, 427 bp). Finally, these fragments were cloned into the *NcoI*-*SalI* sites of the expression cassette to obtain an independent constructs for each FSH subunit.

***Generation and analysis of transgenic mice***

The gel purified DNA inserts (PNSX-FSH $\alpha$  and PNSX-FSH $\beta$ ) were co-microinjected into one-cell pronuclear stage B6CBAF1 mouse embryos, using standard techniques (Hogan et al., 1994), in order to generate double transgenic mice. Transgenic animals were identified by double-PCR analysis of genomic DNA extracted from tail biopsy samples using the 6100 robot (Applied Biosystems). Primers GOAPF1 (5'-AGA GGG GGA CTT CCT GCT TGG-3') and FSHBETA12R (5'-CCC TGT AGA TGC AAA GTT GGA C-3') were used to amplify a 646 bp fragment spanning from the proximal promoter of the caprine  $\beta$ LG gene to intron 2 of the human FSH $\beta$  subunit gene. Primers FSHALFAE2F (5'-CTC CAT TCC GCT CCT GAT GTG-3') and FSHALFAI2R (5'-GAT GTG AAA ATT CAT CTA CAA AGG-3') were used to amplify a 394 bp product spanning from exon 2 to intron 2 of the human FSH $\alpha$  subunit gene.

***Determination of transgene zygosity and copy number by real-time quantitative PCR***

Zygosity of G2 transgenic mice was analyzed by real-time quantitative PCR analysis (Tesson et al., 2002) of genomic DNA prepared from tail biopsy samples. Primers and probes (Taqman<sup>®</sup> MGB probes; PE Applied Biosystems) were designed using Primer Express<sup>™</sup> software (PE Applied Biosystems). For transgene amplification, the primers GOATPROF1 (5'-TGG AAG AAG GCC TCC TAT TGT C-3') and GOATPROR1 (5'-AGG TTC CCG GAA TCC TAC TTG-3') were used to obtain a 88 bp long product of the proximal promoter of the caprine  $\beta$ LG gene. The probe was GOATPRO-TQ (5' FAM-TCG TAG AGG AAG CCA CC-3'). For the reference gene, mouse parathyroid hormone-like (PTHrP), the primers were PTHrPF (5'-AAG GGC AAG TCC ATC CAA GA-3') and PTHrPR (5'-TGA TTT CGG CTG TGT GGA TCT-3') and amplified a product 78 bp in length. The probe was PTHrP-TQ (5'VIC-TTC TTC CTC CAC CAT CTG-3'). All samples were run in triplicate in a 25  $\mu$ l reaction volume containing 2x Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM primer pairs for the PTHrP or 900 nM primer

pairs for the  $\beta$ LG, 250 nM of probe, water to a 23  $\mu$ l final volume, and 2 $\mu$ l of the genomic DNA. The PCR was run in the ABI PRISM<sup>®</sup> 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) using the following amplification parameters: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Zygosity was determined by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (Livak and Schmittgen, 2001) for relative quantification using as a calibrator a DNA sample from a hemizygous transgenic mouse from each of the transgenic lines.

Furthermore, transgene copy number in both founders (G0) and G1 hemizygous transgenic mice was determined by the real-time quantitative PCR system, without the requirement of a control sample previously determined by blotting techniques (Ballester et al., 2004a). A goat genomic DNA sample, carrying a single copy of the  $\beta$ LG gene, was used as a calibrator and the glucagon gene was used as a reference control.

### ***Analysis of mRNA expression***

Total RNA was isolated, using Trizol (Invitrogen), from several tissues (mammary gland, ovary, spleen, liver, kidney and salivary glands) of hemizygous transgenic females (G1) during the second lactation. The Thermoscript RT-PCR System (Invitrogen) was used for first strand cDNA synthesis by using oligodT, according to the supplier's protocol. Primers used to detect the FSH $\alpha$  and  $\beta$  subunits mRNA were FSH $\alpha$ E3F (5'-CAG AAT GCA CGC TAC AGG AA-3') / FSH $\alpha$ E4R2 (5'-CGT GTG GTT CTC CAC TTT GA-3'), amplifying a 218 bp long product, and FSH $\beta$ E2F (5'-GTG CTG GCT ACT GCT ACA CC-3') / BLGE6R (5'-ACC ACA GAG GCA CCG GCA GG-3'), amplifying a 281bp long product, respectively. The murine  $\beta$ -casein and  $\beta$ -actin encoding mRNAs were used as RT-PCR amplification controls. Primers used for  $\beta$ -casein and  $\beta$ -actin were  $\beta$ -csE6F, 5'-CAG AAG GTG AAT CTC ATG GGA CAG C-3' /  $\beta$ -csE7R2, 5'-GTG GAG TGG CAG GGA ATT GGA CGG-3' and  $\beta$ -actF1, 5'-GAC AGG ATG CAG AAG GAG AT-3' /  $\beta$ -actR1, 5'-TTG CTG ATC CAC ATC TGC TG-3', respectively.

***Analysis of FSH in mouse milk and mammary gland tissue***

Milk samples were harvested, as previously described (Ibañez et al., 1997), from G1 hemizygous transgenic females and non-transgenic control females at their second lactation and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Mammary glands were collected from the same females, after euthanasia, and also stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Prior to analysis, mouse milk was diluted 1:3 in distilled water and defatted by centrifugation at 16,000g for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Clear supernatants were mixed with 2x nonreducing Laemmli sample buffer and left unheated. Subsequently, samples were fractionated on a 12.5% SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The separated proteins were electrophoretically transferred onto a methanol-activated PVDF membrane (Bio-Rad) in a Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). The membrane was then incubated overnight in blocking buffer (3% BSA in TBS) with gentle shaking at  $4^{\circ}\text{C}$  and immunoblotting was carried out with the polyclonal rabbit antiserum to human alpha-subunit (AFP 5953689; A.F. Parlow, National Hormone & Pituitary Program). Immunocomplex detection was performed using the peroxidase labeled anti-rabbit antibody IgG (1:5000, Amersham Biosciences, UK) and chemiluminescence (ECL, Amersham Biosciences, UK) according to the manufacturer's protocols. Purified human pituitary FSH (EC-232-662-3, Sigma lot 32K1438, 7000 IU IRP 68/140 per mg) was added to non-transgenic mouse milk for positive controls.

Mammary gland homogenates were prepared from 10 mg of mammary gland tissue using an homogenization buffer (50 mM Tris-HCl, 0.27 M sucrose, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM  $\text{VO}_4$ , 10 mM Na  $\beta$ -glycerolphosphate, 5 mM Ppi, 1% Triton X-100, 1 mM Benzamidine, 1 mM PMSF, 0.1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) containing a protease inhibitor cocktail (Roche), and then centrifuged for 30 min at 25,000g at  $4^{\circ}\text{C}$ . A total of 40  $\mu\text{g}$  of protein concentrate in collected supernatants were fractionated on a 12.5% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) following the same procedure indicated above.



## RESULTS AND DISCUSSION

### *Generation of hFSH transgenic mice*

The DNAs encoding FSH $\alpha$  and  $\beta$  subunits were placed into a goat  $\beta$ LG expression cassette which contained 410 bp of proximal promoter region and 2.5 kb of 3' flanking region (Fig. 1). This cassette, which has been previously obtained by our group, is able to express the caprine  $\beta$ LG transgene in the mammary gland of transgenic mice in a position independent manner (Pena et al., 2001). We used FSH genomic constructs because the presence of intronic sequences has been reported to increase transcriptional efficiency in transgenic mice (Brinster et al., 1988; Choi et al., 1991; Whitelaw et al., 1991).

A total of 1254 one-cell mouse embryos were co-microinjected with an equimolar mix of the two constructs to generate double transgenic mice. To identify founder animals carrying transgenic sequences, a double-PCR analysis of tail purified genomic DNA was performed. A total of 9 transgenic founders (#6, 7, 12, 19, 22, 40, 42, 51, 545) were identified among the 83 live-born progeny, three of which carried only the hFSH $\alpha$  construct (#6 and 51) or the hFSH $\beta$  construct (#545). The percentage of animals (10.8%) that integrated at least one construct is in accordance with the frequency of integration of a single transgene (10-30%; Gordon et al., 1980). The percentage of animals that integrated the two hFSH $\alpha/\beta$  transgenes was 7.2%. Prunkard et al. (1996) obtained an 8% percent of triple transgenic mice carrying all three human fibrinogen genes.

Two of the double transgenic founders (#7 and 40) did not transmit the transgenes to their progeny and founder #22 only transmitted the  $\alpha$  subunit, which suggests a different integration site of the two transgenes in this animal. In order to generate an additional transgenic line (named Tg545 $_{\alpha+\beta}$ ), a G1 transgenic male from line Tg22, carrying only the FSH $\alpha$  transgene, was mated with transgenic founder female #545, that had only integrated the FSH $\beta$  subunit. This way, a total of 4 stably transmitting hFSH $\alpha/\beta$  lines (Tg12, Tg19, Tg42 and, Tg545 $_{\alpha+\beta}$ ) were obtained. The transgenic line Tg19 could not be fixed, as no homozygous animals were detected among the offspring of the hemizygous intercrossings. In these crossings, the ratio between hemizygous versus non transgenic offspring was 2:1, which revealed that the presence of the transgene was recessive lethal. It has been reported that between

5% and 10% of transgenic lines produced by pronuclear microinjection carry insertional mutations, including visible mutations and prenatal lethals (Meisler, 1992). In a previous work we described a transgene insertional mutation that disrupted the PLC- $\beta$ 1 mouse gene, generating a distinct phenotype in the transgenic mice homozygous for the mutation (Ballester et al., 2004b). Here, transgenic animals from line Tg19 may carry a transgene-induced recessive insertional mutation due to the disruption of one or more genes essential for embryonic or fetal development. Further studies are needed to understand the molecular mechanisms underlying the lethality in this transgenic line.

The number of transgene copies was estimated by real-time quantitative PCR both in founder and in G1 hemizygous transgenic mice (Table 1). As the primers and probe used were positioned in the goat  $\beta$ LG promoter region, we could not distinguish between the two hFSH subunits. Therefore, although the two constructs were microinjected with an equal molar ratio, it was not possible to estimate whether the integration ratio between hFSH  $\alpha$  and  $\beta$  transgenes was balanced or whether one of the two transgenes was integrated more efficiently than other. Founder mice #7 and #40 contained 6 and 4 copies, respectively, of the transgenes per cell but did not transmit the transgene to their progeny, indicating that the transgenes were not integrated in the germline. Comparison of the G0 and G1 generation transgene copy numbers further revealed that founder mouse #42 was a somatic mosaic.

#### ***Study of mRNA expression of $\alpha$ and $\beta$ FSH subunits.***

The hFSH $\alpha$  and  $\beta$  transgene mRNA expression in the mammary gland of lactating transgenic mice was analysed by RT-PCR (Fig.2). G1 females of the four established hFSH transgenic lines expressed both hFSH transgenes ( $\alpha$  and  $\beta$ ), which indicates that the caprine  $\beta$ LG regulatory sequences are able to drive the expression of both hFSH subunits to the mammary gland of transgenic mice. Next, in order to study the ectopic expression of the transgenes, several other tissues were analysed (see material and methods). Low levels of ectopic expression were detected in three of the four transgenic lines (Tg12, Tg19 and Tg545, data not shown). A similar effect has been observed when heterologous DNA sequences are

inserted in an ovine- $\beta$ LG expression cassette (Archibald et al., 1990; Shani et al., 1992; Prunkard et al., 1996), being the expression of the transgene dependent of its integration site. In our previous work, the transgenic lines for the caprine  $\beta$ LG transgene pPX(7.0) did not show ectopic expression and the transgene was expressed in a position independent manner (Pena et al., 2001). The existence of two DnaseI hypersensitivity sites (HS) in the first and second intron of the goat  $\beta$ LG gene in lactating mammary gland chromatin and a putative matrix attachment region (MAR) encompassing the first exon and intron of the goat  $\beta$ LG gene may be responsible for the mammary gland specific expression of the caprine  $\beta$ LG transgene (Pena et al., 1998, 2001). However, the DNA elements present within the hFSH constructs used in the present study may not have the ability to insulate them from neighbouring chromatin effects. Interestingly, this ectopic expression appeared as a position-dependent phenomenon for the FSH $\beta$  transgene, as the tissue pattern of ectopic expression was different in the three transgenic lines. In contrast, the transgenic lines shared identical ectopic expression pattern for the FSH $\alpha$  transgene (all the tissues analysed showed ectopic expression) , being more likely that control elements located in this FSH $\alpha$  transgene are influencing its expression.

#### ***Analysis of the recombinant hFSH in the milk of transgenic mice***

Milk from hemizygous lactating transgenic females from the four transgenic lines was examined by Western blot analysis under nonreducing conditions to detect the presence of the hFSH $\alpha/\beta$  heterodimer. Although analyses with different concentrations of milk were performed, no bands that could correspond to the hFSH $\alpha/\beta$  protein were found. Several factors could account for the failure to detect this protein by Western blot, such as the expression at very low levels, the inability of the mouse mammary gland to secrete this protein into the milk or the absence of the hFSH protein. In order to determine the sensibility of the Western blot using a polyclonal rabbit antiserum to human alpha-subunit, we performed serial dilutions of human pituitary FSH diluted in nontransgenic mouse milk. This method was able to detect 10 ng of the human pituitary FSH, meaning that the expression of the transgene in the four lines was under this detectable level. Considering that the

samples used to perform the Western blot analysis were equivalent to 10  $\mu$ l of milk, expression levels in the four transgenic lines were under 1  $\mu$ g/ml.

Mammary gland homogenates from hemizygous lactating transgenic mice were then analyzed by Western blot, as the amount of protein that could be used in the analysis was higher than with diluted milk. The hFSH  $\alpha$  and  $\beta$  protein was found in the mammary gland homogenates from hemizygous females from the transgenic lines (data not shown), which indicated that the protein was correctly produced and assembled. Although the transgenic females lactated normally and were able to raise litters, a problem, although much less likely, with the hFSH $\alpha/\beta$  protein secretion can not be discarded.

In conclusion, the caprine  $\beta$ LG regulatory sequences used in the present work were able to direct the expression of the two hFSH subunits ( $\alpha$  and  $\beta$ ) to the mammary gland of transgenic mice. However, the hFSH $\alpha/\beta$  protein could not be detected in the mouse milk, probably as a result of very low levels of expression. Therefore, the two hFSH constructs should be modified in order to increase expression levels and to produce sufficient quantities of hormone for both research and commercial purposes.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was financially supported by the CICYT project AGL2000-0687. M Ballester received a research scholarship (FI) from AGAUR (Generalitat de Catalunya).

### **REFERENCES**

- Archibald, A.L., McClenaghan, M., Hornsey, V., Simons, J.P., and Clark, A.J. (1990) High level expression of biologically active human  $\alpha_1$ -antitrypsin in the milk of transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **87**:5178-5182.
- Ballester, M., Castelló, A., Ibáñez, E., Sánchez, A., and Folch, J.M. (2004a) Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *BioTechniques*, **37**:610-613.

- Ballester, M., Molist, J., López-Bejar, M., Sánchez, A., Santaló, J., Folch, J.M., and Ibáñez, E. (2004b) Disruption of the mouse phospholipase C- $\beta$ 1 gene in a  $\beta$ -lactoglobulin transgenic line affects viability, growth, and fertility in mice. *Gene*, **341**:279-289.
- Boime, I., Ben-Menahem, D., and Olijve, W. (1999) Studies of recombinant gonadotropins: intersection of basic science and therapeutics. En: Fauser, B.C.J.M. (Ed.), *Molecular biology in reproductive medicine*. The Parthenon Publishing Group. pp. 147-163.
- Brinster, R.L., Allen, J.M., Behringer, R.R., Gelinis, R.E., and Palmiter, R.D. (1988) Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **85**:836-840.
- Choi, T., Huang, M., Gorman, C., and Jaenisch, R. (1991) A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Molecular and Cellular Biology*, **11**:3070-3074.
- Coulibaly, S., Besenfelder, U., Miller, I., Zinovieva, N., Lassnig, C., Kotler, T., Jameson, J.L., Gemeiner, M., Müller, M., and Brem, G. (2002) Expression and characterization of functional recombinant bovine follicle-stimulating hormone (boFSH $\alpha/\beta$ ) produced in the milk of transgenic rabbits. *Molecular Reproduction and Development*, **63**:300-308.
- Feng, W., Matzuk, M.M., Mountjoy, K., Bedows, E., Ruddon, R.W., and Boime, I. (1995) The asparagine-linked oligosaccharides of the human chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit facilitate correct disulfide bond pairing. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**:11851-11859.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., and Ruddle, F.H. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **77**:7380-7384.
- Greenberg, N.M., Anderson, J.W., Hsueh, A.J.W., Nishimori, K., Reeves, J.J., DeAvila, D.M., Ward, D.N., and Rosen J.M. (1991) Expression of biologically active heterodimeric bovine follicle-stimulating hormone in milk of transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**:8327-8331.

- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., and Lacy, E. (1994) Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual (2<sup>a</sup> ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Houdebine, L-M. (2000) Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Research*, **9**:305-320.
- Ibáñez, E., Folch, J.M., Coll, A., Santaló, J., Egozcue, J., and Sánchez, A. (1997) Expression of caprine  $\beta$ -lactoglobulin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Research*, **6**(1):69-74.
- Keene, J.L., Matzuk, M.M., and Boime, I. (1989) Expression of recombinant human choriogonadotropin in Chinese hamster ovary glycosylation mutants. *Molecular Endocrinology*, **3**:2011-2017.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.
- Larrick, J.W., and Thomas, D.W. (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**:411-418.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, **25**:402-408.
- Loumaye, E., Campbell, R., and Salat-Baroux, J. (1995) Human follicle-stimulating hormone produced by recombinant DNA technology: a review for clinicians. *Human Reproduction Update*, **1**:188-199.
- Loumaye, E., Dreano, M., Galazka, A., Howles, C., Ham, L., Munafo, A., Eshkol, A., Giudice, E., De Luca, E., Sirna, A., Antonetti, F., Giartosio, C-E., Scaglia, L., Kelton, C., Campbell, R., and Chappel, S. (1998) Recombinant follicle stimulating hormone: development of the first biotechnology product for the treatment of infertility. *Human Reproduction Update*, **4**:862-881.
- Matzuk, M.M., and Boime, I. (1988a) Site-specific mutagenesis defines the intracellular role of the asparagines-linked oligosaccharides of chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit. *Journal of Biological Chemistry*, **263**:17106-17111.
- Matzuk, M.M., and Boime, I. (1988b). The role of the Asparagine-linked oligosaccharides of the  $\alpha$  subunit in the secretion and assembly of human chorionic gonadotropin. *Journal of Cell Biology*, **106**:1049-1059.
- Meisler, M.H. (1992) Insertional mutation of classical and novel genes in transgenic

- mice. *Trends in Genetics*, **8**:341-344.
- Olijve, W., de Boer, W., Mulders, J.W., and van Wezenbeek, P.M. (1996). Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Molecular Human Reproduction*, **2**:371-382.
- Pena, R.N., Folch, J.M., Sánchez, A., and Whitelaw, C.B.A. (1998) Chromatin structures of goat and sheep  $\beta$ -lactoglobulin gene differ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **252**:649-653.
- Pena, R.N., Ibáñez, E., Folch, J.M., Vidal, F., Sánchez, A., and Santaló, J. (2001) Expression mammary gland-specific of the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene comprising a 410 bp-long promoter in transgenic mice. *Transgenics*, **3**:175-182.
- Pierce, J.G., and Parsons, T.F. (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, **50**:465-495.
- Prunkard, D., Cottingham, I., Garner, I., Bruce, S., Dalrymple, M., Lasser, G., Bishop, P., and Foster, D. (1996) High-level expression of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic mice. *Nature Biotechnology*, **14**:867-871.
- Shani, M., Barash, I., Nathan, M., Ricca, G., Searfoss, G.H., Dekel, I., Faerman, A., Givol, D., and Hurwitz, D.R. (1992) Expression of human serum albumin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Research*, **1**:195-208.
- Tesson, L., Heslan, J-M., Ménoret, S., and Anegon, I. (2002) Rapid and accurate determination of zygosity in transgenic animals by real-time quantitative PCR. *Transgenic Research*, **11**:43-48.
- Whitelaw, C.B., Archibald, A.L., Harris, S., McClenaghan, M., Simons, J.P., and Clark, A.J. (1991) Targeting expression to the mammary gland: intronic sequences can enhance the efficiency of gene expression in transgenic mice. *Transgenic Research*, **1**:3-13.

**Table 1.** Transgene copy number in the six double (hFSH $\alpha$  and  $\beta$ ) transgenic founders animals (G0) and in the G1 hemizygous transgenic mice from each line that transmitted both transgenes.

Transgenic lines	Number of copies	
	G0	G1
Tg7 <sup>1</sup>	6	–
Tg12	2	2
Tg19	10	10
Tg22	9	ND
Tg40 <sup>1</sup>	4	–
Tg42	5	9
Tg545 $_{\alpha+\beta}$ <sup>2</sup>	–	3

ND, non determined

<sup>1</sup>Founders that did not transmit the transgenes to their progeny

<sup>2</sup>Tg22xTg545



---

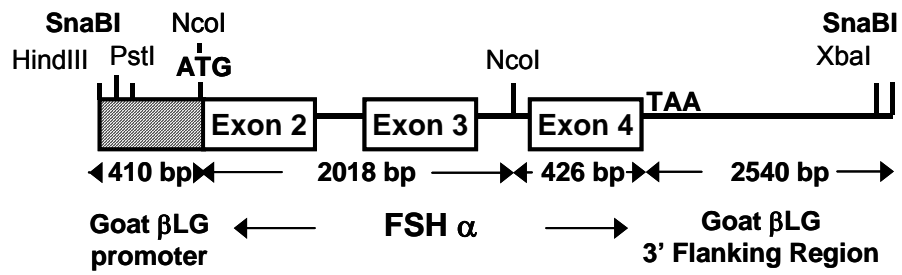
**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** Structure and restriction sites of the hFSH  $\alpha$  (A) and  $\beta$  (B) transgenes. The restriction sites corresponding to enzymes used to excise the transgenes from the plasmid vectors are indicated in bold.

**Figure 2.** Analysis of hFSH $\alpha$  and  $\beta$  transgene expression in the mammary gland of lactating transgenic females from the four established lines. **Lane 1**, molecular size marker IX (Roche). **Lanes 2-6**, RT-PCR for hFSH $\beta$ ; lane 2, 283-Tg12; lane 3, 89-Tg19; lane 4, 650-Tg42; lane 5, 739-Tg545; lane 6, nontransgenic mouse. **Lanes 7-11**, RT-PCR for hFSH $\alpha$ ; lane 7, 283-Tg12; lane 8, 89-Tg19; lane 9, 650-Tg42; lane 10, 739-Tg545; lane 11, nontransgenic mouse. **Lanes 12-17**, RT-PCR control for mouse  $\beta$ -casein; lane 12, 283-Tg12; lane 13, 89-Tg19; lane 14, 650-Tg42; lane 15, 739-Tg545; lane 16, nontransgenic mouse; lane 17, negative control sample.

FIGURE 1

A



B

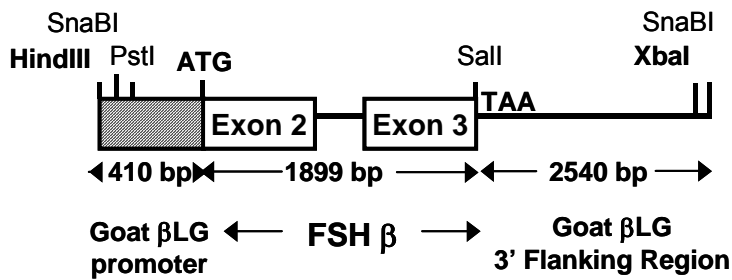
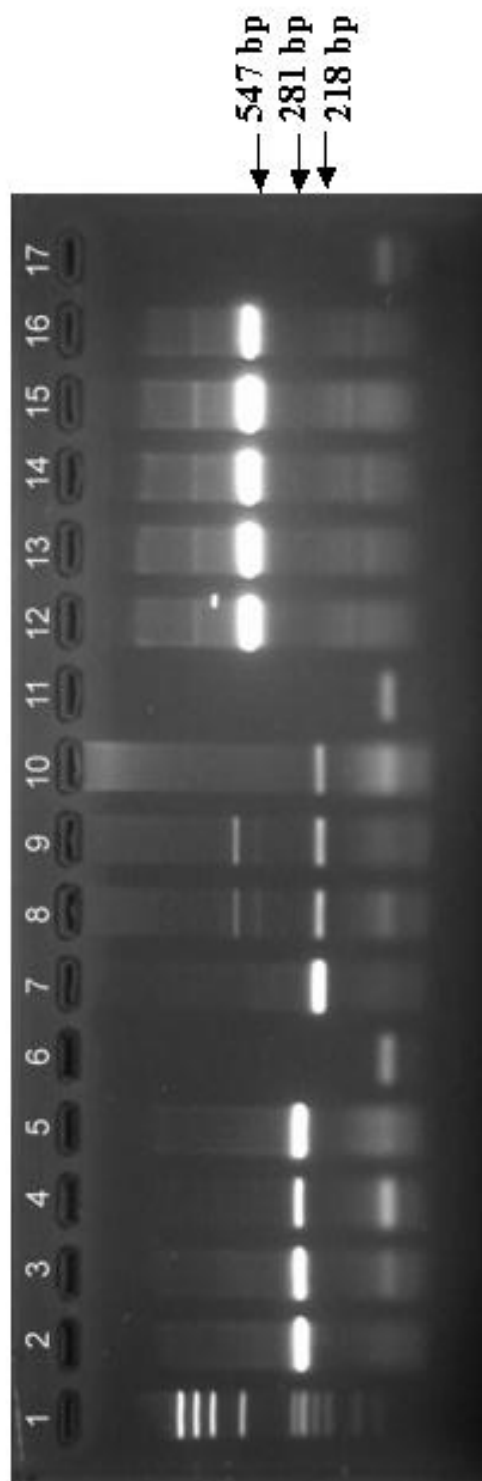


FIGURE 2



4. *“Polymorphisms in the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene”*

*Ballester M., Sánchez A. and Folch J.M.*

*Aceptado en el Journal of Dairy Research*

**Polymorphisms in the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene**

MARIA BALLESTER\*, ARMAND SÁNCHEZ AND JOSEP M. FOLCH

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat  
Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain

\*Corresponding author

Maria Ballester

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat  
Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain

Tel.: +34-93-581-4260; fax: +34-93-581-2106

E-mail address: [maria.ballester@uab.es](mailto:maria.ballester@uab.es)

**SUMMARY**

$\beta$ -lactoglobulin polymorphisms have been reported in the milk of different goat breeds, although no genetic variants affecting the protein have been characterized. In this study, we amplified and sequenced the proximal promoter and the first six exons containing the entire coding region for the  $\beta$ -lactoglobulin gene in eleven goat breeds from Spain, France, Italy, Switzerland, Senegal and Asia to identify genetic variants. Fifteen polymorphisms have been detected, nine in the promoter region and six in the exons of the  $\beta$ -lactoglobulin gene. All polymorphisms were single nucleotide substitutions with the exception of one deletion/insertion in the promoter region. The polymorphisms in the coding region did not produce any amino acid change. In addition, pyrosequencing technology was used to genotype four polymorphisms in the promoter region in 200 goats belonging to eleven breeds. Differences in allelic frequencies for these polymorphisms between breeds are described and a specific polymorphism for the Italian populations has been identified. Finally, the analysis of association between these four promoter point mutations was also investigated resulting in five haplotypes, being the GCGC the most frequent haplotype in all breeds analysed.

## INTRODUCTION

$\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) is the major whey protein in the milk of ruminants. It is also found in the milk of most mammals with the exception of humans, rodents, and lagomorphs (Pérez & Calvo, 1995). Although no clear physiological function has been defined for this protein, a role in the transport of retinol and fatty acids has been suggested (Pérez & Calvo, 1995; Flower, 1996)

Since Aschaffenburg & Drewry (1955) detected the first polymorphism in the bovine  $\beta$ -lg protein, polymorphisms have been characterized for all the major milk proteins. Nowadays, eleven variants of bovine  $\beta$ -lg have been described at the DNA level (Ng-Kwai-Hang & Grosclaude, 1992; Godovac-Zimmermann et al. 1990, 1996) being the variants A and B the most frequent. These variants have been associated with quantitative effects on milk composition and cheese-making properties (reviewed in Ng-Kwai Hang & Grosclaude, 1992). For instance, the B variant has been correlated with higher casein content in milk which results in increased cheese yield (Lundén et al. 1997). Milk from  $\beta$ -lg AA genotype cows contains more  $\beta$ -lg than milk from  $\beta$ -lg BB genotype cows (Hill, 1993). In fact, quantification of  $\beta$ -lg A and B in the milk of heterozygous (AB) animals has shown a relative proportion of 60:40 between the A and B variants (Lum et al. 1987) which has been correlated with higher levels of mRNA for  $\beta$ -lg A compared with B (Wilkins et al. 1995). This differential allelic expression has been explained by nucleotide polymorphisms in the bovine  $\beta$ -lg promoter region associated with these two alleles (Wagner et al. 1994; Lum et al. 1997; Folch et al. 1999). In sheep, several transcription factors are known to bind to recognition sequences of the  $\beta$ -lg promoter (Watson et al. 1991). Comparison of ovine and caprine  $\beta$ -lg promoter sequences reveals a conservation of these binding sites (Folch et al. 1994). Three variants (A, B, C) have been reported in sheep (Gaye et al. 1986; Erhardt, 1989) and variants A and B have also been associated with milk production and milk composition (reviewed in Moioli et al. 1998). In goat, no variants producing amino acid change have been characterized at the DNA level, but polymorphisms in the 3' untranslated region (exon 7) and in the  $\beta$ -lg proximal promoter region of the Spanish and French goats have been described (Pena et al. 2000; Yahyaoui et al.

2000). Differences in  $\beta$ -Ig content, ranging from 43% to 63% of major whey proteins, have been detected in the milk of the Italian Girgentana goats (Chianese et al. 2000). A polymorphism in the promoter region of individuals of this breed, with reduced  $\beta$ -Ig content, has recently been identified but it was not correlated with the  $\beta$ -Ig content (Graziano et al. 2003).

The aim of this work was to study the genetic polymorphism in the caprine  $\beta$ -Ig gene. We describe new polymorphisms in the proximal promoter region and in exons 1, 2, 3, and 6 of the goat  $\beta$ -Ig gene. In addition, a protocol to genotype four polymorphisms of the proximal promoter region has been developed using pyrosequencing technology. The distribution of allelic frequencies has been evaluated in 200 goats belonging to eleven breeds.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Animal samples***

A total of 200 goat DNA samples were chosen at random from the following breeds: Alpine ( $n=22$ , France), Saanen ( $n=22$ , Switzerland), Malagueña ( $n=21$ , Spain), Murciano-Granadina ( $n=21$ , Spain), Tinerfeña ( $n=14$ , Canary Islands, Spain), Palmera ( $n=14$ , Canary Islands, Spain), Majorera ( $n=11$ , Canary Islands, Spain), Teramana ( $n=22$ , Italy), Girgentana ( $n=19$ , Italy), Cashmere ( $n=18$ , Asia) and Sahelian ( $n=16$ , Senegal) breeds. Genomic DNA was isolated from blood samples using standard protocols (Ausubel et al. 1987).

### ***Amplification of the caprine $\beta$ -lactoglobulin gene***

Genomic DNA samples from different goat breeds were used to amplify two overlapping fragments of the  $\beta$ -Ig gene. Primers GOAPF3 and GoatI1R were used to amplify an 833 bp caprine fragment that includes: 588 bp of the proximal promoter, 136 bp of exon 1, and 109 bp of intron 1. Primers GOAPF1 and BLG7 were used to amplify an 4854 bp fragment containing the entire coding region of the gene (from -187 position in the proximal promoter to exon 7). All primers were designed over the goat  $\beta$ -Ig gene (Folch et al. 1994) and are indicated in Table 1.

The PCR reactions were performed with Expand High Fidelity PCR System (Roche, Barcelona, Spain) in a 50  $\mu$ l final volume. The reaction mixture contained



2.6 units of Expand High Fidelity PCR System enzyme mix, 1x PCR buffer, 1 mM-MgCl<sub>2</sub> for the 833 bp fragment amplification or 1.5 mM-MgCl<sub>2</sub> for the 4854 bp fragment amplification, 200 μM of each dNTP, 0.3 μM of each primer and approximately 125 ng of goat genomic DNA. For the 4854 bp fragment amplification the thermal cycling conditions were: 95 °C for 3 min, 10 cycles of 95 °C for 30 s, 70 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min 30 s, followed by 25 cycles of 95 °C for 30 s, 70 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min 30 s increasing 20 s extension in each cycle and a final extension of 72 °C for 10 min. The thermal conditions for the 833 bp fragment amplification were similar with the exception of the annealing temperature (60 °C) and the extension time (90 s, increasing 20 s extension in each cycle).

### ***DNA sequencing reactions***

PCR products from two animals per breed (Alpine, Saanen, Malagueña, Murciano-Granadina, Tinerfeña, Palmera, Teramana, Girgentana, Cashmere, and Sahelian) were sequenced for the 833 bp fragment of the proximal promoter. In addition, the 4854 bp fragment was sequenced from two animals per breed indicated above with the exception of Cashmere and Sahelian breeds. Primers used for sequencing reactions are detailed in Table 1.

The PCR products were purified with QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Milano, Italy). Sequencing was carried out with BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit in an ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). MultAlin software (Corpet, 1988) was used to analyse the nucleotide sequences.

### ***Genotyping by pyrosequencing***

Genotyping was done by pyrosequencing in a PSQ HS 96A system (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden). This DNA sequencing technique is based on indirect bioluminescent quantification of released pyrophosphate (P<sub>pi</sub>) as a result of nucleotide incorporation during DNA synthesis. In a cascade of enzymatic reactions, visible light is generated being proportional to the number of incorporated nucleotides (Ronaghi et al. 1996, 1998).

A 181 bp fragment of goat β-Ig proximal promoter region (Folch et al. 1994) was amplified from 200 genomic DNA samples to genotype four polymorphisms at

positions: -134, -118, -64, and -60 relative to transcription start. PCR amplification was performed in a 25  $\mu$ l reaction mixture containing 0.625 units of Taq DNA polymerase (Life Technologies, Rockville, MD), 1x PCR buffer, 1.5 mM-MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M of each dNTP, 0.5  $\mu$ M of each primer and approximately 125 ng of goat genomic DNA. The thermal cycling profile was: 95 °C for 5 min, 35 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 90 s, with a final extension of 72 °C for 5 min. Primers used were: forward BLGPFpyro (5'-TGG AAG AAG GCC TCC TAT TGT C-3') and reverse BLGPRpyro (5'-biotin-CTT CTG AGC TCT GCA GGG AGT-3'). A total of 20  $\mu$ l of the PCR product was used in the pyrosequencing reaction, using the SNP reagent kit (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's suggestions. The sequencing primers were designed on the forward strand: primer BLGSNP134-114 (5'-GGC CTC CTA TTG TCC T-3') to genotype polymorphisms at positions -134 and -114 and primer BLGSNP64-60 (5'-CTC GTG GCT GGG G-3') to genotype polymorphisms at positions -64 and -60 in the proximal promoter of goat  $\beta$ -lg gene.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### ***Identification of polymorphisms in the goat $\beta$ -lg gene***

The proximal promoter region (an 833 bp PCR fragment) was sequenced in animals from 10 different goat breeds. The alignment and analysis of these sequences allowed the identification of nine polymorphic sites, eight of which were base substitutions and one was a deletion/insertion of one nucleotide (Table 2). Interestingly, all the base substitutions are located in CpG dinucleotides suggesting that these polymorphisms are originated by 5-methylcytosine deamination (Duncan & Miller, 1980). This result indicates that the goat  $\beta$ LG proximal promoter region is likely methylated. The polymorphism at position -60 has previously been reported in Spanish and French goats (Yahyaoui et al. 2000) and the polymorphism at position -341 has recently been characterized in Alpine, Saanen and different Italian breeds (Graziano et al. 2003).

No genetic variants affecting the coding region of the  $\beta$ -lg gene have been described in the caprine species, although different protein variants of faster mobility have been reported (Macha, 1970). In order to detect polymorphisms in the

coding region of the goat  $\beta$ -lg gene, we amplified and partially sequenced a 4854 bp fragment corresponding to all the  $\beta$ -lg coding region from different breeds. Comparative sequence analysis revealed six single nucleotide substitutions in exon 1, 2, 3, and 6 (Table 2). Five of these polymorphisms occurred in the coding region and were synonymous substitutions, suggesting a selection pressure reducing diversity at this DNA region. Mutations at nucleotide position 100, 121, and 834 were only found in five samples from Cashmere, Palmera and Alpine goats, respectively. The rest of polymorphisms were widely distributed among breeds. The sixth mutation was found in the non-coding region of exon 6 (4122) in all studied breeds. Further studies are required to determine whether this polymorphism affects the stability of the  $\beta$ -lg mRNA.

#### ***Genotyping and allelic frequencies of the $\beta$ -lg proximal promoter region polymorphisms***

Two hundred goat genomic DNA samples from eleven breeds were genotyped for four polymorphisms at positions: -134, -118, -64, and -60 by pyrosequencing technology using two independent reactions (Fig. 1). Analysis of these four point mutations was performed both because of their distinct distribution among breeds and location in a region where different transcription factor binding sites have been reported (Folch et al. 1994). We used the pyrosequencing technology for SNP analysis because the technique offers an extremely accurate and easy distinction between the various genotypes. The reaction is performed in real-time and the raw data is directly analysed allowing the genotyping of large numbers of samples in a short period of time. Moreover, closely located polymorphisms can be identified in a single extension reaction and information about the adjacent nucleotides is also obtained. Finally, this method is time- and cost-competitive if it is compared with other sequencing methods like primer extension analysis used for genotyping.

The allelic frequencies are shown in table 3. No significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were observed, calculated using an exact test (Guo & Thompson, 1992) in the GENEPOP software (Raymond & Rousset, 1995).

The -64 (A/G) polymorphism was only found in Italian breeds with a higher frequency for the -64 A allele (0.21) in Girgentana goats. Although this breed

originally comes from the geographic areas of Asia, including Afghanistan and the Himalayan regions, it was raised in Sicily Island where has been used in familiar livestock farming. Nowadays, this breed is in danger of extinction (FAO, 2002) with a population size less than 500 individuals. So, it seems more plausible that allelic distribution of this breed-specific polymorphism might be explained by genetic drift and founder effects. In addition, this polymorphism is localized in an AP-2 consensus binding site (CCCMNSSS; TRANSFAC database, Wingender et al. 1996), being a good candidate to explain the differences in  $\beta$ -lg content observed in animals of this breed. On the other hand, allelic frequencies for the -60C allele agree with the results previously described by Yahyaoui et al. (2000) for the Murciano-Granadina, Canary, Malagueña and Saanen breeds. Moreover, Graziano et al. (2003) have analysed this polymorphic position in different Italian breeds and T allele, that was not present for the Girgentana breed in our study, is found at low frequency. The -60 T allele was not found in the Canary breeds, this difference could be explained by the long -term isolation in the Canary Islands of these breeds (Amills et al. 2004). The -118 (T/C) polymorphism that was only found at low frequencies in the Alpine, Saanen and Malagueña breeds is also located in an AP-2 consensus binding site (Wingender et al. 1996). Finally, -134 (T/G) polymorphism was widely distributed among all the analysed breeds with the exception of Sahel.

Subsequently, we have investigated the association of these four polymorphisms that results in sixteen theoretically haplotypes. Five haplotypes were only identified and their frequencies were computed using an expectation-maximization algorithm (Lange, 1997) (Arlequin software, Schneider et al. 2000). The haplotype GCGC may correspond to the ancestral type as it was found in all the analysed breeds with a frequency of 0.702. The second most frequent haplotype TCGC (0.133) was found in all the breeds analysed with the exception of Sahel breed, followed by the haplotype GCGT (0.125) that was only found in Girgentana and Canarian breeds. Haplotypes less frequent were GCAC (0.025) and GTGC (0.015) from Italian breeds and Alpine and Saanen breeds, respectively.

Although further studies are required to evaluate the effect of these variants in the expression of  $\beta$ -lg gene and therefore in the milk protein composition, these

novel polymorphisms can be used as molecular markers and in the association studies with milk production traits.

This work was financially supported by the CICYT project AGL2000-0687. M Ballester received a research scholarship (FI) from AGAUR (Generalitat de Catalunya). We thank Dr Marcel Amills and Dra Antonella Angiolillo for providing goat samples.

## REFERENCES

- Amills M, Capote J, Tomás A, Kelly L, Obexer-Ruff G, Angiolillo A & Sánchez A** 2004 Strong phylogeographic relationships among three goat breeds from the Canary Islands. *Journal of Dairy Research* **71** 1-6
- Aschaffenburg R & Drewry J** 1955 Occurrence of different  $\beta$ -lactoglobulins in cow's milk. *Nature* **176** 218-219
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K** (Ed.) 1987 *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience
- Chianese L, Portolano B, Troncone E, Pizzolongo F, Ferranti P, Addeo F, Alicata ML, Pilla F & Calagna G** 2000 The quality of Girgentana goat milk. *Proc. 7<sup>th</sup> Int. Conf. on Goats*, Tours, France **2** 946-949
- Corpet F** 1988 Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16** 10881-10890
- Duncan BK & Miller JH** 1980 Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* **287** 560-561
- Erhardt G** 1989 Evidence for a third allele at the  $\beta$ -lactoglobulin locus of sheep milk and its occurrence in different breeds. *Animal Genetics* **20** 197-204
- FAO** 2002 Domestic animal diversity information system (DAD-IS 2.0). <http://www.fao.org/dad-is>
- Flower DR** 1996 The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemistry Journal* **318** 1-14
- Folch JM, Coll A & Sánchez A** 1994 Complete sequence of the caprine  $\beta$ -lactoglobulin gene. *Journal of Dairy Science* **77** 3493-3497

- Folch JM, Dovc P & Medrano JF** 1999 Differential expression of bovine  $\beta$ -lactoglobulin A and B promoter variants in transiently transfected HC11 cells. *Journal of Dairy Research* **66** 537-544
- Gaye P, Hue-Delhaie D, Mercier J-C, Soulier S, Vilotte J-L & Furet J-P** 1986 Ovine  $\beta$ -lactoglobulin messenger RNA: nucleotide séquence and mRNA levels during functional differentiation of the mammary. *Biochimie* **67** 1097-1107
- Godovac-Zimmermann J, Krause I, Buchberger J, Weiss G & Klostermeyer H** 1990 Genetic variants of bovine beta-lactoglobulin. A novel wild-beta-lactoglobulin W and its primary sequence. *Biological Chemistry Hoppe-Seyle* **371** 255-260
- Godovac-Zimmermann J, Krause I, Baranyi M, Fischer-Fruhholz S, Juszczak J, Erhardt G, Buchberger J & Klostermeyer H** 1996 Isolation and rapid sequence characterization of two novel bovine beta-lactoglobulins I and J. *Journal of Protein Chemistry* **15** 743-750
- Graziano M, D'Andrea M, Angiolillo A, Lagonigro R & Pilla F** 2003 A new polymorphism in goat  $\beta$ -lactoglobulin promoter region. *Italian Journal of Animal Science* **1** 65-68
- Guo SW & Thompson EA** 1992 Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiples alleles. *Biometrics* **48** 361-372
- Hill JP** 1993 The relationship between  $\beta$ -lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **76** 281-286
- Lange K** 1997 Mathematical and statistical methods for genetic analysis. Springer. New York
- Lum LS, Dovc P & Medrano JF** 1997 Polymorphisms of Bovine  $\beta$ -lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. *Journal of Dairy Science* **80** 1389-1397
- Lundén A, Nilsson M & Janson L** 1997 Marked effect of  $\beta$ -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *Journal of Dairy Science* **80** 2996-3005

- Machà J** 1970 [Protein Polymorphism in goats' milk.] *Zivocisná Výroba* **15** 801-805
- Martin P, Szymanowska M, Zwierzchowski L & Leroux C** 2002 The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reproduction Nutrition Development* **42** 433-459
- Moioli B, Pilla F & Tripaldi C** 1998 Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research* **27** 185-195
- Ng-Kwai-Hang KF & Grosclaude F** 1992 Genetic polymorphism of milk proteins. In *Advanced Dairy chemistry-1. Proteins* pp.405-455 (Ed. P.F. Fox). London: Elsevier Applied Science
- Pena RN, Sánchez A & Folch JM** 2000 Characterization of genetic polymorphism in the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene. *Journal of Dairy Research* **67** 217-224
- Pérez MD & Calvo M** 1995 Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: A review. *Journal of Dairy Science* **78** 978-988
- Raymond M & Rousset F** 1995 GENEPOP population genetics software for exact tests and ecumenicism. Version 1.2. *Journal of Heredity* **86** 248-249
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M & Nyrén P** 1996 Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry* **242** 84-89
- Ronaghi M, Uhlén M & Nyrén P** 1998 A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281** 363-365
- Schneider S, Roessli D & Excoffier L** 2000 Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva
- Wagner VA, Schild TA & Geldermann H** 1994 DNA variants within the 5'-flanking region of milk-protein-encoding genes. II. The  $\beta$ -lactoglobulin-encoding gene. *Theoretical and Applied Genetics* **89** 121-126

- Watson JC, Gordon KE, Robertson M & Clark AJ** 1991 Interaction of DNA-binding proteins with a milk protein gene promoter: in vitro identification of a mammary gland-specific factor. *Nucleic Acids Research* **19** 6603-6610
- Wilkins RJ, Davey HW, Wheeler TJ & Ford CA** 1995 Differential expression of  $\beta$ -lactoglobulin alleles A and B in dairy cattle. In *Intercellular Signalling in the Mammary Gland* pp.189-190 (Eds CJ Wilde, CH Knight and M Peaker). New York: Plenum
- Wingender E, Dietze P, Karas H & Knüppel R** 1996 TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Research* **24** 238-241
- Yahyaoui MH, Pena RN, Sánchez A & Folch JM** 2000 Rapid communication: polymorphism in the goat beta-lactoglobulin proximal promoter region. *Journal of Animal Science* **78** 1100-1101



**Table 1.** Primers sequence.

Primer <sup>†</sup>	Position <sup>‡</sup>	Size (bp)	Sequence (5'-3')
GOAPF3	promoter (-588)	20	GTCAC TTTCCCGTCCTGGGG
GOAPF1	promoter (-187)	21	AGAGGGGGACTTCCTGCTTGG
GoatE1R2	exon 1 (100)	22	GCCTTTCATGGTCTGGGTGACG
GoatI1R	intron 1 (226)	20	GCTGCCCTAGCTGACTGATG
GoatI1F	intron 1 (675)	20	CATTCCCCAGGGTGCAGAGT
GoatI3R	intron 3 (1960)	21	TCATCACCACCAGCCCCTTAG
GoatI3F	intron 3 (2900)	20	GCTGGTCGTGGAGGGTGCTG
GoatI6R	intron 6 (4203)	20	GACCCCAGGGCCTAATGTGG
BLG7 <sup>§</sup>	exon 7 (4646)	22	GCGGATCCGAGCAGGAGGCCAC

<sup>†</sup>F: Forward, R: Reverse

<sup>‡</sup>Position is indicated using as reference the goat  $\beta$ -lg gene sequence (Folch et al. 1994).

<sup>§</sup>Two nucleotides are modified to generate a *Bam*HI restriction site.

**Table 2.** Polymorphisms in the goat  $\beta$ -lg gene.

Location	Nucleotide position <sup>†</sup>	Polymorphism	Breed <sup>‡</sup>
promoter	-341	T/C	Gir, Alp, Saa, Tin, Mur, Cac, Sah
	-283	C/T	Ter, Pal, Mur
	-197	G/A	Mal, Cac
	-134	G/T	Ter, Pal, Mur
	-118	C/T	Alp
	-114	-/G deletion/insertion	Gir, Alp, Tin, Mur, Cac, Sah
	-64	G/A	Gir
	-60	C/T	Ter, Saa, Mur
	-22	G/A	Cac
	exon 1	100	C/T
121		C/T	Pal
exon 2	834	G/A	Alp
	840	C/T	Ter, Saa, Mur, Mal
exon 3	1806	C/T	Gir, Alp, Saa, Tin, Pal
exon 6	4122	T/C	Gir, Ter, Alp, Saa, Tin, Pal, Mur, Mal

<sup>†</sup>Position of polymorphic sites relative to the goat  $\beta$ -lg gene (Folch *et al.* 1994).

<sup>‡</sup>Gir: girgentana; Ter: teramana; Alp: alpine; Saa: saanen; Tin: tinerfeña; Pal: palmera; Mur: murciano-granadina; Mal: malagueña; Cac: cashmere; Sah: sahelian.

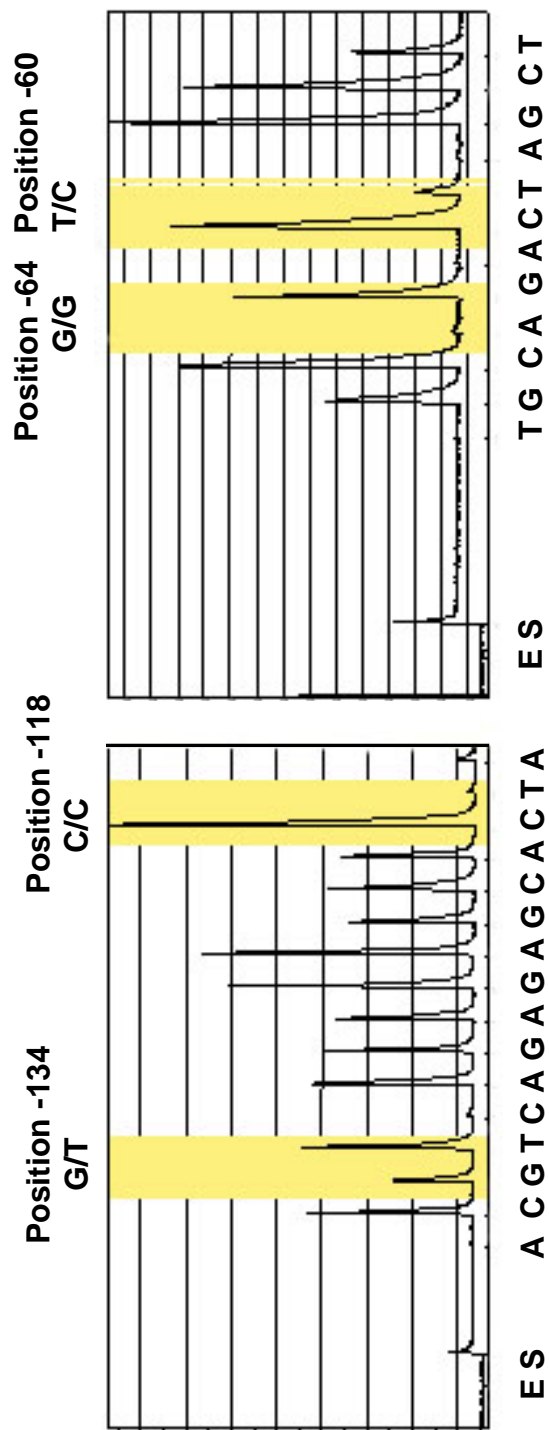
**Table 3.** Allelic frequencies of the -134, -118, -64 and -60 polymorphisms of the goat  $\beta$ -lg promoter region in different breeds.

allelic frequencies									
Breed	n <sup>o</sup> of animals	position -134		position -118		position -64		position -60	
		T	G	T	C	A	G	T	C
Alpine	22	0.18	0.82	0.10	0.90	0	1	0.05	0.95
Saanen	22	0.07	0.93	0.02	0.98	0	1	0.34	0.66
Malagueña	21	0.12	0.88	0.02	0.98	0	1	0.12	0.88
Murci-Gran	21	0.12	0.88	0	1	0	1	0.21	0.79
Tinerfeña	14	0.11	0.89	0	1	0	1	0	1
Palmera	14	0.18	0.82	0	1	0	1	0	1
Majorera	11	0.32	0.68	0	1	0	1	0	1
Teramana	22	0.25	0.75	0	1	0.05	0.95	0.32	0.68
Girgentana	19	0.03	0.97	0	1	0.21	0.79	0	1
Cashmere	18	0.17	0.83	0	1	0	1	0.03	0.97
Sahelian	16	0	1	0	1	0	1	0.19	0.81
Total	200								

**FIGURE LEGEND**

**Fig. 1.** Genotyping of the polymorphisms at positions –134, -114, -64 and –60 of goat  $\beta$ -lg proximal promoter. Pyrogrames for one animal from the Malagueña breed.

FIGURE 1



# **DISCUSIÓN**

## **1. Disrupción del gen PLC- $\beta$ 1 en el ratón**

Actualmente, se conoce un gran número de genes responsables de enfermedades genéticas en el ratón que están siendo utilizados como modelos de enfermedades humanas. Muchos de estos modelos son generados mediante la disrupción del gen de interés por recombinación homóloga, obteniéndose ratones *knockout* (Austin *et al.*, 2004). No obstante, en los últimos años, la técnica de microinyección pronuclear, que ha sido utilizada de forma general para la expresión de genes exógenos en el ratón, se ha convertido en una herramienta muy importante para el estudio de la función de diferentes genes de mamíferos y el desarrollo de modelos en ratón para enfermedades humanas (Meisler, 1992; Woychik y Alagramam, 1998).

La utilización del ratón como modelo para el estudio de la biología y la enfermedad humana tiene una serie de ventajas con respecto a otros organismos utilizados hasta el momento (gusanos, moscas, renacuajos, etc); ya que, el ratón es un mamífero, y su desarrollo, fisiología, comportamiento y enfermedades son similares a las descritas en humanos. Al menos un 99% de los genes del ratón tienen homólogos en la especie humana (Austin *et al.*, 2004).

En nuestro grupo, se generaron una serie de líneas de ratones transgénicos para la construcción pPX(7.0) (véase apartado 9.1 y 10, introducción) con el fin de estudiar el efecto del tamaño del promotor de la  $\beta$ LG caprina en la expresión del transgén (Pena *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en este experimento nos permiten disponer en la actualidad de un *cassette* de expresión que es capaz de dirigir de forma específica, independiente del lugar de integración y dependiente del número de copias, el transgén de la  $\beta$ LG caprina. Este *cassette* de expresión ha sido utilizado en el presente trabajo para la obtención de ratones transgénicos que expresen la FSH humana en la glándula mamaria (artículo 3, enviado a *Theriogenology*).

No obstante, los animales homocigotos de una de las líneas transgénicas (tg56) generadas para la construcción pPX(7.0) presentó un fenotipo distinto al resto de líneas. La caracterización del lugar de integración del transgén de la  $\beta$ LG caprina en esta línea transgénica, permitió verificar que el fenotipo presentado por

los ratones homocigotos tg56 era debido a la disrupción en la expresión de un gen específico del ratón: la **Fosfolipasa C- $\beta$ 1 (PLC- $\beta$ 1)** (Ballester *et al.*, 2004a).

En primer lugar, fue muy importante determinar la localización cromosómica del transgén lo que permitió verificar su integración en una única posición del genoma. Asimismo, el análisis del cariotipo permitió descartar alteraciones estructurales cromosómicas que pudieran dar lugar al fenotipo de los animales. El transgén fue mapeado en la banda citogenética F3 del cromosoma 2, lo que permitió realizar una primera revisión de los genes mapeados del ratón en esta región.

Una vez localizado el transgén a nivel cromosómico, se realizó el análisis molecular para determinar su lugar de integración. Utilizando el transgén como una “etiqueta” molecular, se amplificó y secuenció la región 5’ flanqueante al mismo mediante la utilización de la técnica *Vectorette*, basada en una *Anchored PCR*. La utilización de esta técnica permitió identificar una secuencia parcialmente complementaria al ARNm del gen PLC- $\beta$ 1 del ratón. Este gen se localiza en la banda citogenética F del cromosoma 2, verificando así el mapeo cromosómico del transgén realizado con anterioridad.

Mientras que si se ha caracterizado su estructura génica en humanos, en el inicio de este trabajo en el ratón sólo se conocía la secuencia del ARNm de la PLC- $\beta$ 1. Por tanto, en nuestro estudio utilizamos la información existente del gen humano, el cual está formado por 32 exones y 31 intrones (Caricasole *et al.*, 2000), para deducir que el transgén estaba integrado en el intrón 30 del gen de la PLC- $\beta$ 1.

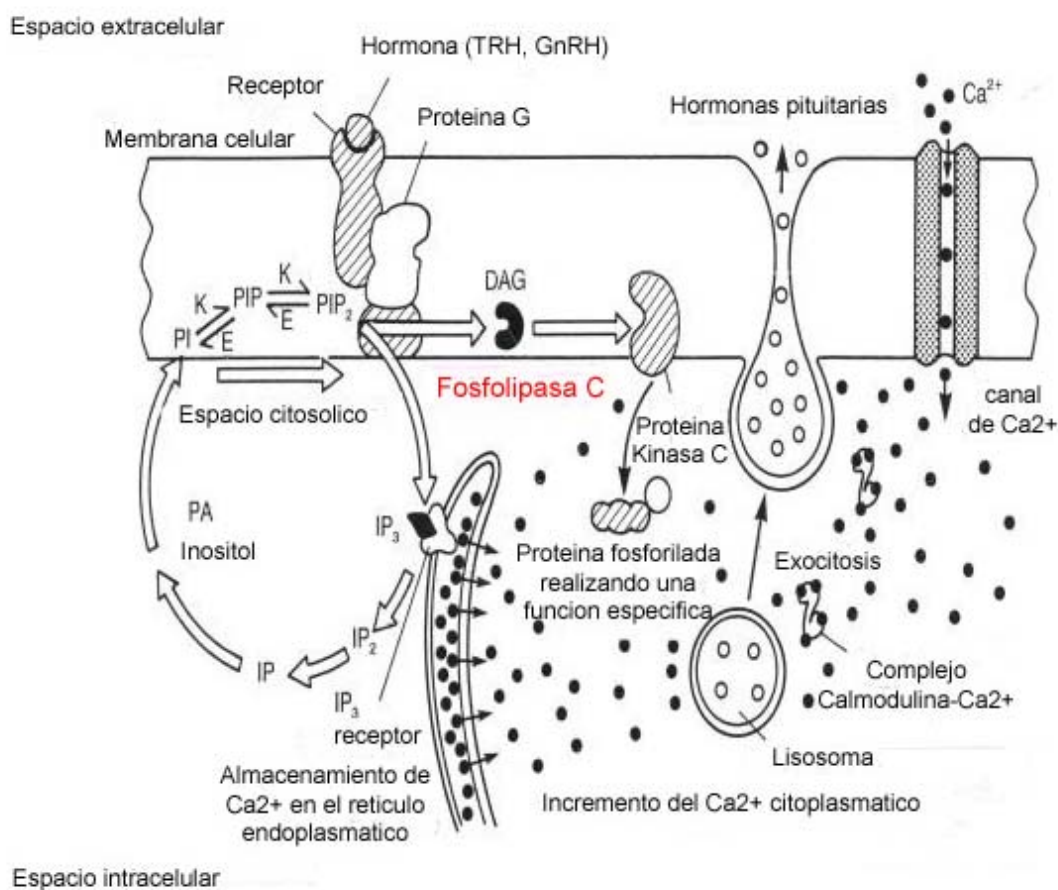
Las mutaciones por inserción generadas por la técnica de microinyección a pronúcleo pueden ser inserciones simples del transgén lo que facilita el estudio de estas mutaciones. Sin embargo, también se han descrito deleciones de tamaño variable o alteraciones estructurales cromosómicas relacionadas con la inserción de los transgenes, que dificultan su localización y que además pueden estar afectando múltiples genes, no pudiéndose identificar el gen directamente asociado al fenotipo mutante (Woychik y Alagramam, 1998).

En nuestro caso, la caracterización completa de las secuencias 5’ y 3’ flanqueantes al transgén permitió verificar que la inserción del transgén había



causado sólo la pérdida de 30 nucleótidos en el intrón 30 de la PLC-β1 del ratón, lo que facilitó la caracterización de esta mutación, que fue llamada PLC-β1βLG.

La PLC-β1 pertenece a una gran familia de fosfolipasas C. Cuando se traduce, da lugar a una enzima con un papel muy importante en las vías de traducción de las señales transmembranales al catalizar la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) dando lugar a segundos mensajeros intracelulares: el diacilglicerol y el inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) (Bahk *et al.*, 1994). Esta proteína es activada por la familia de las G proteínas siendo las subunidades α<sub>q</sub> y α<sub>11</sub> las que activan la PLC-β1 (figura 1).



**Figura 1.** Señal hormonal a través del sistema fosfatidil-inositol, generándose segundos mensajeros: el inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), el diacilglicerol (DAG) y el calcio. La acción del IP<sub>3</sub> incrementa los niveles de calcio citoplásmico. Abreviaciones: DAG, diacilglicerol; PA, ácido fosfatídico; IP, inositol fosfato; IP<sub>2</sub>, inositol difosfato; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trifosfato; IP<sub>4</sub>, inositol 1,3,4,5-tetrafosfato; PIP, fosfatidil-inositol fosfato; PIP<sub>2</sub>, fosfatidil-inositol 4,5,-difosfato; K, kinasa; E, esterasa; puntos negros, Calcio (Ca<sup>2+</sup>).

Debido a que la hidrólisis de la PIP2 es una de las respuestas inmediatas a varias señales extracelulares, la PLC- $\beta$ 1 es muy importante para que se desarrollen numerosas actividades celulares (Bahk *et al.*, 1998).

En 1997, Kim *et al.* crearon un ratón *knockout* para el gen PLC- $\beta$ 1 con el fin de investigar el papel que jugaba dicho gen en el cerebro, donde se expresa de forma abundante. Este grupo determinó la función esencial de la PLC- $\beta$ 1 para el funcionamiento normal del circuito inhibitorio neuronal, al acoplarse con los receptores acetilcolina muscarínicos. Recientemente, se ha descrito un nuevo modelo de disrupción de este gen en ratones transgénicos, producido mediante mutagénesis por inserción de un transgén en el intrón 3 del gen PLC- $\beta$ 1 del ratón (Böhm *et al.*, 2002). El estudio también se centra en las consecuencias a nivel neurológico que provoca la mutación del gen, describiendo un desorden epileptiforme en los ratones homocigotos para la mutación.

Aunque la mutagénesis por inserción es un fenómeno que se produce de manera aleatoria en el genoma del ratón, la descripción de dos mutaciones por inserción en dos líneas transgénicas independientes que afectan al locus de la deformidad de la extremidad, unida a una tercera mutación del mismo gen producida mediante radiación, ha planteado la posibilidad de que existan lugares en el genoma con más predisposición a la integración de los transgenes (revisado en Woychik y Alagramam, 1998). Presumiblemente, la integración de estos transgenes se produciría en regiones del genoma con una mayor susceptibilidad a la rotura de la cadena doble de ADN. Un fenómeno similar podría explicar las dos mutaciones por inserción que han ocurrido en el gen PLC- $\beta$ 1 (Böhm *et al.*, 2002; Ballester *et al.*, 2004a).

En el presente trabajo se describen los efectos que provoca la disrupción del gen PLC- $\beta$ 1 sobre el crecimiento, los rasgos morfométricos y la viabilidad de los ratones homocigotos, pudiendo utilizarse la mutación como un modelo distinto de disrupción del mismo gen. Mientras que en el estudio de Kim *et al.* (1997) los ratones homocigotos presentaban un crecimiento retardado y una mortalidad elevada a partir de la tercera semana de vida precedida por ataques epilépticos, en nuestro estudio observamos que a pesar de tener un crecimiento retardado, la muerte de estos animales (60%) se produce a una edad más temprana (durante

las dos primeras semanas después del nacimiento o durante la primera semana después del destete) y sin producirse ningún síntoma de déficit neurológico. Asimismo, el retraso en el crecimiento de los animales homocigotos PLC- $\beta$ 1 $_{\beta$ LG se produce en la etapa postnatal, con un tamaño significativamente inferior al de sus hermanos heterocigotos y a los ratones no transgénicos, que se traduce en un menor peso y longitud de estos animales mutantes. Estos ratones presentan a su vez una serie de características como un tamaño del cerebro y de huesos largos mayor en proporción al tamaño de su cuerpo o la presencia de cifosis, en algunos de los animales analizados, sin signos neurológicos evidentes.

Al igual que ocurre con el modelo descrito por Böhm et al. (2002) donde la inserción de un transgén anula la expresión del gen PLC- $\beta$ 1, el animal *knockout* obtenido por Kim et al. (1997) tampoco expresa el gen PLC- $\beta$ 1, ya que insertan un *cassette* de neomicina en una diana de restricción (*Bgl*II) localizada en el exón 3 del gen. Sin embargo, en los ratones PLC- $\beta$ 1 $_{\beta$ LG de nuestro estudio se ha caracterizado un ARNm híbrido, que contiene los 30 primeros exones del gen truncado PLC- $\beta$ 1 del ratón unido a los 7 exones del gen de la  $\beta$ LG caprina (incluida la señal de poliadenilación). Este ARNm híbrido contiene suficiente información para dar lugar a una proteína truncada funcional, al incluir una gran parte de la secuencia carboxi-terminal del gen PLC- $\beta$ 1. Esta secuencia contiene las dos regiones conservadas de residuos básicos que son necesarias para la activación de la PLC- $\beta$ 1 por las Gq $\alpha$  subunidades de las proteínas G, su asociación con la fracción subcelular particulada y su presencia en el núcleo (Kim et al., 1996). Una cierta funcionalidad de este ARNm híbrido, podría explicar el fenotipo atenuado que presentan nuestros ratones.

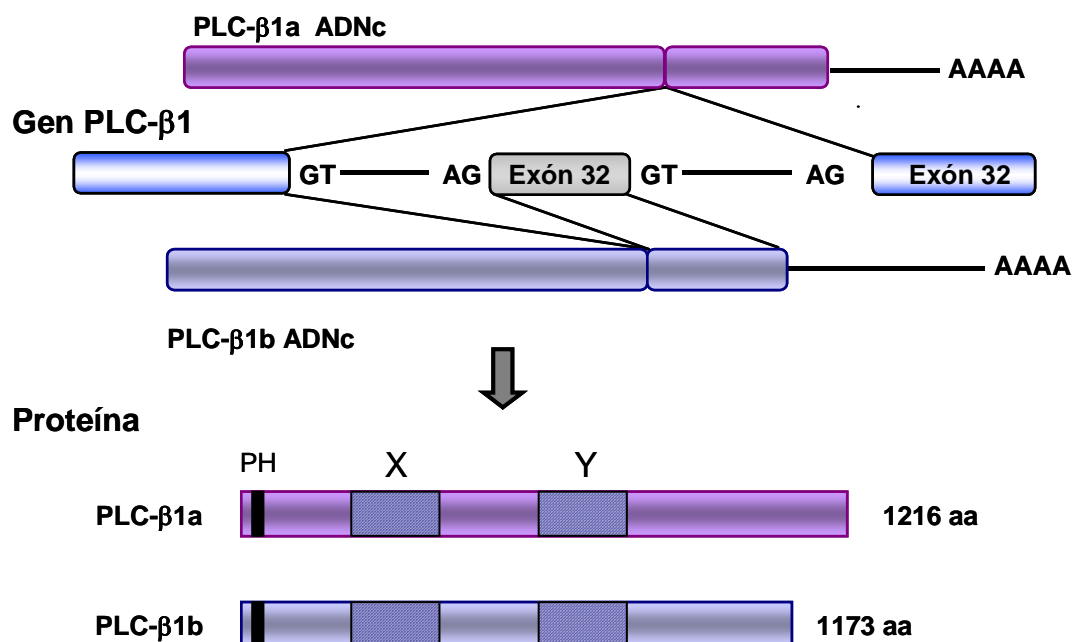
Otra característica que también se observa en los ratones homocigotos de la línea Tg56 es que tanto las hembras como los machos presentan niveles bajos de fertilidad. Un estudio realizado con espermatozoides de ratones que no expresan la Fosfolipasa C- $\beta$ 1 (PLC- $\beta$ 1 $^{-/-}$ ) (Choi et al., 2001) muestra una disminución significativa en la reacción acrosómica al compararlo con espermatozoides normales, siendo también más bajo el porcentaje de fertilización y de desarrollo embrionario. Böhm et al. (2002) también describen infertilidad en los machos, pero debido a la ausencia de acoplamiento. Por otra parte, Avazeri et al. (2000) estudian

la relación que existe entre la PLC- $\beta$ 1 y la reanudación de la 1ª meiosis del oocito. Proponen una redistribución del citoplasma al núcleo de la PLC- $\beta$ 1 durante este periodo, demostrando la existencia de un ciclo fosfoinositídico nuclear. Para que se de el paso de la PLC- $\beta$ 1 al núcleo es necesaria la secuencia COOH-terminal que sólo tienen las PLC tipo  $\beta$  (Kim *et al.*, 1996; Avazeri *et al.*, 2000). Estos autores concluyen que para que se produzca la rotura de la vesícula germinal (GVBD) es necesaria la síntesis y recolocación de la PLC- $\beta$ 1 en el córtex y núcleo del oocito.

Aunque sólo se han realizado estudios preliminares sobre la baja tasa de fertilidad que presentan nuestros ratones mutantes, los resultados difieren con respecto a los modelos publicados. No se han visto problemas relacionados con el acoplamiento en los machos, recuperándose espermatozoides móviles del epidídimo de estos animales, y los oocitos de las hembras pueden ser fecundados, produciéndose por tanto con anterioridad la rotura de la vesícula germinal. Debido a las diferencias encontradas entre los distintos modelos de mutación del gen PLC- $\beta$ 1, se analizó el patrón de expresión del ARNm híbrido.

Se ha descrito un procesamiento alternativo en el gen PLC- $\beta$ 1 de la rata que da lugar a dos tipos de ARNm, el tipo a y el tipo b. Estos dos tipos de transcritos codifican para dos polipéptidos de 150 KDa para la PLC- $\beta$ 1 tipo a y 140 KDa para la PLC- $\beta$ 1 tipo b, los cuales difieren en la región carboxi-terminal (correspondiente al exón 32; figura 2) (Bahk *et al.*, 1994). Este procesamiento alternativo también se ha descrito en la especie humana (Caricasole *et al.*, 2000) y en el ratón (GenBank: U85712 y U85713). En nuestro trabajo se obtuvieron híbridos entre el gen PLC- $\beta$ 1 y el gen de la  $\beta$ LG caprina, no pudiéndose formar los dos tipos de PLC- $\beta$ 1 (tipo a o tipo b) al insertarse el transgén en el intrón 30 del gen PLC- $\beta$ 1.

Aunque se han realizado estudios de expresión de los ARNm (tipo a y b) del gen PLC- $\beta$ 1 en diferentes tejidos humanos y de rata mediante la técnica de RT-PCR, en el ratón sólo se ha estudiado la expresión del gen PLC- $\beta$ 1 en diferentes áreas del cerebro (Watanabe *et al.*, 1998). Mientras que las dos isoformas de la PLC- $\beta$ 1 se detectaron en todos los tejidos humanos analizados (variando los niveles de expresión según el tejido), en la rata sólo se detectó expresión en diferentes áreas del sistema nervioso central (SNC), encontrándose niveles bajos de expresión en pulmón y testículos (Caricasole *et al.*, 2000).



**Figura 2.** Procesamiento alternativo que se produce al transcribirse el gen PLC-β1 y los dos tipos de proteínas que se traducen; PH (pleckstrin-homology), X e Y: dominios proteicos (modificado de Bahk *et al.*, 1994).

Los resultados encontrados en la rata varían con los encontrados en nuestro estudio en ratón donde si se detecta expresión de la PLC-β1 en todos los tejidos analizados. Para descartar un posible efecto del transgén en la expresión del gen PLC-β1, se realizaron estudios de expresión en ratones no transgénicos, encontrándose un patrón de expresión similar. Sin embargo, al cuantificar estos niveles de expresión, mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo-real, se comprobó que los niveles de expresión del gen PLC-β1 habían disminuido con la inserción del transgén (véase figura 4, artículo 1), esto podría ser debido a una mayor inestabilidad de este ARNm híbrido, lo que provocaría la rápida degradación de estas moléculas.

Como hemos comentado anteriormente, este ARNm híbrido contiene toda la información necesaria para producir una proteína funcional. Al traducirse, este

ARNm híbrido dará lugar a una proteína truncada que contendrá, además de la región codificante perteneciente a los 30 primeros exones del gen PLC- $\beta$ 1 del ratón, 10 aminoácidos resultantes de la inserción del transgén.

No obstante, esta proteína no pudo ser detectada mediante la técnica de *Western blot*. La poca cantidad de proteína PLC- $\beta$ 1 truncada producida, debido a los bajos niveles de expresión de ARNm híbrido en los ratones homocigotos PLC- $\beta$ 1 $_{\beta$ LG, podría ser la causa de la incapacidad de detección de esta proteína. Otras posibilidades como la obtención de una proteína inestable o con una conformación distinta podrían haber imposibilitado la detección mediante la técnica de *Western blot*.

Por otra parte, no se puede descartar la ausencia de proteína truncada en los ratones homocigotos PLC- $\beta$ 1 $_{\beta$ LG, atribuyendo las diferencias fenotípicas obtenidas entre los distintos modelos de mutación del gen PLC- $\beta$ 1 (Kim *et al.*, 1997; Böhm *et al.*, 2002; Ballester *et al.*, 2004a) a diferencias en el *background* genético de los animales. Estas diferencias de *background* genético pueden provocar que mutaciones que afectan a un mismo locus generen fenotipos distintos o fenotipos con un grado distinto de intensidad. Un ejemplo sería los ratones homocigotos *knockout* para el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR). Mientras que los ratones *knockout* con el *background* CF-1 mueren en el periodo preimplantacional debido a la degeneración de la masa celular interna, los ratones *knockout* con el *background* CD-1 viven hasta la edad del destete, muriendo a causa de múltiples defectos en sus órganos (revisado en Auerbach, 2004).

En conclusión, aprovechando uno de los inconvenientes de la técnica de microinyección como es la integración aleatoria del transgén, se pueden caracterizar mutaciones que pueden afectar a genes ya descritos (“clásicos”) o también a nuevos genes, siendo una herramienta muy útil para el estudio de su función y para la generación de modelos de enfermedades.

En el presente trabajo, describimos un nuevo modelo de disrupción del gen PLC- $\beta$ 1 que puede ser útil para investigar el papel de este gen en los mecanismos moleculares relacionados con el desarrollo, crecimiento y fertilidad.

## **2. PCR cuantitativa a tiempo real**

Desde la aparición de la PCR cuantitativa a tiempo real, han sido muchas las aplicaciones de esta técnica en el campo de la transgénesis. Actualmente, existen diversos trabajos realizados mediante PCR cuantitativa para la determinación del número de copias y la cigosis en plantas (revisado en Bubner y Baldwin, 2004) o la discriminación entre ratones transgénicos homocigotos y heterocigotos (Tesson *et al.*, 2002; Shitara *et al.*, 2004).

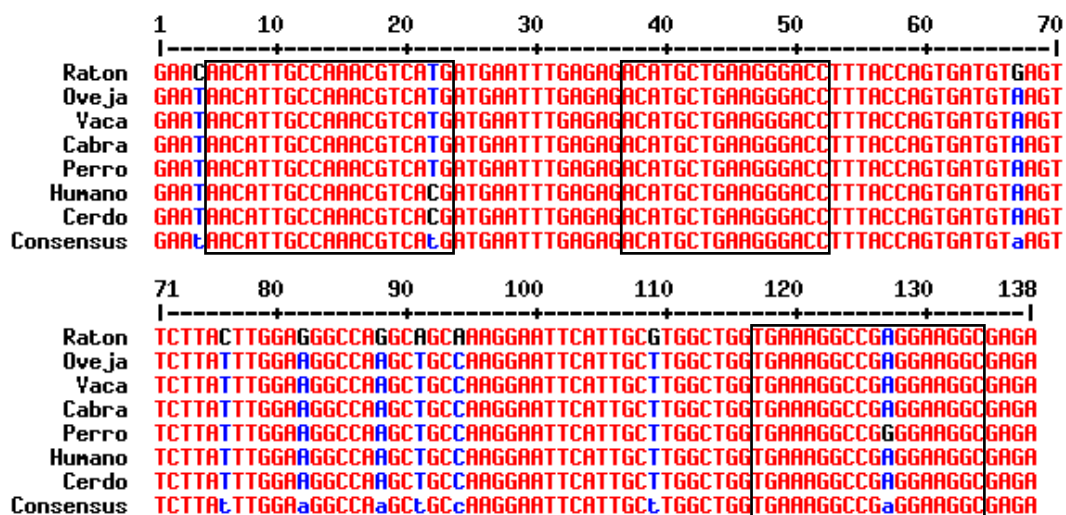
En el año 2001, Ingham *et al.* describieron un sistema para determinar el número de copias del transgén en plantas transformadas utilizando la cuantificación relativa con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). De forma similar, Tesson *et al.* (2002) determinaron la cigosis de ratones transgénicos para el factor acelerador de deterioro humano (hDAF). Para la realización de estas metodologías era necesaria la utilización de una muestra control previamente cuantificada mediante *Southern blot*.

La determinación de la cigosis en los ratones transgénicos mediante este método, ha permitido el ahorro de tiempo y dinero para fijar las líneas transgénicas en homocigosis. Del mismo modo, la determinación del número de copias insertadas del transgén en las distintas líneas transgénicas también es necesaria, ya que permite evaluar el grado de mosaicismo de los ratones fundadores y determinar si la expresión del transgén está correlacionada con el número de copias insertadas del mismo.

En el presente trabajo se describe un sistema basado en la PCR cuantitativa a tiempo real para la determinación del número de copias integradas del transgén en 7 de las líneas de ratones transgénicos para la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ LG) caprina (pPX(7.0)). La ventaja de este sistema es que no se requiere la utilización de una muestra control con un número de copias previamente cuantificado por *Southern blot* (Ballester *et al.*, 2004b). Este método permite cuantificar el número de copias del transgén substituyendo las técnicas tradicionales de transferencia (*dot blot*, *slot blot*, *southern blot*), que además de necesitar una gran cantidad de ADN, son muy laboriosas y generan resultados muchas veces ambiguos y poco fiables.

El método de cuantificación utilizado, al igual que en los trabajos anteriormente citados, se basa en el uso de la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Se trata de un método comparativo en el que la cantidad de gen diana es normalizada por un gen

endógeno (que corrige diferencias en la cantidad de ADN total añadido en cada reacción) y referida a una muestra que actúa como calibradora. En nuestro estudio se utilizó como gen endógeno el glucagón y como calibrador una muestra de ADN genómico de cabra que, sin la necesidad de ser cuantificada, nos garantizó la disponibilidad de un buen control de copia única para el gen de la  $\beta$ LG. Para poder aplicar el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  es condición necesaria que los dos genes (diana y endógeno) amplifiquen con una eficiencia similar, y que esta eficiencia se aproxime al 100%. Además, en nuestro caso, al utilizar como calibrador una muestra de ADN de una especie distinta a las muestras problema, es necesario que los dos genes amplifiquen en ambas especies (murina y caprina) con una eficiencia y sensibilidad similar. Si esto no se consigue, no se puede utilizar como calibrador una muestra que provenga de una especie distinta a la que va ser cuantificada. Para garantizar amplificaciones de eficiencia y sensibilidad parecida en ambas especies son muy importantes los cebadores y sondas utilizados. Estos han de ser diseñados a partir de secuencias muy conservadas entre las dos especies, ya que un solo *mismatch* que afecte a los cebadores o la sonda de una especie puede provocar diferencias en los Ct obtenidos para una misma cantidad de ADN entre las dos especies (figura 3).



**Figura 3.** Alineamiento del exón 4 del gen glucagón de diferentes especies utilizado como gen endógeno. Véase la conservación entre especies de las secuencias correspondientes a los cebadores y la sonda utilizados (enmarcados).



Previamente a la cuantificación del número de copias se validó el método a utilizar. Esta validación consistió en realizar curvas estándar, a partir de diluciones seriadas, para el transgén (gen de la  $\beta$ LG) y el gen endógeno (glucagón) en las dos especies, con el fin de obtener la eficiencia de amplificación y el rango de cuantificación lineal para cada uno de los genes. La pendiente de la recta de regresión (S) que se obtiene al representar el Ct en función del  $\log_{10}$  de la concentración de ADN (figura 1, artículo 2) permite determinar la eficiencia de amplificación [eficiencia PCR= $10^{(1/S)}-1$ ], indicando una pendiente de  $-3,32$  una eficiencia en la PCR del 100% (véase Applied Biosystems user bulletin #2 en <http://www.appliedbiosystems.com>). En todas las amplificaciones se obtuvieron eficiencias en la PCR superiores al 97%. Asimismo, la diferencia entre los Cts obtenidos para el gen de la  $\beta$ LG y el glucagón ( $\Delta$ Ct) en las distintas diluciones del ADN de cabra fue constante; obteniéndose en valor absoluto una pendiente  $<0,1$  en la recta de regresión, obtenida al representar el  $\Delta$ Ct en función del log de la concentración de ADN, requisito necesario para realizar la cuantificación relativa del número de copias mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Applied Biosystems user bulletin #2).

Las curvas estándar fueron realizadas con ADN genómico obtenido del hígado de un ratón transgénico (fundador Tg46) y de una cabra. Se escogió este tejido porque se ha descrito la inhibición de la PCR a tiempo real al utilizar ADN obtenido de colas de ratón mediante el método estándar de digestión con proteinasa K (Burkhart *et al.*, 2002). Estudios realizados en nuestro laboratorio con ADN genómico obtenido del mismo tejido de especies como el ratón y el cerdo corroboran esta hipótesis (resultados no publicados y comunicación personal); encontrándose por tanto en este tejido inhibidores de la PCR cuantitativa que pueden estar afectando la actividad de la *Taq* ADN polimerasa (Burkhart *et al.*, 2002).

Como ya se ha comentado, se cuantificaron un total de 7 líneas para el transgén de la  $\beta$ LG caprina. El número de copias de estas líneas había sido previamente determinado mediante la técnica de *Southern blot* (Pena *et al.*, 2001), lo que permitió validar el nuevo sistema de cuantificación utilizado. Los resultados de las dos técnicas coincidieron para las líneas de bajo número de copias (tabla 2,

artículo 2), encontrándose a veces resultados contradictorios que pueden ser atribuidos a la dificultad de cuantificación mediante la técnica de *Southern blot*.

Al igual que ocurre con las técnicas de transferencia, este sistema no permite cuantificar con exactitud líneas con un gran número de copias, ya que, basándonos en la amplificación exponencial de la PCR, la máxima diferencia de Ct ( $\Delta Ct$ ) es entre una y dos copias ( $\Delta Ct=1$ ), disminuyendo el  $\Delta Ct$  conforme incrementa el número de copias.

Con el fin de determinar la precisión del método se utilizaron entre 4 y 5 animales de la G1 de cada línea. Como era de esperar, las desviaciones estándar (sd) del número de copias entre los ratones de una misma línea fueron aumentando conforme lo hacía el número de copias, incrementando así la dificultad de discriminación entre copias consecutivas. Un ejemplo de ello fue la línea Tg19 que presentó una sd de 0,946 no pudiéndose determinar si tenía 18,19, o 20 copias. De igual modo, la línea Tg56 que contenía aproximadamente 45 copias del transgén, no pudo ser cuantificada con exactitud debido a que los Cts para el transgén estaban fuera del rango lineal de cuantificación. En nuestro experimento no se dispone de líneas con un número de copias integradas del transgén en la G1 entre 7 y 17, no pudiéndose determinar la capacidad máxima de discriminación de este sistema, que al menos es, para este estudio, de 6 copias (Tg60). La sd del número de copias de esta línea es de 0,144, estando lejos de una sd de 0,5 que sería la máxima desviación posible para discriminar entre dos líneas con un número de copias consecutivo. Diferentes artículos sobre la cuantificación del número de copias en plantas han sido publicados (revisado en Bubner y Baldwin, 2004), siendo la capacidad máxima de discriminación descrita de 4 copias (Ingham *et al.*, 2001).

En conclusión, para conseguir una buena capacidad de discriminación en líneas con un número de copias superior a dos, es muy importante mantener errores estándar bajos. Para ello es fundamental mantener la sd muy por debajo de un 0,38, que sería el valor teórico recomendado entre las replicas de cada muestra para diferenciar entre 1 y 2 copias, y que permitirá no superar la sd de 0,5 entre el número de copias de los animales de una misma línea transgénica.

En el presente trabajo se ha desarrollado un nuevo sistema basado en la PCR cuantitativa a tiempo real que permite cuantificar con exactitud el número de

copias en líneas transgénicas con al menos hasta 6 copias del transgén sin necesidad de utilizar una muestra previamente determinada por *Southern blot*. Asimismo, debido a que los cebadores y la sonda del gen de referencia (glucagón) han sido diseñados sobre secuencias conservadas en los rumiantes y que mayoritariamente las regiones promotoras más utilizadas para la expresión de proteínas heterólogas en animales transgénicos provienen de estas especies, este método puede ser utilizado para la cuantificación del número de copias en distintos animales transgénicos con estas regiones promotoras.

### **3. Expresión de la Hormona Estimulante del Folículo en ratones transgénicos**

A diferencia de la especie murina, donde entre un 10-30% de los ratones nacidos a partir de los embriones microinyectados llevan integrado el transgén en su genoma (Hogan *et al.*, 1994), en las especies domésticas el porcentaje es menor, siendo entre un 5-10% la descendencia que será portadora del transgén (Ziomek, 1998). Si ha este factor le unimos los largos periodos de gestación y los meses necesarios para que estos animales alcancen la madurez sexual (tabla 1), el tiempo y coste para la obtención de un animal doméstico transgénico mediante microinyección es mucho mayor. Con el fin de verificar que las construcciones son capaces de dirigir la expresión del transgén a la glándula mamaria, sin producir ninguna alteración funcional en los animales, es muy importante que estas construcciones sean previamente testadas *in vivo* utilizando un modelo más barato y más rápido como es el ratón.

Como se ha comentado anteriormente, estudios realizados en nuestro grupo con construcciones para la  $\beta$ LG caprina (Ibáñez *et al.*, 1997; Pena *et al.*, 2001), nos permiten disponer en la actualidad de un *cassette* de expresión que puede dirigir la expresión del transgén de forma eficiente y específica a la glándula mamaria.

En el presente trabajo se han elaborado dos construcciones genéticas híbridas entre las regiones reguladoras del gen de la  $\beta$ LG caprina y los genes que codifican las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la hormona FSHh. Estas construcciones han sido comicroinyectadas en embriones de ratón, obteniéndose ratones transgénicos que expresan la FSHh en la glándula mamaria (Ballester *et al.*, enviado a *Theriogenology*).

**Tabla 1.** Características productivas de especies domésticas utilizadas como *bioreactores* transgénicos

	<b>Conejo</b>	<b>Cerdo</b>	<b>Oveja</b>	<b>Cabra</b>	<b>Vaca</b>
<b>Gestación (meses)</b>	1	4	5	5	9
<b>Edad madurez sexual (meses)</b>	5	6	8	8	15
<b>Tiempo entre la introducción del transgén-primera lactación (meses)</b>					
<b>Hembras fundadoras</b>					
Lactación inducida-prepúberes	-	-	9	9	16
Lactación natural	7	16	18	18	33
<b>Machos fundadores</b>					
Lactación inducida hijas prepúberes	-	-	22	22	45
Lactación natural hijas	15	28	31	31	57
<b>Número de crías</b>	8	10	1-2	1-2	1
<b>Producción anual de leche (l)</b>	4-5a	300b	500	800	8000
<b>Proteína recombinante bruta por hembra y año (kg)</b>	0,02	1,5	2,5	4	40

a Producción media total de 2-3 lactaciones por año.

b Producción media total de 2 lactaciones por año.

(Modificado de Rudolph, 1999)

### **3.1. Construcciones para las dos subunidades de la hormona FSHh**

Para la obtención de animales transgénicos que expresen proteínas heterólogas en su glándula mamaria, es muy importante en primer lugar, el diseño de las construcciones que van a ser integradas.

En el presente trabajo se ha utilizado un *cassette* de expresión que contiene 410 pb de región promotora proximal y 2,5 kb de región 3' flanqueante del gen de la  $\beta$ LG caprina. A estas regiones reguladoras se le han insertado de forma independiente los dos genes (los exones codificantes con los correspondientes intrones) de las dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de la hormona FSHh, obteniéndose dos construcciones genética híbridas. Se escogió este tipo de construcción porque diferentes trabajos muestran como la incorporación de los intrones en las construcciones transgénicas incrementa la eficiencia transcripcional (Brinster *et al.*, 1988; Choi *et al.*, 1991; Whitelaw *et al.*, 1991). Esto podría ser debido a un efecto directo del procesamiento de los exones en la regulación de la expresión génica

(Brinter *et al.*, 1988) o a la existencia de elementos *cis-acting* que ayudarían al gen a adoptar una configuración apropiada de la cromatina facilitando el acceso de los factores de transcripción a la región promotora (Whitelaw *et al.*, 1991). Otros autores han demostrado como la incorporación de intrones heterólogos pueden incrementar la expresión génica, sugiriendo también un mecanismo post-transcripcional dependiente del procesamiento de los exones en el incremento de la expresión (Choi *et al.*, 1991).

### **3.2 Obtención de ratones transgénicos para la FSH humana**

Como ya hemos comentado, uno de los inconvenientes de la microinyección a pronúcleo es la baja eficiencia de producción de ratones transgénicos. Existen muchos factores que afectan esta eficiencia, desde la medida del transgén que va a ser utilizado hasta la capacidad de los embriones de tolerar la manipulación y continuar su desarrollo después de la implantación en las madres receptoras. Los dos parámetros más críticos que determinan la integración del ADN microinyectado en el genoma del ratón es la concentración y la forma en la que el ADN es inyectado (Brinster *et al.*, 1985). En el presente trabajo ambas construcciones fueron linealizadas ya que se ha descrito un eficiencia de integración 5 veces mayor para las moléculas de ADN lineales con respecto a las construcciones tradicionales basadas en plásmidos (moléculas de ADN circular, superenrolladas) (Brinster *et al.*, 1985). Una vez linealizado, el ADN de las dos construcciones fue comicroinyectado a una concentración final de 5 ng/μl. Generalmente, cuando se comicroinyectan moléculas distintas de ADN lineal, éstas se integran juntas en el mismo lugar del genoma (Brinster *et al.*, 1985; Greenberg *et al.*, 1991; Prunkard *et al.*, 1996). Por otra parte, un estudio realizado por Brinster *et al.* (1985) muestra como un incremento en la concentración del ADN de 0,5 a 1 ng/μl produce un incremento del doble en la tasa de integración del transgén, siendo constante la frecuencia de integración cuando se inyecta 1 y 10 ng/μl. Sin embargo, la eficiencia de obtención de animales transgénicos disminuye cuando se utilizan concentraciones iguales o superiores a 10 ng/μl, afectando la supervivencia de los embriones. Esto podría ser debido a un efecto del mismo ADN o de contaminantes presentes en la solución de microinyección (Brinster *et al.*, 1985; Nottle *et al.*, 2001).

En nuestro estudio se ha obtenido una frecuencia de integración de los transgenes de un 10,8% (9 ratones transgénicos de 83 animales analizados), frecuencia que se encuentra entre los valores esperados para una construcción simple (Gordon *et al.*, 1980). Seis de los 9 animales transgénicos generados han integrado los dos transgenes, obteniéndose una frecuencia de integración del 7,2%. Prunkard *et al.* (1996) obtuvieron 12 ratones transgénicos para la construcción multimérica del fibrinógeno humano que constaba de 3 *cassettes* de expresión. La frecuencia de integración de las tres construcciones fue del 8% (149 animales analizados). En un estudio reciente donde también se han obtenido ratones transgénicos para el fibrinógeno recombinante humano (Butler *et al.*, 2004), se ha obtenido un porcentaje de ratones transgénicos para las 3 construcciones de un 23% (9 ratones transgénicos de 39 ratones analizados), frecuencia muy elevada al tratarse de construcciones multiméricas.

Debido a que las construcciones multiméricas son comicroinyectadas, existe un porcentaje de ratones que no integra todas las construcciones. En estudios con ratones transgénicos para construcciones multiméricas como el fibrinógeno recombinante humano (Prunkard *et al.*, 1996) y la FSH bovina (Greenberg *et al.*, 1991) se observó un porcentaje de animales transgénicos multiméricos del 85%, existiendo un 15% de animales que no habían integrado todos los transgenes. En nuestro estudio el porcentaje de ratones que sólo ha integrado uno de los dos transgenes es mayor (33%), encontrando 3 líneas de ratones transgénicos con una sola subunidad (tg6,  $\alpha$ ; tg51,  $\alpha$ ; y tg545,  $\beta$ ).

Teniendo en cuenta que las dos construcciones se microinyectaron a una concentración equimolar, este menor porcentaje podría ser explicado por la presencia de extremos distintos en las moléculas de ADN de ambas subunidades de la hormona FSHh, generados al cortar con distintos enzimas de restricción para linealizarlas y liberarlas del plásmido. Mientras que en experimentos con construcciones multiméricas como el de Prunkard *et al.* (1996) y el de John *et al.* (1999), las tres construcciones son digeridas con el mismo enzima de restricción (*MluI*) generando extremos cohesivos, en nuestro experimento la construcción con la subunidad  $\alpha$  de la FSHh fue digerida con el enzima de restricción *SnaBI*, generando extremos romos, y la subunidad  $\beta$  con los enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI*, generando extremos cohesivos. Teniendo en cuenta el modelo propuesto

de integración del ADN microinyectado en el genoma (Brinster *et al.*, 1981, 1985; Bishop y Smith, 1989), en el que antes de integrarse las moléculas de ADN microinyectadas se unen intramolecularmente (circularización) e intermolecularmente (formación de tándems), produciéndose posteriormente una recombinación homóloga entre todos los tipos de moléculas; podríamos hipotetizar que es más fácil la recircularización de moléculas con extremos romos que no con extremos cohesivos, dificultando así su integración en el genoma, y que es más fácil la formación de tándems entre moléculas distintas con extremos cohesivos iguales o distintos, que con extremos romos. Asimismo un estudio realizado por Brinster *et al.* (1985) muestra como la microinyección de moléculas lineales de ADN con extremos romos tiene una eficiencia de integración (8%) muy baja con respecto a las moléculas de ADN lineal con extremos cohesivos iguales o distintos (24-31%). Teniendo en cuenta estos factores, en un mismo lugar de integración, esperaríamos un mayor porcentaje de integración de las moléculas de ADN de la subunidad  $\beta$  de la FSHh con respecto a las moléculas de la subunidad  $\alpha$ , las cuales se recircularizarían con mucha más facilidad dificultando su integración en el genoma. No obstante, deben existir otros factores que estén influenciando la integración de las distintas construcciones, ya que en el experimento de Butler *et al.* (2004) para la obtención de fibrinógeno recombinante humano, las tres construcciones utilizadas, digeridas con los enzimas *NotI/PvuI* generando extremos cohesivos, dieron lugar a 6 líneas trigénicas con ratios equilibradas y desequilibradas de los tres transgenes integrados en su genoma.

De los 6 animales fundadores (7, 12, 19, 22, 40, y 42) obtenidos, el 7 y el 40 no transmitieron los transgenes a la descendencia, pudiendo ser estos animales mosaicos. La hembra fundadora 22 sólo transmitió a la descendencia la subunidad  $\alpha$ , indicando una posible integración de los transgenes en lugares distintos del genoma, pudiendo al menos ser mosaico para la subunidad  $\beta$ . El resto de líneas (tg12, tg19 y tg42) transmitió los dos transgenes a la descendencia. Debido a la existencia de un animal transgénico (545) que sólo tenía integrada la subunidad  $\beta$ , con el fin de generar una nueva línea transgénica, se cruzó esta hembra con un macho G1 (261) descendiente de la hembra fundadora 22, creando la nueva línea transgénica tg545 $_{\alpha+\beta}$ .

Una vez obtenidos los ratones fundadores, estos fueron cruzados con ratones normales para fijar las líneas. Como ya se ha explicado en la introducción (capítulo 6), si el transgén se integra en el genoma del embrión después de la primera división celular, el animal fundador será mosaico para el transgén (Wilkie *et al.*, 1986). Si el animal fundador es mosaico en línea germinal, el patrón de transmisión del transgén a la descendencia será inferior al 50%, dependiendo el porcentaje del grado de mosaicismo del animal. Es posible incluso que el animal fundador no contenga el transgén integrado en la línea germinal no pudiendo transmitirlo a la descendencia. Otro factor que indica el posible mosaicismo de los ratones fundadores, es la comparación del número de copias entre estos animales y su descendencia (G1).

Al analizar la tasa de transmisión del transgén a la descendencia en las tres líneas que transmiten ambas subunidades (tabla 2), observamos como las frecuencias de transmisión de estos transgenes se encuentran dentro de los valores esperados para las líneas tg12 y tg19, sin embargo, la tasa de transmisión de los transgenes en la línea tg42 esta muy por debajo de la esperada, indicando un mosaicismo germinal de este fundador. Al analizar el número de copias, observamos como en las líneas tg12 y tg19, tanto los fundadores como la descendencia poseen el mismo número de copias, lo que verifica que estos animales fundadores no son mosaico. Asimismo, el fundador 42 además de ser mosaico en línea germinal también lo es a nivel somático al poseer menos copias (5) que su descendencia (9). Los fundadores 7 y 40, poseen 6 y 4 copias, respectivamente, de los transgenes, siendo mosaicos al no poseer los transgenes en línea germinal y por tanto no transmitirlos a su descendencia. Por último, la fundadora 22 posee 9 copias de los transgenes, siendo también mosaico al menos para la subunidad  $\beta$  al no transmitirla a su descendencia.

Una vez obtenida la G1, estos animales hemocigotos para el transgén fueron cruzados entre sí con el fin de obtener ratones homocigotos y poder fijar la línea. La tasa de transmisión esperada para los ratones transgénicos es de un 75%, sin embargo, la frecuencia de transmisión del transgén en la línea tg19 no se ajustaba a la esperada, resultando en una proporción 2:1 entre ratones transgénicos versus no-transgénicos. Esto indicaría que los animales homocigotos de la línea tg19 mueren durante el desarrollo embrionario, siendo la integración del transgén letal



en homocigosis. Como ya se ha explicado en la introducción (apartado 6), entre un 5-10 % de los ratones fundadores creados por microinyección de ADN presentan mutaciones producidas por la inserción del transgén (Palmiter y Brinster 1986), este porcentaje incluiría las mutaciones por inserción que causan letalidad prenatal. En nuestra línea tg19, el transgén ha debido insertarse en un lugar del genoma donde interrumpe o altera la función de uno o más genes imprescindibles para el desarrollo prenatal, siendo necesaria una caracterización de este lugar de integración para acabar de entender la causa de la letalidad de los ratones homocigotos.

**Tabla 2.** Líneas transgénicas para las dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de la  $\beta$ lg/FSH humana

	<b>Tg7</b>	<b>Tg12</b>	<b>Tg19</b>	<b>Tg22</b>	<b>Tg40</b>	<b>Tg42</b>	<b>Tg545<math>_{\alpha+\beta}</math><sup>2</sup></b>
<b>Fundador</b>	♀	♂	♀	♀	♀	♀	♀
<b>Frecuencia transmisión sólo FSH<math>\alpha</math></b>	0% (0/32)	0% (0/52)	0% (0/62)	57,6% (34/59)	0% (0/40)	41,4% (29/70)	23,2% (10/43)
<b>Frecuencia transmisión sólo FSH<math>\beta</math></b>	0% (0/32)	0% (0/52)	0% (0/62)	0% (0/59)	0% (0/40)	0% (0/70)	37,2% (16/43)
<b>Frecuencia transmisión FSH<math>\alpha</math> + FSH<math>\beta</math> juntas</b>	0% (0/32)	44,2% (23/52)	48,4% (30/62)	0% (0/59)	0% (0/40)	7,1% (5/70)	23,2% (10/43)
<b>Mosaico línea germinal</b>	SI	NO	NO	SI	SI	SI	-
<b>Nº de copias del transgén en fundador<sup>1</sup></b>	6	2	10	9	4	5	-
<b>Nº de copias del transgén en G1</b>	-	2	10	-	-	9	3
<b>Mosaico somático</b>	-	NO	NO	-	-	SI	-

Sólo se han cruzado los fundadores que eran transgénicos dobles (FSH  $\alpha$  +  $\beta$ ).

<sup>1</sup>El nombre de copias se ha determinado cuantificando el promotor de la  $\beta$ LG (presente en las dos construcciones). Por tanto, estas cifras son globales no distinguiéndose entre el número de copias de cada subunidad.

<sup>2</sup>La línea tg545 $_{\alpha+\beta}$  se ha obtenido mediante el cruce de la ♀tg nº 545 (transgénica sólo para la FSH $\beta$ ) con el ♂tg nº 261 (animal de la G1 de la línea tg22, transgénico que sólo transmite la subunidad  $\alpha$ ).

Las frecuencias observadas de transmisión de los transgenes a la descendencia (en aquellas líneas que transmiten ambos transgenes) se ajustan en todos los casos, excepto en la línea tg42 ( $\chi^2$ ;  $p < 0,01$ ), a las esperadas ( $\chi^2$ ;  $p > 0,05$ )

### **3.3. Expresión del ARNm de las subunidades ( $\alpha$ y $\beta$ ) de la hormona FSH humana en la glándula mamaria**

Tras el análisis de expresión del ARNm en la glándula mamaria de hembras transgénicas en lactación mediante la técnica de RT-PCR, se pudo comprobar como las hembras (G1) de las 4 líneas transgénicas establecidas expresaban los dos transgenes ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de la FSHh, demostrando la capacidad de las regiones reguladoras del gen de la  $\beta$ LG caprina de dirigir la expresión de secuencias heterólogas a la glándula mamaria en lactación.

Por otra parte, el análisis de expresión del ARNm en otros tejidos, reveló la presencia de expresión ectópica para las dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) en las líneas transgénicas tg12, tg19 y tg545 $_{\alpha+\beta}$ , no observándose expresión ectópica en la línea tg42. Mientras que el patrón de expresión ectópica presentado por la subunidad  $\beta$  fue distinto para las 3 líneas transgénicas, encontrándose expresión ectópica en distintos tejidos; el patrón de expresión ectópica para la subunidad  $\alpha$  fue similar en las tres líneas transgénicas, encontrándose expresión ectópica en todos los tejidos analizados.

Un efecto similar se observa al insertar secuencias heterólogas en *cassettes* de expresión con las regiones reguladoras del gen de la  $\beta$ LG ovina (Archibald *et al.*, 1990; Shani *et al.*, 1992; Prunkard *et al.*, 1996). Mientras que estas regiones son capaces de dirigir la expresión del transgén de la  $\beta$ LG ovina a la glándula mamaria de ratonas en lactación, con independencia del lugar de integración (Whitelaw *et al.*, 1992); la inserción de genes heterólogos altera la expresión del transgén, siendo dependiente del lugar de integración y modificando, a su vez, los patrones de expresión temporal y espacial del transgén. Un estudio realizado por Webster *et al.* (1997) muestra como la eliminación de las secuencias intrónicas del transgén de la  $\beta$ LG ovina, incrementa su sensibilidad a los efectos de posición del lugar de inserción cromosómico. Sin embargo, no se ha detectado una correlación entre la eliminación de los intrones y la expresión ectópica de los transgenes de la  $\beta$ LG ovina (Webster *et al.*, 1997). Mientras que debe existir algún mecanismo dominante que dirige la expresión del transgén de la  $\beta$ LG ovina de forma independiente al lugar de integración en la glándula mamaria; la existencia de

expresión ectópica de este transgén sugiere su incapacidad para aislarse de los efectos de la cromatina adyacente en otros tejidos (Farini y Whitelaw, 1995). No obstante, a diferencia del transgén de la  $\beta$ LG ovina ( $\beta$ LG- $\Delta$ Dp), las líneas para el transgén del mismo tamaño de la  $\beta$ LG caprina, no presentaron expresión ectópica (Pena *et al.*, 2001).

La expresión eficiente del transgén ha sido atribuida a dos tipos de elementos control (revisado en Houdebine, 1994, 2000; Webster *et al.*, 1997):

1. elementos que actúan como súper-*enhancers*, activando la transcripción del transgén en el tejido apropiado. Un ejemplo sería el LCR (*locus control region*) del gen de la  $\beta$ -globina.
2. elementos que actúan aislando el transgén de la estructura de la cromatina adyacente al lugar de integración del transgén. Un ejemplo sería los MARs (*matrix attached region*), generalmente son regiones ricas en AT que unen los lazos de la cromatina a la matriz nuclear donde hay concentrados muchos factores de transcripción.

La presencia de elementos control en la unidad de transcripción del gen de la  $\beta$ LG caprina podría ser la responsable de las diferencias de especificidad tisular encontradas entre las construcciones de la  $\beta$ LG caprina y ovina del mismo tamaño (Pena *et al.*, 2001). La existencia de una región MAR que abarca del primer exón al segundo intrón del gen de la  $\beta$ LG caprina junto con la existencia de dos regiones hipersensibles a la ADNasa I en los intrones 1 y 2, podría explicar estas diferencias.

La falta de elementos control en nuestras construcciones capaces de aislar el transgén de la cromatina adyacente podría explicar la presencia de expresión ectópica en 3 de las 4 líneas analizadas, siendo al menos esta expresión dependiente del lugar de integración para la subunidad  $\beta$ , al presentar un patrón de expresión tisular distinto entre las líneas. No obstante, el patrón de expresión ectópica de la subunidad  $\alpha$  fue similar para las tres líneas, pudiendo tener en su secuencia elementos control que dirijan esta expresión en estos tejidos.

### **3.4 Expresión de la hormona FSH humana en la leche de los ratones transgénicos**

Con el fin de determinar y cuantificar la concentración de la hormona FSH humana, diferentes diluciones de la leche de hembras transgénicas fueron analizadas mediante la técnica de *Western blot*.

Después de realizar distintos experimentos no se pudo detectar la presencia de la proteína en la leche, pudiéndose atribuir estos resultados a varios factores como:

- \* Una expresión de esta proteína por debajo de los niveles de detección de la técnica de *Western blot*.
- \* La retención de la proteína en el interior de las células de la glándula mamaria.
- \* La no producción de la proteína.

Una baja expresión de la proteína podría ser la causa más probable de la no detección de la proteína FSH en la leche de las hembras transgénicas. Teniendo en cuenta que nuestro método es capaz de detectar entre 10-20 ng de proteína FSH humana comercial y que la máxima cantidad de leche añadida fue la equivalente a 10  $\mu$ l, los niveles de expresión en nuestras líneas transgénicas estarían por debajo de 1-2  $\mu$ g/ml. Esta baja expresión podría ser debida a un bajo número de copias integradas de alguna de las dos subunidades, que provocaría la disminución de los niveles producidos de hormona en la leche. En 1991, Greenberg et al. obtuvieron líneas de ratones transgénicos para la FSH bovina (FSHb). Estos autores diseñaron dos construcciones distintas para la subunidad  $\alpha$  de la FSHb, una de las cuales contenía además del ADNc de esta subunidad, 4 copias de la secuencia GRE (*glucocorticoid response element*) de un promotor del virus del tumor mamario del ratón (GRE $\alpha$ ). Esta secuencia fue incorporada con el fin de incrementar la expresión de la subunidad  $\alpha$ , ya que de forma natural, es expresada en exceso en la glándula pituitaria. La utilización de esta segunda construcción generó un mayor número de líneas de ratones transgénicos que expresaban ambas subunidades (60%) a niveles mucho más elevados, con respecto a las líneas que no contenían la secuencia GRE en la construcción de la

subunidad  $\alpha$  (27%). En nuestro experimento no se ha tenido en cuenta la mayor expresión natural de la subunidad  $\alpha$ , inyectándose los dos transgenes a una concentración equimolar. La menor integración de este transgén podría haber dado lugar a su baja expresión, factor que provocaría la producción de la hormona FSH por debajo de los niveles detectables.

Sin embargo, no hay que descartar otros factores, ya que, desde la aparición del primer animal transgénico capaz de producir en su leche una proteína recombinante (Simons *et al.*, 1987), muchas han sido las proteínas recombinantes obtenidas con mayor o menor éxito (tabla 3). Estas diferencias en las concentraciones de proteína obtenida han sido mayoritariamente atribuidas a la influencia del lugar de integración en la expresión de los transgenes y la falta o existencia de regiones reguladoras o silenciadoras en el transgén que determinan su expresión.

Por último, el análisis proteico de varias muestras de tejido de glándula mamaria mediante *Western blot*, nos permite afirmar al menos que la glándula mamaria de nuestros ratones transgénicos contienen la FSHh ensamblada. Aunque no existen, a simple vista, anomalías en la glándula mamaria de nuestras hembras transgénicas, y estas son capaces de amamantar correctamente a sus crías, no podemos descartar que exista algún problema en la secreción de la FSHh. Sin embargo, la detección de la proteína en la glándula mamaria podría ser debida al mayor volumen de muestra que puede ser analizado por *Western blot*, ya que las muestras de leche son diluidas para poder eliminar la grasa, siendo por tanto mucho mayor el volumen que hay que cargar para conseguir la misma concentración proteica.

En conclusión, para poder obtener animales de producción que secreten cantidades suficientes de FSHh para su comercialización, es necesario en primer lugar la modificación de las construcciones, con el fin de conseguir niveles elevados de expresión que permitan determinar si la glándula mamaria es capaz de sintetizar una proteína con la misma actividad y propiedades que presenta la proteína natural.

**Tabla 3.** Niveles obtenidos en la leche de ratones transgénicos de distintas proteínas de interés farmacéutico

<b>Región Promotora</b>	<b>Proteína</b>	<b>Rendimiento</b>
<b>Caseína <math>\alpha</math>s1 bovina</b>	Factor VIII humano (Chen <i>et al.</i> , 2002)	7-50 $\mu$ g/ml
	Procolágeno $\alpha$ 1 (I) humano (Toman <i>et al.</i> , 1999)	8 mg/ml
	GM-CSF (Uusi-Oukari <i>et al.</i> , 1997)	1 mg/ml
	Ácido $\alpha$ -glucosidasa humano (Bijvoet <i>et al.</i> , 1996)	1,5 $\mu$ g/ml
	Lactoferrina humana (Platenburg <i>et al.</i> , 1994)	36 $\mu$ g/ml
<b><math>\beta</math>-caseína bovina</b>	Trombopoyetina humana (Sohn <i>et al.</i> , 1999)	1,5 mg/ml
<b><math>\beta</math>LG ovina</b>	Fibrinógeno humano (Prunkard <i>et al.</i> , 1996)	2 mg/ml
	Albúmina sérica humana (Shani <i>et al.</i> , 1992)	2,5 mg/ml
	Antitripsina $\alpha$ 1 humana (Archibald <i>et al.</i> , 1990)	0,5-7 mg/ml
<b><math>\beta</math>-caseína de rata</b>	Hormona de crecimiento humana (Lee <i>et al.</i> , 1996)	0,02-5,5 mg/ml
	FSH bovina (Greenberg <i>et al.</i> , 1991)	15 $\mu$ g/ml
<b>WAP del conejo</b>	Hormona de crecimiento bovina (Thepot <i>et al.</i> , 1995)	1-16 mg/ml
	Eritropoyetina humana (Rodríguez <i>et al.</i> , 1995)	10 ng/ml
	Hormona de crecimiento humana (Devinoy <i>et al.</i> , 1994)	4-22 mg/ml
<b>WAP del ratón</b>	Hormona paratiroidea humana (Rokkones <i>et al.</i> , 1995)	0,4 $\mu$ g/ml

Abreviaciones: GM-CSF: factor de estimulación colonial de granulocitos-macrófagos; FSH: hormona estimulante del folículo (modificado de Lui *et al.*, 2003)

#### **4. Polimorfismo en el gen de la $\beta$ -Lactoglobulina caprina**

Durante los últimos años, gracias al progreso en las técnicas de biología molecular, se ha producido un incremento en la caracterización de variantes genéticas tanto en las caseínas como en las proteínas séricas. Estos polimorfismos

resultan de interés como marcadores moleculares en estudios de asociación con caracteres productivos. Asimismo, si afectan a regiones reguladoras, pueden resultar relevantes en el conocimiento de los mecanismos de control de la expresión de estos genes, pudiendo ser utilizados como *cassettes* de expresión en animales transgénicos.

Actualmente, se conocen 11 variantes para la  $\beta$ -lactoglobulina bovina ( $\beta$ LG) a nivel del ADN (tabla 2 introducción) y tres variantes para la  $\beta$ LG ovina (A, B y C; Gaye *et al.*, 1986; Erhardt, 1989). Sin embargo, aunque en la leche de algunas razas caprinas se ha descrito la existencia de variabilidad proteica para la  $\beta$ LG (Machà, 1970; Boulanger, 1976), no se ha caracterizado ninguna variante genética que afecte a la región codificante del gen.

En el presente trabajo hemos caracterizado un total de 15 polimorfismos en el gen de la  $\beta$ LG caprina en distintas razas (Alpina, Saanen, Malagueña, Murciano-Granadina, Tinerfeña, Palmera, Majorera, Teramana, Girgentana, Cachemir y Sahel). Nueve de las mutaciones están localizadas en la región promotora proximal y el resto en los exones 1 al 6 (Ballester *et al.*, 2005). Con la excepción de un polimorfismo localizado en el promotor, en la posición -114 del inicio de transcripción (relativo a la secuencia del gen de la  $\beta$ LG caprina descrito en Folch *et al.*, 1994), que provoca la inserción/delección del nucleótido G, el resto de polimorfismos son substituciones de un nucleótido. Generalmente estas mutaciones son transiciones entre pirimidinas (C/T, incluyendo la complementaria reversa G/A) que afectan a los dinucleótidos CpG y que pueden ser atribuidas a la deaminación de las 5-metilcitosinas (Duncan y Miller, 1980).

El promotor del gen de la  $\beta$ LG ha sido bien caracterizado en la especie ovina (Watson *et al.*, 1991) conservándose los lugares de unión para factores de transcripción en el gen de la especie bovina (Graml *et al.*, 1989; Lum *et al.*, 1997) y caprina (Folch *et al.*, 1994). La interacción de los factores de transcripción con las secuencias *cis* es necesaria para que se inicie la transcripción y mutaciones en estas regiones pueden afectar la unión de estos factores disminuyendo la eficiencia de transcripción. Con el fin de estudiar las regiones promotoras de distintos genes de proteínas lácteas, se han realizado diferentes estudios con animales transgénicos (Whitelaw *et al.*, 1992; Ibáñez *et al.*, 1996; Pena *et al.*, 2001).

Whitelaw et al. (1992) demostró que los 406 pb proximales de la región promotora del gen de la  $\beta$ LG ovina eran suficientes para dirigir la expresión del transgén a la glándula mamaria de los animales transgénicos, y que esta expresión era dependiente del número de copias integradas del transgén. Lo mismo ocurre con el promotor de la  $\beta$ LG caprina (Pena et al., 2001), lo que indicaría la presencia de elementos reguladores importantes, necesarios para la correcta expresión de estos genes.

Por este motivo, la caracterización de polimorfismos en estas regiones es importante, ya que pueden provocar diferencias en la transcripción de los ARNm provocando alteraciones fisiológicas en el animal. Un ejemplo de ello serían los efectos observados en la composición de la leche y el rendimiento quesero asociados a las variantes genéticas A y B de la  $\beta$ LG bovina. La leche de los animales con el genotipo AA presenta un mayor contenido de proteínas séricas que los animales de genotipo BB. Este mayor contenido proteico es debido a un incremento en la  $\beta$ LG, con un contenido medio de 2,58 mg/ml para el alelo A con respecto a un contenido medio de 1,7 mg/ml para el alelo B (Ng-Kwai Hang y Grosclaude, 1992). Estas diferencias han sido detectadas a nivel del ARNm con hibridaciones alelo específicas del ARN total para los animales heterocigotos AB (ratio A:B de ARNm  $1,65 \pm 0,2$ ; Ford et al., 1993), sugiriendo una expresión diferencial de los alelos A y B que podría ser atribuible a diferencias en la transcripción del ARNm. Con el fin de explicar estas diferencias de expresión se han caracterizado una serie de polimorfismos en la región promotora de la  $\beta$ LG bovina (revisado en Martin et al., 2002). Lum et al. (1997) describió nueve polimorfismos alelo específicos en los 733 pb de región promotora proximal. Posteriormente, se realizaron estudios con células HC11 transfectadas transitoriamente con las regiones promotoras de la  $\beta$ LG bovina A y B, demostrándose que los 9 nucleótidos alelo específicos que difieren entre las dos variantes son responsables de la transcripción diferencial entre los promotores de la  $\beta$ LG A y B (Folch et al., 1999).

En la cabra, se han encontrado diferencias en el contenido de  $\beta$ LG en la leche de animales de la raza italiana Girgentana (Chianese et al., 2000). Recientemente, se ha descrito un polimorfismo en la región promotora de estos



animales, no encontrándose una correlación entre la mutación y el contenido en  $\beta$ LG (Graziano *et al.*, 2003).

Como se ha comentado anteriormente, en el presente trabajo se han caracterizado nueve polimorfismos en la región promotora proximal. Las mutaciones localizadas en las posiciones -60 y -341 han sido previamente caracterizadas en razas españolas y francesas, y en las razas Saanen, Alpina e italianas (Yahyaoui *et al.*, 2000; Graciano *et al.*, 2003, respectivamente). El polimorfismo de la posición -118 (C/T) está localizado en la secuencia consenso de unión del factor de transcripción AP-2 (CCCMNSSS; TRANSFAC database, Wingender *et al.*, 1996), produciéndose la pérdida de esta secuencia consenso en los animales con dicha mutación. Asimismo, la mutación en la posición -64 (G/A) provoca la aparición de una secuencia consenso para el factor de transcripción AP-2 en los animales que presentan el nucleótido A.

Con el fin de realizar un genotipado rápido de 4 de las mutaciones caracterizadas en esta región promotora: -134, -118, -64 y -60 (dos de las cuales afectan las secuencias de unión de la AP-2) se utilizó la técnica de *pyrosequencing*. Se genotiparon un total de 200 animales de distintas razas, no observándose desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg en las poblaciones analizadas.

La mutación -64 (G/A) resultó ser específica de las razas italianas con una frecuencia para el alelo A de 0,21 en la raza Girgentana. Esta mutación provoca la aparición de la secuencia consenso de unión de la AP-2, siendo este polimorfismo un buen candidato para explicar las diferencias detectadas en el contenido de  $\beta$ LG en los animales de esta raza. El otro polimorfismo que afectaba a la región consenso de unión de la AP-2, en la posición -118, se encontró exclusivamente y a muy baja frecuencia en las razas Alpina, Saanen y Malagueña. El polimorfismo -134 (G/T) se encontró ampliamente distribuido entre distintas razas con la excepción de la raza africana. De forma similar y de acuerdo con los frecuencias previamente descritas por Yahyaoui *et al.* (2000), la mutación -60 (C/T) se encontró ampliamente distribuida entre las distintas razas a excepción de la raza Girgentana, donde si se ha descrito la presencia del alelo T a baja frecuencia (Graciano *et al.*, 2003), y las razas canarias (Tinerfeña, Palmera y Majorera).

Actualmente, las razas domésticas caprinas presentan una estructura filogeográfica muy débil que podría ser explicada por el transporte intercontinental de estos animales favorecido por los movimientos migratorios humanos, las rutas comerciales o los viajes de exploración de nuestros antepasados (Luikart *et al.*, 2001). No obstante, un estudio reciente muestra como las razas Majorera, Tinerfeña y Palmera presentan una fuerte relación filogeográfica debido al largo aislamiento al que han sido sometidas estas razas en las Islas Canarias (Amills *et al.*, 2004). Este aislamiento podría explicar la falta del alelo T en la posición -60 del promotor de la  $\beta$ LG, el cual está ampliamente distribuido en el resto de razas.

Asimismo, el origen y aislamiento de la cabra Girgentana (figura 4) en la isla de Sicilia podría explicar la alta frecuencia del alelo A en esta raza. Además, la disminución en los últimos años del tamaño poblacional de esta raza (< 500), que actualmente se encuentra en peligro de extinción (FAO; <http://www.fao.org/dad-is>), hace plausible que la deriva genética haya jugado un papel importante en la distribución alélica de esta mutación.



**Figura 4.** Cabra Girgentana. Como muestra la figura, los animales de esta raza son blancos, a veces con manchas marrones sobre la cara y con gruesos cuernos en espiral. Esta raza se caracteriza por ser una buena productora de leche.

Por otra parte, se investigó la asociación de estos cuatro polimorfismos, encontrándose 5 de los 16 haplotipos teóricos posibles. La baja frecuencia de algunos alelos en distintas razas, junto con la presencia de dos de las posiciones polimórficas en un bajo número de razas (véase tabla 3, artículo 4) provoca una reducción en el número de haplotipos posibles. Por otra parte, la proximidad de las cuatro mutaciones hace difícil que se produzcan todas las recombinaciones posibles; siendo necesario, también, el análisis de un mayor número de animales de cada raza para detectar haplotipos que se encuentran a muy baja frecuencia. La tabla 4 muestra los distintos haplotipos observados. El haplotipo GCGC fue considerado el ancestral debido a que se encontró en todas las razas analizadas con una frecuencia de 0,70.

**Tabla 4.** Frecuencia de los haplotipos observados en las distintas razas analizadas

<b>Haplotipo</b>	<b>Frecuencia (%)</b>	<b>Raza</b>
<b>GCGC</b>	70,25	todas las razas
<b>TCGC</b>	13,25	todas las razas excepto Sahel
<b>GCGT</b>	12,50	Girgentana y razas Canarias
<b>GCAC</b>	2,50	Teramara y Girgentana
<b>GTGC</b>	1,50	Alpina y Saanen

Por último, se caracterizaron 6 polimorfismos en los exones de la  $\beta$ LG, cinco de los cuales se encontraron en la región codificante para la proteína. Todas las mutaciones fueron sinónimas, no produciéndose cambios aminoacídicos que pudieran dar lugar a la caracterización de variantes genéticas para la  $\beta$ LG en esta especie. Exceptuando las mutaciones +100 (exón 1), +121 (exón 1), y +834 (exón 2) que sólo se encontraron en las razas Cachimir, Palmera y Alpina, respectivamente, el resto de mutaciones se encontraron ampliamente distribuidas en el resto de razas (tabla 5). No obstante, debido a que sólo se analizaron 2 animales de cada raza, no se puede descartar la presencia de los polimorfismos en aquellas razas donde no han sido detectados.

**Tabla 5.** Polimorfismos detectados en los 6 primeros exones del gen de la  $\beta$ LG caprina en las 11 razas de cabras analizadas

<b>Exones</b>	<b>Posición nucleotídica</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Raza</b>
<b>1</b>	100	C/T	Cachimir
	121		Palmera
<b>2</b>	834	G/A	Alpina
	840	C/T	Teramana, Saanen, Murciano-Gra, Malagueña
<b>3</b>	1806	C/T	Girgentana, Alpina, Saanen, Tinerfeña, Palmera
<b>6</b>	4122	T/C	Alpina, Saanen, Girgentana, Teramana, Tinerfeña, Palmera, Murciano-Gra, Malagueña

La mutación localizada en la posición +4122 (T/C) está situada en la región 3' no-codificante del gen de la  $\beta$ LG. Dos polimorfismos han sido identificados y caracterizados previamente en la región 3' no-codificante (exón 7) del gen de la  $\beta$ LG caprina en razas españolas y francesas (Pena *et al.*, 2000), y posteriormente en razas italianas (Pappalardo *et al.*, 2001).

La región 3' no-codificante del ARNm juega un papel muy importante en la estabilidad del mensajero en el citoplasma, pudiendo determinar la vida media de estas moléculas. Por tanto, los polimorfismos detectados podrían afectar a los niveles de traducción de este ARNm provocando cambios en la expresión de esta proteína láctea.

En el presente trabajo se han caracterizado un total de 15 polimorfismos repartidos entre la región promotora proximal y los seis primeros exones del gen de la  $\beta$ LG caprina. Aunque hacen falta estudios para poder determinar como afectan estos polimorfismos en la expresión del gen de la  $\beta$ LG, estas mutaciones pueden ser utilizadas como marcadores moleculares en estudios de asociación con caracteres de producción láctea.

# **CONCLUSIONES**

1. La caracterización del lugar de integración del transgén de la  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ LG) caprina (pPX(7.0)) en la línea de ratones transgénicos tg56 ha permitido verificar que el fenotipo presentado por los ratones homocigotos de esta línea era debido a la disrupción de un gen específico del ratón: la Fosfolipasa C- $\beta$ 1 (PLC- $\beta$ 1).
2. Se ha detectado la expresión de un ARNm híbrido entre el gen de la PLC- $\beta$ 1 y el gen de la  $\beta$ LG caprina que contiene la información necesaria para dar lugar a una proteína funcional, y que podría explicar el fenotipo atenuado que presentan los ratones homocigotos tg56 al compararlos con otros modelos de mutación del mismo gen.
3. La línea tg56 constituye un nuevo modelo de disrupción del gen de la PLC- $\beta$ 1 de utilidad para investigar el papel de este gen en los mecanismos moleculares relacionados con el desarrollo, crecimiento y fertilidad.
4. Se ha desarrollado un nuevo método basado en la PCR cuantitativa a tiempo real para determinar el número de copias integradas del transgén en las distintas líneas transgénicas, sin la necesidad de tener una muestra previamente cuantificada por *Southern blot*.
5. Se ha demostrado que este nuevo método permite cuantificar con total precisión líneas transgénicas que contengan al menos hasta 6 copias del transgén. El valor de desviación estándar obtenido para los ratones transgénicos de la G1 pertenecientes a la línea tg19, nos impide precisar con exactitud el número de copias del transgén, valor que oscila entre 18-20 copias.

6. Este método puede ser utilizado para cuantificar el número de copias integradas del transgén en animales transgénicos con regiones reguladoras de genes de rumiantes, ya que el gen endógeno utilizado ha sido diseñado sobre secuencias conservadas en rumiantes y ratón.
7. Se ha utilizado el *cassette* de expresión de la  $\beta$ LG caprina, puesto a punto en nuestro grupo, para realizar las construcciones de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la FSH humana. Estas construcciones contienen 410 pb de promotor y 2540 pb de región 3' flanqueante del gen de la  $\beta$ LG caprina y las regiones codificantes de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (2,4 Kb y 1,8 Kb, respectivamente) del gen de la Hormona Estimulante del Folículo humana (FSHh).
8. Se han obtenido 9 ratones transgénicos de un total de 83 animales analizados, los animales 6, 51 y 545 sólo han integrado un transgén. El resto de animales (7, 12, 19, 22, 40 y 42) han integrado los dos transgenes de la FSHh, siendo la frecuencia de integración para los dos transgenes del 7,2%. Los ratones fundadores 7 y 40 no transmitieron los transgenes a la descendencia y la hembra fundadora 22 sólo transmitió la subunidad  $\alpha$ .
9. Se han establecido un total de 4 líneas transgénicas (tg12, tg19, tg42, tg545 $_{\alpha+\beta}$ ) que transmiten de forma estable los dos transgenes de la FSHh. La línea tg545 $_{\alpha+\beta}$  proviene del cruce de un macho G1 (que sólo tiene integrada la subunidad  $\alpha$ ) de la línea tg22 con la hembra 545 que sólo tenía integrada la subunidad  $\beta$ .
10. Mediante la técnica de RT-PCR se ha podido comprobar que las 4 líneas establecidas expresan las dos subunidades del gen de la FSHh en la glándula mamaria de hembras transgénicas en lactación. No obstante, no se ha podido detectar la presencia de la hormona FSHh en la leche de estas hembras transgénicas, aunque si se ha detectado la presencia de la proteína en la glándula mamaria mediante la técnica de *Western blot*.

- 11.** Se han caracterizado un total de 11 polimorfismos en el gen de la  $\beta$ LG caprina. Nueve de las mutaciones están localizadas en la región promotora proximal y el resto en los exones 1, 2, 3 y 6. Los polimorfismos localizados en la región codificante del gen no determinan cambio aminoacídico.
  
- 12.** Dos de los polimorfismos identificados en la región promotora (posición -118 y -60 del inicio de transcripción) se encuentran localizados sobre regiones consenso de unión del factor de transcripción AP-2, siendo una de estas mutaciones específica de las razas italianas Girgentana y Teramana.
  
- 13.** Se ha desarrollado un protocolo de genotipado rápido de 4 de las mutaciones (-134, -118, -64 y -60) caracterizadas en la región promotora mediante la técnica de pyrosequencing, determinándose las frecuencias génicas en 200 animales de 11 razas caprinas (Alpina, Saanen, Malagueña, Murciano-Granadina, Tinerfeña, Palmera, Majorera, Teramana, Girgentana, Cachemir y Sahel).



# **BIBLIOGRAFÍA**

- A**kerstrom, B., Flower, D.R., y Salier, J-P. (2000) Lipocalins: unity in diversity. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1482**:1-8.
- Aleandri, R., Buttazzoni, L.G., y Schneider, J.C. (1990) The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *Journal of Dairy Science*, **73**: 241-255.
- Alexander, L.J., Hayes, G., Pearse, M.J., Beattie, C.W., Stewart, A.F., Willis, I.M., y MacKinlay, A.G. (1989) Complete sequence of the bovine beta-lactoglobulin cDNA. *Nucleic Acids Research*, **17**:6739.
- Alexander, L.J., y Beattie, C.W. (1992) Sequence of porcine beta-lactoglobulin cDNA. *Animal Genetics*, **23**:263-265.
- Alexander, L.J., Hayes, G., Bawden, W., Stewart, A.F., y Mackinlay, A.G. (1993) Complete nucleotide sequence of the bovine  $\beta$ -lactoglobulin gene. *Animal Biotechnology*, **4**:1-10.
- Ali, S., y Clark, A.J. (1988) Characterization of the gene encoding ovine beta-lactoglobulin. Similarity to the genes for retinol binding protein and other secretory proteins. *Journal of Molecular Biology*, **199**:415-426.
- Ali, S., McClenaghan, M., Simons, J.P., y Clark, A.J. (1990) Characterization of the alleles encoding ovine  $\beta$ -lactoglobulins A and B. *Gene*, **91**:201-207.
- A Mills, M., Capote, J., Tomás, A., Kelly, L., Obexer-Ruff, G., Angiolillo, A., y Sánchez, A. (2004) Strong phylogeographic relationships among three goat breeds from the Canary Islands. *Journal of Dairy Research*, **71**:1-6.
- Andersen, D.C., y Krummen, L. (2002) Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**:117-123.
- Anton, I., Zsolnai, A., y Fésüs, L. (1999) Identification of the variant C of  $\beta$ -lactoglobulin in sheep using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **116**:525-528.
- Archibald, A.L., McClenaghan, M., Hornsey, V., Simons, J.P., y Clark, A.J. (1990) High level expression of biologically active human  $\alpha_1$ -antitrypsin in the milk of transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **87**: 5178-5182.
- Aschaffenburg, R., y Drewry, J. (1955) Occurrence of different  $\beta$ -lactoglobulins in cow's milk. *Nature*, **176**: 218-219.
- Auerbach, A.B. (2004) Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochimica Polonica*, **51**:9-31.

Austin, P.C., Battey, J.F., Bradley, A., Bucan, M., et al., (2004) The knockout mouse project. *Nature Genetics*, **36**:921-924.

Avazeri, N., Courtot, A-M., Pesty, A., Duquenne, C., y Lefèvre, B. (2000) Cytoplasmic and nuclear phospholipase C- $\beta$ 1 relocation: role in resumption of meiosis in the mouse oocyte. *Molecular Biology of the Cell*, **11**:4369-4380.

Azuma, N., y Yamauchi, K. (1991) Identification of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) milk. *Comparative Biochemistry and Physiology [B]*, **99**:917-921.

## B

Bahk, Y.Y., Lee, Y.H., Lee, T.G., Seo, J., Ryu, S.H., y Suh, P-G. (1994) Two forms of phospholipase C- $\beta$ 1 generated by alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**:8240-8245.

Bahk, Y.Y., Song, H., Baek, S.H., Park, B.Y., Kim, H., Ryu, S.H., y Suh, P-G. (1998). Localization of two forms of phospholipase C- $\beta$ 1, a and b, in C6Bu-1 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1389**:76-80.

Ballester, M., Molist, J., López-Bejar, M., Sánchez, A., Santaló, J., Folch, J.M., y Ibáñez, E. (2004a) Disruption of the mouse phospholipase C- $\beta$ 1 gene in a  $\beta$ -lactoglobulin transgenic line affects viability, growth, and fertility in mice. *Gene*, **341**:279-289.

Ballester, M., Castelló, A., Ibáñez, E., Sánchez, A., y Folch, J.M. (2004b) Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *BioTechniques*, **37**:610-613.

Ballester, M., Sánchez, A., y Folch, J.M. (2005) Polymorphisms in the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene. Aceptado en el *Journal of Dairy Research*.

Bell, K. (1962) One-dimensional starch gel electrophoresis of bovine skim milk. *Nature*, **195**:705-706.

Bell, K., McKenzie, H.A., Murphy, W.H., y Shaw, D.C. (1970)  $\beta$ -lactoglobulin Droughtmaster: a unique protein variant. *Biochimica et Biophysica Acta*, **214**:427-436.

Bell, K., Mckenzie, H.A., y Shaw, D.C. (1981) Bovine  $\beta$ -lactoglobulin E, F and G of Bali (Banteng) cattle, *Bos (Bibos) Javanicus*. *Australian Journal of Biological Sciences*, **34**:133-147.

Bialek, P., Chan, C-T.J., y Yee, S-P. (2000) Characterization of a novel insertional mouse mutation, *kkt*: a closely linked modifier of *Pax1*. *Developmental Biology*, **218**:354-366.

Bijvoet, A.G., Kroos, M.A., Pieper, F.R., de Boer, H.A., Reuser, A.J., van der Ploeg, A.T., y Verbeet, M.P. (1996) Expression of cDNA-encoded human acid

- alpha-glucosidase in milk of transgenic mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1308**:93-96.
- Bischoff, R., Degryse, E., Perraud, F., Dalemans, W., Ali-Hadji, D., Thepot, D., Devinoy, E., Houdebine, L.M., y Pavirani, A. (1992) A 17.6 kbp region located upstream of the rabbit WAP gene directs high level expression of a functional human protein variant in transgenic mouse milk. *FEBS*, **305**:265-268.
- Bishop, J.O., y Smith, P. (1989) Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA. *Molecular Biology and Medicine*, **6**:283-298.
- Bleck, G.T., y Bremel, R.D. (1993) Variation in expression of a bovine  $\alpha$ -lactalbumin transgene in milk of transgenic mice. *Journal of Dairy Science*, **77**:1897-1904.
- Bleck, G.T., White, B.R., Miller, D.J., y Wheeler, M. (1998) Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. *Journal of Animal Science*, **76**:3072-3078.
- Brem, G., Hartl, P., Besenfelder, U., Wolf, E., Zinovieva, N., y Pfaller, R. (1994) Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the mammary gland of transgenic rabbits. *Gene*, **149**:351-355.
- Brew, K., Vanaman, T.C., y Hill, R.L. (1967) Comparison of the amino acid sequence of bovine  $\alpha$ -lactalbumin and hens egg white lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, **242**: 3747-3749.
- Brew, K., y Grobler, J.A. (1992)  $\alpha$ -Lactalbumin. In: *Advanced Dairy Chemistry*, edited by P.F. Fox, vol.1, Proteins, 2<sup>nd</sup> edn, pp. 191-229. London: Elsevier Applied Science.
- Brinster, R.L., Chen, H. Y., Trumbauer, M.E., Senear, A.W., Warren, R., y Palmiter, R.D. (1981) Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*, **27**: 223-231.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Yagle, M.L., y Palmiter, R.D. (1985) Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **82**:4438-4442.
- Brinster, R.L., Allen, J.M., Behringer, R.R., Gelinas, R.E., y Palmiter, R.D. (1988) Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **85**:836-840.
- Brophy, B., Smolenski, G., Wheeler, T., Wells, D., L'Huillier, P., y Laible, G. (2003) Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of  $\beta$ -casein and  $\kappa$ -casein. *Nature Biotechnology*, **21**:157-162.

- Böhm, D., Schwegler, H., Kotthaus, L., Nayernia, K., Rickmann, M., Köhler, M., Rosenbusch, J., Engel, W., Flügge, G., y Burfeind, P. (2002). Disruption of PLC- $\beta$ 1-mediated signal transduction in mutant mice causes age-dependent hippocampal mossy fiber sprouting and neurodegeneration. *Molecular and Cellular Neurosciences*, **21**:584-601.
- Boime, I., Ben-Menahem, D., y Olijve, W. (1999) Studies of recombinant gonadotropins: intersection of basic science and therapeutics. En: Fauser, B.C.J.M. (Ed.), *Molecular biology in reproductive medicine*. The Parthenon Publishing Group. pp. 147-163.
- Boulanger, A. (1976) Etude biochimique et génétique des protéines du lait de chèvre (*Capra hircus*). Tesis, Universidad de Paris VII.
- Bubner, B., y Baldwin, I.T. (2004) Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Reports*, **23**:263-271.
- Buhler, T.A., Bruyere, T., Went, D.F., Stranzinger, G., y Burki, K. (1990) Rabbit  $\beta$ -casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. *Bio/Technology*, **8**:140-143.
- Burkhart, C.A., Norris, M.D., y Haber, M. (2002) A simple method for the isolation of genomic DNA from mouse tail free of real-time PCR inhibitors. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **52**:145-149.
- Butler, S.P., O'Sickey, T.K., Lord, S.T., Lubon, H., Gwazdauskas, F.C., y Velander, W.H. (2004) Secretion of recombinant human fibrinogen by the murine mammary gland. *Transgenic Research*, **13**:437-450.

**C**

- Capecchi, M.R. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244**:1288-1292.
- Caricasole, A., Sala, C., Roncarati, R., Formenti, E., y Terstappen, G.C. (2000) Cloning and characterization of the human phosphoinositide-specific phospholipase C-beta 1 (PLC $\beta$ 1). *Biochimica et Biophysica Acta*, **1517**:63-72.
- Chen, C.M., Wang, C.H., Wu, S.C., Lin, C.C., Lin, S.H., y Cheng, W.T. (2002) Temporal and spatial expression of biologically active human factor VIII in the milk of transgenic mice driven by mammary-specific bovine alpha-lactalbumin regulation sequences. *Transgenic Research*, **11**:257-268.
- Chianese, L., Portolano, B., Troncione, E., Pizzolongo, F., Ferranti, P., Addeo, F., Alicata, M.L., Pilla, F., y Calagna, G. (2000) The quality of Girgentana goat milk. *Proc. 7<sup>th</sup> International Conference on Goats*, Tours, France **2**:946-949.

- Choi, T., Huang, M., Gorman, C., y Jaenisch, R. (1991) A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Molecular and Cellular Biology*, **11**:3070-3074.
- Choi, D., Lee, E., Hwang, S., Jun, K., Kim, D., Yoon, B-K., Shin, H-S., y Lee, J-H. (2001) The biological significance of phospholipase C  $\beta$ 1 gene mutation in mouse sperm in the acrosome reaction, fertilization, and embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **18**:305-310.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A., y Robl, J.M. (1998) Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, **280**:1256-1258.
- Clark, J., y Whitelaw, B. (2003) A future for transgenic livestock. *Nature reviews. Genetics*, **4**:825-833.
- Clarke, R.A., Sokol, D., Rigby, N., Ward, K., Murray, J.D., y Mackinlay, A.G. (1994) Mammary gland specific expression of bovine  $\alpha_{s1}$ -casein derived transgenes in mice. *Transgenics*, **1**:313-319.
- Collet, C., y Joseph, R. (1995) Exon organization and sequence of the genes encoding alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin from the tammar wallaby (Macropodidae, Marsupialia). *Biochemical Genetics*, **33**:61-72.
- Costantini, F., y Lacy, E. (1981) Introduction of rabbit  $\beta$ -globin gene into the mouse germ line. *Nature*, **294**:92-94.
- Coulibaly, S., Besenfelder, U., Miller, I., Zinovieva, N., Lassnig, C., Kotler, T., Jameson, J.L., Gemeiner, M., Müller, M., y Brem, G. (2002) Expression and characterization of functional recombinant bovine follicle-stimulating hormone (boFSH $\alpha/\beta$ ) produced in the milk of transgenic rabbits. *Molecular Reproduction and Development*, **63**:300-308.

## D

- Das, P., Jain, S., Nayak, S., Apparao, K.B., Totey, S.M., y Garg, L.C. (1999) Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding  $\beta$ -lactoglobulin in *Bubalus bubalis*. *DNA sequence*, **10**:105-108.
- Devinoy, E., Thepot, D., Stinnakre, M-G., Fontaine, M-L., Grabowski, H., Puissant, C., Pavirani, A., y Houdebine, L.M. (1994) High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transgenic Research*, **3**:79-89.
- DiTullio, P., Cheng, S.H., Marshall, J., Gregory, R.J., Ebert, K.M., Meade, H.M., y Smith, A.E. (1992) Production of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the milk of transgenic mice. *Bio/Technology*, **10**:74-77.
- Dobie, K.W., Lee, M., Fantes, J.A., Graham, E., Clark, A.J., Springbett, A.J., Lathe, R., y McClenaghan, M. (1996) Variegated transgene expression in the

mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**:6659-6664.

Drohan, W.N., Zhang, D., Paleyanda, R.K., Chang, R., Wroble, M., Velander, W., y Lubon, H. (1994) Inefficient processing of human protein C in the mouse mammary gland. *Transgenic Research*, **3**:355-364.

Duncan, B.K., y Miller, J.H. (1980) Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* **287**:560-561.

Dyck, M.K., Lacroix, D., Pothier, F., y Sirard, M-A. (2003) Making recombinant proteins in animals-different systems, different applications. *Trends in Biotechnology*, **21**:394-399.

## E

Ebert, K.M., Selgrath, J.P., DiTullio, P., Denman, J., Smith, T.E., Memon, M.A., Schindler, J.E., Monastersky, G.M., Vitale, J.A., y Gordon, K. (1991) Transgenic production of a variant of human tissue type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Bio/Technology*, **9**:835-838.

Ebert, K.M., DiTullio, P., Barry, C.A., Schindler, J.E., Ayres, S.L., Smith, T.E., Pellerin, L.J., Meade, H.M., Denman, J., y Roberts, B. (1994) Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. *Bio/Technology*, **12**:699-702.

Eigel, W.M., Butter, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell, H.M., Harwalkar, V.R., Jenness, R., y Whitenedy, R.M. (1984) Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *Journal of Dairy Science*, **67**:1599-1631.

Erhardt, G. (1989) Evidence for a third allele at the  $\beta$ -lactoglobulin locus of sheep milk and its occurrence in different breeds. *Animal Genetics*, **20**:197-204.

Evans, M.J., y Kaufman, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, **292**:154-156.

## F

Farini, E., y Whitelaw, B.A. (1995) Ectopic expression of  $\beta$ -lactoglobulin transgenes. *Molecular and General Genetics*, **246**:734-738.

Feligini, M., Parma, P., Aleandri, R., Greppi, G.F., y Enne, G. (1998) PCR-RFLP test for direct determination of  $\beta$ -lactoglobulin genotype in sheep. *Animal Genetics*, **29**:473-474.

Flower, D.R. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *The Biochemical Journal*, **318**:1-14.

Flower, D.R., North, A.C.T., y Sansom, C.E. (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochimica*, **1482**:9-24.

- Folch, J.M., Coll, A., y Sanchez, A. (1993) Cloning and sequencing of the cDNA encoding goat beta-lactoglobulin. *Journal of Animal Science*, **71**:2832
- Folch, J.M., Coll, A., y Sánchez, A. (1994) Complete sequence of the caprine  $\beta$ -lactoglobulin gene. *Journal of Dairy Science*, **77**:3493-3497.
- Folch, J.M., Coll, A., Hayes, H., y Sánchez, A. (1996) Characterization of a caprine  $\beta$ -lactoglobulin pseudogene identification and chromosomal localization by *in situ* hybridization in goat, sheep, and cow. *Gene*, **177**(1-2):87-91.
- Folch, J.M. Características y aplicaciones de la transgénesis en animales domésticos. *ITEA* (1997) **18**:370-374.
- Folch, J.M., Dovic, P., y Medrano, J.F. (1999) Differential expression of bovine  $\beta$ -lactoglobulin A and B promoter variants in transiently transfected HC11 cells. *Journal of Dairy Research*, **66**:537-544.
- Ford, C.A., Connett, M.B., y Wilkins, R.J. (1993)  $\beta$ -lactoglobulin expression in bovine mammary tissue. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, **53**:167-169.
- Fox, P.F., y McSweeney, P.L.H. (1998) Dairy chemistry and Biochemistry. London: Chapman & Hall.
- Friedman, R.A., Adir, Y., Crenshaw, E.B., Ryan, A.F., y Rosenfeld, M.G. (2000) A transgenic insertional inner ear mutation on mouse chromosome 1. *Laryngoscope*, **110**:489-496.
- Fujiwara, Y., Miwa, M., Nogami, M., Okumura, K., Nobori, T., Suzuki, T., y Ueda, M. (1997) Genomic organization and chromosomal localization of the human casein gene family. *Human Genetics*, **99**:368-373.

**G**

- Galli-Taliadoros, L.A., Sedgwick, J.D., Wood, S.A., y Körner, H. (1995) Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *Journal of Immunological Methods*, **181**:1-15.
- Garber, K. (2001) Biotech industry faces new bottleneck. *Nature Biotechnology*, **19**:184-185.
- Gaye, P., Hue-Delahaie, D., Mercier, J.C., Soulier, S., Vilotte, J.L., y Furet, J.P. (1986) Ovine beta-lactoglobulin messenger RNA: nucleotide sequence and mRNA levels during functional differentiation of the mammary gland. *Biochimie*, **68**:1097-1107.
- Godovac-Zimmermann, J., Conti, A., Liberatori, J., y Braunitzer, G. (1985) The amino-acid sequence of beta-lactoglobulin II from horse colostrum (*Equus caballus*, Perissodactyla): beta-lactoglobulins are retinol-binding proteins. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **366**:601-608.



- Godovac-Zimmermann, J., Conti, A., Sheil, M., y Napolitano, L. (1990a) Covalent structure of the minor monomeric beta-lactoglobulin II component from donkey milk. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **371**:871-879.
- Godovac-Zimmermann, J., Krause, I., Buchberger, J., Weiss, G., y Klostermeyer, H. (1990b) Genetic variants of bovine beta-lactoglobulin. A novel wild-beta-lactoglobulin W and its primary sequence. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **371**:255-260.
- Godovac-Zimmermann, J., Krause, I., Baranyi, M., Fischer-Fruhholz, S., Juszcak, J., Erhardt, G., Buchberger, J., y Klostermeyer, H. (1996) Isolation and rapid sequence characterization of two novel bovine beta-lactoglobulins I and J. *Journal of Protein Chemistry*, **15**:743-750.
- Golovan, S.P., Meidinger, R.G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M.Z., Barney, D.J., Plante, C., Pollard, J.W., Fan, M.Z., Hayes, M.A., Laursen, J., Hjorth, J.P., Hacker, R.R., Phillips, J.P., y Forsberg, C.W. (2001) Pigs expressing salivary pitase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology*, **19**:741-745.
- Gordon, K., Lee, E., Vitale, J.A., Smith, A.E., Wesphal, H., y Hennighausen, L. (1987) Production of human type plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/Technology*, **5**:1183-1187.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., y Ruddle, F.H. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **77**:7380-7384.
- Graml, R., Weiss, G., Buchberger, J., y Pirchner, F. (1989) Different rates of synthesis of whey proteins and casein by alleles of the  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -s1 casein locus in cattle. *Genetics, Selection, Evolution*, **21**:547-554.
- Graziano, M., D'Andrea, M., Angiolillo, A., Lagonigro, R., y Pilla, F. (2003) A new polymorphism in goat  $\beta$ -lactoglobulin promoter region. *Italian Journal of Animal Science*, **1**:65-68.
- Greenberg, N.M., Anderson, J.W., Hsueh, A.J.W., Nishimori, K., Reeves, J.J., DeAvila, D.M., Ward, D.N., y Rosen J.M. (1991) Expression of biologically active heterodimeric bovine follicle-stimulating hormone in milk of transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**:8327-8331.
- Groenen, M.A.M., y van der Poel, J.J. (1994) Regulation of expression of milk protein genes: a review. *Livestock Production Science*, **38**:61-78.
- Grosclaude, F., Pujolle, J., Garnier, J., y Ribadeu-Dumas, B. (1966) Mise en évidence de deux variants supplémentaires des protéines du lait de vache:  $\alpha_{s1}$ -Cn<sup>D</sup> et Lg<sup>D</sup>. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, **6**:215-222.

Grosclaude, F., Mahé, M.F., y Accolas, J. P. (1982) Note sur le polymorphisme génétique des lactoprotéines de bovins et de yaks Mongols. *Annales de Génétique et de Sélection Animale*, **14**:545-550

Gutiérrez, A., Meade, H.M., Jiménez-Flores, R., Anderson, G.B., Murray, J.D., y Medrano, J.F. (1995) Expression analysis of bovine  $\kappa$ -casein in the mammary gland of transgenic mice. *Transgenic Research*, **5**:271-279.

Gutiérrez-Adán, A., Maga, E.A., Meade, H.M., Shoemaker, C.F., Medrano, J.F., Anderson, G.B., y Murray, J.D. (1996) Alteration of physical characteristics of milk from bovine kappa-casein transgenic mice. *Journal of Dairy Science*, **79**:791-799.

Gutiérrez-Adán, A., Maga, E.A., Behboodi, E., Conrad-Brink, J.S., MacKinlay, A.G., Anderson, G.B., y Murray, J.D. (1999) Expression of bovine  $\beta$ -lactoglobulin in the milk of transgenic mice. *Journal of Dairy Research*, **66**:289-294.

Gutiérrez, G., Ganfornina, M.D., y Sánchez, D. (2000) Evolution of the lipocalin family as inferred from a protein sequence phylogeny. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1482**:35-45.

## H

Hall, A.J., Masel, A., Bell, K., Halliday, J.A., Shaw, D.C., y VandeBerg, J.L. (2001) Characterization of Baboon (*Papio hamadryas*) milk proteins. *Biochemical Genetics*, **39**:59-71.

Halliday, J.A., Bell, K., McKenzie, H.A., y Shaw, D.C. (1990) Feline whey proteins identification, isolation and initial characterization of  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin and Lysozyme. *Comparative Biochemistry and Physiology [B]*, **95**:773-779.

Halliday, J.A., Bell, K., y Shaw, D.C. (1991) The complete amino acid sequence of feline beta-lactoglobulin II and a partial revision of the equine beta-lactoglobulin II sequence. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1077**:25-30.

Halliday, J.A., Bell, K., McAndrew, K., y Shaw, D.C. (1993) Feline  $\beta$ -lactoglobulins I, II and III, and canine  $\beta$ -lactoglobulins I and II; amino acidic sequences provide evidence for the existence of more than one gene for  $\beta$ -lactoglobulin in the cat and dog. *Protein Sequences and Data Analysis*, **5**:201-205.

Halttunen, M., Kämäräinen, M., y Koistinen, H. (2000) Glycodelin: a reproduction-related lipocalin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1482**:149-156.

Hambling, S.G., McAlpine, A.S., y Sawyer, L. (1992) Beta-lactoglobulin. In: *Advanced Dairy Chemistry*, edited by P.F. Fox, vol.1, Proteins, 2<sup>nd</sup> edn, pp. 141-190. London: Elsevier Applied Science.

Hansson, L., Edlund, M., Edlund, A., Johansson, T., Marklund, S.L., Fromm, S., Stromqvist, M., y Tornell, J. (1994) Expression and characterization of

- biologically active human extracellular superoxide dismutase in milk of transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, **69**:5358-5363.
- Harris, S., Ali, S., Anderson, S., Archibald, A.L., y Clark, A.J. (1988) Complete nucleotide sequence of the genomic ovine beta-lactoglobulin gene. *Nucleic Acids Research*, **16**:10379-10380.
- Haskell, R.E., y Bowen, R.A. (1995) Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Molecular Reproduction and Development*, **40**:386-390.
- Hausermann, H.M., Donnelly, K.M., Bell, S.C., Verhage, H.G., y Fazleabas, A.T. (1998) Regulation of the glycosylated beta-lactoglobulin homolog, glycodelin [placental protein 14:(PP14)] in the baboon (*Papio anubis*) uterus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**:1226-1233.
- Hayes, H., Petit, E., Bouniol, C., y Popescu, P. (1993) Localization of the alpha-S2-casein gene (CASAS2) to the homologous cattle, sheep and goat chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **64**:282-285.
- Hill, J.P. (1993) The relationship between  $\beta$ -lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, **76**:281-286.
- Hiroaka, Y., Segawa, T., Kuwajima, K., Sugai, S., y Murai, N. (1980) Alpha-lactalbumin: a calcium metallo-protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **93**: 1098-1104.
- Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Weppert, M., Vogg, B., Ludwig, H., Stojkovic, M., Boelhauve, M., Brem, G., Wolt, E., y Pfeifer, A. (2003) Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO reports*, **4**:1054-1060.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., y Lacy, E. (1994) Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual (2<sup>a</sup> ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Houdebine, L-M. (1994) Production of pharmaceutical proteins from transgenic animals. *Journal of Biotechnology*, **34**:269-287.
- Houdebine, L-M. (2000) Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Research*, **9**:305-320.
- Houdebine, L-M. (2002) Transgenesis to improve animal production. *Livestock Production Science*, **74**:255-268.
- Hyttinen, J-M., Korhonen, V-P., Hiltunen, M.O., Myöhänen, S., y Jänne, J. (1998) High-level expression of bovine  $\beta$ -lactoglobulin gene in transgenic mice. *Journal of Biotechnology*, **61**:191-198.

Ibáñez, E., Folch, J.M., Coll, A., Santaló, J., Egozcue, J., y Sánchez, A. (1997) Expression of caprine  $\beta$ -lactoglobulin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Research*, **6**(1):69-74

Ingham, D.J., Beer, S., Money, S., y Hansen, G. (2001) Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *BioTechniques*, **31**:132-140.

**J** John, D.C., Watson, R., Kind, A.J., Scott, A.R., Kadler, K.E., y Bulleid, N.J. (1999) Expression of an engineered form of recombinant procollagen in mouse milk. *Nature Biotechnology*, **17**:385-389.

Jollès, P., Loucheux-Lefebvre, M.H., y Henschen, A. (1978) Estructural relatedness of  $\kappa$ -casein and fibrinogen  $\gamma$ -chain. *Journal of Molecular Evolution*, **11**:271-277.

Jost, B., Vilotte, J-L., Duluc, I., Rodeau, J-L., y Freund, J-N. (1999) Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland. *Nature Biotechnology*, **17**:160-164.

**K** Keefer, C.L. (2004) Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Animal Reproduction Science*, **82-83**:5-12.

Kerr, D.E., y Wellnitz, O. (2003) Mammary expression of new genes to combat mastitis. *Journal of Animal Science*, **81**:38-47.

Kim, C.G., Park, D., y Rhee, S.G. (1996) The role of carboxyl-terminal basic amino acids in  $G_q\alpha$ -dependent activation, particulate association, and nuclear localization of Phospholipase C- $\beta$ 1. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**:21187-21192.

Kim, D., Jun, K.S., Lee, S.B., Kang, N-G., Min, D.S., Kim, Y-H., Ryu, S.H., Suh, P-G., y Shin H-S. (1997) Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature*, **389**:290-293.

King, J.W.B. (1969) The distribution of sheep  $\beta$ -lactoglobulins. *Animal Production*, **11**:53-57.

Kontopidis, G., Holt, C., y Sawyer, L. (2002) The ligand-binding site of bovine  $\beta$ -Lactoglobulin: evidence for a function?. *Journal of Molecular Biology*, **318**:1043-1055.

Korhonen, V.P., Tolvanen, M., Hyttinen, J.M., Uusi-Oukari, M., Sinervirta, R., Alhonen, L., Jauhiainen, M., Janne, O.A., y Janne, J. (1997) Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of

transgenic mice and rabbits. *European Journal of Biochemistry*, **245**:482-489.

Kraulis, P. J. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, **24**:946-950.

Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans, A., van den Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R., y de Boer, H. (1991) Generation of transgenic dairy cattle using *in vitro* embryo production. *Bio/Technology*, **9**:844-847.

Kues, W.A., y Niemann, H. (2004) The contribution of farm animals to human health. *Trends in biotechnology*, **22**:286-294.

Kumar, S., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Horne, D.S., Law, A.J., Leaver, J., Springbett, A., Stevenson, E., y Simons, J.P. (1994) Milk composition and lactation of beta-casein-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **91**:6138-6142.

Kunz, C., y Lönnerdal, B. (1994) Isolation and characterization of a 21 kDa whey protein in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) milk. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **108B**:463.

Kushibiki, S., Hodate, K., Kurisaki, J., Shingu, H., Ueda, Y., Watanabe, A., y Shinoda, M. (2001) Effect of  $\beta$ -lactoglobulin on plasma retinol and triglyceride concentrations, and fatty acid composition in calves. *Journal of Dairy Research*, **68**:579-586.

**L** Lacy, E., Roberts, S., Evans, E.P., Burtenshaw, M.D., y Costantini, F.D. (1983) A foreign beta-globin gene in transgenic mice: integration at abnormal chromosomal positions and expression in inappropriate tissues. *Cell*, **34**:343-358.

Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V.M., Dolci, S., Farace, M.G., y Spadafora, C. (1989) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, **57**:717-723.

Lavitrano, M., Formi, M., Bacci, M.L., Di Stefano, C., Varzi, V., Wang, H., y Seren, E. (2003) Sperm mediated gene transfer in pig: selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Molecular Reproduction and Development*, **64**:284-291.

Lee, C.S., Kim, K., Yu, D.Y., y Lee, K.K. (1996) An efficient expression of human growth hormone (hGH) in the milk of transgenic mice using rat beta-casein/hGH fusion genes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **56**:211-222.

- Lee, K-F., DeMayo, F.J., Atiee, S.H., y Rosen, J.M. (1988) Tissue specific expression of the rat  $\beta$ -casein gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Research*, **16**:1027-1041.
- Lee, K-F., Atiee, S.H., y Rosen, J.M. (1989) Differential regulation of rat  $\beta$ -casein-chloramphenicol acetyltransferase fusion gene expression in transgenic mice. *Molecular and Cellular Biology*, **9**:560-565.
- L'Huillier, P.J., Soulier, S., Stinnakre, M-H., Lepourry, L., Davis, S.R., Mercier, J-C., y Vilotte, J-L. (1996) Efficient and specific ribozyme-mediated reduction of bovine  $\alpha$ -lactalbumin expression in double transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**:6698-6703.
- Lien, S., Alestrom, P., Steine, T., Langsrud, T., Vegarud, G., y Rogne, S. (1990) A method for  $\beta$ -Lactoglobulin genotyping of cattle. *Livestock Production Science*, **25**:173-176.
- Lindersson, M., Lundén, A., y Andersson, L. (1995) Genotyping bovine milk proteins using allele discrimination by primer length and automated DNA sizing technology. *Animal Genetics*, **26**:67-72.
- Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, **25**:402-408.
- Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J., y Baltimore, D. (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, **295**:868-872.
- Loumaye, E., Dreano, M., Galazka, A., Howles, C., Ham, L., Munafo, A., Eshkol, A., Giudice, E., De Luca, E., Sirna, A., Antonetti, F., Giartosio, C-E., Scaglia, L., Kelton, C., Campbell, R., y Chappel, S. (1998) Recombinant follicle stimulating hormone: development of the first biotechnology product for the treatment of infertility. *Human Reproduction Update*, **4**:862-881.
- Lui, V.C.H., Tam, P.K.H., Leung, M.Y.K., Lau, J.Y.B., Chan, J.K.Y., Chan, V.S.F., Dallman, M., y Cheah, K.S.E. (2003) Mammary gland-specific secretion of biologically active immunosuppressive agent cytotoxic-T-lymphocyte antigen 4 human immunoglobulin fusion protein (CTLA4Ig) in milk by transgenesis. *Journal of Immunological Methods*, **277**:171-183.
- Luikart, G., Gielly, L., Excoffier, L., Vigne, J-D., Bouvet, J., y Taberlet, P. (2001) Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98**:5927-5932.
- Lum, L.S., Dovic, P., y Medrano, J.F. (1997) Polymorphisms of Bovine  $\beta$ -lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. *Journal of Dairy Science*, **80**:1389-1397.

Lundén, A., Nilsson, M., y Janson, L. (1997) Marked effect of  $\beta$ -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *Journal of Dairy Science*, **80**:2996-3005.

**M**

Machà, J. (1970) [Protein Polymorphism in goats' milk.]. *Zivocisná Výroba*, **15**:801-805.

Maga, E.A., Anderson, G.B., Huang, M.C., y Murray, J.D. (1994) Expression of human lysozyme mRNA in the mammary gland of transgenic mice. *Transgenic Research*, **3**:36-42.

Martin, P., y Grosclaude, F. (1993) Improvement of milk protein quality by gene technology. *Livestock Production Science*, **35**:95-115.

Martin, P., Szymanowska, M., Zwierzchowski, L., y Leroux, C. (2002) The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reproduction, Nutrition, Development*, **42**:433-459.

Massoud, M., Attal, J., Thépot, D., Pointu, H., Stinnakre, M.G., Théron, M.C., Lopez, C., Houdebine, L.M. (1996) The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reproduction, Nutrition, Development*, **36**:555-563.

Matzuk, M.M., y Boime, I. (1988a) Site-specific mutagenesis defines the intracellular role of the asparagines-linked oligosaccharides of chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit. *Journal of Biological Chemistry*, **263**:17106-17111.

Matzuk, M.M., y Boime, I. (1988b). The role of the Asparagine-linked oligosaccharides of the  $\alpha$  subunit in the secretion and assembly of human chorionic gonadotropin. *Journal of Cell Biology*, **106**:1049-1059.

McCreath, K.J., Howcroft, J., Campbell, K.H.S., Colman, A., Schnieke, A.E., y Kind, A.J. (2000) Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, **405**:1066-1069.

Meade, H., Gates, L., Lacy, E., y Lonberg, N. (1990) Bovine  $\alpha_{s1}$ -casein gene sequences direct high level expression of active human urokinase in mouse milk. *Bio/Technology*, **8**:443-446.

Medrano, J.F., y Aguilar-Cordova, E. (1990) Polymerase chain reaction amplification of bovine  $\beta$ -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP análisis. *Animal Biotechnology*, **1**:73-77.

Meisler, M.H. (1992) Insertional mutation of classical and novel genes in transgenic mice. *Trends in Genetics*, **8**:341-344.

Mercier, J-C., Gaye, P., Soulier, S., Hue-Delahaie, D., y Vilotte, J-L. (1985) Construction and identification of recombinant plasmids carrying cDNAs

coding for ovine  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin. Nucleotide sequence of  $\alpha_{s1}$ -casein cDNA. *Biochimie*, **67**:959-971.

Mercier, J-C., y Vilotte, J-L. (1993) Structure and function of milk protein genes. *Journal of Dairy Science*, **76**:3079-3098.

Mighell, A.J., Smith, N.R., Robinson, P.A., y Markham, A.F. (2000) Vertebrate pseudogenes. *FEBS Letters*, **468**:109-114.

Moioli, B., Pilla, F., y Tripaldi, C. (1998) Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*, **27**:185-195.

Morrow, D.M., Xiong, N., Getty, R.R., Ratajczak, M.Z., Morgan, D., Seppala, M., Riittinen, L., Gewirtz, A.M., y Tykocinski, M.L. (1994) Hematopoietic placental protein 14. An immunosuppressive factor in cells of the megakaryocytic lineage. *American Journal of Pathology*, **145**:1485-1495.

Murray, J.D. (1999) Genetic modification of animals in the next century. *Theriogenology*, **51**:149-159.

Murray, J.D., y Maga, E.A. (1999) Changing the composition and properties of milk. In: *Transgenic animals in agriculture*, edited by J.D. Murray, et al, pp. 193-208. CAB International, Oxon and New York.

**N** Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E., y Monardes, H.G. (1986) Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, **69**:22-26.

Ng-Kwai-Hang, K.F., y Grosclaude, F. (1992) Genetic polymorphism of milk proteins. In: *Advanced Dairy chemistry*, edited by P.F. Fox, pp. 405-455. Elsevier Science Publishers Ltd. London and New York.

Ng-Kwai-Hang, K.F. (1998) Genetic polymorphism of milk proteins: relationships with production traits, milk composition and technological properties. *Canadian Journal of Animal Science*, **78** (suplemento).

Niemann, H., Halter, R., Carnwath, J.W., Herrmann, D., Lemme, E., y Paul, D. (1999) Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Research*, **8**:237-247.

Nottle, M.B., Haskard, K.A., Verma, P.J., Du, Z.T., Grupen, C.G., McIlpatrick, S.M., Ashman, R.J., Harrison, S.J., Barlow, H., Wigley, P.L., Lyons, I.G., Cowan, P.J., Crawford, R.J., Tolstoshev, P.L., Pearse, M.J., Robins, A.J., y d'Apice, A.J.F. (2001) Effect of DNA concentration on transgenesis rates in mice and pigs. *Transgenic Research*, **10**:523-531.



- O** Olijve, W., de Boer, W., Mulders, J.W., y van Wezenbeek, P.M. (1996). Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Molecular Human Reproduction*, **2**:371-382.
- P** Paleyanda, R.K., Velandar, W.H., Lee, T.K., Scandella, D.H., Gwazdauskas, F.C., Knight, J.M., Hoyer, L.W., Drohan, W.N., y Lubon, H. (1997) Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nature Biotechnology*, **15**:971-975.
- Palmer, C.A., Lubon, H., y McManaman, J.L. (2003) Transgenic mice expressing recombinant human protein C exhibit defects in lactation and impaired mammary gland development. *Transgenic Research*, **12**:283-292.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C., y Evans, R.M. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, **300**:611-615.
- Palmiter, R.D., y Brinster, R.L. (1986) Germ-line transformation of mice. *Annual Review of Genetics*. **20**:465-499.
- Papiz, M.Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Findlay, J.B.C., Sivaprasadarao, R., Jones, T.A., Newcomer, M.E., y Kraulis, P.J. (1986) The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, **324**:383-385.
- Pappalardo, M., Gallo, D., Cosenza, G., Pastore, N., Senese, C., Rubino, R., Marletta, D., y Ramunno, L. (2001) Molecular analysis of the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene: preliminary results. *Proceedings of the A.S.P.A. XIV Congress*, Firenze 61-63.
- Passey, R.J., y MacKinlay, A.G. (1995) Characterisation of a second, apparently inactive, copy of the bovine beta-lactoglobulin gene. *European Journal of Biochemistry*, **233**:736-743.
- Pena, R.N., Folch, J.M., Sánchez, A., y Whitelaw, C.B.A. (1998) Chromatin structures of goat and sheep  $\beta$ -lactoglobulin gene differ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **252**:649-653.
- Pena, R.N., Sánchez, A., Coll, A., y Folch, J.M. (1999) Isolation, sequencing and relative quantitation by fluorescent-ratio PCR of feline beta-lactoglobulin I, II, and III cDNAs. *Mammalian Genome*, **10**:560-564.
- Pena, R.N., Sánchez, A., y Folch, J.M. (2000) Characterization of genetic polymorphism in the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene. *Journal of Dairy Research*. **67**:217-224.

- Pena, R.N., Ibáñez, E., Folch, J.M., Vidal, F., Sánchez, A., y Santaló, J. (2001) Expression mammary gland-specific of the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene comprising a 410 bp-long promoter in transgenic mice. *Transgenics*, **3**:175-182.
- Pérez, M.D., Villegas, C.D., Sánchez, L., Aranda, P., Ena, J.M., y Calvo, M. (1989) Interaction of fatty acids with  $\beta$ -lactoglobulin and albumin from ruminant milk. *Journal of Biochemistry*, **106**:1094-1097.
- Pérez, M.D., Sánchez, L., Aranda, P., Ena, J.M., Oria, R., y Calvo, M. (1992) Effect of  $\beta$ -lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1123**:151-155.
- Pérez, M.D., Puyol, P., Ena, J.M., y Calvo, M. (1993) Comparison of the ability to bind lipids of  $\beta$ -lactoglobulin and serum albumin of milk from ruminant and non-ruminant species. *Journal of Dairy Research*, **60**:55-63.
- Persuy, M-A., Stinnakre, M-G., Printz, C., Mahe, M-F., y Mercier, J.C. (1992) High expression of the caprine  $\beta$ -casein gene in transgenic mice. *European Journal of Biochemistry*, **205**:887-893.
- Pervaiz, S., y Brew, K. (1986) Purification and characterization of the major whey proteins from the milks of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), the florida manatee (*trichechus manatus latirostris*) and the beagle (*Canis familiaris*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **246**:846-854.
- Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y., y Verma, I.M. (2002) Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**:2140-2145.
- Pierce, J.G., y Parsons, T.F. (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, **50**:465-495.
- Pinkert, C.A., y Murray, J.D. (1999) Transgenic farm animals. En: *Transgenic Animals in agriculture*, editado por J.D. Murray, et al, pp. 1-18. CAB International, Oxon and New York.
- Pintado, B., y Gutiérrez-Adán, A. (1999) Transgenesis in large domestic species: future development for milk production. *Reproduction, Nutrition, Development*, **39**:535-544.
- Piotte, C.P., Hunter, A.K., Marshall, C.J., y Grigor, M.R. (1998) Phylogenetic analysis of three lipocains-like proteins present in the milk of *Trichosurus vulpecula* (Phalangeridae, Marsupialia). *Journal of Molecular Evolution*, **46**:361-369.
- Platenburg, G.J., Kootwijk, E.P.A., Kooiman, P.M., Woloshuk, S.L., Nuijens, J.H., Krimpenfort, P.J.A., Pieper, F.R., de Boer, H.A., y Strijker, R. (1994)

Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. *Transgenic Research*, **3**:99-108.

Powell, K. (2003) Barnyard biotech-lame duck or golden goose?. *Nature Biotechnology*, **21**:965-967.

Prinzenberg, E-M., y Erhardt, G. (1999) Molecular genetic characterization of ovine  $\beta$ -lactoglobulin C allele and detection by PCR-RFLP. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **116**:9-14.

Prosser, C.G., Turner, S-A., McLaren, R.D., Langley, B., L'Huillier, P.J., Molan, P., y Auldust, M.J. (2000) Milk whey protein concentration and mRNA associated with  $\beta$ -lactoglobulin phenotype. *Journal of Dairy Research*, **67**:287-293.

Prunkard, D., Cottingham, I., Garner, I., Bruce, S., Dalrymple, M., Lasser, G., Bishop, P., y Foster, D. (1996) High-level expression of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic mice. *Nature Biotechnology*, **14**:867-871.

Puyol, P., Pérez, M.D., Ena, J.M., y Calvo, M. (1991) Interaction of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin and other bovine and human whey proteins with retinol and fatty acids. *Agricultural and Biological Chemistry*, **55**:2515-2520.

## R

Recio, I., Molina, E., Ramos, M., y de Frutos, M. (1995) Quantitative analysis of major whey proteins by capillary electrophoresis using uncoated capillaries. *Electrophoresis*, **16**: 654-658.

Rijnkels, M., Wheeler, D.A., de Boer, H.A., y Pieper, F.R. (1997) structure and expresión of the mouse casein gene locus. *Mammalian Genome*, **8**:9-15.

Rijnkels, M., Kooiman, P.M., Platenburg, G.J., van Dixhoorn, M., Nuijens, J.H., de Boer, H.A., y Pieper, F.R. (1998) High-level expression of bovine  $\alpha_{s1}$ -casein in milk of transgenic mice. *Transgenic Research*, **7**:5-14.

Roberts, B., DiTullio, P., Vitale, J., Hehir, K., y Gorden, K. (1992) Cloning of the goat  $\beta$ -casein encoding gene and expression in transgenic mice. *Gene*, **121**:255-262.

Rodriguez, A., Castro, F.O., Aguilar, A., Ramos, B., Del Barco, D.G., Lleonart, R., y De la Fuente, J. (1995) Expresión of active human erythropoietin in the mammary gland of lactating transgenic mice and rabbits. *Biological Research*, **28**:141-153.

Rokkones, E., Fromm, S.H., Kareem, B.N., Klungland, H., Olstad, O.K., Hogset, A., Iversen, J., Bjoro, K., y Gautvik, K.M. (1995) Human parathyroid hormone as a secretory peptide in milk of transgenic mice. *Journal of Cell Biochemistry*, **59**:168-176.

- Rosen, J.M. (1986) Regulatory sequences involved in the hormonal control of casein gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **464**: 87-99.
- Rosen, J.M., Wyszomierski, S.L., y Hadsell, D. (1999) Regulation of milk protein gene expression. *Annual Review of Nutrition*, **19**:407-436.
- Rudolph, N.S. (1999) Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends in Biotechnology*, **17**:367-374.

## S

- Schaar, J., Hansson, B., y Pettersson, H-E. (1985) Effects of genetic variants of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin on cheesemaking. *Journal of Dairy Research*, **52**: 429-437.
- Schlee, P., Krause, I., y Rottmann, O. (1993) Genotyping of ovine  $\beta$ -lactoglobulin alleles A and B using the PCR. *Arch. Tierz*, **36**: 519-523.
- Schnieke, A.E., Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scott, A.R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., y Campbell, K.H. (1997) Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, **278**:2130-2133.
- Shamay, A., Solinas, S., Pursel, V.G., McKnight, R.A., Alexander, L., Beattie, C., Hennighausen, L., y Wall, R.J. (1991) Production of the mouse whey acidic protein in transgenic pigs during lactation. *Journal of Animal Science*, **69**:4552-4562.
- Shani, M., Barash, I., Nathan, M., Ricca, G., Searfoss, G.H., Dekel, I., Faerman, A., Givol, D., y Hurwitz, D.R. (1992) Expression of human serum albumin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Research*, **1**:195-208.
- Shitara, H., Sato, A., Hayashi, J-i., Mizushima, N., Yonekawa, H., y Taya, C. (2004) Simple method of zygosity identification in transgenic mice by real-time quantitative PCR. *Transgenic Research*, **13**:191-194.
- Simons, J.P., McClenaghan, M., y Clark, A.J. (1987) Alteration of the quality of milk by expression of sheep  $\beta$ -lactoglobulin in transgenic mice. *Nature*, **328**:530-532.
- Simpson, K.L., Bird, P., Shaw, D., y Nicholas, K.R. (1998) Molecular characterisation and hormone-dependent expression of the porcine whey acidic protein gene. *Journal of Molecular Endocrinology*, **20**: 27-35.
- Sohn, B.H., Kim, S.J., Park, H., Park, S.K., Lee, S.C., Hong, H.J., Park, Y.S., y Lee, K.K. (1999) Expression and characterization of bioactive human thrombopoietin in the milk of transgenic mice. *DNA Cell Biology*, **18**:845-852.

- Sokol, D. L., Passey, R.J., Mackinlay, A.G., y Murray, J.D. (1998) Regulation of CAT protein by ribozyme and antisense mRNA in transgenic mice. *Transgenic Research*, **7**:41-50.
- Soulier, S., Vilotte, J.L., Stinnakre, M.G., y Mercier, J.C. (1992) Expression analysis of ruminant  $\alpha$ -lactalbumin in transgenic mice: developmental regulation and general location of important *cis*-regulatory elements. *FEBS*, **297**:13-18.
- Spencer, T.E., Stagg, A.G., Joyce, M.M., Jenster, G., Wood, C.G., Bazer, F.W., Wiley, A.A., y Bartol, F.F. (1999) Discovery and characterization of endometrial epithelial messenger ribonucleic acids using the ovine uterine gland knockout model. *Endocrinology*, **140**:4070-4080.
- Stacey, A., Schnieke, A., Kerr, M., Scott, A., McKee, C., Cottingham, I., Binas, B., Wilde, C., y Colman, A. (1995) Lactation is disrupted by  $\alpha$ -lactalbumin deficiency and can be restored by human  $\alpha$ -lactalbumin gene replacement in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **92**: 2835-2839.
- Stewart, T.A., Wagner, E.F., y Mintz, B. (1982) Human  $\beta$ -globin gene sequences injected into mouse eggs, retained in adult, and transmitted to progeny. *Science*, **217**:1046-1048.
- Stromqvist, M., Houdebine, M., Andersson, J.O., Edlund, A., Johansson, T., Viglietta, C., Puissant, C., y Hansson, L. (1997) Recombinant human extracellular superoxide dismutase produced in milk of transgenic rabbits. *Transgenic Research*, **6**:271-278.
- T**esson, L., Heslan, J-M., Ménoret, S., y Anegon, I. (2002) Rapid and accurate determination of zygosity in transgenic animals by real-time quantitative PCR. *Transgenic Research*, **11**:43-48.
- Thepot, D., Devinoy, E., Fontaine, M.L., Stinnakre, M.G., Massoud, M., Kann, G., y Houdebine, L.M. (1995) Rabbit whey acidic protein gene upstream region controls high-level expression of bovine growth hormone in the mammary gland of transgenic mice. *Molecular Reproduction and Development*, **42**:261.
- Thepot, D., y Houdebine, L.M. (1999) The transcriptional regulation of milk protein genes. *AgBiotechNet*, **1**:1-6.
- Threadgill, D.W., y Womack, J.E. (1990) genomic analysis of the major bovine casein genes. *Nucleic Acids Research*, **18**:6935-6942.
- Toman, P.D., Pieper, F., Sakai, N., Karatzas, C., Platenburg, E., de Wit, I., Samuel, C., Dekker, A., Daniels, G.A., Berg, R.A., y Platenburg, G.J. (1999) Production of recombinant human type I procollagen homotrimer in the mammary gland of transgenic mice. *Transgenic Research*, **8**:415-427.

**U** Uusi-Oukari, M., Hyttinen, J.M., Korhonen, V.P., Vasti, A., Alhonen, L., Janne, O.A., y Janne, J. (1997) Bovine alpha s1-casein gene sequences direct high level expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the milk of transgenic mice. *Transgenic Research*, **6**:75-84.

**V** Vaisse, C., Atger, M., Potier, B., y Milgrom, E. (1990) Human placental protein 14 gene: sequence and characterization of a short duplication. *DNA and Cell Biology*, **9**:401-413.

Van Berkel, P.H.C., Welling, M.M., Geerts, M., van Veen, H.A., Ravensbergen, B., Salaheddine, M., Pauwels, E.K.J., Pieper, F., Nuijens, J.H., y Nibbering, P.H. (2002) Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nature Biotechnology*, **20**:484-487.

Van Cott, K.E., Lubon, H., Gwazdauskas, F.C., Knight, J., Drohan, W.N., y Velander, W.H. (2001) Recombinant human protein C expression in the milk of transgenic pigs and the effect on endogenous milk immunoglobulin and transferring levels. *Transgenic Research*, **10**:43-51.

van der Putten, H., Botteri, F.M., Miller, D.A., Rosenfeldt, M.G., Fan, H., Evans, R.M., y Verma, I.M. (1985) Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **82**:6148-6152.

Velander, W.H., Page, R.L., Morcol, T., Russell, C.G., Canseco, R., Young, J.M., Drohan, W.N., Gwazdauskas, F.C., Wilkins, T.D., y Johnson, J.L. (1992a) Production of biologically active protein C in the milk of transgenic mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **665**:391-403.

Velander, W.H., Johnson, J.L., Page, R.L., Russell, C.G., Subramanian, A., Wilkins, T.D., Gwazdauskas, F.C., Pittius, C., y Drohan, W.N. (1992b) High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **89**:12003-12007.

Vilotte, J.L., Soulier, S., Stinnakre, M.G., Massoud, M., y Mercier, J.C. (1989) Efficient tissue-specific expression of bovine  $\alpha$ -lactalbumin in transgenic mice. *European Journal of Biochemistry*, **186**:43-48.

**W** Wagner, E.F., Stewart, T.A., y Mintz, B. (1981) The human  $\beta$ -globin gene and a functional thymidine kinase gene in a developing mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **78**:5016-5020.

Wagner, T.E., Hoppe, P.C., Jollick, J.D., Scholl, D.R., Hodinka, R.L., y Gault, J.B. (1981) Microinjection of a rabbit  $\beta$ -globin gene in zygotes and its subsequent

- expression in adult mice and their offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **78**:6376-6380.
- Wagner, V.A., Schild, T.A., y Geldermann, H. (1994) DNA variants within the 5'-flanking region of milk-protein-encoding genes. II. The  $\beta$ -lactoglobulin-encoding gene. *Theoretical and Applied Genetics*, **89**:121-126.
- Wall, R.J., Pursel, V.G., Shamay, A., McKnight, R.A., Pittius, C.W., y Hennighausen, L. (1991) High level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary gland of transgenic swine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**:1696-1700.
- Wall, R.J., Rexroad, C.E., Jr, Powell, A., Shamay, A., McKnight, R., y Hennighausen, L. (1996) Synthesis and secretion of the mouse whey acidic protein in transgenic sheep. *Transgenic Research*, **5**:67-72.
- Watanabe, M., Nakamura, M., Sato, K., Kano, M., Simon, M.I., y Inoue, Y. (1998) Patterns of expression for the mRNA corresponding to the four isoforms of phospholipase C beta in mouse brain. *The European Journal of Neuroscience*, **10**:2016-2025.
- Watson, J.C., Gordon, K.E., Robertson, M., y Clark, A.J. (1991) Interaction of DNA-binding proteins with a milk protein gene promoter: in vitro identification of a mammary gland-specific factor. *Nucleic Acids Research*, **19**:6603-6610.
- Webster, J., Donofrio, G., Wallace, R., Clark, A.J., y Whitelaw, C.B.A. (1997) Intronic sequences modulate the sensitivity of  $\beta$ -lactoglobulin transgenes to position effects. *Gene*, **193**:239-243.
- Whitelaw, C.B., Archibald, A.L., Harris, S., McClenaghan, M., Simons, J.P., y Clark, A.J. (1991) Targeting expression to the mammary gland: intronic sequences can enhance the efficiency of gene expression in transgenic mice. *Transgenic Research*, **1**:3-13.
- Whitelaw, C.B., Harris, S., McClenaghan, M., Simons, J.P., y Clark, A.J. (1992) Position-independent expression of the ovine  $\beta$ -lactoglobulin gene in transgenic mice. *Journal of Biochemistry*, **286**:31-39.
- Whitelaw, C.B., Springbett, A.J., Webster, J., y Clark, J. (1993) The majority of  $G_0$  transgenic mice are derived from mosaic embryos. *Transgenic Research*, **2**:29-32.
- Whitelaw, C.B., Grolli, S., Accornero, P., Donofrio, G., Farini, E., y Webster, J. (2000) Matrix attachment region regulates basal  $\beta$ -lactoglobulin transgene expression. *Gene*, **244**:73-80.
- Whitelaw, C.B.A., Radcliffe, P.A., Ritchie, W.A., Carlisle, A., Ellard, F.M., Pena, R.N., Rowe, J., Clark, A.J., King, T.J., y Mitrophanous, K.A. (2004) Efficient

generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS letters*, **571**:233-236.

Wilkie, T.M., Brinster, R.L., y Palmiter, R.D. (1986) Germline and somatic mosaicism in transgenic mice. *Developmental Biology*, **118**:9-18.

Wilkins, R.J., y Kuys, Y.M. (1992) Rapid  $\beta$ -lactoglobulin genotyping of cattle using the polymerase chain reaction. *Animal Genetics*, **23**:175-178.

Wilmot, I., Archibald, A.L., McClenaghan, M., Simons, J.P., Whitelaw, C.B.A., y Clark, A.J. (1991) Production of pharmaceutical proteins in milk. *Experientia*, **47**:905-912.

Wingender, E., Dietze, P., Karas, H., y Knüppel, R. (1996) TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Research* **24**:238-241.

Woychik, R.P., y Alagramam, K. (1998) Insertional mutagenesis in transgenic mice generated by the pronuclear microinjection procedure. *The International Journal of Developmental Biology*, **42**:1009-1017.

Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmot, I., Garner, I., y Colman, A. (1991) High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technology*, **9**:830-834.

Wu, S-Y., Pérez, M.D., Puyol, P., y Sawyer, L. (1999)  $\beta$ -lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *The journal of biological chemistry*, **274**: 170-174.

**Y** Yahyaoui, M.H., Pena, R.N., Sánchez, A., y Folch, J.M. (2000) Rapid communication: polymorphism in the goat beta-lactoglobulin proximal promoter region. *Journal of Animal Science*, **78**:1100-1101.

Yarus, S., Rosen, J.M., Cole, A.M., y Diamond, G. (1996) Production of active bovine tracheal antimicrobial peptide in milk of transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**:14118-14121.

**Z** Ziomek, C.A. (1998) Commercialisation of proteins produced in the mammary gland. *Theriogenology*, **49**:139-144.



**ANEXO**

## CONSTRUCCIÓN FSH-ALFA



Región 3'F  
βLG cabra

CTGTGCTCTCCCTTCTGAGTCTTTCTGGACAACGGGCAGGGGGTGGAGAAGGCCCGGCACAG  
GGTGGGGAGTGGTCTGGCTCAGAGGATGACAGCGGGGCTGGGATCCAGGGCGTCTGCATCACA  
GTCTTGTGACATCTGGGGGCCACACACATCACTGTGGCTCTTTGAAACTTTTCAGGAACCAGG  
GAGGACTCAGCAGAGATATCTGCCAGTTACCTTGGAGTGTTCACTCAACACCCAAACTCGAC  
AAAGGACAGAAAGTGGAAAATGGCTGTCTCTTAGTCTAATAAATATTGATATGAAAACTCAAG  
TTGCTCATGGATCAAATTATGCCCTTTTATGAATCCAGCCACTACTGTGGTATCAAACCTTCA  
TGTACCCAAAACGCACTGATCTTTTTCTGTGCTAAAATGAAATAAAGAGATTTCCCAAGATAG  
AGGAGCTGGGCAAAGAGGTACGGTTGGAAGGAGACTTGTTCTGCACACACAGCAAGGAGAT  
CCAACCAGTCCATCCTAAAGGAGATCAGTCCTGGGTGTTTATTGGAGGGACTGATGTTGAAGC  
TGAAACTCCAATGCTTTGGCCACCTGATGTGAAGAGCTGCCTCATTTGAAAAGACCCTGATGC  
TGGGAAAGATTGAGGGCAGGAGGAGAAGGGGACGACAGAGGATGAGATGGTTGGATGGCATCA  
CTGACACAATGGACATGGGTTTGGGTGGACTCCGGGAGTTGGTGTGACAGGGAGGCCTGGC  
GTGCTGCGGTTTATGGGGTCACAAAGACTGAGCGACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTG  
AGGTATACAGCAAAGTGGGGATTTTTTAAATGATAAGAATAATTTGCACATAGCATAGTGTGT  
ACTCATATTTATATGCGTACCTGAATGCTCAGTCACTCAGTCGTACCTGACTCTGTGACCTAT  
GGACCATAGCCCTCCAGGTTCTTTCTGTCCCCAGAAATTCTCCAGGCAAGAATACTGGAGTGGG  
TAGCCATTTCTCCTCCAGGCGATCCTCCCGACCCAGGGATTGAACCGGCATCTCCTGCATTG  
GCAGGTGGATTCTTTACCCTGTGCCACCAGGGAAGCCTGTGTTACTGTCTATGTCCCACTTA  
ATTACCAAAGCTGCTCCAAGAAAAAGCCCTATGCCTCTGAGCTTCCCGGCCTGCAGAGTTGT  
GGGGGTAGACTGTGACCTGGGAACACCCTCCCGCTTCCAGGACTCCCGGGCCACATGACCCACA  
CTCCTGCAGACAGCCGGGTAGTTCTGCTCTTACGGCTCATTATCTTTAAGAAAACTGAGGTC  
TATTTTGTGACTTCGCTGCCGTAACCTTCTGAACATCCAGAGCGATGGACGGCCTCCTCCCAG  
GCCTCAGGGGCTTCAGGGAGCCAGCCTTACCTACGAGTACCAGACACACGGGGGTGGCCCC  
GCCTCCAGGGTGTCTCACAGTCTTCCCATCGTCTCTGATCAAAGAGCGAGATCAATGACTTCTTA  
GGAGCAAGCAGACACCCACAGGACTGAGGTTACCAGACTGAGCCGTCTTTTGAACCTAA  
AGACACACAGCTCTCGAAGTTTTTCTCTTTAATCTGGATTTAAGGCCTATTTGCCCTCAAGA  
GGGAAGACACACCTGCGTGTCCCCAGGACAGCCACTCGGTGGCATCCAAGGCCACTTAGTATT  
ATCTGACCGCACCTGGAATCAATCGGTCCAAACTGGACAAAAATCTTGGTGGGAAGTTTCAT  
CCCAGAGGCTCAACCAGCCTGCTTTGACCACCTGCATCTTTTTTTCTTTTATGCGTATGTAT  
GTATATATATATTTTTTTTTTTTTTTTTCATTTTTTGGCTGTGCTGGCTGTTCTGTTTCAGTTCGG  
CACGCAGGCTTTCTCTCTAGTTGCAGTATGAGACCTTCTCTTATCACAGAGCAGTC**TCTAGAT**  
**ACGTA**

Se subrayan los exones y se indican en color las dianas de restricción.

## CONSTRUCCIÓN FSH-BETA

