

¿CÓMO FUNCIONA?

Sistema “Brainbow” para el estudio del mapa conectómico neural a gran escala

Manuel Pedro Jiménez García

Licenciado en Biología y becario predoctoral, IBIS, Sevilla
manubiomed42@gmail.com

61

Introducción a las técnicas de estudio del mapa conectómico neural

Comprender la contribución de las interconexiones neuronales en la función del cerebro ha sido una preocupación que los neurocientíficos han tenido a lo largo de los años. Para poder dar respuesta al estudio de la función del encéfalo se requieren varios tipos de datos:

- Un primer tipo se basa en realizar un mapa físico del circuito neuronal, indicando las conexiones sinápticas entre neuronas.
- Un segundo tipo va enfocado a la comprensión de cómo viaja el impulso nervioso por esos circuitos neuronales cuando se percibe un estímulo, se toma una decisión o se lleva a cabo una determinada acción.
- Un tercer tipo de datos, puesto que el circuito puede sufrir modificaciones, tratará la información referente al cambio del circuito y las señales que viajan por él, con respecto al tiempo.
- Finalmente, se necesitarán herramientas específicas que permitan convertir todos los datos obtenidos en una explicación del **mapa conectómico neural**. En esa línea están trabajando los neurocientíficos, para desarrollar una herramienta que permita la interpretación de los datos obtenidos.

Así pues, uno de los objetivos principales en neurociencia es mapear los diferentes circuitos neuronales con la finalidad de dilucidar los mecanismos que subyacen a la actividad, integridad y posibles alteraciones del cerebro en los trastornos neurológicos y psiquiátricos. Por tanto, el desarrollo de una metodología que permita visualizar los circuitos neurales, con la máxima resolución, que se aproxime a las condiciones en el organismo vivo, es esencial para extraer la mayor información posible y que posibilite la comprensión del proceso neuropatológico de estudio.

Durante el pasado siglo XX, los neurocientíficos han usado diferentes técnicas neuroanatómicas para el estudio de la conectividad neural como son las tinciones de células individuales mediante impregnaciones de plata o inyecciones intracelulares, y también las técnicas microscópicas para el trazado neuronal. Sin embargo, estas técnicas tienen limitaciones que han de complementarse con otras aproximaciones para conocer en detalle el conectoma neural.

Recientemente, una de las técnicas que han permitido una revolución en neurociencia en este sentido, solventando alguna de estas limitaciones, ha sido el sistema Brainbow, que se comentará a continuación.

Generalidades de la técnica Brainbow

La complejidad inherente de los circuitos neuronales en mamíferos, incluido el hombre, plantea serios problemas para el

estudio de las neuronas individuales y sus diferentes conexiones, ya que se ha de encontrar una técnica de tinción o marcaje que permita el estudio de la morfología y conexiones de una neurona concreta dentro del conjunto de sus neuronas vecinas, así como el circuito desempeñado por todas ellas.

La técnica *Brainbow* permite identificar células individuales, diferenciándolas del resto de neuronas vecinas, en el encéfalo de cualquier modelo animal mediante el marcaje fluorimétrico selectivo que se obtiene mediante la expresión combinatoria de proteínas fluorescentes distintas, como son las proteínas roja (RFP, *Red Fluorescent Protein*), azul cian (CFP, *Cyan Fluorescent Protein*), verde (GFP, *Green Fluorescent Protein*), amarilla (YFP, *Yellow Fluorescent Protein*), naranja (OPF, *Orange Fluorescent Protein*), y otras.

La técnica *Brainbow* se basa en el sistema genético de recombinación *Cre/lox*, que permite un cambio en la estructura permitiendo activar la transcripción de la construcción génica introducida dentro de la célula, que dará lugar a la proteína fluorescente por escisión, inversión o recombinación intercromosómica de ese ADN que codifica para la/s proteína/s fluorescente/s. De esta manera, a partir de un único transgén (o varias copias del mismo) se pueden generar varias proteínas fluorescentes. Además, debido a que la expresión de una u otra proteína fluorescente se realiza en el genoma de la célula, hace posible que la célula completa incluyendo todas sus prolongaciones (dendritas y axón), adopten un único color, lo que permite distinguir a esa célula y ver sus conexiones neuronales.

A este conjunto de técnicas basadas en el sistema de recombinación *Cre/lox* se las denominó “*Brainbow*”, ya que se podría traducir como “cerebro-arco-iris”, debido a la amplia paleta de colores que permite generar atendiendo a la combinación de proteínas fluorescentes.

Estrategias *Brainbow in vitro* para generar expresión diferencial de los genes

Existen diversas estrategias del sistema *Brainbow* para la expresión de múltiples proteínas fluorescentes a partir de un único transgén. De manera genérica se destacan dos de ellas, la *Brainbow-1* utiliza el sistema *Cre* de escisión de sitios *lox* incompatibles con el objetivo de generar múltiples eventos de recombinación, mientras que la *Brainbow-2* utiliza el sistema *Cre*, pero con segmentos invertidos de ADN flanqueados por sitios *LoxP* en orientación reversa y dispuestos en tándem, es decir, repetidos, para generar diferentes eventos de recombinación.

Estos eventos de recombinación ocurren gracias a la herramienta genética *Cre/lox*, que permite, mediante la enzima *Cre* recombinasa y las diferentes secuencias *lox* de ADN intercaladas en genes concretos de una construcción genética, generar nuevas y diferentes construcciones génicas a partir de uno o más sucesos de recombinación específica de sitio, que ocurren con una probabili-

dad similar, independientemente del tipo de secuencia *lox* utilizada.

Siguiendo la estrategia **Brainbow-1** se han diseñado dos sistemas que, atendiendo al número de proteínas fluorescentes que se pueden obtener dependiendo del evento molecular que tiene lugar, son: **Brainbow-1.0** y **Brainbow-1.1**. La primera utiliza el sistema *Cre* con excisión de ADN y genera tres proteínas fluorescentes: roja (RFP), amarilla (YFP) o azul (CFP), y por tanto marca las células de esos colores. Por otro lado, **Brainbow-1.1** también utiliza el sistema *Cre* con excisión de ADN, pero produce cuatro proteínas fluorescentes: naranja (OPF), roja (RFP), amarilla (YFP) y azul (CFP) (Figura 1).

En cuanto a **Brainbow-2** se han diseñado dos sistemas: **Brainbow-2.0**, que utiliza el sistema *Cre* con inversión del ADN, generando dos proteínas fluorescentes diferentes: roja (RFP) y azul (CFP); y **Brainbow-2.1**, que utiliza el sistema *Cre* tanto con escisión como inversión del ADN y permite formar múltiples eventos de recombinación, generando cuatro proteínas fluorescentes dife-

tes sistemas **Brainbow** empleando más de una copia de las proteínas fluorescentes, haciendo posible que la co-expresión diferencial de múltiples copias de estas construcciones genere mezclas de proteínas fluorescentes, permitiendo colorear a la célula de la combinatoria de fluorocromos de estas proteínas. Este proceso se ha constatado en mayor detalle *in vivo*, permitiendo marcar neuronas individuales e incluso células gliales, con más de 90 tonalidades de colores.

Existen diferentes parámetros experimentales que afectan a la combinatoria de colores obtenida, pudiendo alterar el color de marcaje de la célula. Estos factores pueden ser: la elección del promotor, así como el número de copias del transgén que se generen, la longitud del transgén, la eficiencia y duración del proceso de recombinación, la temperatura y el medio de cultivo (*in vitro*), y el estado fisiológico del animal (*in vivo*).

Técnica **Brainbow** *in vivo*

A partir de los ensayos *in vitro* que han permitido desarrollar los diferentes sistemas **Brainbow**, el siguiente paso ha sido constatar este marcaje fluorimétrico en un modelo animal, es decir, realizar una aproximación de la técnica **Brainbow** *in vivo*. Para ello, se creó el ratón transgénico **Thy1-Brainbow** que permite expresar el sistema **Brainbow** en diferentes tipos neuronales del encéfalo. Se utilizaron los sistemas **Brainbow-1** y **Brainbow-2**, bajo elementos reguladores del gen *Thy1*, que tiene una tasa de expresión elevada en múltiples tipos neuronales, demostrándose que los eventos de recombinación y la posterior expresión diferencial de los genes se mantienen de igual manera *in vitro* e *in vivo*.

Más adelante, se profundizó en el conocimiento de la expresión combinatoria de diferentes proteínas fluorescentes en un mismo tipo celular de este ratón transgénico, de manera que se obtiene una amplia paleta de colores en diferentes tipos celulares, siendo las causas de este aumento en la gama de colores: la recombinación independiente de múltiples copias de la construcción introducida, así como las recombinaciones parciales que se den entre copias, todo ello en un tipo neuronal determinado. En la figura 2 se muestran dos ejemplos concretos en los que se insertan tres copias de la construcción del sistema **Brainbow-1.0**, que genera

tres proteínas diferentes que forman diez colores.

La utilidad del sistema **Brainbow** para analizar las diferentes conexiones neuronales depende del número de colores distinguibles que presenten dichas neuronas. Llegados a este punto cabría preguntarse, ¿Cuántos colores podrían generarse para permitir un equilibrio entre la especificidad de marcaje neuronal y el diferente color que se genere? Se pueden generar tantos colores como per-

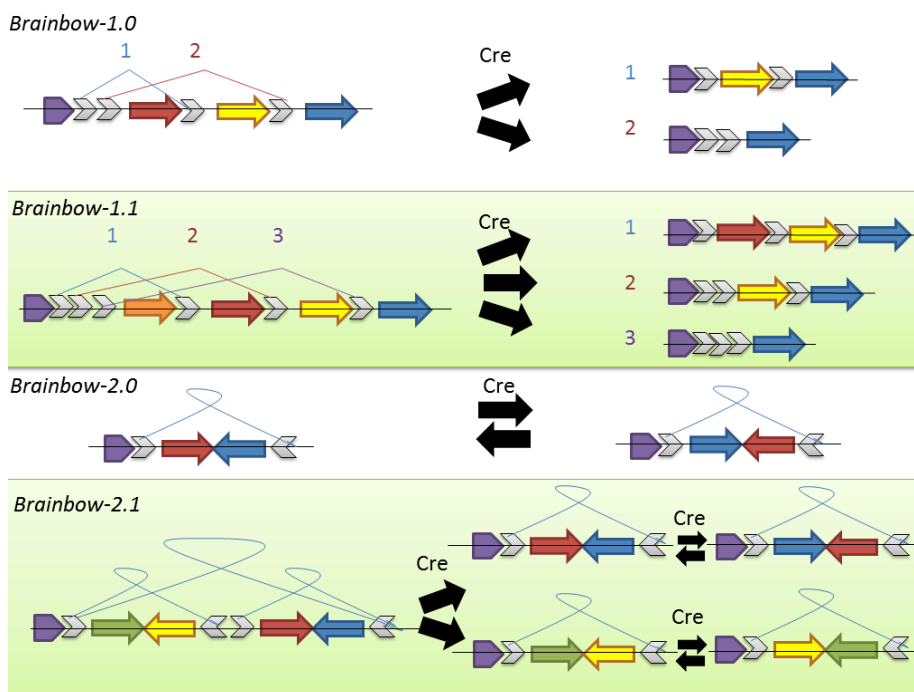


Figura 1: Estrategias **Brainbow.** En **Brainbow-1.0** y **Brainbow-1.1**, los pares *lox* incompatibles o heteroespecíficos crean dos o tres posibilidades de escisión, que posibilitan la expresión de distintas proteínas fluorescentes. En **Brainbow-2.0**, los sitios *loxP* se localizan en posición reversa, definiendo un segmento de ADN invertido en donde dos genes de proteínas fluorescentes se localizan enfrentados: esta construcción se invierte mientras *Cre* recombinasa esté activa, y cuando se estabilizan los genes de proteínas fluorescentes no invertidos, se expresan. En **Brainbow-2.1**, dos unidades invertidas se posicionan en tándem, ofreciendo una escisión e inversión adicionales, promoviendo un total de cuatro posibles expresiones de proteínas fluorescentes. Imagen adaptada de Weissman et al. (2011) donde la flecha morada es el promotor constitutivo y las flechas de colores indican las secuencias codificadoras de las diferentes proteínas fluorescentes.

rentes: roja (RFP), verde (GFP), azul (CFP) y amarilla (YFP), (Figura 1). La utilización de una u otra proteína fluorescente puede modificarse de la construcción génica.

En definitiva, todos estos sistemas se han realizado atendiendo a una única copia del gen que codifica para la proteína fluorescente, el cual, tras los sucesos de recombinación pertinentes, producirá una única proteína fluorescente, haciendo que la célula fluoreszca con ese color. Sin embargo, se pueden utilizar los diferen-

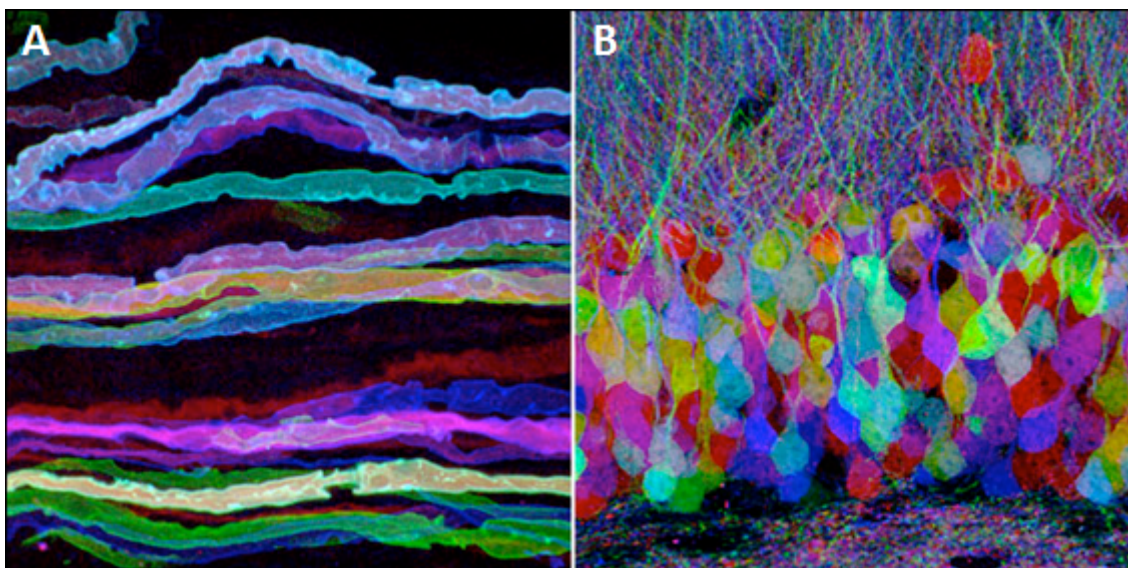


Figura 2: Expresión combinatoria de las proteínas fluorescentes a causa de la integración en tándem de más de un transgén. Se indican en los diez colores que se pueden obtener únicamente con la combinatoria de tres proteínas fluorescentes: azul (CFP), verde (GFP) y roja (RFP). En (A) se muestra el nervio oculomotor de un ratón *Thy1-Brainbow-1.0* donde se observan axones motores en diferente color, según el tipo celular de origen, y en (B) se muestra el giro dentado de un ratón *Thy1-Brainbow-1.0*, donde distintas neuronas adquieren un color diferente. Imagen obtenida de Livet et al, (2007), licencia *Creative Commons* (CC).

63

mita la combinatoria de proteínas fluorescentes según el número de copias del transgén introducidas, de manera que si una determinada cepa de ratón transgénico *Thy1-Brainbow* posee, por ejemplo, 8 copias del transgén, las poblaciones neuronales mostrarán un perfil colorimétrico mayor que si tuvieran menor número de copias. Se estima que para 8 copias se pueden obtener hasta 89 colores diferentes, y para 16 copias, 166 colores. Todo ello permite diferenciar componentes neuronales específicos de circuitos complejos.

Especificidad de marcaje celular

Uno de los objetivos fundamentales de la técnica *Brainbow* es el marcaje selectivo de diferentes tipos neuronales (o de sus etapas de desarrollo) y sus conexiones para poder generar un mapa conectómico neural. Se sabe que esta técnica marca células de un mismo tipo, dentro de una determinada población celular, con diferentes colores pero permitiendo identificar al tipo celular y facilitando la visualización de sus interacciones.

Este sistema debe cumplir una serie de requisitos para permitir el marcaje específico de un tipo celular, como son:

- La utilización de un **promotor de alta expresión** de toda la construcción genética, como es el promotor *Thy1.2* o el de citomegalovirus (*CMV*), que permiten expresar niveles medibles de proteínas fluorescentes. Además de la utilización de **elementos reguladores que optimicen la expresión** como regiones eficientes de iniciación de la traducción y una señal de poliadenilación adecuada en el ARN mensajero,
- El uso de **etiquetas de expresión (Tag)** fusionadas con la secuencia que codifica para la proteína fluorescente que se vaya a expresar en la construcción, como pueden ser secuencias que codifiquen aminoácidos hidrófobos que permitan un anclaje en la membrana plasmática o de otros orgánulos, así como otras

secuencias que permitan el anclaje a diversas estructuras moleculares axonales, dendríticas, o del soma neuronal. Todo ello ayuda en el marcaje específico de un tipo neuronal concreto, y por otro lado, un marcaje a nivel subcelular.

- El diseño de **iniciadores o inductores de la recombinación mediada por Cre recombinasa**, lo que permitirá una expresión homogénea de la/s proteína/s fluorescente/s en diversos tipos celulares. Actualmente existen inductores y recombinasas Cre específicos comerciales para marcar la retina y neuronas motoras, entre otros.

- Las **características fotoquímicas de las proteínas fluorescentes**, que dependen de las secuencias que las codifican y del entorno físico-químico de plegamiento proteico. Actualmente, se siguen generando nuevos colores y con diferentes características fotoquímicas.

- Las **estrategias genéticas que permiten generar animales transgénicos** que expresen una o más proteínas fluorescentes, ya que permitirán diferente eficiencia de expresión, así como especificidad de marcaje.

Aplicaciones directas. Estudio del trazado neuronal y de la interacción glial

Las aplicaciones del sistema *Brainbow* cubren fundamentalmente el estudio de circuitos neuronales de mayor complejidad, permitiendo construir mapas conectómicos neuronales. El sistema se probó inicialmente en regiones del encéfalo conocidas, como la capa granular del cerebelo, permitiendo obtener datos de la tipología celular, la forma y disposición de las fibras musgosas en este nivel, así como los contactos sinápticos entre las fibras musgosas y las dendritas de las células granulosas. Todo ello se acompaña de

reconstrucciones tridimensionales, mediante programas informáticos específicos, a partir de la información obtenida mediante microscopía de fluorescencia y confocal de las secciones de encéfalo analizadas.

Por otro lado, se quiso testar si el sistema *Brainbow* se puede utilizar para el estudio de la interacción glial, partiendo de estudios previos de las relaciones anatómicas entre las células gliales y de sus interacciones con neuronas. Se comprobó que la técnica *Brainbow* proporciona un método alternativo para el estudio de la interacción glial, que permite corroborar procesos ya conocidos, y aumentar el grado de conocimiento con mayor detalle. Se ha demostrado que el sistema *Brainbow* permite observar interacciones entre células gliales vecinas tales como los astrocitos, la glia de Bergmann del cerebelo y las células de Schwann.

Perspectivas de futuro de la técnica *Brainbow*

La técnica *Brainbow* mediada por el sistema genético *Cre/lox*, permite realizar estudios a gran escala de interacción celular en diferentes modelos animales. Existen, además, otros sistemas alternativos al *Cre/lox* como el *CreER* o *CreERT* que generan resultados similares en la combinatoria de colores y marcaje neuronal, permitiendo en un futuro generar sistemas aún más específicos y controlados que permitan el estudio estandarizado de zonas anatómicas muy concretas.

Por otro lado, los sistemas que permiten generar una combinatoria de unos 100 colores diferentes son muy útiles para la visualización y el estudio de las conexiones de un gran número de neuronas, ya que una mayor cantidad de colores permite discernir entre neuronas con elevada resolución, llegando incluso al nivel de la sinapsis, sin tener que utilizar la microscopía electrónica. Por lo tanto, la principal ventaja del sistema *Brainbow* a este nivel es que la utilización del sistema de regulación *Thy1* permite marcar específicamente ciertas poblaciones neuronales.

Las perspectivas de futuro van encaminadas al diseño de nuevas construcciones genéticas que permitan vencer las limitaciones actuales, permitiendo expandir aún más el espectro cromático y las características fotoquímicas de las proteínas fluorescentes. El conocimiento de diferentes promotores eficientes y específicos de tipo celular, junto con la obtención de construcciones génicas específicas del modelo animal y del tipo celular, la optimización de las técnicas de obtención de micro-secciones de tejido y la estandarización de la microscopía de fluorescencia y confocal, contribuirán, sin duda, a la mejora de la resolución final de estas técnicas. Todo ello encaminado al avance del conocimiento del encéfalo animal y humano, que nos permita dilucidar con mayor precisión los eventos celulares patológicos que ocurren en enfermedades como el Alzheimer, el Huntington y otras neuropatologías que afectan a una gran parte de la población.

64

Lecturas recomendadas para saber más:

1. Dhawale, A., Bhalla, U.S. (2008). The network and the synapse: 100 years after Cajal. *HFSP J.* 2 (1): 12–16.
2. Lichtman, J., Livet, J., Sanes, J. (2008). A technicolour approach to the connectome. *Nature Reviews Neuroscience.* 9 (6): 417–422. doi:10.1038/nrn2391.
3. Livet, J., Weissman, T. A., Kang, H., Draft, R. W., Lu, J., Bennis, R. A., Sanes, J. R., Lichtman, J. W. (2007). Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature.* 450(7166), 56–62. doi:10.1038/nature06293.
4. Shaner, N. C., Steinbach, P. A., Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2, 905–909.
5. Livet, J., Hampel, S., Chung, P., McKellar, C., Hall, D., Looger, L., Simpson, J. (2011). *Drosophila Brainbow*: a recombinase-based fluorescence labeling technique to subdivide neural expression patterns. *Nature Methods* 8 (3): 253–260. doi:10.1038/nmeth.1566.
6. Sauer, B. (1987). Functional expression of the Cre-Lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7: 2087–2096.

NOTA DE LOS EDITORES: Véase “*Mapas del cerebro*” en la sección *Monitor de Encuentros en la Biología* 143, donde se comenta la publicación de un *Focus on Mapping the Brain* en la el número de Junio de 2013 de la revista *Nature Methods*. Ese *Focus* contiene, entre otros, el artículo (5) de la lista de “Lecturas recomendadas para saber más”.

