

BrainBow: la belleza de estudiar sistemas complejos

Moreta, Erick ¹ & Oña, Claudia ¹

¹ Vitroplantae

Correo para correspondencia: erickmorett@gmail.com

Resumen

Uno de los retos más grandes que tiene la neurobiología es el estudio de la gran variedad de tipos y subtipos de neuronas, así como las conexiones complejas que forman entre ellas. Brainbow es una técnica que permite discriminar células individuales y etiquetarlas con colores únicos al expresar sofisticados circuitos de ADN. El mecanismo de esta técnica se centra en el uso de una herramienta de edición genética llamada recombinación Cre-Lox. El uso de este instrumento permite la expresión aleatoria de una proteína fluorescente mediante la intervención de diferentes secuencias de recombinación Lox. Debido a que más de un circuito es introducido en una neurona, cada una puede expresar diferentes combinaciones de proteínas fluorescentes y generar decenas de colores únicos. Esta técnica de etiquetado ha permitido la identificación de neuronas individuales, para así estudiarlas. BitBow, una de las últimas mejoras realizadas a BrainBow, aumenta exponencialmente la paleta de colores para proporcionar miles de etiquetas únicas. En los últimos años, este tipo de técnicas prometen ser de gran ayuda para el estudio de otros organismos modelos y dilucidar sus más complejos sistemas.

Palabras clave: Brainbow, Cre-Lox, Herramienta de edición genética, Neurobiología.

Abstract

One of the greatest challenges that neurobiology has faced is the study of great variety of neurons types and sub/types; as well as their complex connections. Brainbow is a technique that allows the distinction of individual cells due to unique color labels by expressing sophisticated DNA circuits. The mechanism of this technique centers on the use of a genetic editing tool called Cre-Lox recombination. The use of this tool enables the random expression of a fluorescent protein through including different Lox recombination sequences. Given that more than one circuit is introduced into a neuron, each can express different combinations of fluorescent proteins and generate dozens of unique colors. This labeling technique has led to the identification of individual neurons so that scientists can study them. Bitbow, one of the latest upgrades of Brainbow, exponentially enhance the color pallet and provide thousands of unique labels. In recent years, these kinds of techniques promise to be of great help for the study of other model organisms and elucidate their most complex systems.

Keywords: Brainbow, Cre-Lox, Gen editing tool, Neurobiology.

Artículo

La neurobiología es sin duda uno de los campos más complejos dentro de la Biología. Esta indaga los procesos que ocurren dentro de uno de los órganos más complejos conocidos: el cerebro. La complejidad de este órgano se debe a la gran variedad de tipos y subtipos de neuronas y a las complejas conexiones que forman entre ellas [1]. Múltiples técnicas han intentado facilitar a los científicos el estudio de estas células y sus interacciones. El cultivo celular ha proporcionado los medios para estudiar los mecanismos celulares y moleculares del sistema nervioso [2]. Sin embargo, el cultivo de células neuronales es complejo ya que las neuronas maduras no experimentan división celular [3]. Además, el cultivo de neuronas no representa la complejidad de una red neuronal real. De esta manera nace la necesidad de poder colocar una etiqueta única en cada neurona y así poder distinguirla para estudiar específicamente cómo y con qué interacciona en un animal vivo.

En este contexto, en 2007 se desarrolló la técnica de etiquetado llamado Brainbow. Esta hizo posible diferenciar neuronas individuales gracias al color único que se genera en cada una [4]. El mecanismo de esta técnica se centra en el uso de una herramienta de edición genética llamada recombinación Cre-Lox en conjunto a la expresión de un tipo de proteínas que, al ser excitadas con luz de un determinado tipo de longitud de onda, emiten luz con otra longitud de onda (Figura 1). Estas proteínas son denominadas proteínas fluorescentes (PF) y se distinguen según el color que emiten. Ejemplos de esto son la proteína fluorescente verde, roja, amarilla, cian (PFV, PFR, PFA, PFC respectivamente) entre otras [5].

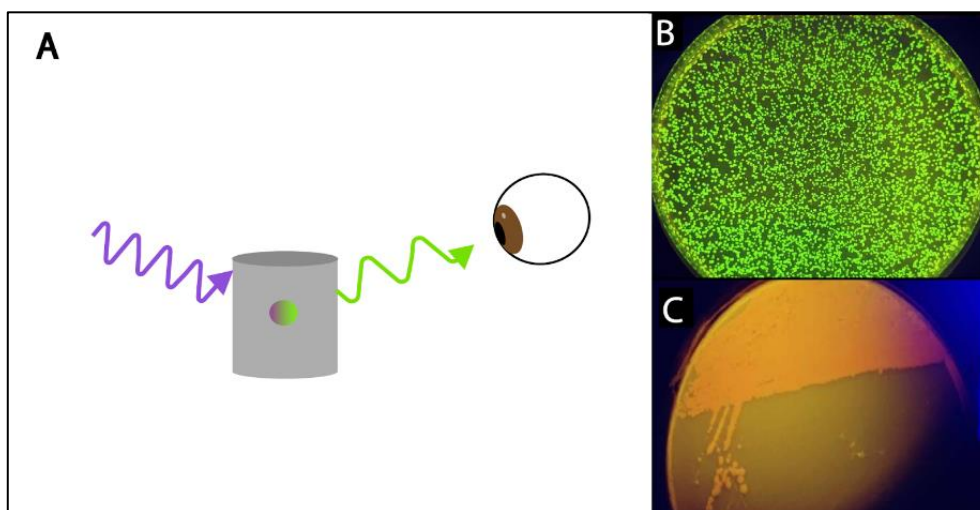


Figura 1. Proteínas fluorescentes. **A.** Proteínas que, al ser excitadas con luz de un determinado tipo de longitud de onda, emiten luz con otra longitud de onda. **B.** Proteína fluorescente verde GFP. **C.** Proteína fluorescente roja (RFP).

Para entender mejor cómo funciona esta técnica, es necesario explicar de manera general el funcionamiento del sistema Cre-Lox. La palabra Cre se refiere al nombre de una enzima que realiza un proceso llamado recombinación del ADN, es decir, generar nuevas combinaciones a partir de ADN pre existente. La recombinación se da cuando la proteína Cre reconoce dos secuencias específicas e idénticas de ADN llamadas Lox, que se encuentran separadas una de la otra. Dependiendo de la dirección de las secuencias Lox, la recombinación puede resultar en la inversión o la eliminación del ADN ubicado en medio de estas secuencias (Figura 2) [6,7].

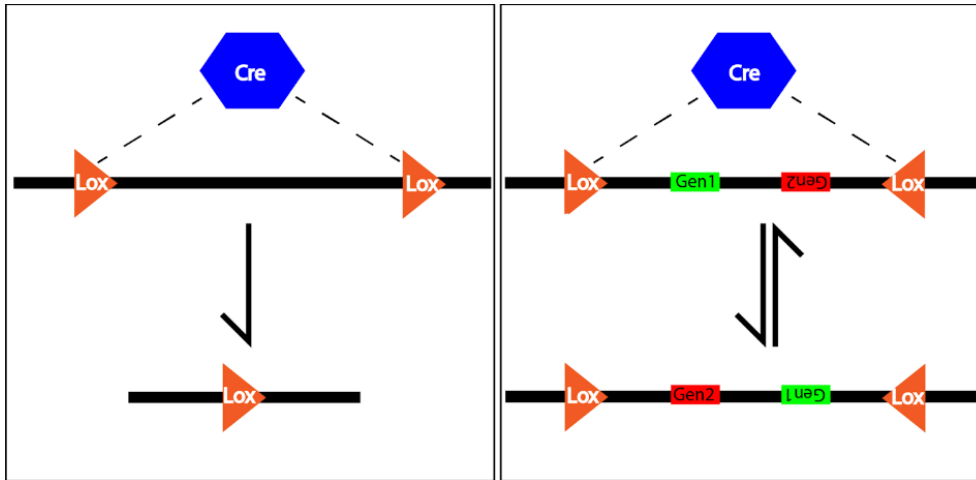


Figura 2. Resultados de la recombinação. **A.** Cuando las secuencias Lox están en la misma dirección, la recombinação resulta en la eliminación del ADN ubicado en medio de estas secuencias. **B.** Cuando las secuencias Lox están en dirección contraria, la recombinação resulta en la inversión del ADN ubicado en medio de estas secuencias.

Existen múltiples versiones de la técnica Brainbow. Sin embargo, en este artículo se explicará un modelo simplificado. Este consiste en utilizar el sistema de recombinação Cre-Lox, con distintos tipos de secuencias Lox (Ej. Lox1, Lox2). Estas, no pueden participar en el proceso de recombinação con una secuencia Lox que no sea del mismo tipo (Figura 3).

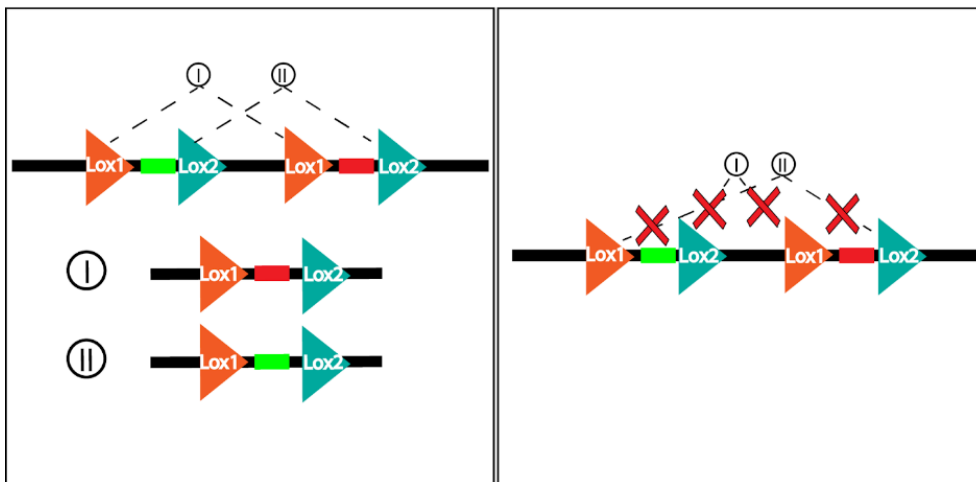


Figura 3. La proteína Cre realiza la recombinação cuando las secuencias Lox son del mismo tipo. **A.** Recombinações posibles. **B.** Recombinações no posibles.

Además, el orden en el que se colocan los diferentes tipos de secuencias Lox en el diseño del ADN del sistema BrainBow, hace que una vez que haya ocurrido un proceso de recombinação, no pueda ocurrir otro. Esto se debe a que en la primera recombinação se pierde una de las secuencias Lox necesaria para que ocurra otra recombinação. La enzima Cre puede actuar en cualquier sitio donde hay un par de Lox, lo que hace que la recombinação sea un proceso aleatorio (Figura 3).

Para usar este sistema de aleatorización de ADN como una forma de generar diferentes etiquetas de colores, en medio de cada secuencia Lox se encuentra un tipo diferente de proteína fluorescente. En el sistema BrainBow se usaron tres tipos de proteínas fluorescentes: PFR, PFA, PFC. De esta forma el circuito de ADN está diseñado con dos diferentes pares de sitios Lox y tres proteínas fluorescentes como se muestra en la Figura 4. Al ocurrir la recombinação, solamente una de las tres proteínas fluorescentes se expresa de manera aleatoria.

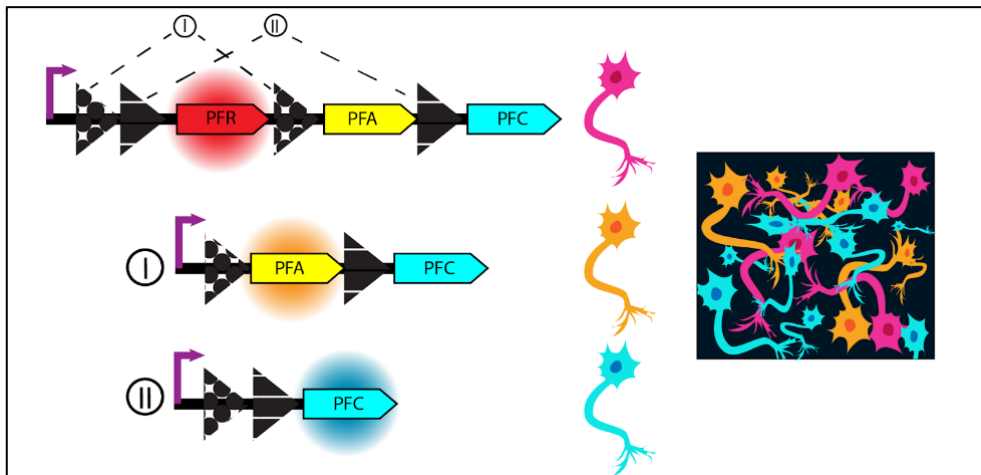


Figura 4. Diseño del circuito de ADN CreLox de BrainBow. Diseñado con 2 diferentes pares de sitios Lox y 3 proteínas fluorescentes. La PF que se expresa es la más cercana al promotor que se muestra como una flecha púrpura. Adaptado de [4].

Sin embargo, en el momento de expresar este circuito de ADN en neuronas de ratones transgénicos, estas exhibieron una paleta de hasta 90 tonalidades. ¿Cómo ocurrió esto si solamente se expresa una de las tres PF? La explicación radica en que durante la introducción del ADN sintético en el cromosoma de cada neurona más de un circuito fue introducido y por tanto el proceso de expresión aleatorio de una PF ocurrió más de una vez. De esta forma, una neurona podía expresar diferentes combinaciones de proteínas fluorescentes y exhibir colores fuera de los 3 principales usados en el circuito (Figura 5).

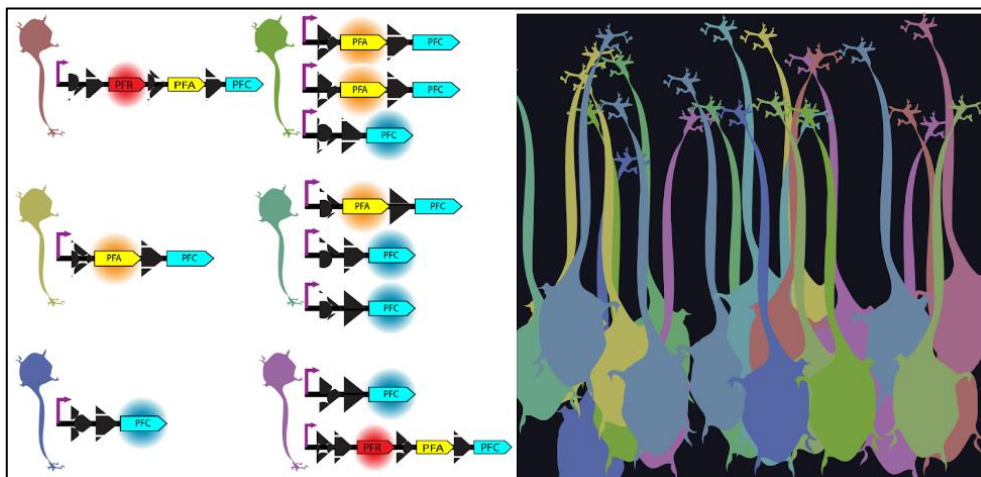


Figura 5. Más de un circuito introducido en una neurona. Cada una expresa diferentes combinaciones de proteínas fluorescentes fuera de los 3 principales usados en el circuito.

Para mejorar el rendimiento del análisis de linajes neuronales, estudiar la morfología neuronal y revelar patrones de redes neuronales se diseñó Bitbow, un formato digital de Brainbow que aumenta exponencialmente la paleta de colores para proporcionar miles de etiquetas únicas [8]. A diferencia de BrainBow, Bitbow permite que cada proteína fluorescente se exprese de forma independiente tras la recombinación [9]. Además, localizar estas proteínas coloridas en sitios específicos de la célula, permite tener una mayor resolución en el momento de estudiar diferentes linajes neuronales [8].

La técnica Brainbow tiene gran aplicabilidad. En los últimos años se han desarrollado varias adaptaciones para diferentes tejidos y organismos modelo. Es una técnica útil, ya que sirve tanto

para tejidos densamente como escasamente poblados [10]. En conclusión, la herramienta de edición genética BrainBow permite la identificación de células individuales para distinguirlas y estudiarlas específicamente. Su introducción ha supuesto una mejora notable en la neurobiología y promete ser útil para muchos otros campos en el futuro.

Referencias

- [1] Li,Y.; Walker, L.A.; Zhao, Y.; Edwards, E.M.; Michki, N.S.; Cheng, H.P.J.; Ghazzi, M.; Chen, T.Y.; Chen, M.; Roossien, D.H.; Cai, D., Bitbow enables highly efficient neuronal lineage tracing and morphology reconstruction in single drosophila brains., *Front. Neural Circuits*. 15, 2021, 732183.
- [2] BioTechne, Neural Cell Culturing Guide, 2020, [En línea]. Disponible en: <https://resources.rndsystems.com/images/site/rnd-systems-neural-guide-br.pdf> [Accedido: 19 marzo, 2022].
- [3] J. Gordon, S. Amini, M.K. White, General overview of neuronal cell culture., *Methods Mol. Biol.* 1078, 2013, 1–8.
- [4] Livet, J.; Weissman, T.A.; Kang, H.; Draft, R.W.; Lu, J.; Bennis, R.A.; Sanes, J.R.; Lichtman, J.W., Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system., *Nature*. 450, 2007, 56–62.
- [5] Kremers, G.-J.; Gilbert, S.G.; Cranfill, P.J.; Davidson, M.W.; Piston, D.W., Fluorescent proteins at a glance., *J. Cell Sci.* 124, 2011, 157–160.
- [6] Sternberg, N.; Hamilton, D., Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites., *J. Mol. Biol.* 150, 1981, 467–486.
- [7] J. Xu, Y. Zhu, A rapid in vitro method to flip back the double-floxed inverted open reading frame in a plasmid., *BMC Biotechnol.* 18, 2018, 52.
- [8] Li,Y.; Walker, L.A.; Zhao, Y.; Edwards, E.M.; Michki, N.S.; Cheng, H.P.J., Ghazzi, M.; Chen, T.Y.; Chen, M.; Roossien, D.H.; Cai, D., Bitbow: a digital format of Brainbow enables highly efficient neuronal lineage tracing and morphology reconstruction in single brains, *BioRxiv*, 2020.
- [9] Veling, M.W.; Li, Y.; Veling, M.T.; Litts, C.; Michki, N.; Liu, H.; Ye, B.; Cai, D. Identification of Neuronal Lineages in the Drosophila Peripheral Nervous System with a “Digital” Multi-spectral Lineage Tracing System., *Cell Rep.* 29, 2019, 3303-3312.
- [10] Weissman, T.A.; Pan, Y.A.; Brainbow: new resources and emerging biological applications for multicolor genetic labeling and analysis., *Genetics*. 2015, 293–306.