

PRESENTACIÓN

La tecnología *knock-out*, premio Nobel de Fisiología o Medicina 2007

JUAN-RAMÓN LACADENA CALERO

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

En el año 2001, la Fundación Lasker concedió el Premio Albert Lasker de Investigación Médica Básica a los mismos tres galardonados Nobel que hoy nos convocan: Mario R. Capecchi, Martin J. Evans y Oliver Smithies, «por el desarrollo de una poderosa tecnología para manipular el genoma del ratón con exquisita precisión para la creación de modelos animales de enfermedades humanas». Una vez más, los premios de la Fundación Lasker se han convertido en una antesala de los premios Nobel. La posibilidad de que estos científicos fueran galardonados con el premio Nobel se convirtió en una especie de profecía. Yo me puedo vanagloriar de que desde hace ya unos cuantos años vengo repitiendo en mis clases y conferencias —y tengo numerosos testigos de ello— que la «técnica de modificación génica por recombinación homóloga» (*gene targeting*) y las «células troncales embrionarias» (*embryo stem cells*) iban a ser los temas elegidos por la Fundación Nobel como objeto de sus premios.

Efectivamente, el 8 de octubre de 2007, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska hizo pública su decisión de otorgar el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2007, conjuntamente a Mario R. Capecchi¹, Martin J. Evans² y Oliver Smithies³ por su descubrimiento

¹ Mario R. Capecchi, nacido en 1937 en Italia y actualmente ciudadano norteamericano, hizo su doctorado en Biofísica en la Universidad de Harvard, siendo en la actualidad investigador en el Howard Hughes Medical Institute y Distinguished Professor of Human Genetics and Biology en la Universidad de Utah, Salt Lake City, USA.

² Sir Martin J. Evans nació en Gran Bretaña en 1941. PhD en Anatomía y Embriología por la Universidad de Londres (1969). En la actualidad es Director de la School of Biosciences y Professor of Mammalian Genetics en la Universidad de Cardiff, UK.

³ Oliver Smithies nació en 1925 en Gran Bretaña, aunque es ciudadano norteamericano. Se doctoró en Bioquímica en la Universidad de Oxford (1951). Actualmente es

de «los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias».

Desde 1995 en que ingresé en esta Real Corporación con un discurso titulado «Historia “nobelada” de la Genética: Concepto y método», he seguido siempre de cerca las concesiones de los premios Nobel en relación con la investigación genética o temas biológicos afines a ella (1). Incluso, diez años después (2), tuve la oportunidad de ampliar y actualizar aquel discurso de ingreso en esta Real Academia Nacional de Farmacia con ocasión de la conmemoración en 2005 por la Sociedad Española de Genética del centenario de la introducción en el mundo científico del término «genética» por parte del biólogo británico William Bateson en una carta que escribió el 18 de abril de 1905 a Adam Sedgwick (Bateson, 1905) y que al año siguiente el mismo Bateson propuso en la «*Conference on Hybridization and Plant breeding*» (Londres, 1906) para denominar oficialmente a la nueva ciencia que explica «la herencia y la variación en los seres vivos». De hecho, las actas de aquella reunión de Londres se recogieron bajo el epígrafe «*Report of the Third International Conference on Genetics*», dando así origen a los sucesivos *Congresos Mundiales de Genética*.

Hoy, en 2007, podemos estar orgullosos los amantes de la ciencia genética porque ya son 34 las veces en que el galardón ha correspondido a la Genética o ciencias afines. De los 34 premios considerados, 27 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 6 a la Química y 1 de la Paz y, a su vez, de los 72 científicos galardonados, 59 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 12 de Química y 1 de la Paz. Por cierto que, de estos 72 científicos, ¡solamente 3 de ellos son mujeres!: Barbara McClintock (1983), Christiane Nüsslein-Volhard (1995) y Linda S. Buck (2004). Esta baja proporción (4,1%) se ajusta a la del cómputo general ya que, de un total de 777 galardones concedidos en el conjunto de todos los Premios Nobel desde 1901, solamente 35 (4,4%) han correspondido a mujeres: 2 en Física, 3 en Química, 7 en Fisiología o Medicina, 11 en Literatura y 12 de la Paz. Una de ellas, Marie Curie, recibió el galardón dos veces (en Física y en Química).

Excellence Professor of Pathology and Laboratory Medicine en la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, North Carolina, USA.

Finalmente, es de destacar que en lo que va de década se ha premiado la investigación genética en seis ocasiones: 2001 (Hartwell, Hunt y Nurse, «por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular»), 2002 (Brenner, Horvitz y Sulston, «por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada»), 2004 (Axel y Buck, «por sus descubrimientos de receptores olorosos y la organización del sistema olfativo»), 2006 (Fire y Mello, «por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena»), 2006 (Kornberg, «por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica»), y 2007 (Capecci, Evans y Smithies, «por sus descubrimientos de los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias»).

LA REGLA DE ORO DE LA INVESTIGACIÓN

Como he señalado en ocasiones anteriores (1, 2), la regla de oro de la investigación biológica, extensible obviamente a la investigación genética, se basa en los tres puntos siguientes: qué pregunta o problema se trata de resolver, en qué material biológico y mediante qué técnica. No hay duda que si un investigador quiere llegar a premio Nobel habrá de plantearse una pregunta importante y, a partir de ahí, decidir cuál es el organismo más adecuado para abordar el problema y si dispone de la técnica metodológica o instrumental necesaria. Este año 2007, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska ha premiado en Capecci, Evans y Smithies la técnica metodológica que permite «introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias». Como señalaba la nota de prensa de la Asamblea Nobel al anunciar el premio, la «modificación de genes por recombinación homóloga», puesta a punto por Capecci y Smithies, junto con la utilización de «células troncales embrionarias como vehículo para introducir material genético en la línea germinal de ratones», tal como investigó Evans, dieron lugar a una poderosa tecnología conocida como «modificación génica específica en ratones» (*gene targeting in mice*) actualmente utilizada en casi todas las áreas de investigación en biomedicina, desde la investigación básica al desarrollo de nuevas terapias.

La modificación génica específica permite inactivar genes concretos del ratón, dejándoles «fuera de combate» o «noqueados» (*knock-out*). Ello ha permitido descubrir el papel de numerosos genes durante el desarrollo embrionario del ratón, la fisiología del estado adulto, el envejecimiento y la enfermedad. Hasta la fecha, se han llegado a noquear unos diez mil genes que equivalen aproximadamente a la mitad del genoma del ratón, esperándose que, en un esfuerzo de coordinación internacional, pronto se llegue a disponer de la colección completa de ratones *knock-out*. Mediante esta técnica se puede analizar el papel de los genes individuales en estados de salud o enfermedad, produciendo en el ratón modelos de enfermedades humanas; de hecho, como señalaba la Institución Karolinska, ya hay más de 500 modelos de enfermedades humanas en ratón tanto de enfermedades cardiovasculares como neurodegenerativas, diabetes o cáncer. Como dice Hansson (3), miembro del Comité Nobel para Fisiología o Medicina, «entre las ciencias biomédicas básicas, es difícil imaginar la investigación médica contemporánea sin el uso de los modelos génicos modificados (*gene targeted models*)». Evidentemente, la técnica es válida también para el planteamiento contrario; es decir, inactivar mutaciones concretas para recuperar el estado normal en el ratón: es el ratón *knock-in*.

Es interesante recordar que la inducción de mutaciones en la investigación genética había merecido ya el premio Nobel en dos ocasiones anteriores: la primera, en 1946, cuando Hermann J. Muller fue galardonado con el premio Nobel de Fisiología o Medicina «por su descubrimiento de la inducción de mutaciones mediante radiación con rayos X»; la segunda, en 1993, cuando Michael Smith obtuvo el premio Nobel de Química «por su contribución fundamental al establecimiento de la mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos y su desarrollo para estudios de proteínas». La diferencia entre ambas aproximaciones a la mutagénesis inducida estriba, como claramente se ve, en que en el segundo caso la mutagénesis es dirigida al producir cambios específicos en la secuencia de bases del ADN manipulado. En la investigación de Capecchi, Smithies y Evans, premiada este año 2007, aunque no se trata realmente de inducir mutaciones, sin embargo el resultado es equivalente al lograr sustituir por recombinación homóloga en un *locus* determinado un gen normal o un gen mutado (ratones *knock-out* o *knock-in*, respectivamente). Su investigación ha

permitido modificar (sustituir) genes específicos en la línea germinal de mamíferos y producir descendencia que lleva y expresa el gen modificado: es la *tecnología knock-out* (3).

En cierta ocasión dijo el gran evolucionista Theodosius Dobzhansky que la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, que durante muchos años fue la especie reina de la investigación genética, había pasado a la honorífica oscuridad de una reina fundadora, cediendo su puesto a otras especies (virus, bacterias, hongos, etc.). El premio Nobel 2007 ha vuelto a mostrar la importancia de la especie elegida para llevar a cabo la investigación propuesta: una vez más, el humilde ratón ha mostrado su idoneidad.

La *tecnología knockout* en ratones tiene dos componentes principales: por un lado, el fenómeno de *recombinación homóloga*, que permite sustituir un gen de un locus determinado por otra forma alélica y, por otro lado, la utilización de cultivos de *células troncales embrionarias* (ES) para modificar la línea germinal de los ratones. Ambos aspectos fueron desarrollados por Capecchi y Smithies y por Evans, respectivamente. A la hora de explicar en su conjunto cómo se desarrolló la *tecnología knockout* podría iniciarse la exposición empezando por las células troncales embrionarias para seguir con la recombinación homóloga o, por el contrario, empezar por la recombinación homóloga y seguir con las células troncales embrionarias para terminar, en cualquiera de los dos casos, en la unión de ambos componentes para llegar a obtener los *ratones knockout*. En mi exposición seguiré la segunda opción.

La historia empezó en 1982 cuando Capecchi y colaboradores demostraron que las células somáticas de ratón poseen una maquinaria enzimática que actúa de forma eficaz en la mediación de la recombinación homóloga (4). Ante la posibilidad de utilizar esta maquinaria enzimática para inducir la recombinación homóloga entre una molécula de ADN introducida en la célula y la misma secuencia presente en el genoma de la célula receptora, Capecchi solicitó una subvención a los NIH para ensayar la factibilidad de su hipótesis (*gene targeting*) en células de mamífero. Sin embargo, su solicitud fue rechazada porque los revisores del proyecto consideraron que era extremadamente improbable que el ADN introducido encontrara su secuencia homóloga dentro del genoma, según citó

con posterioridad el propio Capecchi (5). Curiosamente, casi simultáneamente, Martin Evans solicitaba en Inglaterra al UK Medical Research Council subvención para un proyecto similar que también fue denegado por ser excesivamente ambicioso. Me pregunto si los correspondientes revisores no se habrán sonrojado por su desacierto, aunque sea en la intimidad. Hay que recordar que, en el anecdotario científico, estas situaciones han ocurrido muchas veces.

Afortunadamente, Capecchi no cejó en su empeño y obtuvo células mutantes susceptibles a la neomicina, siendo capaz de reparar tal deficiencia introduciendo el gen funcional normal *neo^r* con una alta frecuencia (1 por 1.000 células inyectadas), abriendo la posibilidad de que la recombinación homóloga pudiera ser utilizada para manipular genes del genoma de mamíferos (6).

Por su parte, también Oliver Smithies creía que podía utilizarse la recombinación homóloga para reparar genes mutados; es decir, una especie de «cirugía génica» que permite eliminar un gen defectuoso sustituyéndolo por otro sano. El primer paso lo dio Smithies ya en 1962 cuando propuso que una variante alélica del gen de la haptoglobina humana se había producido en la evolución por fenómenos de recombinación homóloga (7). Más tarde demostró que los genes Gg y Ag de la hemoglobina fetal humana se habían originado a través de mecanismos de recombinación homóloga (8). Un paso adelante definitivo lo dio el grupo de Smithies al desarrollar un método que permitía recuperar por selección en el cultivo celular humano las células que habían sido genéticamente modificadas por recombinación homóloga de un plásmido en el gen de la β -globina (9).

La etapa siguiente hacia la nueva *tecnología knockout* surgió de la pregunta siguiente: ¿podría utilizarse la recombinación homóloga para modificar genes específicos en la línea germinal de manera que pudieran obtenerse animales genéticamente modificados? En otras palabras, ¿podrían utilizarse las células troncales embrionarias pluripotentes de ratón que Martin J. Evans había descubierto y cultivado en 1981 en colaboración con el embriólogo Matt Kaufman (10)? En este trabajo seminal, Evans y Kaufman señalaban ya que el uso de las células troncales pluripotentes embrionarias (ES) como vehículo para transferir alelos mutantes al genoma del ratón tendría grandes ventajas y tres años más tarde, en otro trabajo fundamental,

Evans y colaboradores demostraron que la inyección de células troncales embrionarias en el blastocisto de ratón contribuían a la formación de células germinales funcionales y, por tanto, podían ser usadas para la obtención de ratones quiméricos (11). El siguiente paso consistió en probar que las células ES podían utilizarse para introducir material genético en la línea germinal (12). Un año más tarde, Evans y colaboradores (13) introducían en células ES mediante infección con retrovirus el gen mutante para la hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT-) presente en el síndrome de Lesch-Nyhan, generando un ratón quimérico y en su descendencia ratones transgénicos portadores de la enfermedad. Como señala Hansson (2007), era el primer modelo animal de enfermedad humana creado por manipulación genética de células troncales embrionarias. Hay que señalar que, de forma simultánea, otro grupo de investigación obtenía también ratones deficientes para HPRT procedentes de una delección espontánea producida en un cultivo de células ES (14).

Podría decirse que el paso efectivo a la *tecnología knockout* se dio cuando Evans y colaboradores en su publicación de 1987 antes mencionada (13) dicen, citando las investigaciones de Capecchi (6) y de Smithies (9), que «puede ser eventualmente posible producir alteraciones específicas en genes endógenos por medio de recombinación homóloga con copias clonadas modificadas *in vitro*». Efectivamente, ese mismo año 1987, el grupo de Smithies utilizaba por vez primera la recombinación homóloga para corregir (por sustitución homóloga) la mutación HPRT⁻ (que era una delección) en un cultivo de células ES seleccionando las células en un medio HAT que requiere la actividad enzimática HPRT (15). Asimismo, en 1987 Thomas y Capecchi (16) introdujeron el gen de la resistencia a neomicina en un exón del gen HPRT en células ES, demostrando que en el cultivo se podían seleccionar células que habían perdido la actividad HPRT pero ganado la actividad neo^r de resistencia a la neomicina, señalando que «esta combinación de usar células ES como línea celular receptora y la mutagénesis sede-específica obtenida por recombinación homóloga (*gene targeting*) proporcionará los medios para generar ratones de cualquier genotipo deseado». Además delineaban la estrategia a seguir en el futuro: «una ventaja de este escenario es que la primera generación quimérica será normalmente heterocigota para la mutación sustituida (*targeted*) y que la siguiente generación puede

ser utilizada para generar individuos homocigotos. Así, sólo tiene que ser inactivado uno de los dos loci, pudiendo mantenerse en heterocigosis los letales recesivos. Si esta estrategia tiene éxito, esta tecnología será utilizada en el futuro para diseccionar el proceso de desarrollo del ratón, así como para generar modelos de enfermedades humanas en el ratón». Como señala Hansson en su informe avanzado en el que comenta la concesión del premio Nobel, «esta visión se ha hecho realidad y es ahora una piedra angular de la medicina experimental» (3).

Finalmente cabe añadir que al año siguiente, en 1988, Capecchi y colaboradores (17) mejoraban la técnica mediante la estrategia de una doble selección positiva-negativa. Para ello introdujeron un gen de resistencia a neomicina (neo^r) en un exón del vector de reemplazamiento que llevaba a su vez en un extremo y fuera del locus a sustituir en el proceso de recombinación homóloga el gen de la timidina quinasa (tk). Cuando se produce la recombinación homóloga se origina un cromosoma con el gen noqueado que expresará la información neo^r , pero no la tk que habrá desaparecido. Sin embargo, si el vector de reemplazamiento se integra al azar en cualquier lugar del genoma de la célula expresará tanto la resistencia a la neomicina como la actividad timidina quinasa y en caso de no integración del vector la célula sería susceptible a la neomicina. Por consiguiente, si las células ES sometidas a tratamiento crecen en presencia de neomicina y de la droga ganciclovir, solamente sobrevivirán las que lleven el cromosoma con el gen noqueado producido por la recombinación homóloga puesto que son resistentes a la neomicina (neo^r) y no les afecta la droga ganciclovir al no tener el gen tk (doble selección positiva-negativa).

Desde el punto de vista de la posible aplicación clínica de los descubrimientos comentados, hay que señalar que, además del síndrome de Lesch-Nyhan utilizado en las investigaciones iniciales ya mencionadas, el grupo de Smithies ha trabajado en modelos animales de algunas enfermedades como la fibrosis quística (18, 19), la hipertensión y la aterosclerosis (20).

Para terminar, permítaseme cerrar el círculo de esta reflexión por donde había comenzado, haciendo de nuevo una predicción sobre futuros premios Nobel que, de alguna manera, tienen que ver con lo que hoy celebramos. Me refiero, en primer lugar, a James A. Thom-

son, de la Universidad de Wisconsin-Madison, quien en 1998 fue el primero en aislar y mantener en cultivo células troncales embrionarias humanas (21), continuando de alguna manera lo que Evans había logrado en ratones en 1981 (10). Pero no sólo eso, sino que muy recientemente, el 20 de noviembre de 2007, la revista *Science* publicaba en su versión *online* un trabajo del grupo que lidera Thomson (22) en el que demuestran que han logrado reprogramar células somáticas adultas humanas (procedentes de prepucio de recién nacido y de piel de feto) y convertirlas en células troncales pluripotentes, introduciendo en ellas mediante un vector viral cuatro genes (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28*) que regulan la transcripción (factores de transcripción). Estas *células troncales pluripotentes inducidas* (iPS cells) tienen cariotipo normal, expresan actividad telomerasa, expresan marcadores celulares de superficie y genes que caracterizan a las células troncales embrionarias (ES) y mantienen el potencial de desarrollo para diferenciarse en células de las tres capas germinales primarias. La eficacia de la técnica es de una célula iPS obtenida por cada 10.000 células tratadas que, en términos prácticos, es muy alta.

El otro candidato a un futuro premio Nobel puede ser Shinya Yamanaka. La publicación del trabajo del grupo de Thomson ha sido simultánea con la del grupo de Yamanaka de la Universidad de Kyoto, Japón, en la revista *Cell* en su versión *online* (23). Utilizando como vector un retrovirus, introdujeron en células somáticas humanas (células de la piel de la cara de una mujer de treinta y seis años y de tejido conectivo sinovial de un varón de sesenta y nueve años) cuatro genes reguladores de la transcripción (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*) con una eficacia de una célula troncal pluripotente inducida (iPS) obtenida por cada 5.000 células de piel utilizadas en el tratamiento.

Hay que señalar que ya en 2006 Yamanaka había logrado la reprogramación de células somáticas de piel en ratón utilizando los mismos cuatro genes, por lo que se le puede acreditar la paternidad de la técnica (24). En una acelerada carrera científica, el 6 de diciembre de 2007, el grupo de Rudolf Jaenisch (25) hizo público, en la versión *online* de la revista *Science*, el éxito de la aplicación en ratones de la técnica de Yamanaka para el tratamiento de la anemia falciforme humana en un modelo de ratón utilizando células pluripotentes inducidas (iPS) mediante reprogramación de células de la

piel. Es un paso adelante esperanzador en la posible utilización de células iPS en la terapia celular del futuro.

Pensando en una futura aplicación clínica de estas técnicas hay que señalar dos inconvenientes: en primer lugar, la utilización de un retrovirus como vector para introducir los genes reguladores que reprograman las células somáticas y, en segundo lugar, en el caso de Yamanaka, la utilización del proto-oncogén *c-myc*, lo cual puede suponer un obstáculo para lograr la autorización para llevar a cabo la investigación clínica. De hecho, un 20% de los ratones implantados con células iPS desarrollaron teratomas cancerosos.

La publicación de estas investigaciones oscurece en alguna medida la que una semana antes (el 14 de noviembre de 2007) habían hecho público Mitalipov y colaboradores, del Oregon National Primate Research Center, en la revista *Nature online* (26), quienes obtuvieron dos líneas celulares troncales embrionarias de un primate no humano (un macho adulto de nueve años de macaco rhesus, *Macaca mulata*) mediante la técnica de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT). En principio lograron la formación de 35 blastocistos clónicos a partir de 213 transferencias nucleares (un 16% de éxito), obteniendo finalmente dos líneas celulares troncales embrionarias a partir de 304 ovocitos procedentes de 14 hembras. Este intento de abrir las puertas a la clonación terapéutica humana puede que resulte innecesario si llega a hacerse una realidad clínica la reprogramación de células somáticas adultas utilizando técnicas semejantes a las de Yamanaka y Thomson. En este contexto cabe señalar que Ian Wilmut, de la Universidad de Edimburgo y padre científico de la oveja Dolly, ya ha anunciado que abandona la investigación en clonación terapéutica humana para pasarse a la utilización de la técnica de reprogramación de Yamanaka. También José B. Cibelli, uno de los pioneros de la clonación humana (27, 28) (Cibelli *et al.*, 2001, 2002), se ha manifestado a favor de la nueva técnica de reprogramación mientras que, por ejemplo en España, otros científicos siguen agarrándose a la investigación con células troncales embrionarias como a un clavo ardiendo.

Uno de los problemas bioéticos que actualmente vivimos es el que contrapone al imperativo categórico kantiano con el imperativo tecnológico: «como se puede hacer, hay que hacerlo». Como decía

Hans Jonas (1979) en su obra *El principio de responsabilidad. Ensayo de una ética para la civilización tecnológica*:

«La tesis de partida de este libro es que la promesa de la técnica moderna se ha convertido en una amenaza, o que la amenaza ha quedado indisolublemente asociada a la promesa... Lo que hoy puede hacer el hombre —y después, en el ejercicio insoslayable de ese poder, tiene que seguir haciendo— carece de parangón en la experiencia pasada».

BIBLIOGRAFÍA

- (1) LACADENA, J. R. (1995): Historia «nobelada» de la Genética: Concepto y método. *Discurso de Ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España*. Madrid, 76 pp.
- (2) LACADENA, J. R. (2006): Conmemorando los 100 años del término «Genética» (1905-2005): Una historia «nobelada» de la Genética. *Conferencia Plenaria pronunciada en el Congreso de la Sociedad Española de Genética, Almería, 2005, Secretariado de Publicaciones, Universidad de León y Sociedad Española de Genética*, 109 pp.
- (3) HANSSON, G. K. (2007): Gene modification in mice. Advanced information, *The Nobel Assembly at Karolinska Institutet*, página web *Nobelprize.org*
- (4) FOLGER, K. R.; WONG, E. A.; WAHL, G.; CAPECCHI, M. R. (1982): Patterns of integration of DNA microinjected in cultured mammalian cells: Evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol. Cell Biol.* 2: 1372-1387.
- (5) CAPECCHI, M. R. (2001): Generating mice with targeted mutations. *Nat. Med.* 7: 1086-1090.
- (6) THOMAS, K. R.; FOLGER, K. R.; CAPECCHI, M. R. (1986): High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell.* 44: 419-428.
- (7) SMITHIES, O.; CONNELL, G. E.; DIXON, G. H. (1962): Chromosomal rearrangements and the evolution of haptoglobin genes. *Nature.* 196: 232-236.
- (8) SLIGHTORN, J. L.; BLECHL, A. E.; SMITHIES, O. (1980): Human fetal Gg y Ag globin genes: Complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. *Cell.* 21: 627-638.
- (9) SMITHIES, O.; GREGG, R. G.; BOGGS, S. S.; DORALEWSKI, M. A.; KUCHERLAPATI, R. S. (1985): Insertion of DNA sequences into the human beta-globin locus by homologous recombination. *Nature.* 317: 230-234.
- (10) EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. (1981): Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature.* 292: 154-15.
- (11) BRADLEY, A.; EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H.; ROBERTSON, E. (1984): Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature.* 309: 255-256.

- (12) ROBERTSON, E.; BRADLEY, A.; KUEHN, M.; EVANS, M. J. (1986): Gefrm-line transmission of genes introduced into cultured pluripotent cells by retroviral vector. *Nature*. 323: 445-448.
- (13) KUEHN, M. R.; BRADLEY, A.; ROBERTSON, E.; EVANS, M. J. (1987): A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*. 326: 295-298.
- (14) HOOPER, M.; HARDY, K.; HANDYSIDE, A.; HUNTER, S.; MONK, M. (1987): HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*. 326: 292-295.
- (15) DOETSCHMAN, T.; GREGG, R. G.; MAEDA, N.; HOOPER, M. L.; MELTON, D. W.; THOMPSON, S.; SMITHIES, O. (1987): Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 330: 576-578.
- (16) THOMAS, K. R.; CAPECCHI, M. R. (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 51: 503-512.
- (17) MANSOUR, S. L.; THOMAS, K. R.; CAPECCHI, M. R. (1988): Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse-embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*. 336: 348-352.
- (18) CLARKE, L. L.; GRUBB, B. R.; GABRIEL, S. E.; SMITHIES, O.; KOLLER, B. H.; BOUCHER, R. C. (1992): Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science*. 257: 1125-1128.
- (19) SNOUWAERT, J. N.; BRIGMAN, K. K.; LATOUR, A. M.; MALOUF, N. N.; BOUCHER, R. C.; SMITHIES, O., *et al.* (1992): An animal model for cystic fibrosis made by gene-targeting. *Science*. 257: 1083-1088.
- (20) SMITHIES, O.; MAEDA, N. (1995): Gene targeting approaches to complex genetic diseases: Atherosclerosis and essential hypertension. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92: 5266-5272.
- (21) THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. (1998): Embryonic stem cells derived from human blastocysts. *Science*. 282: 1145-1147.
- (22) YU, J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J. L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G. A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I. I.; THOMSON, J. A. (2007): Induced pluripotent stem cell derived from human somatic cells. *Science* doi:10.1126/science.1151526.
- (23) TAKAHASHI, K., *et al.* (2007): *Cell* doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- (24) TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126: 663-676.
- (25) HANNA, J.; WERNING, M.; MARKOULAKI, S.; SUN, CH-W.; MEISSNER, A.; CASSADI, J. P.; BEARD, C.; BRAMBRINK, T.; WU, L-CH.; TOWNES, T. M.; JAENISCH, R. (2007): Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* DOI: 10.1126/science.1152092.
- (26) BYRNE, J. A.; PEDERSEN, D. A.; CLEPPER, L. L.; NELSON, M.; SANGER, W. G.; GOKHALE, S.; WOLF, D. P.; MITALPOV, S. M. (2007): Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* doi:10.1038/nature 06357.

- (27) CIBELLI, J. B.; KIESSLING, A. A.; CUNNIFF, K.; RICHARDS, C.; LANZA, R. P.; WEST, M. D. (2001): Somatic cell nuclear transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development. *E-biomed: The Journal of Regenerative Medicine*, 2: 25-31 (<http://www.liebertpub.com/ebi>).
- (28) CIBELLI, J. B.; LANZA, R. P.; WEST, M. D.; EZZELL, C. (2002): The first human cloned embryo. *Scient. Amer.* 286 (1): 42-49.

En esta ya institucionalizada sesión científica que cada año dedica la Real Academia Nacional de Farmacia a conmemorar los premios Nobel de Fisiología o Medicina y de Química, según el caso, el Doctor Lluís Montoliu José, Investigador Científico del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, y Presidente de la International Society for Transgenic Technologies, nos expondrá su visión del Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2007 y de los tres galardonados en relación con la *tecnología knockout*.