

La modificación genética dirigida en ratones es premiada con el Nobel de Fisiología o Medicina de 2007

LLUÍS MONTOLIU*

Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid

RESUMEN

El Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2007 ha sido otorgado, merecidamente, a los investigadores norteamericanos Mario Capecchi y Oliver Smithies, y al científico británico Sir Martin Evans, por sus contribuciones pioneras y diseño experimental conducentes a la obtención de los primeros ratones mutantes con una modificación genética dirigida, con la inactivación específica de un gen, dejando intacto el resto del genoma. Martin Evans describió, en 1981, la extraordinaria plasticidad de las células troncales embrionales pluripotentes de la masa interna celular del blastocisto, lo que permitía mantenerlas en cultivo indefinidamente, modificarlas genéticamente y reintroducirlas en un nuevo blastocisto, sin que perdieran la posibilidad de convertirse en cualquiera de los tipos celulares que pueblan un organismo adulto, incluyendo la línea germinal. Mario Capecchi exploró, en los años ochenta, las estrategias que permitieron modificar, de forma selectiva, una determinada secuencia genética mediante el procedimiento de recombinación homóloga y estableció en 1988 el método general de selección doble positiva-negativa. Finalmente, Oliver Smithies, en 1989, fue el primer investigador que integró las evidencias experimentales de sus dos colegas, modificó un gen (lo inactivó) en células troncales embrionales pluripotentes en cultivo, obtuvo después un ratón quimérico y, finalmente, mediante cruces, un animal que, en todas sus células, era portador de la mutación inicial del gen seleccionado.

* **Información de contacto:**

Lluís Montoliu

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

Campus de Cantoblanco, c/ Darwin, 3

28049 Madrid (España)

Telf.: 91 585 48 44. Fax: 91 585 45 06

e-mail: montoliu@cnb.csic.es

Abreviaturas: ES (del inglés, *embryonic stem cells*).

Palabras clave: Células troncales embrionarias.—Ratones mutantes.—Blastocistos.—Recombinación homóloga.—Genómica funcional.

SUMMARY

Gene targeting in mice awarded with the 2007 Nobel Prize in Physiology or Medicine

The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2007 has been awarded jointly, well deserved, to the American scientists Mario Capecchi and Oliver Smithies, and to the British scientist Sir Martin Evans, for their pioneer contributions and experimental design resulting in the obtention of the first knockout mice with a gene targeted event, with the specific inactivation of a gene, leaving the rest of the genome intact. Martin Evans described, in 1981, the extraordinary plasticity of pluripotent embryonic stem cells, from the inner cell mass of the blastocyst, thus allowing their maintenance in culture indefinitely, their genetic manipulation and, eventually, their reintroduction in a new blastocyst, without losing their capacity to differentiate to any of the cellular types found in an adult organism, including the germ line. Mario Capecchi explored, in the 80s, the strategies that allowed him to selectively alter a given genetic sequence, using the homologous recombination procedure, and established, in 1988, the general method of positive-negative double selection. Finally, Oliver Smithies, in 1989, modified a first gene (inactivated) in embryonic stem cells in culture, later obtained a chimera and eventually, through a number of crosses, an animal that, in all of its cells, was carrying the initial mutation of the selected gene.

Keywords: Embryonic stem cells.—Knockout mice.—Blastocysts.—Homologous recombination.—Functional genomics.

EL PREMIO NOBEL DE FISIOLÓGÍA O MEDICINA DE 2007

El 8 de octubre de 2007, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska (Estocolmo, Suecia) anunció su decisión de otorgar el premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2007 a tres destacados científicos, de forma conjunta. Los científicos premiados, merecidamente, fueron Mario Capecchi, Martin J. Evans y Oliver Smithies por sus logros y descubrimientos de «los principios para la incorporación de modificaciones genéticas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias» (Figura 1). Pocas veces un premio Nobel de Medicina ha sido tan celebrado, a la par que esperado desde hace tiempo, por la comunidad de investigadores en biomedicina como en

esta ocasión. El conjunto de los descubrimientos premiados, que a continuación se desglosarán y discutirán, y las individualidades científicas mencionadas explícitamente (e implícitamente) en el premio, hacen que este prestigioso galardón venga a reconocer la relevancia y trascendencia de una de las revoluciones tecnológicas más importantes de la biología moderna, esto es, la posibilidad de obtener animales (ratones) con mutaciones específicas en su genoma, con objeto de poder dilucidar la función del gen que resulta alterado por la modificación en un organismo adulto, mientras que el resto de su genoma permanece intacto. Como en tantas otras ocasiones, sin duda en esta también, se puede decir que en este premio «*son* todos los que *están*, pero no *están* todos los que *son*». Sin embargo, los tres científicos elegidos representan fielmente el formidable esfuerzo y concatenación de eventos científicos y técnicos, realizados de forma independiente, pero usando cada uno de los tres investigadores los recursos y hallazgos publicados por los otros dos, que culminó en 1989 con la obtención del primer ratón mutante con una alteración genética específica, planificada, en su genoma (1).

Los tres investigadores premiados: Mario Capecchi, Sir Martin Evans y Oliver Smithies son muy conocidos en el campo y, ellos mismos han coincidido en otras muchas ocasiones anteriores en los que se les ha galardonado, por parte de otras instituciones, por similares motivos por los que ahora, finalmente, reciben el esperado Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2007. Quizá uno de los premios más importantes recibidos anteriormente, de forma conjunta, también por los tres investigadores, fue el Premio Albert Lasker de investigación médica básica, en 2001, otorgado en el mes de septiembre en New York, pocos días después del fatídico y desgraciadamente famoso 11 de septiembre (<http://www.laskerfoundation.org/awards/library/2001basic.shtml>). En esa ocasión el jurado destacó que las razones para el premio eran «el desarrollo de una tecnología poderosa para la modificación del genoma del ratón con precisión exquisita, lo que permite la creación de modelos animales de enfermedades humanas».

Ambas frases, la que se usó para razonar el premio Albert Lasker en 2001 y la usada para comunicar el premio Nobel en 2007, recogen a la perfección tanto los hechos científicos relevantes como la trascendencia en biomedicina de los descubrimientos premiados.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007

"for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells"

 <p>Photo: Tim Roberts/PR Newswire. © HHMI</p> <p>Mario R. Capecchi</p> <p>🏆 1/3 of the prize</p> <p>USA</p> <p>University of Utah Salt Lake City, UT, USA; Howard Hughes Medical Institute</p> <p>b. 1937 (in Italy)</p>	 <p>Photo: The Press Association Limited</p> <p>Sir Martin J. Evans</p> <p>🏆 1/3 of the prize</p> <p>United Kingdom</p> <p>Cardiff University Cardiff, United Kingdom</p> <p>b. 1941</p>	 <p>Photo: Scanpix/Dan Sears</p> <p>Oliver Smithies</p> <p>🏆 1/3 of the prize</p> <p>USA</p> <p>University of North Carolina at Chapel Hill Chapel Hill, NC, USA</p> <p>b. 1925 (in United Kingdom)</p>
---	--	---

FIGURA 1. *Comunicado original y fotografías de los investigadores premiados que aparecen en la WEB oficial de la fundación Nobel (reproducido a partir del contenido de la página WEB http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/).*

LOS INVESTIGADORES PREMIADOS

Mario R. Capecchi nació en Italia, en 1937, pero a raíz de la segunda guerra mundial emigró con su familia a los Estados Unidos de América, donde acabó aprendiendo a leer y escribir a los nueve años y obteniendo, finalmente, su nacionalidad norteamericana. Realizó su doctorado en biofísica en 1967, por la Universidad de Harvard (Cambridge, MA, USA). Actualmente es profesor de genética humana y biología en la Universidad de Utah, en Salt Lake City (UT, USA), e investigador del prestigioso Howard Hughes Medical Institute.

Mario Capecchi, junto con Oliver Smithies, tuvo la brillante idea e imaginó que el proceso de recombinación homóloga, de apareamiento de hebras del ADN en razón de la similitud de secuencias, y la posterior resolución del complejo con la alteración de la secuencia primaria genética, podía ser usado específicamente para la modificación de genes en células de mamíferos (2, 3). Para ello optimizó los métodos existentes de modificación genética celular e incorporó la microinyección directa como protocolo que aumentaba la eficacia del proceso hasta obtener un evento de recombinación homóloga por cada 1.000 células microinyectadas (2). Posteriormente, trasladó sus observaciones a las células troncales embrionarias pluripotentes de ratón (células ES), que obtuvo del laboratorio de Martin Evans, entre otros, con el objetivo de inactivar genes de forma específica, mediante recombinación homóloga. Usó primero genes directamente seleccionables, como el gen que codifica para la hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT) (4), cuyas mutaciones pueden seleccionarse en un medio de cultivo determinado; y, posteriormente, utilizó en sus experimentos genes que no eran directamente seleccionables, como el proto-oncogén *int-2* (5), para lo cual diseñó lo que ha sido, a la postre, probablemente su mayor contribución en el campo y lo que le ha valido el reconocimiento internacional y todos los premios recibidos, incluyendo el reciente Premio Nobel. Mario Capecchi diseñó para estos genes, cuyas mutaciones no eran directamente seleccionables (esto es, la inmensa mayoría de los genes), el sistema doble de selección positiva-negativa de clones de células ES recombinantes portadores de la mutación específica deseada, mediante el uso combinado de la resistencia al antibiótico neomicina, por incorporación de un gen que codificaba para la misma, y la mortalidad inherente de la timidina quinasa del virus del herpes en presencia de análogos de nucleósidos, como el ganciclovir (6, 7) (Figura 2). Con esta estrategia, de aplicación universal, llegó la verdadera revolución en biología molecular del ratón, pasándose a obtenerse en los años siguientes, y hasta la fecha, innumerables ratones mutantes portadores de mutaciones específicas, los denominados ratones *knock-out*, utilizando la terminología anglosajona de origen pugilístico que tan sucinta y estupendamente describe de forma muy obvia el proceso realizado, la inactivación de un gen.

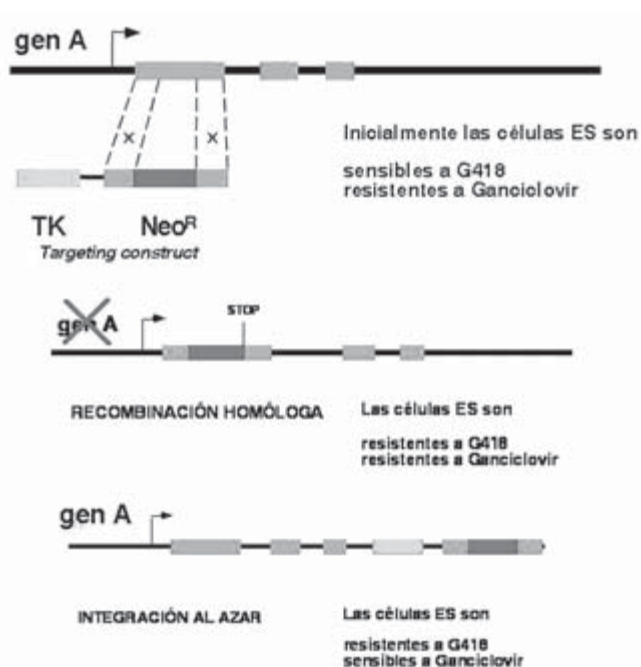


FIGURA 2. *Estrategia general para la obtención de una mutación específica mediante la doble selección positiva y negativa, descrita por Mario Capecchi.*

La incorporación de la mutación mediante recombinación y a través de las regiones de homología de secuencias, bajo la selección positiva aplicada mediante el gen de resistencia a la neomicina se complementa con la selección negativa, para evitar inserciones al azar, asociada a la presencia del gen HSV-tk que determina la mortalidad de la célula en presencia de ganciclovir (4).

En el artículo probablemente clave en la contribución de Mario Capecchi a todas estas tecnologías (4), en el que demuestra que es posible interrumpir, de forma específica, el gen *HPRT* con el gen de resistencia a la neomicina, usando vectores de recombinación homóloga, tanto de inserción como de sustitución, el manuscrito lo concluye con un párrafo premonitorio, símbolo de todos los desarrollos y ratones *knock-out* que vendrían posteriormente. Dice así: «*We have demonstrated that we can inactivate by gene targeting a specific locus in the mouse genome. The protocol we have developed to inactivate the endogenous *Hprt* gene should be adaptable to other genes as well. We have also shown that ES cells are a suitable host for gene targeting experiments. It is hoped that this combination of using ES cells as the*

recipient cell line and site-specific mutagenesis achieved by gene targeting will provide the means for generating mice of any desired genotype. An advantage of this scenario is that the first generation chimera will usually be heterozygous for the targeted mutation and that subsequent breeding can be used to generate the homozygous animal. Thus, only one of the two loci need be inactivated, and recessive lethals can be maintained as heterozygotes. If successful, this technology will be used in the future to dissect the developmental pathway of the mouse as well as to generate mouse models for human genetic diseases» (4).

Sir Martin J. Evans nació en 1941 en el Reino Unido y mantiene su nacionalidad británica. Obtuvo su doctorado en anatomía y embriología en 1969 por el University College London (UCL). Actualmente es el director de la facultad de biociencias y profesor en genética de mamíferos por la Universidad de Cardiff, en el Reino Unido.

Martin Evans, embriólogo de formación, y probablemente el más prematuro de los tres investigadores premiados en el campo objeto del galardón, estaba interesado en explorar y entender la capacidad de determinados tipos celulares de diferenciarse, de convertirse, en cualquiera de los más de 200 tipos celulares existentes en un mamífero adulto. Inicialmente, en los primeros años setenta del siglo pasado, Martin Evans fijó su atención en las células que aparecían en tumores de la línea germinal, en las gónadas, denominados carcinomas embrionarios o teratocarcinomas, de los que podían obtenerse células pluripotentes, denominadas células EC (del inglés, *embryonal carcinoma cells*) (8) con la capacidad de diferenciarse a virtualmente cualquier tipo celular (9). Este primer trabajo, realizado en colaboración con la investigadora Gail Martin, dio pie a explorar la capacidad de colonización de embriones preimplantacionales por parte de estas mismas células EC (10) y comprobó su participación efectiva en la embriogénesis normal del ratón (11), tras la microinyección de estas células EC en blastocistos de ratón. Las células EC las obtuvo a partir de los teratomas que, con elevada frecuencia, se daban en una cepa de ratón (129Sv) que había sido descubierta por Leroy Stevens (The Jackson Laboratory) en 1954 (12) y en la que ya se había determinado la capacidad diferenciadora de los cuerpos embrioides que podían derivarse de ellas (13) y su clonalidad y aparente multipotencialidad (14).

Sin embargo, también pudo comprobar que el origen canceroso de estas células determinaba la aparición de tumores en los ratones quiméricos obtenidos, que no logragaban colonizar la línea germinal, a la par que observó alteraciones cariotípicas graves en las células EC que desaconsejaban su uso como vehículo para trasladar modificaciones genéticas al genoma del ratón (11).

Tras este fracaso inicial fijó su atención en las células embrionarias presentes en la masa interna celular del blastocisto, y descubrió que tenían unas características similares a las células EC, en relación a las proteínas que sintetizaban, lo que sugería fuertemente su probable pluripotencia (15). En efecto, al año siguiente, en 1981, publicó su artículo científico principal, por el que se le reconoce internacionalmente y por lo que se le premia ahora con el galardón Nobel, demostrando el aislamiento y el establecimiento original de cultivos de células embrionarias pluripotentes (células ES) obtenidos de la masa interna celular de blastocistos de ratón (16). Estas células tenían un aspecto muy parecido a las células EC, formaban teratomas *in vivo* con la aparición de múltiples tipos celulares al ser inyectados en ratones atímicos, tenían el cariotipo estable propio de las células de ratón (20 pares de cromosomas) y, lo que era más importante, formaban «espléndidas quimeras», en palabras del propio Martin Evans (17) (Figura 3).

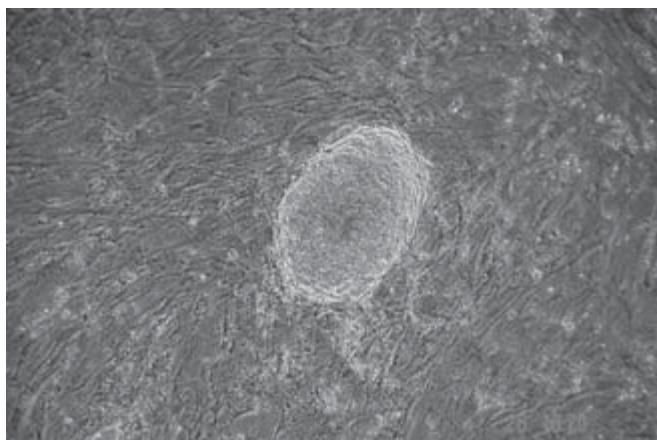


FIGURA 3. **Células troncales embrionarias pluripotentes de ratón (células ES).** La fotografía muestra una colonia de células ES de la cepa R1 creciendo sobre un césped de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Fotografía: Lluís Montoliu.

Sin embargo, siendo este descubrimiento cierto, publicado en la revista *Nature* en el mes de julio de 1981 y llevado a cabo en colaboración con otro embriólogo, Martin H. Kaufman, no es menos cierto que unos meses más tarde, en diciembre de 1981, la investigadora Gail Martin, anterior colaboradora del propio Martin Evans, publicó un trabajo científico en la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, describiendo el aislamiento y el cultivo de las mismas células ES, también a partir de blastocistos de ratón (18), utilizando otra cepa y un procedimiento distinto al usado por Martin Evans (16) y, a la postre, el protocolo que posteriormente ha sido utilizado de forma habitual en los laboratorios para el aislamiento de nuevas células ES. Por ello, desde entonces, internacionalmente, la «paternidad» de las células ES se atribuye, tanto a Martin Evans como a Gail Martin, profesora del departamento de anatomía de la Universidad de California en San Francisco y actual directora del programa de biología del desarrollo, quien sin embargo no ha merecido la misma atención por parte de la academia sueca para incluirla entre los galardonados.

Martin Evans, tras la inicial caracterización de las células ES en 1981, continuó explorando sus propiedades pluripotentes y demostró, en 1984, que no sólo contribuían de forma muy importante a la formación de quimeras, sino que lograban colonizar la línea germinal del individuo quimérico resultante, consiguiéndose la transmisión del genotipo celular inicial a las generaciones posteriores (19). Este importante artículo tenía como primer autor a Allan Bradley, actual director del The Wellcome Trust Sanger Institute.

Seguidamente el laboratorio de Martin Evans se preocupó de demostrar que era posible modificar genéticamente estas células ES en cultivo y trasladar luego la modificación genética al ratón a través de la línea germinal, utilizando a las propias células ES como vehículo. Decidió intentarlo primero usando retrovirus (20), y logró demostrar, en octubre de 1986, que era posible transmitir por línea germinal en ratones el genotipo de células ES modificadas genéticamente por vectores retrovirales (21), experimento que confirmaron, apenas dos meses más tarde, de forma independiente, Achim Gossler y colaboradores, en el laboratorio de Rolf Kemler (22).

Nuevamente el trabajo del laboratorio de Martin Evans fue decisivo en la creación del que se considera es el primer modelo animal,

obtenido por modificación genética, de una enfermedad humana, el síndrome de Lesch-Nyhan, cuya causa molecular es la mutación del gen *HPRT*, situado en el cromosoma X, y que cursa con alteración del metabolismo de purinas y desordenes neurológicos y motores graves. Mediante mutagénesis inducida por integración de retrovirus y selección de células ES mutantes en medio selectivo lograron generar finalmente ratones quiméricos que transmitían a su descendencia la mutación original, generando un modelo animal de la enfermedad congénita humana (23). Un trabajo muy similar, pero realizado independientemente, apareció conjuntamente en el mismo número de la revista *Nature* por parte de Martin Hooper y colaboradores (24).

En el trabajo de Martin Evans en el cual demostraba la posibilidad de mutar el gen *HPRT* en células ES y trasladar la mutación, por línea germinal, a la descendencia (23), se postulaba que quizá fuera posible en algún momento producir alteraciones específicas en genes endógenos mediante recombinación homóloga, en combinación con las células ES, citando para ello los trabajos pioneros de los dos otros investigadores premiados, Mario Capecchi (2) y Oliver Smithies (25), que habían demostrado que la modificación dirigida del genoma en células en cultivo era posible. En concreto, sus palabras, igualmente premonitorias, también en el último párrafo del artículo, eran: «*The success of this approach for the genetic manipulation of the mouse opens up the possibility of deriving strains carrying specifically induced alterations in other genes, as long as the mutant cells can be selected from the population of infected cells or easily screened for. It may also eventually be possible to produce specific alterations in endogenous genes through homologous recombination with cloned copies modified in vitro*» (20).

Finalmente, **Oliver Smithies**, el tercero de los investigadores premiados con el Nobel de Fisiología o Medicina 2007, y también el de mayor edad, nació en 1925 en el Reino Unido pero posteriormente obtuvo la nacionalidad norteamericana. Realizó su doctorado en bioquímica en 1951 en la Universidad de Oxford, en el Reino Unido, y actualmente es profesor de Patología y de medicina de laboratorio en la Universidad de North Carolina en Chapel Hill, NC; USA.

Oliver Smithies, al igual que Mario Capecchi, se interesó por los mecanismos que permitían la modificación genética del genoma me-

diante recombinación homóloga en células de ratón en cultivo (25), cuyo mecanismo, descrito inicialmente en bacterias, ya había merecido la concesión de otro premio Nobel, en 1958, a Joshua Lederberg. El laboratorio de Smithies demostró que la maquinaria necesaria para la recombinación homóloga estaba operativa y funcional en células de mamífero, utilizando plásmidos con genes seleccionables portadores de mutaciones en regiones distintas, pero de cuya reparación mediante recombinación homóloga podían obtenerse productos finales funcionales, tanto entre moléculas de ADN no integradas (26) como con secuencias de ADN integradas en el genoma (27).

Con estas premisas metodológicas, habiendo demostrado la posibilidad de modificar secuencias de ADN mediante recombinación homóloga, tan sólo les faltaba, a Oliver Smithies y a Mario Capecchi, lanzarse a probar otro tipo celular, distinto de los que habían estado usando en sus trabajos (mayoritariamente fibroblastos). En efecto, las células ES, que había obtenido el laboratorio de Martin Evans, fueron las que suscitaron la atención de los otros dos investigadores.

En primer lugar, Oliver Smithies recibió de Martin Evans, en una visita a su laboratorio, las células ES que habían sido descritas unos pocos años antes (16) y utilizadas para la generación de células deficientes en el gen *HPRT* (23). Oliver Smithies también usó las células ES portadoras de mutaciones espontáneas en el gen *HPRT* que habían sido caracterizadas anteriormente (24), y decidió utilizarlas en un experimento de recombinación homóloga para justamente lo contrario, para corregir esta mutación y recuperar la función del gen *HPRT* inicialmente mutado en células ES, seleccionándolas en presencia de medio HAT (con hipoxantina, aminopterina y timidina) que requiere de la actividad del enzima HPRT para que las células puedan sobrevivir (28). También reprodujo los experimentos iniciales de Martin Evans, generando mutaciones *de novo* en el gen *HPRT* en células ES, pero esta vez mediante recombinación homóloga y selección por resistencia al análogo de neomicina G418 y presencia del metabolito 6-tioguanina, usado para la selección de mutantes del gen *HPRT* (29).

Sin embargo, la que es posiblemente la contribución fundamental y el experimento clave del laboratorio de Oliver Smithies fue publicado en noviembre de 1989, en la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1). En ese artículo se demostraba, por vez primera, que una modificación planificada y obtenida

mediante recombinación homóloga en un gen específico (gen *HPRT*), usando células ES de ratón, podía transmitirse por la línea germinal obteniéndose primero ratones quiméricos (Figura 4) y, posteriormente, la descendencia que heredaba en su genoma, con precisión, la modificación inicialmente establecida en las células ES en cultivo.

Sin duda, el artículo del laboratorio de Oliver Smithies, de 1989, representa el primer ratón en el cual confluían, de forma precisa, planificada y efectiva, las tecnologías de recombinación homóloga, células ES y transmisión de la mutación por vía germinal a la descendencia a través de los ratones quiméricos generados (1).

Oliver Smithies publicó, simultáneamente al artículo clave de su laboratorio, otro trabajo importante en el que demostraba que el mismo proceso era posible ser replicado en otros loci, con genes que probablemente no se expresaban en las células ES; como el gen de la beta 2-microglobulina, generando la mutación y el ratón *knockout* correspondiente (30).

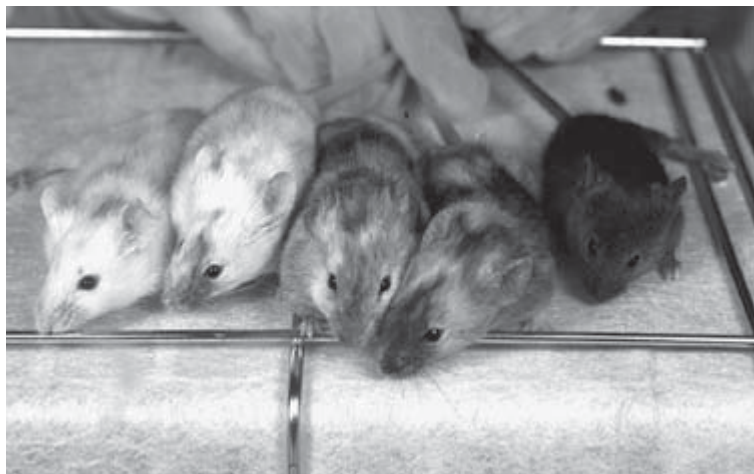


FIGURA 4. **Ratones quiméricos.** Quimeras obtenidas tras la agregación de células ES de la cepa R1 (pigmentadas) con embriones de ocho células de ratón de la cepa CD1 (albina). Fotografía: Lluís Montoliu.

En su artículo fundamental de 1989 (1), Oliver Smithies concluía el texto del manuscrito con el siguiente párrafo, premonitorio de la revolución que se avecinaba en biología y biomedicina: «*The use of*

homologous recombination to alter chosen genes in a preplanned way in animal germ lines is likely to be generally applicable. Homologous recombination has been used to modify genes in ES cells that are probably not expressed, and genes for which no direct selection is available. The procedure is likely to be applicable to species other than the mouse as appropriate ES cell lines become available» (1).

IMPACTO DE ESTAS TECNOLOGÍAS EN BIOMEDICINA

Conocido el genoma humano y el de otras especies de mamíferos próximas a nosotros, como el ratón, las tecnologías de modificación genética dirigida desarrolladas en este roedor, que han merecido el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2007, permiten progresar en el conocimiento exhaustivo y sistemático de nuestros genes, aumentar la comprensión biológica de sistemas complejos como son los mamíferos y desarrollar modelos animales que reproduzcan fielmente las alteraciones genéticas observadas en muchas patologías humanas congénitas.

En general, se sabe que el genoma de los mamíferos contiene unos 22.000 genes. La función de muchos de ellos, de su inmensa mayoría, está conservada evolutivamente, es decir, el producto del gen A realiza la misma función, o muy parecida, en el ratón y en el hombre. Así pues, si averiguamos cuál es la función del gen A en el ratón, por ejemplo, mediante la inactivación específica de este gen por procedimientos de recombinación homóloga en células ES, y obtenemos posteriormente el ratón mutante que carezca del gen A, podremos analizar el fenotipo resultante y, a partir de estas observaciones, deducir cuál sería la función de este mismo gen en humanos.

De forma parecida, si de nuestras investigaciones moleculares logramos identificar una mutación genética en un determinado locus y creemos que es la causa de la enfermedad congénita que presenta el paciente, podemos intentar reproducir, también mediante técnicas de inactivación específica de ese mismo locus por procedimientos de recombinación homóloga en células ES y producción posterior del ratón *knockout* correspondiente, un animal con la misma mutación observada en humanos, pero ahora presente en el locus homólogo de ratón. El estudio de las características, respues-

tas y comportamiento de ese nuevo modelo animal así generado, o de su respuesta a fármacos o tratamientos, permitirá aumentar nuestro conocimiento de la enfermedad y posibilitará el desarrollo de terapias curativas o paliativas para la condición genética en estudio. Hoy en día, prácticamente todas las disciplinas médicas, sin excepción, pueden contar con modelos animales obtenidos mayoritariamente en ratones mediante modificación genética dirigida y son innumerables las revisiones específicas o más generalistas existentes al respecto, que dan cuenta de los múltiples modelos animales generados (31, 32).

La limitación de las técnicas de modificación dirigida del genoma del ratón radicaba en la existencia de muchos genes pleiotrópicos, con patrones de expresión complejos, presentes en etapas del desarrollo embrionario y en fases de la vida adulta. Por ello, cualquier intento de inactivar uno de estos genes conllevaba la muerte del animal en algún momento del desarrollo, imposibilitando el estudio. Este problema se solucionó con la aparición de la estrategia de generación de mutaciones condicionales, con herramientas tecnológicas trasladadas por el laboratorio de Klaus Rajewsky desde las bacterias a las células de mamífero, en concreto usando las secuencias loxP y la recombinasa específica CRE que las reconoce, eliminando todo aquello que encuentra entre dos de esas secuencias situadas consecutivamente y en la misma dirección en una molécula de ADN (33). La combinación de técnicas de marcaje específico de un gen, delimitado por secuencias loxP, mediante técnicas de recombinación homóloga en células ES, con la preparación de líneas de ratones transgénicos con expresión específica de la CRE en determinados tejidos, permitía inactivar (eliminar) el gen en estudio solamente en aquellos tejidos en los cuales existía actividad CRE, permitiendo en muchos casos superar la fase de mortalidad embrional o perinatal y así desarrollar individuos adultos en los que poder investigar el resultado de la mutación en un tejido concreto (34).

La mejora y optimización de todas las técnicas de modificación dirigida del genoma del ratón ha permitido, a lo largo de estos veinte años desde la obtención del primer ratón con una mutación planificada, acumular unos pocos miles de ratones *knock-outs* y variantes relacionadas (*knock-ins*, *knock-downs*). Sin embargo, todavía quedan muchos genes del genoma de cuya función y relevancia no co-

nocemos nada o apenas nada. Por ello, en la actualidad, diversos consorcios internacionales han iniciado proyectos de mutagénesis sistemática del genoma de ratón, utilizando células ES, inserciones al azar o de forma dirigida, y derivando posteriormente ratones quiméricos de todas y cada una de las modificaciones génicas producidas. El objetivo es poder disponer primero de toda una colección de células ES con mutaciones en todos y cada uno de los más de 20.000 genes y, eventualmente, disponer de los ratones mutantes correspondientes, en los que evaluar los efectos de la ausencia de todos y cada uno de los genes investigados. En Europa, esta iniciativa a gran escala se denomina EUCOMM (*European Conditional Mouse Mutagenesis Program*) (35). Existen iniciativas similares en Canadá (NorthCOMM) y en Estados Unidos (KOMP).

PERSPECTIVAS

Todavía son muchos los modelos animales que restan por generar hasta completar una biblioteca virtual de ratones *knock-out*, cada uno con un gen inactivado de los más de 20.000 genes existentes en un genoma de mamífero. Por ello, este campo seguirá siendo muy activo en biomedicina en los próximos años.

Por otra parte, quizás para el gran público, para la sociedad en general y para algunos científicos en particular, no directamente relacionados con estos temas, la existencia de las células troncales pluripotentes embrionarias se dio a conocer en 1998, cuando el trabajo de James Thomson demostró, diecisiete años más tarde tras los artículos de Evans (16) y Martin (18), que también era posible obtener células ES a partir de la masa interna celular de blastocistos humanos provenientes de los procesos de fecundación *in vitro* (36). En aquel entonces, ese trabajo —y otro similar, del laboratorio de Gearhart (37), que aportaba la novedad de obtener células parecidas a las ES a partir del primordio germinal, del esbozo gonadal de embriones en formación provenientes de abortos terapéuticos—, vino a coincidir casi en el tiempo con la descripción del primer evento de reconstrucción embrional y obtención de un mamífero adulto por transferencia nuclear de células somáticas (el nacimiento de la oveja *Dolly* mediante procedimientos de clonación reproductiva) (38), lo

cual rápidamente dio pie a propuestas combinatorias de ambas dos tecnologías con el objetivo de desarrollar estrategias terapéuticas alternativas en medicina regenerativa que vinieron a denominarse: procedimientos de clonación terapéutica (39). Finalmente, como tal, la clonación terapéutica, como prueba de concepto, solamente ha podido demostrarse experimentalmente en el ratón, en un experimento magistral desarrollado en el laboratorio de Rudolf Jaenisch (40) mientras que, por el momento, los diferentes intentos de establecer metodológicamente los primeros pasos en humanos han resultado o bien en fracasos, parciales o totales, o bien en intentos de fraude científico (41).

Por todo ello, no deja de ser sorprendente que en el mismo año que el comité Nobel premia el trabajo pionero de modificación genética dirigida del genoma del ratón a través de células ES, hayan aparecido unos trabajos científicos realizados por varios laboratorios de forma independiente (nuevamente destaca el laboratorio de James Thomson, más otro, japonés, liderado por Shinya Yamanaka), que describen la obtención de células pluripotentes inducidas, muy parecidas a las células ES en sus características, mediante la reprogramación nuclear de células somáticas (esencialmente fibroblastos) inducida por la expresión de un reducido conjunto de genes (42, 43). De nuevo en esta ocasión, los resultados obtenidos en ratones por el propio laboratorio de Yamanaka (44), aplicando procedimientos experimentales similares, precedieron a los reportados en humanos y ha sido precisamente en el ratón donde ha podido demostrarse que, desde todos los puntos de vista conocidos y documentados, estas células pluripotentes inducidas son formal y funcionalmente indistinguibles (45, 46) de las células ES inicialmente descritas por Martin Evans (16) y Gail Martin (18) en 1981, lo cual abre unas insospechadas vías para el estudio de protocolos alternativos de medicina regenerativa que pueden ahora progresar y diseñarse sin requerir el paso obligado por células embrionarias pluripotentes o células ES. Sin duda alguna, los próximos años y los experimentos venideros situarán correctamente la relevancia y trascendencia de estos extraordinarios descubrimientos, casi tan extraordinarios como los que, con todo merecimiento, han llevado a otorgar en 2007 el premio Nobel de Medicina o Fisiología a Mario Capecchi, Martin Evans y Oliver Smithies.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) KOLLER, B. H.; HAGEMANN, L. J.; DOETSCHMAN, T.; HAGAMAN, J. R.; HUANG, S.; WILLIAMS, P. J.; FIRST, N. L.; MAEDA, N. y SMITHIES, O. (1989): Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyl-transferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 8927-8931.
- (2) 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.
- (3) THOMAS, K. R.; CAPECCHI, M. R. (1986): Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene. *Nature.* 324: 34-38.
- (4) THOMAS, K. R.; CAPECCHI, M. R. (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 51: 503-512.
- (5) 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.
- (6) CAPECCHI, M. R. (1989): The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 5: 70-76.
- (7) CAPECCHI, M. R. (1989): Altering the genome by homologous recombination. *Science.* 244: 1288-1292.
- (8) EVANS, M. J. (1972): The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 28: 163-176.
- (9) MARTIN, G. R.; EVANS, M. J. (1975): Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 1441-1445.
- (10) PAPAIOANNOU, V. E.; MCBURNEY, M. W.; GARDNER, R. L.; EVANS, M. J. (1975): Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature.* 258: 70-73.
- (11) PAPAIOANNOU, V. E.; GARDNER, R. L.; MCBURNEY, M. W.; BABINET, C.; EVANS, M. J. (1978): Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 44: 93-104.
- (12) STEVENS, L. C.; LITTLE, C. C. (1954): Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 40: 1080-1087.
- (13) STEVENS, L. C. (1960): Embryonic potency of embryoid bodies derived from a transplantable testicular teratoma of the mouse. *Dev. Biol.* 2: 285-297.
- (14) KLEINSMITH, L. J.; PIERCE, G. B. Jr. (1964): Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* 24: 1544-1551.
- (15) LOVELL-BADGE, R. H.; EVANS, M. J. (1980): Changes in protein synthesis during differentiation of embryonal carcinoma cells, and a comparison with embryo cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 59: 187-206.
- (16) EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 292: 154-156.
- (17) EVANS, M. J. (2001): The cultural mouse. *Nat. Med.* 7: 1081-1083.

- (18) MARTIN, G. R. (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 7634-7638.
- (19) BRADLEY, A.; EVANS, M.; KAUFMAN, M. H.; ROBERTSON, E. (1984): Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 309: 255-256.
- (20) EVANS, M. J.; BRADLEY, A.; KUEHN, M. R.; ROBERTSON, E. J. (1985): The ability of EK cells to form chimeras after selection of clones in G418 and some observations on the integration of retroviral vector proviral DNA into EK cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 50: 685-689.
- (21) ROBERTSON, E.; BRADLEY, A.; KUEHN, M.; EVANS, M. (1986): Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*. 323: 445-448.
- (22) GOSSLER, A.; DOETSCHMAN, T.; KORN, R.; SERFLING, E.; KEMLER, R. (1986): Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 9065-9069.
- (23) KUEHN, M. R.; BRADLEY, A.; ROBERTSON, E. J.; EVANS, M. J. (1987): A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*. 326: 295-298.
- (24) 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.
- (25) SMITHIES, O.; GREGG, R. G.; BOGGS, S. S.; KORALEWSKI, M. A.; KUCHERLAPATI, R. S. (1985): Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 317: 230-234.
- (26) KUCHERLAPATI, R. S.; EVES, E. M.; SONG, K. Y.; MORSE, B. S.; SMITHIES, O. (1984): Homologous recombination between plasmids in mammalian cells can be enhanced by treatment of input DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 3153-3157.
- (27) SONG, K. Y.; SCHWARTZ, F.; MAEDA, N.; SMITHIES, O.; KUCHERLAPATI, R. (1987): Accurate modification of a chromosomal plasmid by homologous recombination in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 6820-6284.
- (28) 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.
- (29) DOETSCHMAN, T.; MAEDA, N.; SMITHIES, O. (1988): Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 8583-8587.
- (30) KOLLER, B. H.; SMITHIES, O. (1989): Inactivating the beta 2-microglobulin locus in mouse embryonic stem cells by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 8932-8935.
- (31) HARDOUIN, S. N.; NAGY, A. (2000): Mouse models for human disease. *Clin. Genet.* 57: 237-244.
- (32) HARPER, A. J. (2005): Production of transgenic and mutant mouse models. *Methods Mol. Med.* 104: 185-202.

- (33) GU, H.; MARTH, J. D.; ORBAN, P. C.; MOSSMANN, H.; RAJEWSKY, K. (1994): Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*. 265: 103-106.
- (34) RAJEWSKY, K.; GU, H.; KÜHN, R.; BETZ, U. A.; MÜLLER, W.; ROES, J.; SCHWENK, F. (1996): Conditional gene targeting. *J. Clin. Invest.* 98: 600-603.
- (35) FRIEDEL, R. H.; SEISENBERGER, C.; KALOFF, C.; WURST, W. (2007): EUCOMM the European Conditional Mouse Mutagenesis Program. *Brief Funct. Genomic Proteomic*. Oct 29.
- (36) THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282: 1145-1147.
- (37) SHAMBLOTT, M. J.; AXELMAN, J.; WANG, S.; BUGG, E. M.; LITTLEFIELD, J. W.; DONOVAN, P. J.; BLUMENTHAL, P. D.; HUGGINS, G. R.; GEARHART, J. D. (1998): Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 13726-13731.
- (38) WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385: 810-813.
- (39) COLMAN, A.; KIND, A. (2000): Therapeutic cloning: concepts and practicalities. *Trends Biotechnol.* 18: 192-196.
- (40) RIDEOUT, W. M. 3rd; HOCHEDLINGER, K.; KYBA, M.; DALEY, G. Q.; JAENISCH, R. (2002): Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell*. 109: 17-27.
- (41) KENNEDY, D. (2006): Editorial Retraction of Hwang *et al.* Papers. *Science*. 311: 335.
- (42) 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 Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. [www.sciencexpress.org/20 November 2007/ Page 1/10.1126/science.1151526](http://www.sciencexpress.org/20%20November%202007/Page%201/10.1126/science.1151526).
- (43) TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K. and YAMANAKA, S. (2007): Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- (44) TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126: 663-676.
- (45) WERNIG, M.; MEISSNER, A.; FOREMAN, R.; BRAMBRINK, T.; KU, M.; HOCHEDLINGER, K.; BERNSTEIN, B. E.; JAENISCH, R. (2007): *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 448: 318-324.
- (46) OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. (2007): Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 448: 313-317.