

# Hablemos de...

# Ratones *knockout*

JOSÉ M. MATO DE LA PAZ

CIC bioGUNE. Parque Tecnológico de Bizkaia. Derio. Bizkaia. España.

## Puntos clave

- La tecnología para generar ratones *knockout* la desarrollaron Mario Capecchi, Martin Evans y Oliver Smithies entre 1987 y 1989.
- Los ratones *knockout* tienen inactivado un gen específico.
- Los ratones *knockout* condicionales tienen inactivado un gen en un órgano, tipo celular o estado de desarrollo específico.
- En los ratones *knockout* inducibles, el gen seleccionado se inactiva en el momento deseado.
- También es posible generar ratones *knockin* en los que la secuencia del gen diana se ha alterado para modificar su función mediante la introducción de mutaciones puntuales o generando inserciones/delecciones específicas.

La investigación animal ha sido fundamental para el conocimiento actual de la fisiología y la fisiopatología humana. La cirugía experimental y el empleo de dietas bien definidas han sido las 2 técnicas empleadas para crear modelos animales de enfermedades humanas, hasta que, entre 1987 y 1989, Mario Capecchi, Martin Evans y Oliver Smithies desarrollaron la tecnología que ha permitido a los investigadores crear modelos en ratón de enfermedades humanas y que conocemos con el nombre de ratones *knockout*. Con esta tecnología, los investigadores han manipulado genéticamente ratones y han creado modelos para el estudio de enfermedades, como la aterosclerosis, el cáncer, la fibrosis quística, el Parkinson, etc. Esta misma tecnología ha servido, además, para estudiar los procesos biológicos normales y ha facilitado la comprensión, por ejemplo, de cómo el sistema nervioso se desarrolla o cómo funciona el sistema inmunitario. En este artículo se han elegido 3 momentos, en mi opinión estelares, de la investigación animal. El descubrimiento de la insulina por Frederick Banting y Charles Best, la relación entre diabetes mellitus, hepatotoxicidad y el metabolismo de los grupos metilo, y la generación de ratones *knockout*.

El descubrimiento de la insulina, en 1921, por Frederick Banting y Charles Best, utilizando perros como modelo experimental, constituye uno de los momentos más importantes de la investigación animal por la repercusión que tuvo, de manera casi inmediata, en el tratamiento de la diabetes mellitus y en el conocimiento de la enfermedad.

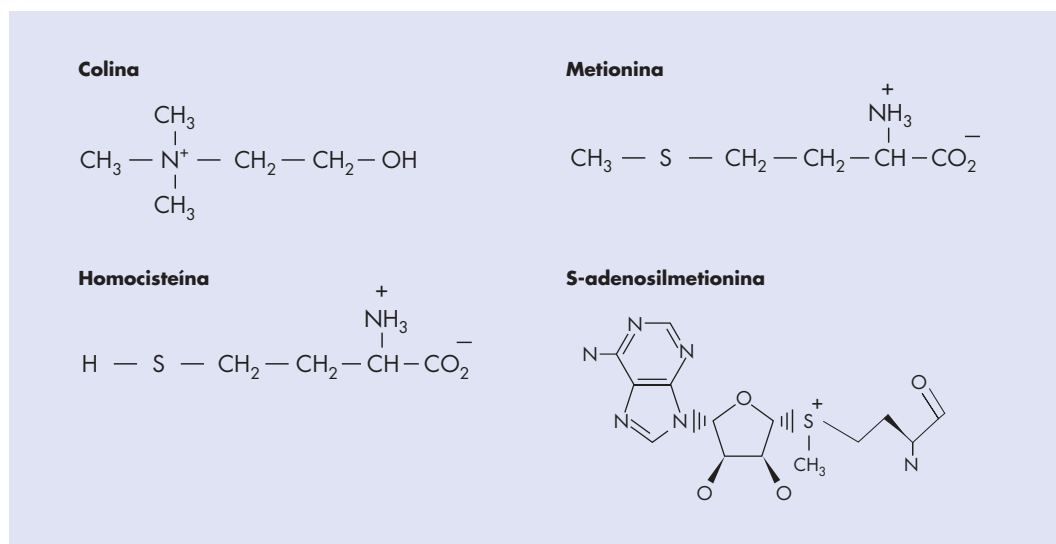
Entre 1930 y 1933, Banting y Best descubrieron que la administración de colina prevenía la formación de hígado graso en perros pancreatetectomizados tratados con insulina. Estos estudios unieron 2 enfermedades hasta entonces independientes: diabetes mellitus y hepatotoxicidad.

Minkowski, intentaron aislar del páncreas la sustancia eficaz para el tratamiento de la diabetes mellitus. Como es bien conocido, en 1921 Frederick Banting comenzó a trabajar en esta idea en el Laboratorio de Fisiología de la Universidad de Toronto (Canadá), del que era director John Macleod, cuyo colaborador era Charles Best, un joven estudiante de medicina<sup>1</sup>. Los primeros experimentos de Banting y Best consistieron en ligar los ductos pancreáticos de varios perros para destruir las células acinares y obtener extractos pancreáticos libres de tripsina y otras enzimas pancreáticas, presentes en estas células y evitar así la degradación de la sustancia capaz de reducir los valores de glucosa. Varias semanas después de realizar esta intervención, Banting y Best extrajeron los páncreas a los perros, los cortaron en pequeños trozos, los homogenizaron y extrajeron con solución salina. A continuación, probaron este extracto salino en perros a los que habían convertido en diabéticos mediante la extirpación del páncreas.

En respuesta a la inyección intravenosa de este extracto pancreático, la concentración de glucosa en sangre en los perros diabéticos se redujo a valores normales y la glucosa en orina desapareció. En general, Banting y Best observaron una mejoría generalizada en la salud de estos animales. Seguidamente, prepararon extractos de páncreas de ternera fetal, debido a que en este estadio el contenido de tripsina y otras enzimas pancreáticas es mucho menor que en el animal adulto. La utilización de ternera fetal les permitió, además, obtener grandes cantidades de extractos pancreáticos, y así pudieron

## Descubrimiento de la insulina

Desde que en 1889 Joseph von Mering y Oscar Minkowski demostraron que la extirpación del páncreas en perros producía diabetes, numerosos investigadores, incluido el propio



**Figura 1.** Estructura de la colina, homocisteína, metionina, y S-adenosilmetionina.

probar diversos procedimientos de extracción obteniendo los mejores resultados con soluciones alcohólicas ligeramente ácidas. La inyección diaria de insulina, como se denominó la sustancia activa aislada de estos extractos pancreáticos, podía mantener vivos a perros diabéticos durante varias semanas. En los meses siguientes, el procedimiento de extracción se mejoró y en 1922 los primeros pacientes diabéticos se trataron con insulina. En 1923, Banting y Macleod recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por el descubrimiento de la insulina.

## Diabetes, hepatotoxicidad y metabolismo de grupos metilo

Entre 1930 y 1933, Banting y Best descubrieron que la administración de colina prevenía la formación de hígado graso en perros pancreatectomizados tratados con insulina y que la administración a ratas de una dieta deficiente en colina producía, asimismo, hígado graso. La colina la habían descubierto Chevreul, Strecker y Dessaignes a mediados del siglo XIX, y es uno de los primeros compuestos metilados identificados en tejidos animales (fig. 1). Unos años después del descubrimiento realizado por Banting y Best sobre el efecto lipotrópico de la colina, Tucker y Eckstein demostraron que una dieta deficiente en metionina, un aminoácido metilado, cuya estructura Berger y Coyne habían identificado en 1928 (fig. 1), también era capaz de inducir hígado graso en ratas. Estos autores también observaron que la homocisteína, que se diferencia de la metionina por la ausencia de un grupo metilo (fig. 1), no tiene actividad lipotrópica. De esta manera, por primera vez se proporcionó evidencia sobre la importancia de los grupos metilo en la prevención de la enferme-

dad del hígado graso. Es también importante indicar que estos estudios unieron 2 enfermedades hasta entonces independientes: diabetes mellitus y hepatotoxicidad.

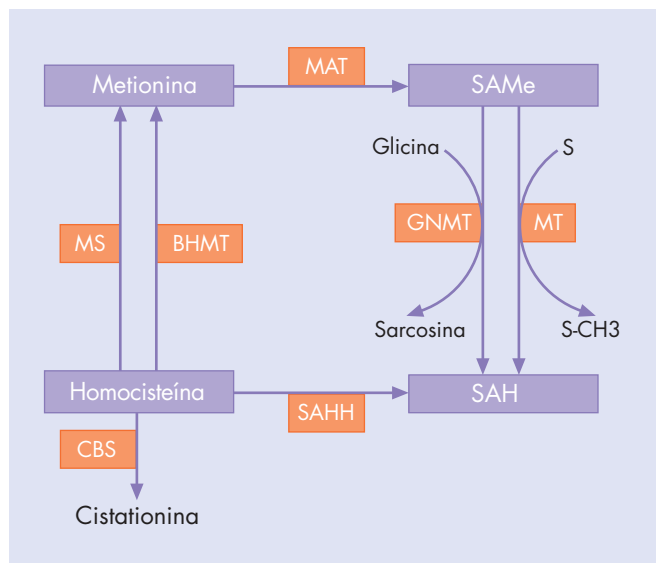
Entre los años 1940 y 1943, Vincent du Vigneaud et al demostraron que la metionina proporcionaba los grupos metilo necesarios para la síntesis biológica de la colina, pero que no lo hacía directamente, sino que se transformaba en otra molécula, de naturaleza desconocida, que recibió el nombre de “metionina activa”. Este trabajo condujo a Du Vigneaud a desarrollar los conceptos de transmetilación –la utilización del grupo metilo unido a la metionina para la síntesis de diversos compuestos metilados, como la colina, la betaina y la creatina– y de transulfuración –la transferencia del átomo de azufre de la metionina a la cisteína y posteriormente al glutatión–, así como a la identificación de algunas de las principales enzimas implicadas en el metabolismo de la metionina. En 1955 Vincent du Vigneaud recibió el Premio Nobel de Química por sus trabajos sobre compuestos de azufre biológicamente activos y por la síntesis de la primera hormona polipeptídica, la oxitocina<sup>2</sup>.

En 1953, Giulio Cantoni demostró que el adenosintrifosfato reaccionaba con la metionina para formar S-adenosilmetionina (SAMe) (fig. 1), y que esta molécula, que podía transferir su grupo metilo a una gran variedad de moléculas, incluida la nicotinamida y la creatinina, era la largamente buscada “metionina activa”<sup>3</sup>. Durante la siguiente década, el metabolismo de la metionina se dilucidó completamente (fig. 2) y el papel de la SAMe como el principal donante de grupos metilo en las reacciones biológicas (incluida la metilación de lípidos, proteínas, ácido desoxirribonucleico [ADN], ácido ribonucleico [ARN] y un gran número de pequeñas moléculas como las catecolaminas) quedó firmemente establecido.

Durante la década de los años sesenta y setenta, trabajos realizados por diferentes laboratorios demostraron que las dietas deficientes en grupos metilo favorecían la aparición de tumores hepáticos en respuesta a diversos carcinógenos, y en 1983,

La administración a ratas de una dieta deficiente en grupos metilo (dietas deficientes en colina y/o metionina) produce en pocas semanas hígado graso, y si la dieta se continúa, los animales desarrollan tumores hepáticos.

Entre los años 1940 y 1943, Vincent du Vigneaud demostró que la metionina proporcionaba los grupos metilo necesarios para la síntesis biológica de colina, pero que no lo hacía directamente, sino que se transformaba en otra molécula que recibió el nombre de metionina activa.



**Figura 2.** Metabolismo de la metionina. CBS: cistationina sintasa; GNMT: glicina N-metiltransferasa; MAT: metionina adenosiltransferasa; MS: metionina sintasa; MT: otras metiltransferasa; S: sustrato que se metila; SAH: S-adenosilhomocisteína; SAHH: S-adenosilhomocisteína hidrolasa; S-CH3: sustrato metilado; SAME: adenosilmetionina.

Lionel Poirier demostró que una deficiencia grave en grupos metilo en la dieta producía cáncer de hígado en ausencia de cualquier otro agente carcinógeno<sup>4</sup>. Asimismo, Poirier observó que la actividad tumorigénica de las dietas deficientes en grupos metilo era proporcional a la disminución de los valores de SAME hepáticos. Años más tarde, Francisco Feo et al demostraron que la administración de SAME a ratas prevenía la aparición de tumores inducida por diversos agentes carcinógenos. Sin embargo, la demostración definitiva de la existencia de una relación causal entre el contenido hepático de SAME y la aparición de tumores no fue proporcionada hasta casi 20 años después. En 2001, José Mato y Shelly Lu demostraron que ratones genéticamente manipulados, deficientes en la síntesis hepática de SAME, desarrollaban de forma espontánea hígado graso y hepatocarcinoma celular<sup>5</sup>. De esta forma, se concluía una línea de investigación iniciada hacía 70 años por Frederik Banting y Charles Best, con la demostración de que una dieta deficiente en grupos metilo produce hígado graso. El anterior es uno de los múltiples ejemplos de cómo la posibilidad de manipular genéticamente ratones, con la inactivación de genes específicos, ha transformado durante las últimas 2 décadas la experimentación animal y ha contribuido, de manera espectacular, a nuestro conocimiento actual de la fisiología y la fisiopatología humanas.

En 1953, Giulio Cantoni demostró que el adenosintrifosfato reaccionaba con la metionina para formar S-adenosilmetionina (SAME), y esta molécula era la largamente buscada metionina activa.

En 2000, José Mato y Shelly Lu demostraron que ratones *knockout* deficientes en la síntesis hepática de SAME desarrollaban de forma espontánea hígado graso y hepatocarcinoma celular.

Entre 1987 y 1989, Mario Capecchi, Martin Evans y Oliver Smithies desarrollaron la tecnología que ha permitido a los investigadores crear modelos en ratón de enfermedades humanas y que conocemos con el nombre de ratones *knockout*.

## Generación de ratones *knockout*

Mario Capecchi, Martin Evans y Oliver Smithies son los 3 científicos que, entre 1987 y 1989, desarrollaron la tecnología que ha permitido a los investigadores crear modelos en ratón de enfermedades humanas y que conocemos con el nombre de ratones *knockout*<sup>6</sup>. Con esta tecnología, los investigadores han manipulado genéticamente ratones y han creado modelos para el estudio de enfermedades, como la aterosclerosis, el cáncer, la fibrosis cística, el Parkinson, etc. Esta misma tecnología ha servido, además, para estudiar los procesos biológicos normales y ha facilitado la comprensión, por ejemplo, de cómo el sistema nervioso se desarrolla o cómo funciona el sistema inmunitario.

Para inactivar un gen, se requiere llevar a cabo 2 pasos distintos. Primero se construye un vector. Y una vez hecho esto, el vector se introduce en células madre embrionarias (es decir, en células que pueden dar lugar a cualquier tipo celular en el organismo adulto), para generar un nuevo ratón a partir de estas células. El vector es un segmento de ADN que contiene 2 regiones homólogas a las del ADN endógeno a ambos extremos (para permitir la recombinación entre el vector de inactivación y el genoma del ratón), el gen modificado para inactivar su función, y 2 genes adicionales para controlar la calidad del proceso de inserción en el genoma de las células embrionarias (fig. 3). Las regiones de homología están localizadas a ambos extremos del vector y son complementarias a sitios específicos del genoma alrededor del gen que se quiere inactivar. El vector se une al genoma a través de estos sitios de homología. Esta técnica se beneficia del proceso de recombinación para intercambiar el gen inactivado por el auténtico, como ocurre durante la meiosis. Para estar seguros de que el vector se ha introducido en el genoma, se incluye el gen de resistencia al antibiótico neomicina. Las células que no han incorporado este gen morirán cuando se las cultiva en presencia de neomicina (fig. 3). Es también posible que el vector se haya incorporado en el genoma en un sitio equivocado. Para estar seguros de que esto no ha ocurrido, se inserta en el vector el gen de la timidina cinasa (tk) fuera de la región de homología. Si la recombinación homóloga ha tenido lugar, el gen tk no se encontrará en el genoma y las células serán insensibles a la administración de ganciclovir. Sin embargo, si el vector se ha insertado completamente en el genoma, las células que lo han incorporado morirán al cultivarlas en presencia de ganciclovir (fig. 3). El ganciclovir es un antiviral análogo de la 2'-deoxiguanosina que, en presencia de la enzima tk, se convierte en ganciclovir-monofosfato. A continuación, el monofosfato se convierte en difosfato y trifosfato por las cinasas celulares, y se acumula en el interior de la célula, con lo que inhibe la síntesis de ADN y produce la muerte celular. Es decir, a través de un doble proceso de selección positivo y negativo las células con el inserto en el lugar adecuado pueden seleccionarse. Adicionalmente, se pueden incorporar genes indicadores, como la *green fluorescence protein* (gfp), una proteína fluorescente que permite

seguir el destino de las células que contienen el gen *knockout*, es decir, en qué tipo celular se transforman en el ratón adulto.

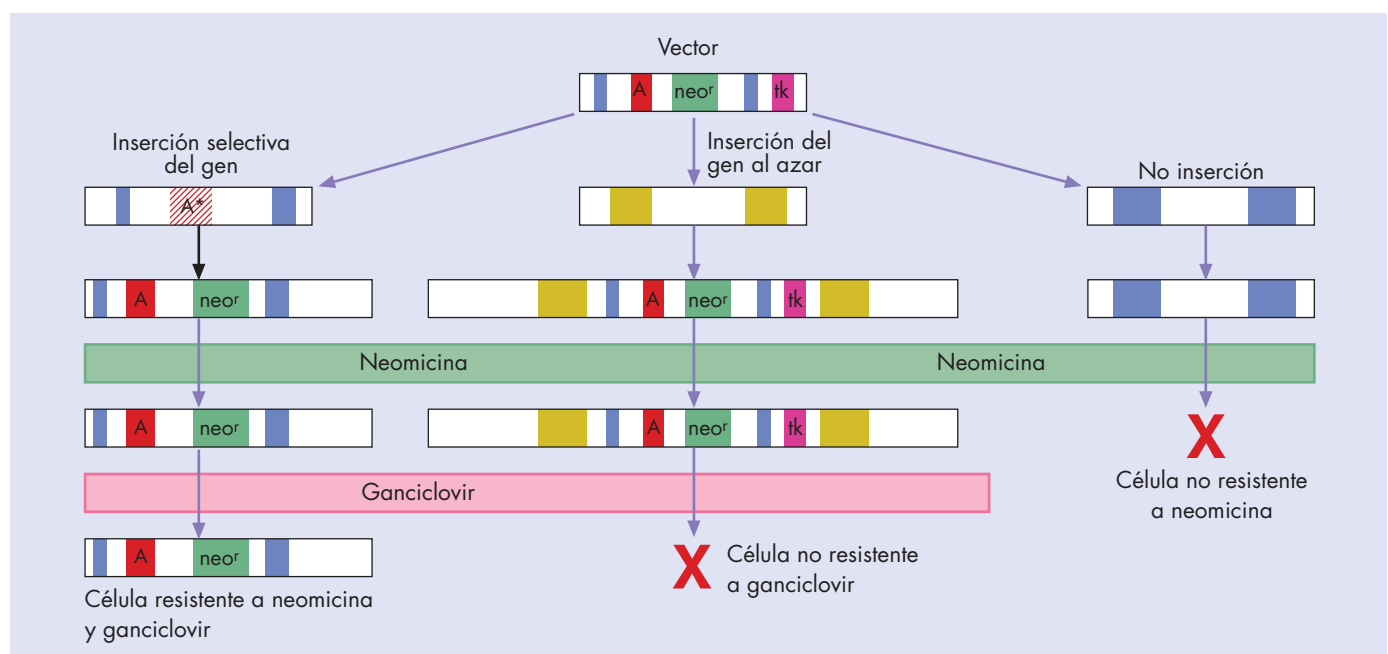
En el segundo paso, las células madre genéticamente manipuladas, preparadas en la fase anterior, se insertan en un blastocisto de ratón que se implanta en el útero de una hembra de ratón para completar el ciclo de gestación. Estos blastocistos contienen 2 tipos de células: las originales y las genéticamente modificadas. Los ratones así nacidos son quimeras, es decir, parte de su cuerpo procede de las células madre originales y de parte de las células madre que contienen el gen inactivado o *knockout*. A menudo, las células embrionarias genéticamente modificadas proceden de ratones que producen animales con pelo marrón, y los blastocistos a los que se inyectan estas células proceden de ratones que generan animales con pelo blanco. Esto permite al investigador seleccionar los ratones que tienen células provenientes de las células genéticamente modificadas y del blastocisto normal: si un ratón es completamente blanco, las células embrionarias no se desarrollaron con el blastocisto; pero si el pelo de los ratones tiene manchas marrones y blancas, la inyección de las células *knockout* embrionarias tuvo éxito. A continuación, se selecciona a los ratones con manchas marrones y blancas en su pelo para cruzarlos entre sí y propagar así el gen *knockout*.

Para inactivar un gen se requiere llevar a cabo 2 pasos distintos: primero se construye un vector con el gen modificado y, una vez hecho esto, el vector se introduce en células madre embrionarias para generar un nuevo ratón a partir de estas células.

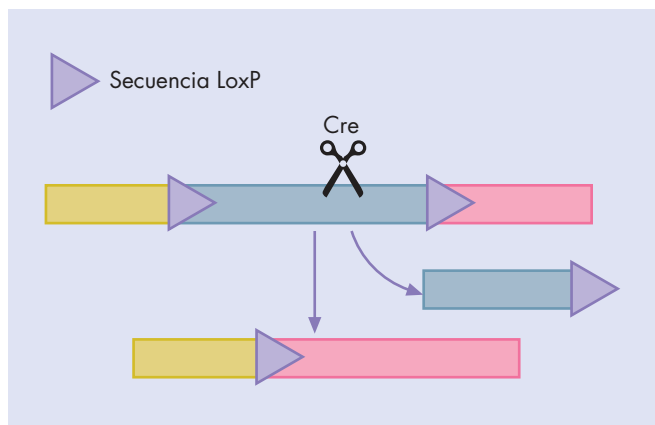
La tecnología desarrollada por Capecchi, Evans y Smithies para generar ratones *knockout* se licenció a Lexicon Genetics, la cual, actualmente, en colaboración con el Texas Institute for Genomic Research, tiene como principal objetivo preparar células embrionarias *knockout* que cubran el genoma entero de ratón para distribuirlos a precios accesibles a la comunidad científica.

En la actualidad, se pueden generar ratones *knockout* condicionales y/o inducibles en los que el gen seleccionado se inactiva únicamente en un cierto órgano, tipo celular o estado de desarrollo, o mediante la adición de un cierto fármaco o condición como el ayuno o la hipoxia.

Aunque actualmente nos puede parecer sencillo llevar a cabo estos pasos, en la década de los ochenta, a muchos el aislamiento de células madre embrionarias de ratón y la recombinación homóloga les parecía no sólo extremadamente difícil, sino conceptualmente imposible. Capecchi, Evans y Smithies recibieron el Premio Lasker de Investigación Biomédica en 2001 y el Premio Nobel de Medicina en 2007 por este trabajo. La tecnología desarrollada para generar ratones *knockout* se licenció a Lexicon Genetics, la cual, actualmente, en colaboración con el Texas Institute for Genomic Research, tiene como principal objetivo preparar células embrionarias *knockout* que cubran el genoma entero de ratón para distribuirlos a precios accesibles a la comunidad científica. Aunque enormemente útil para la investigación biomédica y el desarrollo de nuevos fármacos, la tecnología para la generación de ratones *knockout* tiene varias limitaciones. Por ejemplo, debido a la aparición de defectos durante el desarrollo embrionario, muchos ratones *knockout* mueren mientras se encuentran en el estado fetal antes de que sean útiles para la investigación. Asimismo, pueden haber diferencias entre la función de un mismo gen en ratones y humanos. En particular, mientras que los ratones desarrollan principalmente linfomas y sarcomas, la especie humana tiende a desarrollar cánceres derivados de células epiteliales; es decir, la inactivación de un mismo gen puede tener efectos diferentes en humanos y en ratón. A principio de la década de los noventa, se desarrollaron nuevas tecnologías que permiten la generación de ratones *knockout* condicionales o



**Figura 3.** Preparación de vectores para la generación de ratones *knockout*. A: alelo original; A\*: alelo sustituido; cuadro azul: regiones de homología; tk: timidina cinasa.



**Figura 4.** Mecanismo de acción de la recombinasa Cre.

vectores que son específicos para ciertos tejidos. El objetivo de la tecnología *knockout* convencional es inactivar ambos alelos, de manera que el gen en cuestión esté ausente en todas las células del ratón. El objetivo de los *knockout* condicionales, por el contrario, es inactivar un gen únicamente en un cierto órgano, tipo celular, o estado de desarrollo. Se han desarrollado diversas técnicas para generar animales *knockout* condicionales, si bien la más ampliamente utilizada es el método conocido como de la recombinasa Cre-loxP. La recombinasa Cre es una enzima que actúa como una tijera para cortar un gen que está flanqueado por 2 secuencias diana denominadas loxP. Cuando Cre se expresa, se une a los loxP, los corta y después empalma las 2 mitades restantes, tras haber eliminado el ADN situado entre ellos (fig. 4). Para la generación de animales *knockout* condicionales, un ratón que expresa un gen flanqueado con 2 secuencias de recombinasa loxP específicas (introducido mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias, básicamente como se ha descrito anteriormente para generar ratones *knockout* convencionales) se cruza con otro ratón que expresa la recombinasa Cre. Debido a que esta enzima se expresa sólo en ciertos tipos de células, el gen diana se inactiva únicamente donde el investigador lo desea. Para conseguir que la recombinasa Cre se exprese de manera específica en un cierto tejido o tipo celular, es necesario expresar Cre en un transgén, con un promotor específico de tejido. Por ejemplo, si la recombinasa Cre se coloca en un transgén que contiene el promotor de la albúmina, la recombinasa Cre sólo se expresará en el hígado adulto. También puede colocarse la recombinasa

Cre bajo el control de un promotor inducible (como por ejemplo un fármaco, hipoxia, ayuno, etc.), y así conseguir controlar el momento de la inactivación del gen.

También es posible generar ratones *knockout* en los que el gen inactivado se sustituye por otro cuya función se ha alterado mediante la introducción de mutaciones puntuales o ha generado inserciones/delecciones específicas. Esta técnica, conocida con el nombre de *knockin*, permite generar ratones portadores de las mismas mutaciones identificadas en tumores humanos u otras enfermedades. Finalmente, en los últimos años se ha desarrollado un método general que permite reducir la expresión de genes específicos en ratones usando lentivirus que expresan ARN de interferencia. En 1998, Andrew Fire y Craig Mello descubrieron los ARN de interferencia, los cuales permiten la degradación del ARN mensajero (ARNm) de genes específicos. Este mecanismo, conocido con el nombre de ARN de interferencia, se activa en presencia de moléculas de ARN de doble hebra<sup>7</sup>. Estos ARNm de doble hebra inducen la degradación de las moléculas de ARN que tienen una secuencia idéntica a la del ARN de doble hebra. En 2006, Fire y Mello recibieron el Premio Nobel de Medicina y Fisiología por el descubrimiento del ARN de interferencia y el silenciamiento génico inducido por ARN de doble hebra.

## Bibliografía



● Importante ● Muy importante

1. ●● De Banting F. 1923 Nobel Lecture. Disponible en: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1923/banting-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1923/banting-lecture.html)
2. ●● Du Vigneaud V. 1955 Nobel Lecture. Disponible en: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1955/vigneaudlecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1955/vigneaudlecture.html)
3. ● Cantoni GL. Biological methylation: selected aspects. *Annu Rev Biochem.* 1975;44:435-51.
4. ● Poirier LA. The Effects of Diet, Genetics and Chemicals on Toxicity and Aberrant DNA Methylation: an Introduction. *J Nutr.* 2002;132:2336S-2339S.
5. ● Lu SC, Alvarez L, Huang ZZ, Chen L, An W, Corrales FJ, et al. Methionine adenosyltransferase 1A *knockout* mice are predisposed to liver injury and exhibit increases expresión of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:5560-5.
6. ●● Herskowitz I. 2001 Albert Lasker Award for Basic Medical Research. Disponible en: <http://www.laskerfoundation.org/awards/library/2001remarkira.shtml>
7. ●● Fire AZ. 2006 Nobel Lecture. Disponible en: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2006/fire-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/fire-lecture.html)