

Principios básicos y simples de la tecnología transgénica y knock-out

ANA MILENA HERRERA TORRES¹

Forma de citar: Herrera AM. Principios básicos y simples de la tecnología transgénica y knock-out . Rev CES Med 2005; 19(1): 43-51

RESUMEN

El desarrollo de los animales knock-out ha permitido grandes avances en la investigación médica moderna y en la creación de nuevas alternativas terapéuticas para diferentes enfermedades. Hasta la fecha, la habilidad humana para manipular el genoma murino ha transformado dramáticamente la investigación científica a nivel mundial. Durante la última década, las tecnologías transgénica convencional y de knock-out genético se han convertido en herramientas de incalculable valor para la modelación de desordenes genéticos, para la asignación de diferentes funciones a diferentes genes, para la evaluación de drogas y toxinas, y para la resolución de importantes preguntas en la investigación básica y aplicada. Actualmente, el uso de ambos, animales transgénicos y knock-out, se ha convertido en una práctica estándar global en la investigación biomédica. Debido a los grandes y acelerados avances en la tecnología molecular, es necesario poseer un conocimiento básico simple y actualizado acerca de las técnicas usadas para la manipulación genética murina, que puedan servir como instrumento para la generación de nuevas ideas en la investigación científica. Esta revisión tiene como objetivo repasar los conceptos elementales de la tecnología knock-out para un fácil entendimiento de la misma.

PALABRAS CLAVE

Raton Knock-out

Ratón transgénico

Ratón quimérico

¹ PhD Patología. Docente Facultad de Medicina CES. Grupo Ciencias Basicas y Epidemiológicas. E-mail: aherrera@ces.edu.co

Recibido: 2 junio/ 2005, Revisado: 16 junio/2005, Aceptado: 8 julio/ 2005

SUMMARY

The development of knockout animals has allowed for major advances in modern medical research and at the same time has provided numerous advances in drug therapy. To date the human ability to engineer the mouse genome has profoundly transformed biomedical research in numerous ways and worldwide. During the last decade alone, conventional transgenic and gene knock-out technologies have become invaluable experimental tools for modeling genetic disorders, assigning functions to genes, evaluating drugs and toxins, and by and large helping to answer fundamental questions in basic and applied research. Using both transgenic and knock-out animals has become a global standard practice in biomedical research in this day-in-age. Due to the big and fast advances in molecular technologies, a good state-of-principle knowledge about the techniques used to manipulate and engineer the murine genome could help as a tool to generate new ideas in scientific research. Therefore, this review is intended to revisit the basic concepts in the knock-out technology for an easy understanding of it.

KEY WORDS

Knock-out mouse

Transgenic mouse

Chimeric mouse

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 20 años, la exploración básica de la función de los genes ha sido proporcionada eficientemente por experimentos transgénicos y de knock-out. Aunque el gran beneficio de esta tecnología para el avance en investigación biomédica ha sido comprobado y en muchos aspectos sus técnicas se encuentran estandarizadas y bien documentadas, estos experimentos han mostrado a su vez serias limitaciones intrínsecas a la manipulación genética convencional.⁽¹⁾ Sin embargo, las modifi-

caciones realizadas a nivel geonómico a través de mutagénesis de un gen "blanco" son ampliamente aplicadas en la investigación científica y las técnicas utilizadas para este propósito valen la pena ser entendidas hasta por el científico o médico más novato.⁽²⁾ Para explicarlo de una manera simple, estas técnicas (transgénica y knock-out), hacen posible el diseño de ratones carentes de productos derivados de un gen seleccionado o que exhiben diferentes propiedades regulatorias del mismo. Es por esto que, la tecnología del knock-out genético cuenta en la actualidad con un enorme impacto en muchas, sino en todas las disciplinas médicas.

EL CONCEPTO

Para poder entender como se diseñan y desarrollan los ratones transgénicos y knock-out es necesario repasar los conceptos básicos que definen los mismos:

- Ratón transgénico: Se refiere a un ratón en el cual material genético clonado ha sido transferido. Simplificando, es aquel que posee un gen extraño que ha sido insertado deliberadamente dentro de su genoma.⁽²⁾
- Ratón knock-out: Este es básicamente un ratón producto de un ratón transgénico o quimera en el cual el gen insertado no se expresa o es un gen nulo.⁽²⁾
- Ratón quimera: Este es un ratón que consiste en dos o mas tipos celulares genéticamente diferentes y derivados de diferentes cigotos. Es un ratón que posee células y tejidos con diferente información genética.⁽²⁾
- Gen blanco: Es el gen de interés, el gen que se quiere mutar o anular.
- Transgen: Gen mutado que reemplaza al gen blanco.⁽²⁾
- Vector: Es un agente que lleva un fragmento de ADN al interior de una célula huésped. Es un transportador similar a un virus, pero que no posee cubierta proteica y no se puede mover de célula a célula como lo hace un virus.⁽²⁾

- Secuencia flanqueadora: Región de un gen que precede o sigue a la región de transcripción. Es el ADN a cada lado de un gen blanco.⁽²⁾
- Transfección: Introducción de material genético o ADN a una línea celular específica a través de diferentes métodos como electroporación y precipitación con fosfato de calcio entre otros.⁽²⁾
- Recombinación homóloga: Intercambio o reemplazo de una región de ADN por una secuencia de ADN homóloga perteneciente a un cromosoma homólogo.⁽²⁾
- Heterocigotos: Que posee dos formas diferentes de un gen particular, cada uno heredado de cada progenitor.⁽²⁾
- Homocigotos: Que posee dos copias idénticas de un mismo gen, cada uno heredado de cada progenitor.⁽²⁾

Para poder crear un ratón knock-out y para poder apuntar a un gen de interés particular ("blanco") se pueden realizar dos procesos diferentes: En uno de los procesos de creación de ratones knock-out o transgénicos, es necesaria la construcción de un vector (transportador) que lleve en sí un marcador con secuencias flanqueadoras homólogas al ADN genómico del gen blanco.⁽¹⁾ Posteriormente, este vector se introduce a una línea celular embrionaria mediante el método de transfección.⁽³⁾ La secuencia homóloga que lleva el vector facilita su inserción dirigida al genoma del huésped y es así como el gen introducido reemplaza al gen con la secuencia original, en un proceso denominado *recombinación homóloga*.^(9, 11, 12) Las células embrionarias que hayan sido exitosamente mutadas en el gen blanco serán luego inyectadas a embriones en etapa blastocística (tres y medio días de madurez) o serán co-cultivadas con embriones en etapa de mórula (dos y medio días de madurez) para luego ser implantados en el animal. Así, estas células contribuirán a la formación de tejidos del animal en desarrollo, así como también entrarán a hacer parte de las células de la línea germinal.⁽³⁾ Este proceso dará como resultado ratones quiméricos que, a través de cruces selectivos con ratones sanos, darán como resultado ratones heterocigóticos para el gen deseado y el cruce de éstos a su vez, producirán finalmente ratones knock-out homocigóticos.^(2, 4, 6)

En otro proceso para la creación de ratones transgénicos, se realiza la inyección del gen elegido en el pro-núcleo masculino de un óvulo fertilizado pero que no ha iniciado su proceso de división.⁽¹⁰⁾ Este embrión (óvulo fecundado después de su primera división mitótica) que ya lleva el transgen en su interior, es implantado en el útero de una ratona previamente preparada para poder anidar el huevo fecundado. De esta manera se obtienen crías de las cuales el 5- 40% serán portadoras del gen inyectado y que serán identificadas a través del análisis de su DNA.^(7, 9, 10)

VARIABLES

Para llevar a cabo alguno de estos procedimientos complejos, se deben tener en cuenta numerosas variables como se explica a continuación:

Selección de líneas celulares (células madre embrionarias)

Las células madre embrionarias, son derivadas de células totipotenciales de la masa celular interna de blastocistos en etapa de pre-implantación. Estas células madre son capaces de realizar proliferación ilimitada e indiferenciada *in vitro* y de mantener su capacidad para diferenciarse en todos los diversos tipos de células tisulares. Para poder conservar la pluripotencialidad y viabilidad de estas células *ex vivo* es necesario mantenerlas en un medio de cultivo apto y en presencia de factores inhibidores de diferenciación.⁽³⁾ El medio de cultivo apto se basa en la presencia de fibroblastos primarios mitóticamente inactivados y extraídos de tejido embrionario de ratones entre los días 13-14 de gestación, que sirven principalmente como matriz para favorecer la adherencia celular y para alimentar a las células madre. En cuanto a los factores inhibidores de diferenciación, el más utilizado es el factor inhibidor de leucemia (LIF) que es una glicoproteína multifuncional de la familia interleuquina 6 de las citoquinas y que tiene múltiples efectos en diferentes órganos y sistemas. El

LIF regula el crecimiento y la diferenciación de las células madre embrionarias, al tiempo que aumenta su proliferación. Esto asegura la preservación de la pluripotencialidad de las células embrionarias que las hace aptas para la transfección de material genético durante el proceso de creación de un ratón knock-out. ⁽³⁾

Diseño del vector, mutación del gen y selección celular

El vector o transportador, debe ser construido con un clon genómico que contenga secuencias flanqueadoras homólogas a las secuencias flanqueadoras del gen blanco. Estos vectores son piezas de ADN genómico de tamaño mediano, de aproximadamente 6.000 a 8.000 pares de bases de largo, que son replicas cercanas de genes endógenos y que contienen tanto exones (secuencias de codificación) como intrones (secuencias de intervención). ⁽¹⁰⁾ Para apuntar al gen blanco, el vector es construido con secuencias flanqueadoras homólogas a las del gen blanco más las secuencias usadas para desactivar este mismo, así como también es construido con un "cassette" genético que contiene el "neo", un gen de resistencia a la neomicina que codifica la enzima bacteriana aminoglicósido-transferasa (APH), que se expresa en células mamíferas y que produce resistencia a los antibióticos aminoglicósidos. ^(7,9,10) Cuando el vector entra a las células madre por el método de transfección, ocurre una recombinación homóloga del gen transportado por el vector con el gen blanco, esto es, recombinación de las secuencias flanqueadoras homólogas de ambos genes y el intercambio del gen blanco por el cassette que contiene el neo. Es así como el gen de interés es reemplazado o anulado (Knock-out) (Fig 1). ^(11,12) Sin embargo, en algunas ocasiones se puede presentar el fenómeno de recombinación no-homóloga, en la que el gen huésped se combina con otro gen y como resultado el gen blanco no sufre mutación alguna. El neo gen, actúa como un marcador positivo para seleccionar a todas las células que contienen un gen mutado ó transgen (homólogo y no-homólogo) por su resistencia a la neomicina. Sin embargo,

el marcador de resistencia a la neomicina no diferencia las células cuyo gen mutado es el gen blanco u otro gen diferente. ⁽¹⁴⁾ Para esto, en el vector también se puede insertar otros cassettes genéticos que contengan transgenes que permitan la selección negativa de células en las que la recombinación sucedió en lugares incorrectos. En este cassette genético se inserta un gen de susceptibilidad a algún antiviral o antibiótico de una manera que al existir recombinación homóloga, este gen o cassette sea eliminado y no se exprese. En caso de ocurrir recombinación no-homóloga, aquellas células que expresen el gen morirán en presencia de esta droga (susceptibilidad), es por esto que se le denomina selección negativa. ^(13,14)

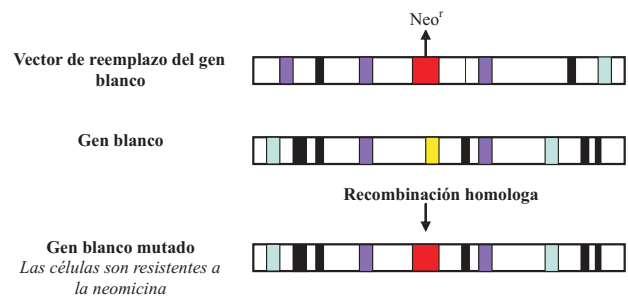


Figura 1. Recombinación homóloga. El vector incluye las secuencias flanqueadoras homólogas al gen de interés (en color púrpura) y el cassette genético que contiene el neo^r gen (color rojo). El gen blanco, es decir el gen que se quiere anular (color amarillo) será reemplazado por el cassette genético durante la recombinación homóloga cuando las secuencias homólogas (púrpura) se combinen y permitan el intercambio de ambos genes. Las células inyectadas con el transgen resultante no poseerán el gen original y presentarán resistencia a la neomicina, lo que facilitará su selección en cultivo.

Producción de ratones quiméricos y knock-out

Las células madre embrionarias transfectadas y exitosamente seleccionadas, son inyectadas en los embriones de ratón. Estos son posteriormente im-

plantados en hembras pseudopreñadas, esto es, hembras hormonalmente preparadas para recibir e implantar un embrión después de ser cruzadas con ratones estériles.^(1,9) Así, algunos de los ratones que nacen son quiméricos, estos presentarán dos tipos diferentes de células: Aquellas que corresponden al genoma del ratón original (embriones), así también como las células derivadas de las células madre embrionarias manipuladas, que llevan el gen modificado integrado en su genoma. El esperma u óvulo presente en los ratones quiméricos, si provienen de las células introducidas en el blastocisto,

portará los genes alterados.^(5, 9, 14) Cuando estos animales se cruzan con animales sanos, las crías resultantes heredarán una copia del cromosoma que lleva la mutación y que proviene de la célula madre embrionaria transfectada, así estos serán animales mutados heterocigotos. Posteriormente, es necesario que estos animales heterocigotos se crucen entre sí para obtener ratones que tengan dos copias del gen mutado (una de cada progenitor), es decir, animales homocigotos knock-out. Estos animales presentan una ausencia completa del gen normal (Fig. 2).⁽¹⁴⁾

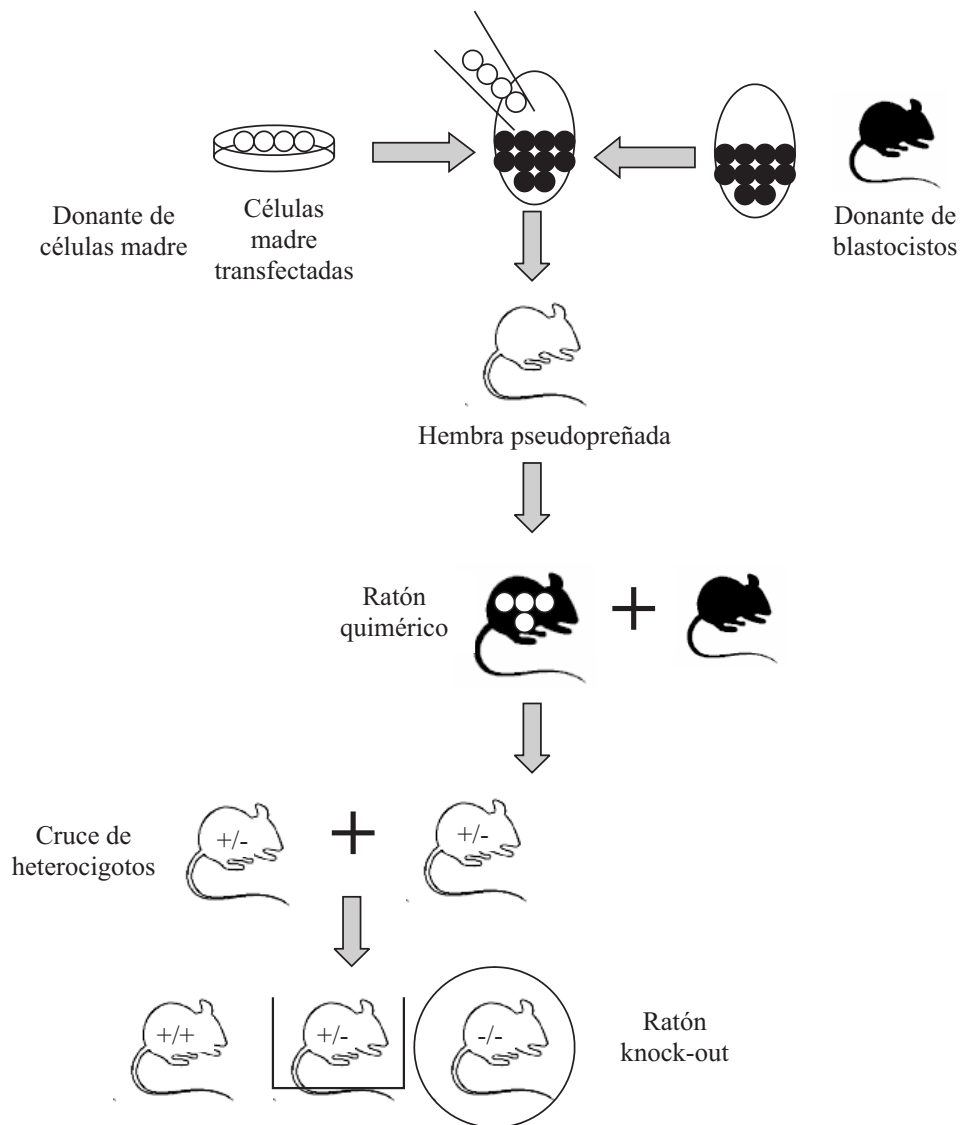


Figura 2. Producción de ratón knock-out.

Inyección en el pro-núcleo para la formación de ratones transgénicos:

Para obtener ratones transgénicos a través de inyección pro-nuclear, es necesario realizar primero la identificación y el aislamiento del fragmento de ADN o transgen deseado y que va a ser transferido.⁽¹⁾ Este transgen debe aislarse de la misma cepa animal a la cual va a ser inyectado y también debe obtenerse en una cantidad suficiente para realizar una microinyección exitosa. Al mismo tiempo se deben extraer los embriones de menos de 8 horas (antes de la fusión de los pro-núcleos) de una ratona a la cual se le indujo super-ovulación (suministro hormonal para gran producción de óvulos) y que se cruzó con un macho de la misma raza. Posteriormente, bajo un microscopio de micro-manipulación se realiza la micro-inyección del ADN foráneo en el pro-núcleo masculino (de mayor tamaño que el femenino) y se espera a que se produzca la fusión pro-nuclear y la proliferación celular.^(1,5,8,9)

Estos embriones en etapa de blastocisto son entonces implantados en una hembra pseudopreñada para la obtención de los ratones transgénicos. Si la integración del ADN foráneo en el genoma celular sucede antes de la fusión de los 2 pro-núcleos, las probabilidades de obtener un ratón transgénico puro son muy altas. Sin embargo, si la integración del ADN al genoma celular sucede después de la fusión pro-nuclear, se obtendrán ratones quiméricos en los que unos tejidos y células contarán con el transgen y otros no.^(5,9) Una vez obtenida las crías se procede a la identificación de la progenie transgénica mediante análisis del ADN. El porcentaje de ratones transgénicos puros obtenidos usualmente a través de esta técnica no excede el 20% y con el cruce consecutivo de estos ratones se obtendrá un ratón transgénico homocigótico, el cual es apto para el estudio de los efectos de diferentes genes en la expresión proteica de los organismos (Fig. 3).^(9,14)

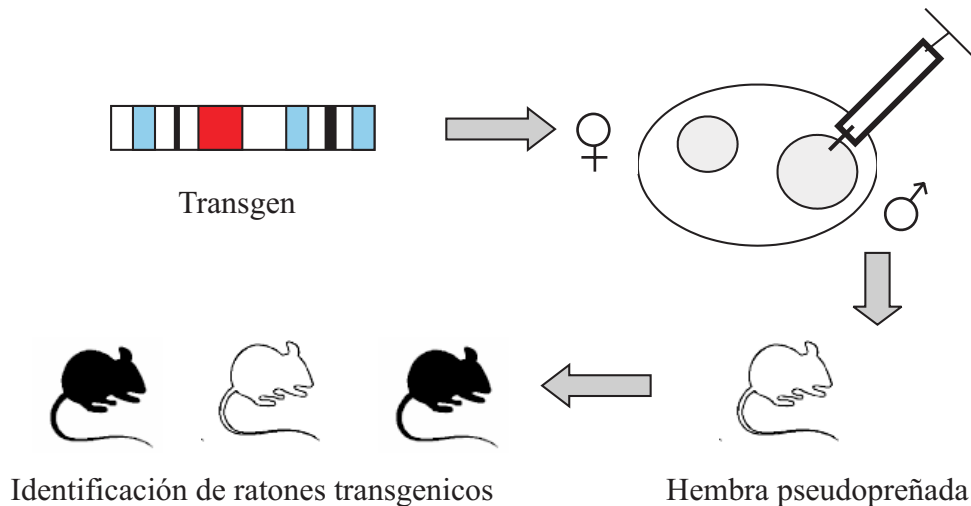


Figura 3. Producción de ratón transgénico.

DATOS PARA TENER EN CUENTA

A la fecha, hay más de 3.000 ratones knock-out que han sido desarrollados. En los próximos años, es muy posible que se induzcan más anulaciones a

la mayoría de los genes en el genoma murino, lo que suman aproximadamente 30.000 genes.⁽¹⁰⁾ El futuro parece entonces muy promisorio para la investigación biomédica y para el desarrollo de nuevos medicamentos, si se consideran los potenciales avances al combinar la genética murina y la aproximación fisiopatológica de las enfermedades.

Hay sin embargo, muchas limitaciones en el modelo knock-out que deben ser consideradas. Entre ellas, la mas importante se trata de los efectos deletéreos que tiene en el organismo el anular genes blancos. La anulación de la función de un gen puede causar severas alteraciones en el proceso de desarrollo del organismo, como también alterar su balance homeostático normal, causando una regulación compensatoria o secundaria al nivel del genoma o del organismo por si mismo o también puede causar la muerte del animal en desarrollo. Estos efectos, no fisiológicos pueden alterar de gran manera el análisis objetivo de los efectos que tiene la nulidad de un gen en particular sobre la expresión protéica y el desarrollo de un organismo.⁽¹⁵⁾ Surgen entonces muchos interrogante en cuanto la verdadera utilidad de esta tecnología: ¿Evita la compensación genética la identificación de la verdadera función de los genes?, ¿Que tan relevante es el modelo knock-out en las etapas del desarrollo del organismo para la investigación de los efectos de un gen en el adulto? y ¿Previene la letalidad embrionica la identificación de muchos de los genes blancos no identificados en el organismo normal? Además, aunque hay similitudes entre los mamíferos (ratones, conejos, humanos, etc.), los resultados obtenidos en ratones no pueden ser directamente extrapolados o interpretados para los humanos porque, tan científicamente maravilloso como parezcan, los ratones knock-out no son útiles para estudiar todos los defectos médicos, pues estos carecen de las funciones mas refinadas que los humanos poseen.⁽⁸⁾ Sin embargo, estudios retrospectivos (cuando se deja el escepticismo a un lado), han demostrado que los ratones knock-out pueden ser altamente informativos en el descubrimiento de la función de un gen y ser de gran utilidad farmacéutica para la identificación del efecto de un medicamento.^(7, 8, 10, 15)

CONCLUSIONES

Los ratones knock-out son una herramienta maravillosa usada para estudiar la función de genes específicos en algún sistema del organismo. A pesar de todas sus limitaciones y desatinos, esta técnica

proporciona un gran medio exploratorio del genoma y de la fisiopatología murina que de alguna manera se puede extrapolar a la fisiopatología humana. El desarrollo de los ratones knock-out representa un avance de incalculable valor para los campos biomédicos y farmacéuticos en tanto que ellos proporcionan información muy valiosa acerca de la construcción genética de los organismos y de los efectos de los diferentes genes en el desarrollo de los mismos. Tal parece que con el constante avance de la biotecnología, el futuro de la tecnología knock-out parece aun mas brillante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, Oesch F, Zabel B. Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiological Genomics* 2002; 11: 115-132.
2. Galli-Taliadoros LA, Sedgwick JD, Wood SA, Korner H. Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *Journal of Immunological Methods* 1995; 181: 1-15.
3. Kirk R. Thomas and Mario R. Capecchi. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51: 502-513.
4. Ehmke H. Mouse gene targeting in cardiovascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284(1): R28-R30.
5. Hall JE. The promise of translational physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283(2): R1259-R1260.
6. Brian P. Zambrowicz & Arthur T. Sands. Knockouts model, the 100 best-selling drugs – will they model the next 100? *Nature Reviews Drug Discovery* 2003; 2(1): 38-51.

7. Abuin A, Holt KH, Platt KA, Sands AT, Zambrowicz BP. Full-speed mammalian genetics: in vivo target validation in the drug discovery process. *Trends in Biotechnology* 2002; 20: 36-42.
8. Seong E, Seasholtz AF, Burmeister M. Mouse models for psychiatric disorders. *Science* 2002; 18 (12): 643-650.
9. Christopher M. Smith. Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *Scientist* 2000; 14(15): 32.
10. Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F. Conditional gene targeting. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98: 600-3.
11. Oliver Smithies, Ronald G. Gregg, Sallie S. Boggs, Michael A. Koralewski & Raju S. Kucherlapati. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal α -globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985; 317(6034): 230-233.
12. Takehiko Shibata. Functions of homologous DNA recombination. *RIKEN Review* 2001; 41: 21-23.
13. Claudine HK. Cre/lox system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutrition reviews* 2004; 62(6): 243-246.
14. Maddison K, Clarke AR. New approaches for modeling cancer mechanisms in the mouse. *Journal of Pathology* 2005; 205: 181-193.
15. Wolf SE, Woodside KJ. Transgenic and gene knock-out techniques and burn research. *Journal of surgical research* 2005; 123: 328-339.
16. Chan AW. Transgenic animals: current and alternative strategies. *Cloning* 1999; 1(1): 25-46.
17. Dinnyes A, Szmolenszky A. Animal cloning by nuclear transfer: state-of-the-art and future perspectives. *Acta Biochim Pol* 2005; 52(3): 585-8.
18. Ogura A, Ogonuki N, Miki H, Inoue K. Microinsemination and nuclear transfer using male germ cells. *Int Rev Cytol* 2005; 246: 189-229.
19. Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 2005; 23(9): 1117-25.
20. Niemann H, Kues W, Carnwath JW. Transgenic farm animals: present and future. *Rev Sci Tech* 2005; 24(1): 285-98.
21. Popova E, Bader M, Krivokharchenko A. Production of transgenic models in hypertension. *Methods Mol Med* 2005; 108: 33-50.
22. Bader M. Mouse knockout models of hypertension. *Methods Mol Med* 2005; 108: 17-32.
23. Babu GJ, Periasamy M. Transgenic mouse models for cardiac dysfunction by a specific gene manipulation. *Methods Mol Med* 2005; 112: 365-77.
24. Houdebine LM. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod Domest Anim* 2005; 40(4): 269-81.
25. Campbell KH, Alberio R, Choi I, Fisher P, Kelly RD, Lee JH, Maalouf W. Cloning: eight years after Dolly. *Reprod Domest Anim* 2005; 40(4): 256-68.
26. Werner RG. Transgenic manufactured biopharmaceuticals: a new method of drug manufacturing. *Expert Opin Investig Drugs* 1999; 8(6): 731-6.
27. Jin SL, Latour AM, Conti M. Generation of PDE4 knockout mice by gene targeting. *Methods Mol Biol* 2005; 307: 191-210.
28. Hunter CV, Tiley LS, Sang HM. Developments in transgenic technology: applications for medicine. *Trends Mol Med* 2005; 11(6): 293-8.

29. Hermeling S, Jiskoot W, Crommelin D, Bornaes C, Schellekens H. Development of a transgenic mouse model immune tolerant for human interferon Beta. *Pharm Res* 2005; 22(6): 847-51.
30. Furuta Y, Behringer RR. Recent innovations in tissue-specific gene modifications in the mouse. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005; 75(1): 43-57.
31. Beglopoulos V, Shen J. Gene-targeting technologies for the study of neurological disorders. *Neuromolecular Med* 2004; 6(1): 13-30.
32. Dove AW. Clone on the range: What animal biotech is bringing to the table. *Nat Biotechnol* 2005; 23(3): 283-5.
33. Ristevski S. Making better transgenic models: conditional, temporal, and spatial approaches. *Mol Biotechnol* 2005; 29(2): 153-63.
34. Minor PD. Transgenic animals for the production of biological medicines. *Dev Biol (Basel)* 2004; 118: 165-9.
35. Jin SL, Latour AM, Conti M. Generation of PDE4 knockout mice by gene targeting. *Methods Mol Biol* 2005; 307: 191-210.
36. Maddison K, Clarke AR. New approaches for modelling cancer mechanisms in the mouse. *J Pathol* 2005; 205(2): 181-93.

