

ELS PREMIS NOBEL

DE L'ANY 2007

SOBRE EL

PREMI NOBEL DE FISIOLOGIA O MEDICINA

CONCEDIT A

MARIO R. CAPECCHI, MARTIN J. EVANS

I OLIVER SMITHIES,

A CÀRREC DE JAUME REVENTÓS,

DE L'INSTITUT DE RECERCA

HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

(BARCELONA),

I ANDREAS DOLL,

DE LA FACULTAT DE MEDICINA

DE LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA

DE BARCELONA

TRANSGÈNESI PER RECOMBINACIÓ HOMÒLOGA EN CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES

RESUM

El Premi Nobel de Fisiologia o Medicina de l'any 2007 va ser atorgat a Mario R. Capecchi, Martin J. Evans i Oliver Smithies pels seus múltiples descobriments relacionats amb la introducció de material genètic específic a la línia germinal de ratolins mitjançant l'ús de cèl·lules mare totipotents embrionàries. Aquestes manipulacions impliquen que els gens modificats en la línia germinal dels mamífers seran transmesos i expressats a la seva descendència. Tota la tecnologia desenvolupada pels tres guardonats i llurs equips, que s'ha anomenat «tècnica de silenciament genètic o *gene-knockout* per recombinació homòloga», ha obert les portes perquè els investigadors puguin determinar les funcions específiques dels gens, tant en la fisiologia i la patologia com en el desenvolupament. Pensant en particular en els humans i en les malalties genètiques fins ara inguaribles, és important esmentar que la feina de Capecchi, Evans i Smithies ha mostrat el camí definitiu cap a la teràpia gènica, que, per primera vegada, deixa l'àmbit de la ficció per esdevenir una realitat.

PARAULES CLAU: transgènesi, cèl·lules mare embrionàries, silenciament genètic, recombinació homòloga, malalties genètiques, teràpia gènica.

ABSTRACT

The 2007 Nobel Prize in Physiology or Medicine was awarded to Mario R. Capecchi, Martin J. Evans i Oliver Smithies for their multiple discoveries dealing with the introduction of

specific genetic material into the mice germ line by means of using pluripotential embryonic stem cells. Those manipulations drive modified genes to mammal germ line and their further transmission and expression to the progeny. The developed technology by the awardees and their teams, which is currently named «gene silencing or gene-knockout by homologous recombination», brought the main issues for scientists to unravel specific functions of genes in physiology, pathology and during development. In humans, the achievements of Capecchi, Evans and Smithies led to the onset and further development of gene therapy to cure the devastating genetic diseases.

KEYWORDS: transgenesis, embryonic stem cells, gene silencing, gene-knockout, homologous recombination, genetic diseases, gene therapy.

CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES: ELS PRIMERS TREBALLS

Martin J. Evans va identificar cèl·lules mare embrionàries, a partir de les quals es deriven totes les cèl·lules dels organismes adults. Va aconseguir posar-les en cultiu, modificar-les genèticament i reintroduir-les en mares pseudogestants per generar una descendència modificada.

«En els estadis més inicials del desenvolupament», deia Evans, «de ben segur que hi ha cèl·lules, a partir de les quals es generen els organismes sencers. No obstant això, sembla que aquestes cèl·lules no es repliquen i romanen en els teixits en un nombre molt reduït.» La conclusió a què va arribar Evans, quan va observar que aquestes cèl·lules existien realment, va ser fruit dels seus estudis sobre la biologia dels teratocarcinomes del ratolí.

Evans es va basar en treballs pioners de molts altres investigadors a qui ha reconegut sempre la gran contribució

i influència en els seus descobriments. Entre aquells, Evans esmenta sempre els seus amics Leroy Stevens i G. Barry Pierce.

Leroy Stevens fou el veritable expert i estudiós dels teratocarcinomes. Va observar com diverses soques endogàmiques de ratolins desenvolupaven espontàniament teratomes als testicles.¹ Estudiant-los amb molta cura amb tècniques microscòpiques, Stevens va arribar a la conclusió que aquests teratomes procedien de cèl·lules germinals primordials i també d'embrions ectòpics. Stevens deia que «després d'haver practicat trasplantaments seriatos dels teratomes, aquests tumors retenien el seu caràcter pleomòrfic. Les cèl·lules pluripotents embrionàries sembla que estiguin a l'origen d'una subpoblació de cèl·lules que es diferencien molt ràpidament, així com d'una altra subpoblació de cèl·lules que, com elles mateixes, romandran indiferenciades».

G. Barry Pierce, deu anys més tard, publicà a la revista *Cancer Research* el que anomenava els dos models d'origen de la multiplicitat dels diferents tipus cel·lulars en el teratoma: l'existència, d'una banda, de múltiples línies cel·lulars precursoras i, de l'altra, la línia de cèl·lules mare pluripotents (*single pluripotential stem cell line*).²

Evans havia estat investigant sobre les cèl·lules embrionàries de carcinomes de ratolins, en concret de teratocarcinomes, que, encara que procedissin de tumors, s'havia demostrat que podien donar origen a qualsevol altre tipus cel·lular. Va identificar en aquestes cèl·lules la particularitat de poder ser vehicles capaços d'introduir material genètic en la línia germinal del ratolí. Els experiments inicials que va realitzar en aquest sentit van tenir èxit, ja que les cèl·lules embrionàries que provenien de tumors portaven cromosomes anormals i

1. STEVENS i LITTLE (1954).
2. KLEINSMITH i PIERCE (1964).

no podien, en conseqüència, contribuir a la formació de cèl·lules de la línia germinal.

Amb aquest problema ben present, Evans va descobrir que es podien establir cultius de cèl·lules amb una dotació cromosòmica normal directament a partir dels embrions de ratolins en els moments més inicials del desenvolupament. Aquestes són les cèl·lules que ara s'anomenen *cèl·lules mare embrionàries* (*embryonic stem cells*).³

CREACIÓ D'ANIMALS TRANSGÈNICS

El setembre del 1980, Jon W. Gordon i Frank H. Ruddle van aconseguir el primer èxit en la producció d'un animal transgènic. Va consistir a incorporar de manera permanent un gen clonat prèviament en el genoma de l'embrió d'un mamífer, en aquest cas d'un ratolí. En aquell moment, aquests autors van crear el terme *transgènic* per referir-se a aquests ratolins. Des de llavors, aquest és el terme utilitzat per referir-se tant a animals com a plantes als quals s'ha transferit artificialment material genètic que en principi no posseïen de manera natural.

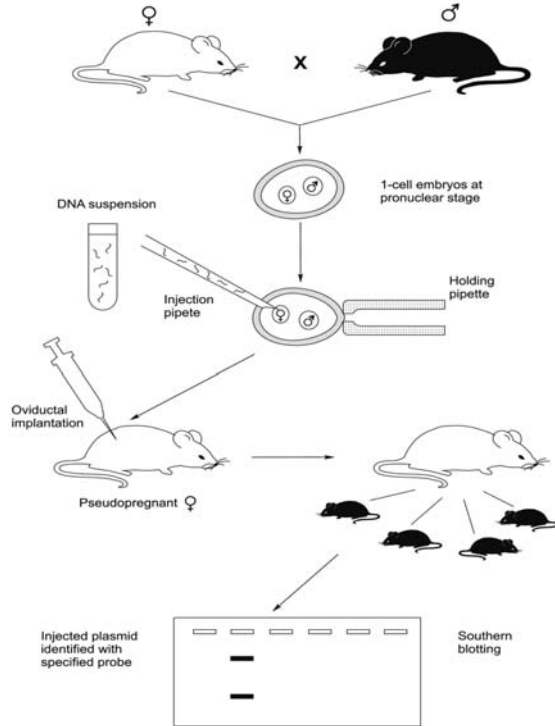
81

Els primers ratolins transgènics van ser obtinguts pel mètode de microinjecció al pronucli (figura 1),⁴ encara que ben aviat es van posar a punt dos mètodes alternatius més, amb els seus avantatges i inconvenients. Aquests mètodes eren la infecció d'embrions per retrovirus portadors del gen que es volia transferir (*transgèn*) i la utilització de cèl·lules pluripotents embrionàries prèviament transfectades amb el DNA d'interès (figura 2).

Per quins motius aquesta tecnologia (la creació d'animals transgènics) ha revolucionat de manera tan notable

3. EVANS (1972).

4. GORDON *et al.* (1980).



82

FIGURA 1. Descripció del mètode per generar animals transgènics per microinjecció pronuclear. De l'encreuament entre un ratolí mascle normal i una femella estimulada hormonalment (LH + FSH), se n'obtenen quirúrgicament els embrions generats abans de la fusió dels dos pronucleus. Un d'aquests pronucleus (el masculí, de preferència, per ser el més gran) és microinjeccionat amb el DNA (constructe que pot incloure seqüències reguladores i gens d'estructura) del nostre interès i que volem que s'expressi en els animals transgènics. Aquests embrions microinjeccionats es mantenen una estona en un incubador a 37 °C per identificar-ne els viables (a causa de la micromanipulació, alguns moriran i apareixeran força encogits després de la incubació). Els identificats com a viables es reintrodueixen quirúrgicament en l'oviducte d'una femella pseudogestant (femella que s'ha identificat en el moment adequat del cicle per acceptar els embrions, mitjançant la presència d'un tap vaginal d'esperma resultant de l'encreuament previ amb un mascle vasectomitzat). (Figura adaptada de Reventós i Munell, 1997.)

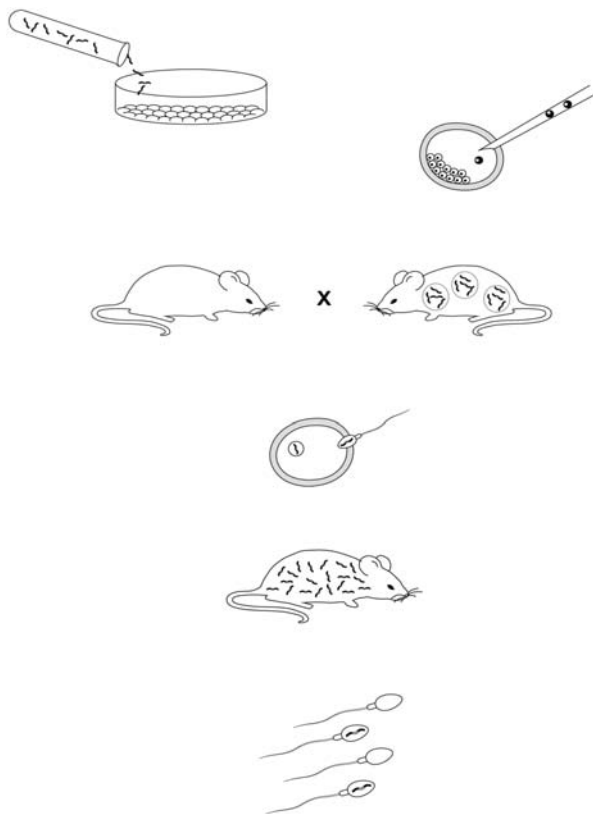


FIGURA 2. Descripció del mètode per generar animals transgènics mitjançant l'ús de cèl·lules mare embrionàries. El DNA del nostre interès (constructe) es transfereix a cèl·lules mare embrionàries en cultiu. Aquestes cèl·lules transfectades s'injecten a continuació a l'interior d'un blastòcit d'una femella donant. Aquest blastòcit es reintrodueix després quirúrgicament a l'oviducte d'una femella pseudogestant que donarà unes cries que seran químeres (tenen una part de les cèl·lules de l'organisme provinent de les cèl·lules del blastòcit original, mentre que l'altra meitat prové de les cèl·lules mare embrionàries a les quals s'havia transfectat el DNA que volem expressar, o *transgèn*). Els ratolins químeres s'encreuen amb altres ratolins normals i donen la progènie F1, i així successivament. (Figura adaptada de Reventós i Munell, 1997.)

la recerca en biologia i medicina i ha permès aquest avenç tan substancial en la comprensió de la regulació gènica, el desenvolupament embrionari i les malalties genètiques, entre d'altres?

La resposta a aquesta pregunta podria resumir-se breument de la següent manera: en primer lloc, els gens injectats s'expressen correctament en els ratolins. Quan sabem que la distribució tissular de l'expressió d'un gen, així com la seva regulació durant el desenvolupament, estan controlades per seqüències de DNA situades molt a prop del mateix gen, podem dirigir l'expressió d'aquests gens a voluntat sempre que les esmentades seqüències reguladores (promotors i estimuladors) s'incloguin per davant del gen que es vol expressar.

Aquest descobriment va ser realitzat per Brinster i col·laboradors quan van dirigir el gen de la timidina-cinasa de l'herpes cap al fetge de ratolins transgènics, posant a més aquest gen sota el control del promotor del gen de la metalotionina de ratolí, que normalment s'expressa al fetge.⁵

En segon lloc, la integració a l'atzar del DNA exogen injectat als cromosomes de l'hoste pot comportar la interrupció d'un gen normal del ratolí, amb la seva consegüent inactivació (*mutació per inserció*) (figura 3). Aquest fet, que inicialment va ser considerat un error o accident metodològic, es va convertir ben aviat en una nova estratègia de recerca o, millor dit, d'identificació de nous gens, ja que el gen interromput es podia localitzar i aïllar pels mètodes corrents de clonació utilitzant el transgèn com a sonda i clonant les zones que flanquegen el lloc d'inserció. D'aquesta manera, amb l'establiment de la correlació entre el gen interromput i el fenotip resultant, es van identificar molts nous gens desconeguts fins llavors.

Ja en aquell moment es pensava que, per haver reeixit a crear animals transgènics i, per tant, a expressar correcta-

5. BRINSTER *et al.* (1981).

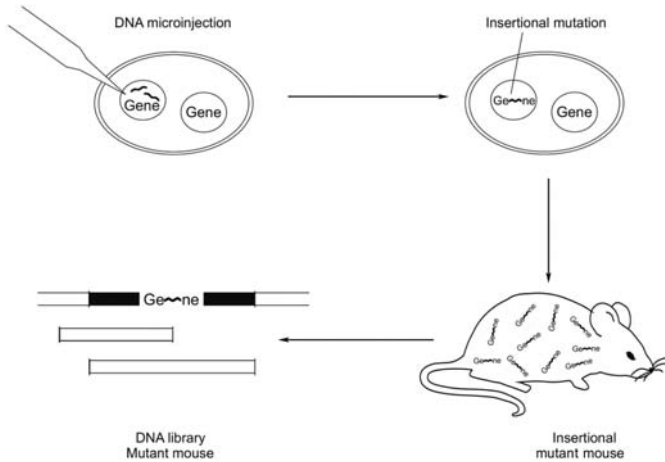


FIGURA 3. Producció de mutants per inserció. Sigui quin sigui el mètode utilitzat, el DNA exogen que volem introduir es pot integrar en qualsevol lloc del genoma de l'hoste. En la majoria dels casos, aquesta inserció es produeix en zones no codificadores (que són les més abundants) i que no tenen cap rellevància. No obstant això, hi ha la possibilitat que aquesta inserció es produeixi en zones codificadores, i aleshores es produeix la interrupció d'un gen en concret. Aquesta interrupció pot donar un fenotip diferent o alterat. Aquesta situació, que es podria considerar com un accident de la manipulació, ens permetrà, però, clonar el lloc d'inserció i, per tant, el gen interromput, i associar nous gens amb fenotips. La interrupció d'un gen important pot ocasionar canvis deletèrics per a l'animal. (Figura adaptada de Reventós i Munell, 1997.)

ment gens en animals que no els tenien de manera natural o els tenien defectuosos, era un pas quasi definitiu cap al disseny de teràpies noves de les malalties genètiques que fins aquell moment no tenien cap tipus de cura efectiva. Nogensmenys, a ningú se li escapava que la integració a l'atzar del transgèn en l'hoste i la possibilitat de crear mutacions per inserció altament deletèries per a l'hoste representaven encara esculls que calia vèncer.

Els investigadors Mario R. Capecchi i Oliver Smithies, cadascun per la seva banda, van descobrir com es podien aprofitar experimentalment les recombinacions homòlogues entre segments de molècules de DNA que ja se sabia que succeïen de manera natural. El descobriment cabdal va ser demostrar com aquesta tècnica es podia utilitzar per dirigir l'expressió de gens seleccionats i produir així línies de ratolins modificats genèticament. Aquests animals són ara, sens dubte, una eina indispensable per a la recerca biomèdica. El coneixement generat a partir dels treballs de Capecchi i Smithies i la possibilitat de generar un nombre tan alt de models animals de malalties han fet canviar la comprensió que se'n tenia i, el que és més important, han permès avançar en les estratègies de tractament.

Els treballs pioners de Joshua Lederberg

Els treballs del nord-americà Joshua Lederberg, de la Universitat de Wisconsin, a final dels anys quaranta i principi dels cinquanta del segle passat, van ser pioners en la comprensió de les recombinacions homòlogues que succeïen de manera natural en moments molt importants de la vida de les cèl·lules, com ho són la meiosi i també la reparació del DNA. Lederberg va fer unes contribucions i uns descobriments importantíssims pel que fa a les recombinacions genètiques i a l'organització del material genètic en els bacteris. Pels seus descobriments, se li va atorgar el Premi Nobel de Fisiologia o Medicina de l'any 1958, que va compartir amb George Wells Beadle, de l'Institut de Tecnologia de Califòrnia, i Edward Lawrie Tatum, de l'Institut Rockefeller d'Investigació Mèdica de Nova York, pels seus descobriments en les funcions dels gens, els quals, segons Beadle i Tatum, actuen com a regula-

dors d'esdeveniments químics en les cèl·lules. Els descobriments de Lederberg van ser considerats transcendentals i, per això, es va endur la meitat del premi, mentre que Beadle i Tatum van compartir-ne l'altra meitat.

Per entendre bé l'essència de les recombinacions homòlogues, s'ha de saber que la replicació exacta i la reparació dels danys del DNA resulten essencials per al manteniment de la informació genètica i la transmissió fidel de pares a fills. La recombinació és clau per a la generació de la diversitat genètica, que és crítica des del punt de vista de l'evolució. Les diferències genètiques entre els individus proporcionen el material essencial de partida per a la selecció natural, que permet a les espècies evolucionar i adaptar-se als canvis de les condicions ambientals.

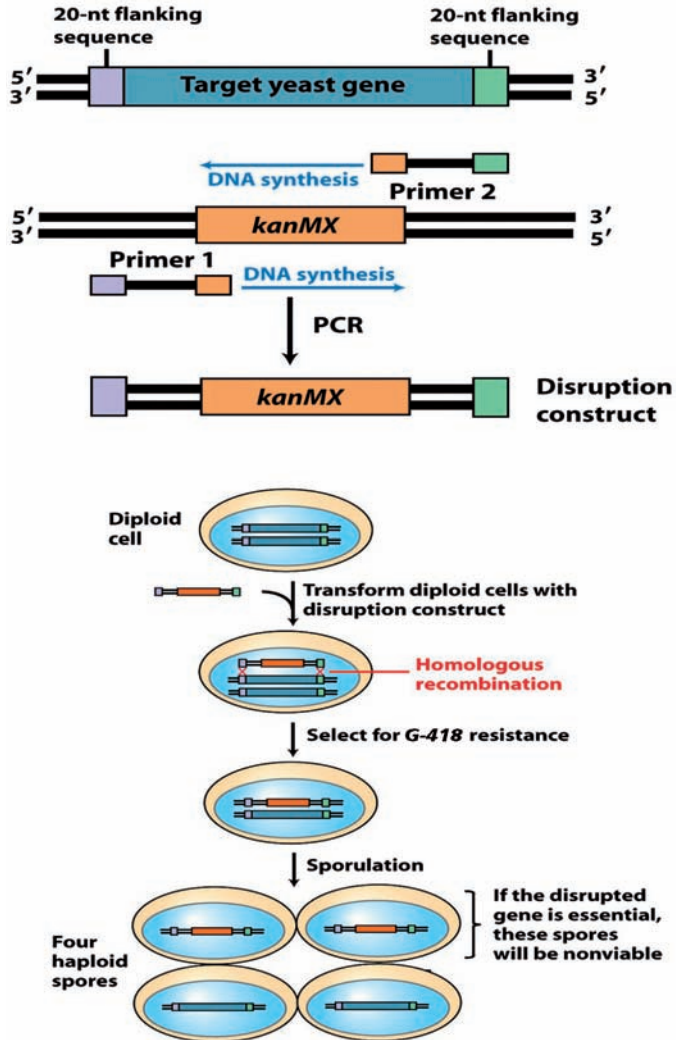
Les recombinacions homòlogues impliquen l'intercanvi d'informació entre molècules de DNA que comparteixen homologia de seqüència al llarg de centenars de parells de bases. Els exemples més rellevants que succeeixen a les cèl·lules de manera natural inclouen la recombinació entre cromosomes aparellats durant la meiosi i la recombinació homòloga que es produeix durant la reparació del DNA.

87

La clau: la selecció positiva-negativa per identificar les recombinacions homòlogues

Les modificacions del genoma del *Saccharomyces cerevisiae* són força senzilles principalment per dos motius: les cèl·lules del llevat incorporen molt ràpidament el DNA exogen en unes determinades condicions experimentals i aquest DNA es bescanvia molt eficientment amb el locus cromosòmic homòleg de la cèl·lula receptora.

Aquesta recombinació dirigida (*targeted*) de seqüències idèntiques (homòlogues) de DNA permet fàcilment que



88

FIGURA 4. Recombinació homòloga amb constructes transfectats en lloc per inactivar gens específics. (Figura adaptada de Lodish *et al.*, 2008.)

qualsevol gen d'un cromosoma de llevat pugui ser substituït per un al·lel mutat. La clau per utilitzar aquest mètode de bes-canvi d'al·lels salvatges per al·lels mutats radica en el mètode per identificar i seleccionar les cèl·lules en què la recombinació ha succeït amb èxit.

El mètode més utilitzat, que es basa en una reacció de PCR per preparar el constructe alterat o mutat, incorpora un marcador de selecció que permetrà identificar les cèl·lules en què s'ha produït la recombinació homòloga. En la figura 4 es pot veure com els encebadors (*primers*) utilitzats per a la reacció d'amplificació del marcador de selecció estan dissenyats incloent-hi vint nucleòtids idèntics a les seqüències que flanquegen el gen del llevat que es pretén substituir. El constructe resultant és el marcador de selecció (per exemple, el gen *kanMX*, que, com en el cas del *neo-r*, confereix resistència al *G-418*), flanquejat per vint parells de bases complementàries amb les zones 5' i 3', que flanquegen el gen diana que es vol substituir en el llevat. Les cèl·lules transformades, en les quals una de les dues còpies del gen diana endogen ha estat substituïda pel constructe mutat, seran identificades per la seva resistència al *G-418*. Aquestes cèl·lules de llevat heterozigòtiques creixeran normalment al marge de la funció del gen diana, però la meitat de les espores haploides derivades d'aquestes cèl·lules portaran el gen modificat (figura 4). Si el gen modificat és essencial per a la seva viabilitat, les espores que el portin no podran sobreviure.

89

LA RECOMBINACIÓ HOMÒLOGA I LES CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES

Va ser cap als voltants del 1986 quan aquestes explicacions van prendre forma. Els investigadors guardonats van saber aleshores que ambdues tècniques utilitzades conjuntament podrien convertir-se en una eina de treball potentíssima i

única per a la recerca. En aquest moment es comencen a generar línies de cèl·lules mare embrionàries a les quals s'ha transferit un gen exogen de manera dirigida per recombinació homòloga. Els investigadors Mario R. Capecchi i Oliver Smithies ja havien demostrat que els gens podien ser introduïts de manera dirigida per recombinació homòloga en cèl·lules en cultiu, mentre que Martin J. Evans hi havia contribuït amb l'establiment dels cultius de les cèl·lules mare embrionàries, que representaven l'eina necessària o vehicle per arribar a la línia germinal. Només calia la combinació de totes dues estratègies.

Les cèl·lules mare embrionàries, o el millor vehicle per transferir DNA a la línia germinal del ratolí

90

Els tipus cel·lulars utilitzats inicialment per Capecchi i Smithies no es van demostrar eficaços en la creació de transgènics per *gene targeting*. Amb aquells tipus cel·lulars no s'aconseguia que hi hagués transferència a la línia germinal. Només si s'acomplia aquesta condició, les modificacions introduïdes en el DNA podrien ser transmeses a la descendència.

El següent pas era, doncs, demostrar que les cèl·lules mare embrionàries podien contribuir a la línia germinal. Per això, Evans va injectar a embrions d'una soca de ratolins cèl·lules mare embrionàries d'una altra soca diferent, també de ratolins. Els embrions resultants eren *mosaics* (compostos de cèl·lules d'ambdues soques), que van ser reintroduïts a femelles pseudogestants (*foster mothers*) per albergar-ne la gestació. Una vegada es van obtenir les cries, mosaics també, d'aquesta gestació, es van encreuar entre elles, i es va poder detectar la presència de gens derivats de les cèl·lules mare embrionàries en les noves cries. Aquests gens eren, ja a partir d'aquell moment, heretats segons les lleis de Mendel.

Evans va començar aleshores a modificar genèticament les cèl·lules mare embrionàries mitjançant l'ús de retrovirus. Va demostrar la factibilitat de la transferència del DNA retroviral de les cèl·lules embrionàries, a través dels ratolins mosaics i cap a la línia germinal dels ratolins. Va aconseguir així ratolins que portaven un nou material genètic mitjançant l'ús de les cèl·lules mare embrionàries.⁶

*Els inicis dels ratolins knock-out ('genoanul·lats'),
o el començament d'una nova era en la genètica*

Els mètodes que hem explicat per modificar les seqüències de gens en els llevats també es poden aplicar en els eucariotes superiors. Els gens alterats es poden introduir a la línia germinal pel mètode de la recombinació homòloga, per produir animals amb una anul·lació o un silenciament específic d'un gen escollit (*gene knock-out* o, més correntment, *knock-out*).

91

Els múltiples descobriments de seqüències de DNA i de proteïnes han portat a la identificació de molts gens nous, amb la utilització del mètode de comparacions de patrons de seqüències de DNA genòmic i també de proteïnes amb d'altres ja coneguts i de funcions també prèviament descrites. Així doncs, les «noves» funcions de les «noves» molècules identificades s'han predit per analogies de seqüència (*dominis funcionals*) amb les «velles» molècules ben estudiades al llarg de molts anys. Tot i això, la funció real i precisa *in vivo* d'aquestes «noves» molècules no ha estat ben definida, ja que no es disposava de formes mutants dels gens descrits. L'estudi de l'alteració (*disruption*) de la funció normal d'un gen específic i l'anàlisi del fenotip resultant podrien ser la clau per entendre la funció d'aquests nous gens i de les proteïnes per a

6. EVANS (1981).

les quals codifiquen en un entorn *in vivo* en els organismes complets.

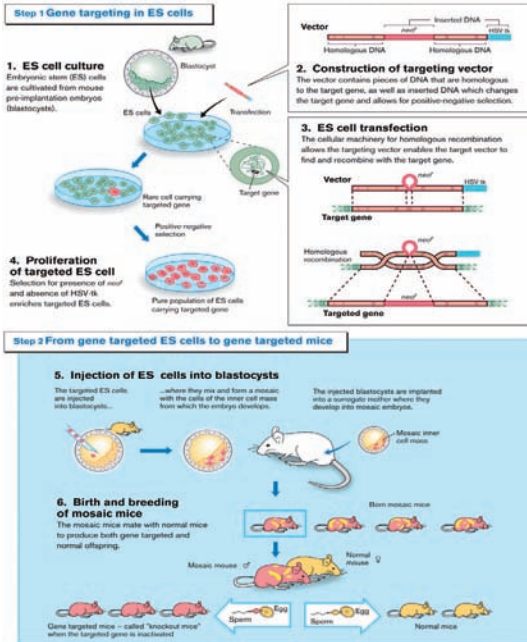
Els primers treballs en què s'utilitzava la recombinació homòloga en cèl·lules mare embrionàries per generar animals transgènics de manera dirigida (*gene targeting*) van ser publicats l'any 1989.⁷ Des de llavors, el nombre de soques de ratolins amb silenciament gènic específic (*knock-outs*) no ha deixat d'augmentar de manera exponencial.

Els ratolins *knock-out* per *gene targeting* es generen per un procediment que consta de dues parts ben diferenciades. En la primera part, el constructe de DNA modificat (que conté l'al·lel alterat o mutat) s'introdueix en una línia de cèl·lules mare embrionàries. Aquestes cèl·lules, que provenen del blastòcit, poden créixer en cultiu durant moltes generacions. En una petita fracció d'aquestes cèl·lules transfectades, el DNA introduït es recombina de manera homòloga, com ja hem explicat, amb el gen diana homòleg endogen, a la vegada que succeeixen també amb més freqüència les recombinacions no homòlogues en diversos llocs dels cromosomes.

Amb la finalitat de seleccionar les cèl·lules en les quals s'hagin produït les recombinacions homòlogues, el constructe de DNA recombinant introduït a les cèl·lules mare embrionàries ha d'albergar dos gens marcadors de selecció diferents (figura 5). Un d'aquests gens (*neo-r*), que confereix la resistència al *G-41S*, ha d'estar inserit dintre del gen diana (*X*) i, per tant, alterar-lo. L'altre gen marcador de selecció, el gen de la timidina-cinasa del virus de l'herpes simple (*HSV-tk*), confereix sensibilitat al ganciclovir (que és un antivíric) i és inserit també al constructe, però fora de la seqüència gènica que es vol alterar (*target gene sequence*). Només les cèl·lules mare embrionàries en les quals s'hagi produït una recombinació homòloga, i que, per tant, no hagin incorporat el gen

7. CAPECCHI (1989) i KOLLER *et al.* (1989).

General strategy for gene targeting in mice



93

FIGURA 5. Estratègia general per obtenir ratolins transgènics per recombinació homòloga i cèl·lules mare embrionàries. 1. *Cultiu de cèl·lules mare embrionàries*. Les cèl·lules mare embrionàries provinents d'embrions preimplantacionals (blastòcits) es cultiven segons com va descriure Martin J. Evans. 2. *Construcció del vector de transferència dirigida* (targeting vector). El vector que utilitzarem conté seqüències de DNA que són homòlogues del gen diana, a més de marcadors de selecció, com ho són el gen de resistència a la neomicina (*neo-r*) i el de la timidina-cinasa del virus de l'herpes simple que confereix sensibilitat a l'antivíric ganciclovir. 3. *Transfecció de les cèl·lules mare embrionàries*. Les cèl·lules es transfecten i es produeix la recombinació homòloga. 4. *Proliferaió de les cèl·lules*. Les cèl·lules es deixen créixer en cultiu i se seleccionen les que han incorporat el vector transfectat per recombinació homòloga mitjançant una selecció positiva-negativa. 5. *Injecció de les cèl·lules en blastòcits* (com s'ha explicat en la figura 2). 6. *Encreuaments successius dels ratolins mosaic per a l'obtenció de cries amb el gen silenciats* (knock-outs). (Il·lustració d'Annika Röhl. Comitè Nobel de Fisiologia o Medicina.)

HSV-tk, podran sobreviure en presència tant del *G-418* com del ganciclovir. En aquestes cèl·lules un al·lel del gen *X* s'haurà modificat.

En la segona part del procés de producció de ratolins *knock-out*, les cèl·lules mare embrionàries heterozigotes per la mutació *knock-out* del gen *X* s'injecten al blastòcit d'un ratolí salvatge receptor, que posteriorment serà transferit a l'oviducte d'una femella pseudogestant (*surrogate pseudopregnant female*) (figura 5). Les cries de la progènie resultant seran químeres, atès que tindran una part de les seves cèl·lules derivada de les cèl·lules trasplantades i l'altra part provindrà de les cèl·lules del blastòcit hoste.

Si les cèl·lules mare embrionàries fossin també homozigòtiques per a una característica fenotípica visible (*marcador*, com podria ser el color del pèl del ratolí), podria ser identificada fàcilment la progènie quimèrica en què les cèl·lules mare embrionàries haurien sobreviscut i proliferat. Els ratolins quimèrics s'encreuarien a continuació amb ratolins homozigots per a un altre al·lel del marcador fenotípic per determinar si la mutació *knock-out* ha estat incorporada a la línia germinal. Finalment, encreuant els ratolins heterozigots per a l'al·lel *knock-out*, es produirà una progènie homozigòtica per a la mutació *knock-out*.

La transferència gènica dirigida com a eina d'estudi de la genètica, les malalties i la biomedicina

La transferència gènica dirigida o *gene targeting* ha esdevingut una tecnologia de pràctica molt estesa, ja que el seu potencial és enorme. Actualment és possible introduir mutacions específiques, per exemple, que poden ser activades en moments precisos i definits, o en cèl·lules específiques o òrgans, tant en el desenvolupament com en l'animal adult.

Pràcticament qualsevol aspecte de la fisiologia dels mamífers pot ser estudiat per *gene targeting*. Aquesta tècnica s'utilitza a hores d'ara en molts laboratoris de recerca de tot el món, i en tants contextos diferents que seria força enrevessat donar detalls exhaustius dels resultats aconseguits fins avui. Això no obstant, presentarem molt breument alguns dels assoliments més recents dels tres guardonats amb el Premi Nobel de Fisiologia o Medicina de l'any 2007.

Per exemple, la *gene targeting* ha permès entendre la funció de molts gens en el desenvolupament fetal dels mamífers. La recerca del guardonat Mario R. Capecchi ha contribuït a descobrir els rols dels gens implicats en el desenvolupament dels òrgans i en l'estructuració i relacions mútues. Això ha constituït un pas molt important per comprendre les causes de moltes malalties congènites i també de malformacions.

Martin J. Evans va aplicar la seva tecnologia principalment al desenvolupament de models murins de malalties humanes. Va aconseguir, per exemple, diversos models de fibrosi quística i va intentar, també, diferents estratègies de teràpia d'aquesta malaltia o el que ara anomenem *teràpia gènica*.

95



FIGURA 6. Els guardonats amb el Premi Nobel de Fisiologia o Medicina de l'any 2007: Mario R. Capecchi, Martin J. Evans i Oliver Smithies.

Oliver Smithies va utilitzar també tota aquesta tecnologia per desenvolupar models murins de malalties hereditàries com la fibrosi quística, com ho va fer Evans, però també de la betatalassèmia, que és una malaltia important de la sang. Va invertir també una gran part de la seva investigació en altres malalties humanes comunes com la hipertensió i l'aterosclerosi.

En conclusió, és molt important remarcar la transcendència de les tecnologies desenvolupades pels tres guardonats i la seva irrupció i àmplia utilització en la recerca en biomedicina. L'impacte dels descobriments explicats aquí no ha fet més que començar i en els propers anys tindrem ocasió de veure encara més avenços en el coneixement dels mecanismes genètics de diferenciació, creixement i desenvolupament de les malalties. L'objectiu final i de més transcendència serà, sens dubte, quan les estratègies terapèutiques d'aquestes malalties n'aconsegueixin la curació. La teràpia gènica comença a ser una realitat des del descobriment de les recombinacions homòlogues que eviten el problema de les insercions de DNA en l'hoste a l'atzar, que poden, com ja hem explicat, interrompre un gen vital per a la supervivència de l'individu o el genoma en alterar la regulació de gens a partir del lloc d'inserció. Aquest és el cas d'alguns dels pacients afectats d'immunodeficiència primària (*nens bombolla*) que van ser tractats per teràpia gènica (amb la inserció del gen de l'adenosina-desaminasa, per exemple): en diverses ocasions, a causa de la interrupció del genoma de l'hoste en el lloc d'inserció, es va posar un oncògen sota la regulació d'un promotor diferent, amb el resultat de l'aparició d'una leucèmia en aquests pacients. Aquest problema, però, no ens ha de fer pensar que la teràpia gènica no pot funcionar; ans al contrari, s'ha de resoldre basant-se en la inserció dirigida (*gene targeting*) i continuar progressant per curar les malalties genètiques.

AGRAÏMENTS

Els autors volen agrair a la doctora Natividad Lobato la preparació de les figures 1, 2 i 3.

BIBLIOGRAFIA

- BRINSTER, R. L.; CHEN, H. Y.; TRUMBAUER, M.; SENEAR, A. W.; WARREN, R.; PALMITER, R. D. (1981). «Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of fusion gene into eggs». *Cell*, vol. 27, núm. 1, p. 223-231.
- CAPECCHI, M. R. (1989). «Altering the genome by homologous recombination». *Science*, vol. 244, p. 1288-1292.
- EVANS, M. J. (1972). «The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells». *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, vol. 28, núm. 1, p. 163-176.
- (1981). «Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation into tissue culture». *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 62, núm. 2, p. 625-631.
- GORDON, J. W.; SCANGOS, G. A.; PLOTKIN, D. J.; BARBOSA, J. A.; RUDDLE, F. H. (1980). «Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 77, núm. 12, p. 7380-7384.
- KLEINSMITH, L. J.; PIERCE, G. B. (1964). «Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells». *Cancer Research*, vol. 24, p. 1544-1551.
- KOLLER, B. H.; HAGEMANN, L. J.; DOETSCHMAN, T.; HAGAMAN, J. R.; HUANG, S.; WILLIAMS, P. J.; FIRST, N. L.; MAEDA, N.; SMITHIES, O. (1989). «Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase

gene by homologous recombination in embryonic stem cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 86, núm. 12, p. 8927-8931.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; MATSUDAIRA, P. (2008). *Molecular cell biology*. Nova York: W. H. Freeman.

REVENTÓS, J.; MUNELL, F. (1997). «Transgenic animal models in reproductive endocrine research». *European Journal of Endocrinology*, vol. 136, p. 566-580.

STEVENS, L. C.; LITTLE, C. C. (1954). «Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 40, núm. 11, p. 1080-1087.