

Experimentació en animals: la revolució dels transgènics

Miquel Garcia i Anna Pujol

Centre de Biologia Molecular i Teràpia Gènica (CBATEG), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Correspondència: Anna Pujol Altarriba. Unitat d'Animals Transgènics (UAT), Centre de Biologia Molecular i Teràpia Gènica (CBATEG), edifici H, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Adreça electrònica: anna.pujol@uab.cat.

DOI: 10.2436/20.1501.02.157
ISSN (ed. impresa): 0212-3037
ISSN (ed. digital): 2013-9802
<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>
Rebut: 20/02/2015
Acceptat: 08/04/2015

Resum

La transgènesi en animals ha estat una eina excepcional per als avenços en biotecnologia i biomedicina. La generació d'animals transgènics que sobreexpressen gens, o genoanullats / genomodificats (*knockout*, KO / *knockin*, KI) que presenten modificacions específiques en determinats gens endògens, sovint per silenciar-los, ha estat clau per a l'anàlisi de la funció gènica i la seva relació amb processos patològics. Aquests animals han esdevingut models de malalties humanes necessaris per desenvolupar noves teràpies i estudis de xenotrasplantament, i han permès millores en l'àmbit de la producció animal. En recerca, però, l'espècie d'elecció ha estat el ratolí, per raons pràctiques i sobretot tecnològiques. Tanmateix, les limitacions tecnològiques per fer transgènesi dirigida en altres espècies es comencen a superar gràcies a la utilització de nucleases específiques de seqüència modificades. Aquesta tècnica està suposant una nova revolució en el camp de la transgènesi animal.

Paraules clau: animal transgènic, genoanullat, biotecnologia, edició del genoma, model animal.

Animals transgènics

En les últimes dècades, la biotecnologia i la biomedicina han mostrat un avenç imparable associat a l'aparició de noves tecnologies. Entre aquestes, l'obtenció d'animals transgènics ha contribuït de manera decisiva a la gran majoria de descobriments científics i mèdics. Ha esdevingut clau en l'anàlisi de la funció gènica, en l'obtenció de models animals de malalties humanes i en el desenvolupament de noves teràpies, tant farmacològiques com gèniques, i en estudis de xenotrasplantament. D'altra banda, els transgènics també s'han utilitzat per aconseguir millores en producció animal.

Va ser al principi dels anys vuitanta que la unió dels coneixements del DNA recombinant i de la reproducció va permetre el desenvolupament de la transgènesi en animals. Els primers van ser els anomenats *transgènics convencionals*, obtinguts per la integració de transgens en un punt a l'atzar del genoma i que permeten l'expressió o sobreexpressió d'un gen determinat. Una dècada després, els treballs d'Evans (1981) en el cultiu i la manipulació de les cèl·lules mare embrionàries murines, i els de Smithies (1985) i Capecchi (1987), en el procés de recombinació homòloga en cèl·lules eucariotes, van obrir la possibilitat de la modificació dirigida del genoma del ratolí (Evans i Kaufman, 1981; Smithies *et al.*, 1985; Thomas i Capecchi, 1987). El desenvolupament d'aquestes tècniques va permetre obtenir ratolins amb un gen específic inactivat (*knockout*, KO) o amb modificacions

Animal research: the transgenics revolution

Summary

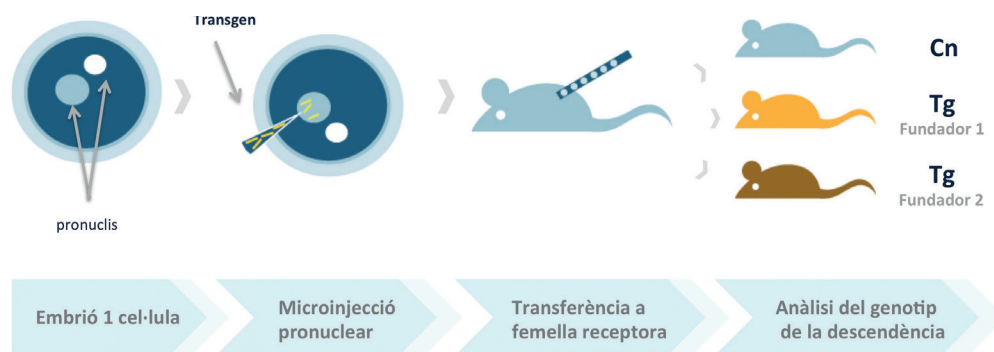
Animal transgenesis has been an essential tool for biotechnology and biomedicine research in recent decades. The generation of transgenic animals that overexpress a certain gene or knockouts/knockins (KO/KI) that carry a modification in a specific endogenous locus have been of key importance in the analysis of gene function and its relationship to pathological processes. These animal models have been used for the development of new therapies and for xenotransplantation studies, as well as to pursue improvements in animal production. Due to practical and mostly methodological reasons, mice have been the species of choice for research purposes. Nowadays, however, the technological limitations of gene targeting in other species are beginning to be overcome through the use of engineered sequence-specific nucleases. This technical advance is leading to a new revolution in the field of animal transgenesis.

Keywords: transgenic animal, knockout, biotechnology, genome editing, animal model.

en un locus determinat (*knockin*, KI). Poc després, la combinació d'aquestes tecnologies amb recombinases específiques de seqüència va permetre desenvolupar animals amb modificacions genètiques dirigides restringides a un tipus celular o induïbles, fet que va obrir el ventall i l'especificitat de les possibles modificacions del genoma a l'abast dels investigadors.

La transgènesi ha estat aplicada amb èxit en múltiples espècies animals, tant vertebrats com invertebrats (Gama Sosa *et al.*, 2010). Tot i així, l'espècie d'elecció per generar transgènics destinats a la recerca és el ratolí. Els genomes humà i de ratolí presenten una homologia elevada i comparteixen la majoria dels gens i els processos fisiològics. Aquestes similituds fan del ratolí un bon model per a l'estudi de la funció gènica i les conseqüències patològiques del seu funcionament anòmal. A més, el ratolí presenta grans avantatges en l'aspecte experimental: un temps de gestació curt (entre 18,5 i 21 dies), l'existència de diferents soques i uns costos de manteniment relativament baixos. Però la principal raó per la qual el ratolí és l'espècie utilitzada majoritàriament en recerca és la possibilitat de treballar amb cèl·lules mare embrionàries murines per fer mutacions dirigides. En altres espècies la manca de disponibilitat d'aquestes línies cellulars, o la baixa eficiència obtinguda en el procés, fa que es requereixin tecnologies més complexes, basades en la transferència de nuclis.

En els últims anys, però, la utilització de nucleases específiques de



.....
 † **Figura 1.** Generació de ratolins transgènics convencionals. El transgèn es microinjecta al pronuclí masculí d'embrions d'una cèl·lula. Els embrió resultants es transfereixen a femelles receptores. Es determina el genotip de la descendència obtinguda per tal d'identificar els ratolins que han incorporat el transgèn (Tg) o els animals control que no l'han incorporat (Cn).

seqüència modificades per generar mutacions dirigides està significativament un nou avenç en el camp de la transgènesi. Aquests sistemes permeten modificar locus concrets del genoma d'animals amb gran eficiència, rapidesa i facilitat, i ho fan possible per a espècies fins ara inaccessibles.

Així, doncs, els continus avenços en el desenvolupament de noves tècniques de transgènesi, que faciliten i fan possible mutacions dirigides en diferents espècies animals, augura un ampli futur en aquest camp, limitat només per l'ètica i la imaginació. En aquest article pretenem exposar com es generen els diferents tipus d'animals transgènics i les seves aplicacions, basant-nos principalment en els models de ratolí perquè, fins al moment, és l'espècie animal d'experimentació per excel·lència.

Ratolins transgènics convencionals

El 1980, Gordon *et al.* van ser els primers a descriure la introducció de DNA forà en el genoma d'un ratolí per microinjecció en el pronuclí masculí d'embrions d'una cèl·lula. Poc temps després, es va aconseguir el primer ratolí transgènic que presentava fenotip. S'hi havia introduït un transgèn que codificava l'hormona de creixement de rata sota el control del promotor de la metal·lotioneïna I, i els ratolins transgènics presentaven un increment corporal important en comparació amb els seus germans no transgènics (Palmiter *et al.*, 1982). Des de llavors, tot i que hi ha diverses possibilitats per introduir el transgèn en el genoma de l'animal (retrovirus, transferència vehiculada per espermatozoides, transposons...), aquesta és la tècnica més utilitzada en ratolí.

Els objectius de la generació d'un animal transgènic convencional són l'expressió o la sobreexpressió de gens endògens o gens d'altres espècies amb un patró d'expressió seleccionat. Per aconseguir-ho cal dissenyar adequadament el transgèn que s'introduirà en el genoma de l'animal. Aquest ha d'estar format per una seqüència promotora, que determinarà on, com i quan s'expressarà el transgèn, i una seqüència codificant, que determinarà el producte gènic que se n'obindrà i que serà el responsable de produir un fenotip. Per exemple, si l'objectiu és aconseguir expressar la proteïna de fluorescència verda (*green fluorescent protein*, GFP) en el múscul esquelètic, el transgèn consistirà en el promotor d'un gen que s'expressi específicament en cèl·lules musculars,

com pot ser l'*MLC* (*miosin light chain*), unit a la regió codificant, o el cDNA del gen *GFP*. A part de l'especificitat de teixit, també es pot determinar el moment de l'expressió del transgèn durant la vida de l'animal. Per això, s'utilitzen sistemes induïbles que s'activen amb l'administració d'un efector, com pot ser la tetraciclina, per via oral o injectat. Normalment, entre el promotor i el cDNA d'interès s'hi inclouen seqüències intròniques heteròlogues, com les del gen de la β -globina del conill, que incrementen l'expressió del transgèn. Amb la mateixa finalitat, a l'extrem 3' s'hi situen seqüències de finalització de la transcripció eucariotes, que inclouen senyals de poliadenilació. Per protegir el transgèn de la possible interacció en la seva expressió dels dominis de cromatina adjacents al punt d'integració, el transgèn pot incorporar elements aïlladors o *insulators* (Wang *et al.*, 1997; Potts *et al.*, 2000).

Quan la mida del transgèn és molt gran, es poden utilitzar cromosomes artificials com els dels bacteris (BAC) o els del bacteriòfag P1 (PAC), que poden incloure fins a 350 kb d'insert, i els de llevat (YAC), que poden incloure més d'1 Mb (Giraldo i Montoliu, 2001). L'avantatge és que tenen la capacitat d'incloure elements reguladors de l'expressió allunyats però necessaris perquè el transgèn s'expressi seguint el patró i la regulació del gen endogen del qual s'ha triat el promotor, i que a més poden actuar com a aïlladors per evitar efectes insercionals.

Els embrions d'una cèl·lula s'obtenen de l'oviducte d'una femella a la qual s'ha induït la superovulació i que s'ha encreuat amb un mascle de la mateixa soca. La microinjecció consisteix en la introducció en el pronuclí masculí de picolitres d'una solució que conté el transgèn en forma lineal i sense seqüències plasmídiques. Els embrions que sobreviuen es transfereixen a l'oviducte d'una femella receptora en estat de pseudogestació, perquè els gestis fins a generar un animal (vegeu la figura 1). Durant aquest procés, una o diverses còpies del transgèn s'integren en tàndem, normalment en un sol punt a l'atzar del genoma i abans de la primera divisió mitòtica. Per això, l'animal que es genera presenta el transgèn integrat en totes les cèl·lules, tant somàtiques com germinals, i serà capaç de transmetre la modificació genètica al 50 % de la descendència, seguint la proporció mendeliana d'un caràcter hemizigòtic o heterozigòtic. Si la inserció del transgèn es fa després de la primera divisió mitòtica, es generen animals mosaic, que es caracteritzen per presentar una transmissió menor del transgèn a la descendència.

El genotip dels animals obtinguts després de la microinjecció es determina per PCR o transferència Southern per identificar els transgènics fundadors, que són aquells que han integrat el transgèn. L'eficiència del procés depèn de diversos factors, entre els quals l'experiència del tècnic, les característiques del transgèn i la soca de ratolí o espècie animal. Cada fundador obtingut s'encreua amb un ratolí no transgènic per generar línies independents. Per cada transgèn, es recomana determinar el fenotip com a mínim en dues línies en paral·lel, per tal d'assegurar que el fenotip observat està produït per l'expressió del transgèn i no per possibles efectes insercionals.

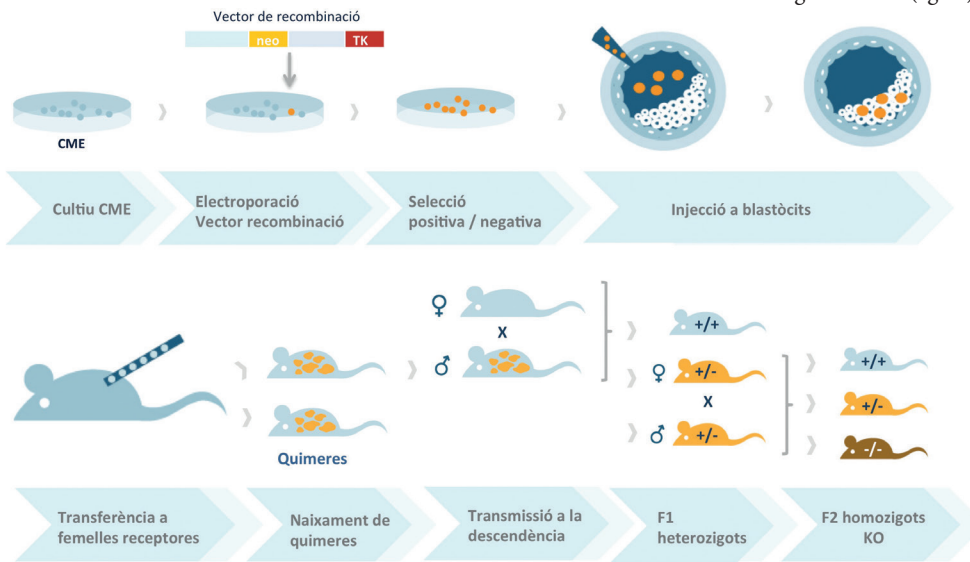
En el cas d'espècies en què la microinjecció del DNA no és tècnicament possible perquè no es poden visualitzar els pronuclis, es po-

den utilitzar vectors vírics com a vehicle per introduir el transgèn al genoma. S'utilitzen vectors retrovírics del tipus lentivirus (derivats del virus de la sida) als quals s'han substituït les seqüències necessàries per al cicle víric pel transgèn, mantenint-ne la capacitat infectiva. Aquest mètode és molt eficient però presenta una sèrie de limitacions: la mida del transgèn no ha de superar les 10 kb perquè es pugui encapsidar dins la partícula vírica, es produeixen punts d'inserció en el genoma múltiples i independents i, finalment, es requereix treballar amb nivells de bioseguretat més estrictes. L'ús de lentivirus va permetre obtenir el primer primat no humà transgènic. Aquest animal expressava la proteïna de fluorescència verda en totes les cèl·lules de l'organisme (Chan *et al.*, 2001).

Ratolins genoanul·lats (*knockout*) i genomodificats (*knockin*) constitutius

La generació de ratolins KO i KI es basa en les tècniques de recombinació homòloga en cèl·lules mare embrionàries (CME). Aquestes s'obtenen de la massa de cèl·lules interna del blastocist. La seva principal característica és la pluripotencialitat, és a dir, el fet que són capaces de generar qualsevol tipus cel·lular. En el cas de les CME murines, aquesta característica es manté fins i tot després de ser modificades genèticament *in vitro*. Així, un cop reintroduïdes en un embrió poden contribuir a generar els diferents llinatges cel·lulars de l'organisme, fins i tot la línia germinal (vegeu la figura 2). Amb aquesta tecnologia s'han obtingut models animals mutants que repliquen fenotips de malalties humanes, com ara diversos tipus de càncer, malalties cardiovasculars, malalties metabòliques, trastorns neurodegeneratius i defectes congènits (Rosenenthal i Brown, 2007). Aquests animals també ofereixen un context biològic en el qual es poden desenvolupar i provar aplicacions terapèutiques.

↓ **Figura 2. Generació de ratolins KO constitutius.** El vector de recombinació s'introdueix per electroporació en cèl·lules mare embrionàries (CME) i se selecciona en cultiu per tal d'obtenir i identificar els clons en què s'ha produït la recombinació homòloga. Aquests s'injecten en blastocists que posteriorment es transfereixen a femelles receptores. Els animals quimera resultants s'encreuen amb animals control (+/+) per tal d'obtenir ratolins heterozigots per a la mutació (+/-). Finalment, els ratolins KO homozigots (-/-) s'obtenen de l'encreuament de dos heterozigots.

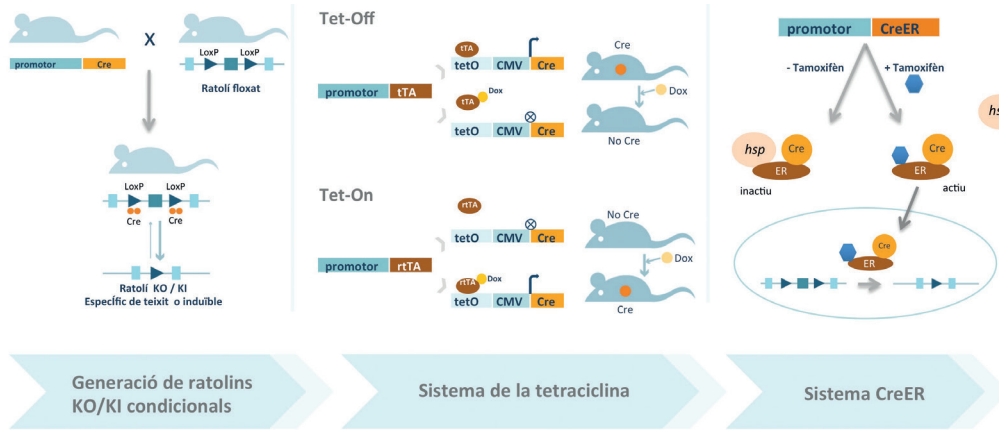


La recombinació homòloga és un procés d'intercanvi de material genètic entre dues molècules de DNA similars. Per induir recombinació homòloga en una regió concreta del genoma de les CME, s'hi introdueix un vector de recombinació per electroporació. Quan l'objectiu és generar un ratolí KO, el vector es construeix de manera que la recombinació produeixi la delecció de seqüències crítiques del locus d'interès, la qual cosa impedeix que es produeixi una proteïna funcional. En el cas dels ratolins KI, l'objectiu és introduir seqüències en una regió genòmica concreta; per exemple, per generar mutacions puntuals o inserir gens marcadors.

El vector de recombinació conté dos fragments o braços homòlegs a les seqüències genòmiques que envolten la regió que es vol modificar. En general, la llargada dels braços és proporcional a la probabilitat de recombinació homòloga (Joyner i Sedivy, 2000). La majoria d'integracions del vector en el genoma són a l'atzar i no per recombinació homòloga. Per tal d'eliminar les integracions a l'atzar, els vectors presenten gens de resistència o sensibilitat a drogues que permetran seleccionar aquells clons en què s'ha produït la modificació específica en la regió d'interès. Els més utilitzats són el gen de resistència a la neomicina (*neo*), que se situa entre els dos braços d'homologia i que permet la selecció positiva dels clons recombinants, i el gen de la timidina-cinasa (*TK*), que confereix sensibilitat a la presència de ganciclovir i que se situa en un extrem del vector i permet la selecció negativa de les integracions a l'atzar.

El genotip dels clons que han superat la doble selecció es determina per transferència *Southern* o PCR. Aquells que tenen la modificació genètica correcta s'integren en embrions perquè contribueixin al desenvolupament de l'animal. Les dues tècniques més utilitzades són la injecció de les CME recombinants en blastocists i l'agregació o injecció a embrions en l'estadi de vuit cèl·lules. Després de la manipulació, els embrions es transfereixen a l'úter d'una femella receptora perquè els gesti. Dels embrions en naixeran ratolins quimera, formats per la contribució de l'embrió i de les CME modificades genèticament. Una variant de la tècnica és la utilització d'embrions tetraploides, que permet generar animals totalment derivats de les CME amb la modificació genètica.

No totes les soques de ratolí són bones per produir línies estables de CME ni per ser utilitzades com a donadores d'embrions. Actualment es disposa de diferents línies de CME. Les més utilitzades són les de fons genètic 129 (agutí) (Brook i Gardner, 1997) i les C57BL/6N (negres o agutís) (Pettitt *et al.*, 2009). Les cèl·lules amb caràcter agutí s'injecten en blastocists C57BL/6 negres per donar lloc a quimeres que presentaran dos colors. Així, el color de pelatge de la quimera es pot relacionar amb el grau de contribució de les CME en la generació de l'animal. En els ratolins amb un grau de quimerisme elevat és més probable que les CME recombinants hagin colonitzat la línia germinal i que la quimera pugui transmetre la mutació a la descendència. Els animals obtinguts hauran rebut la modificació genètica en heterozigosi (+/-) i, per tant, caldrà encreuar-los per obtenir finalment ratolins homozigots (-/-) KO o KI.



↑ Figura 3. Generació de ratolins KO específics de teixit i induïbles. a) Sistema de recombinases Cre-LoxP. Un transgènic que expressa la recombinasa Cre sota el control d'un promotor específic de tipus cel·lular o un sistema induïble, s'encreua amb un ratolí floxat, que presenta una regió crítica del gen d'interès flanquejada per seqüències LoxP. La recombinació es donarà només en els tipus cel·lulars en què s'expressi la recombinasa Cre. b) Sistema induïble de la tetraciclina. Està format per dos elements, un transactivador (*tTA*, *rtTA*) i un operador (*tetO*) que expressarà Cre. La unió de tetraciclina al transactivador produeix la inhibició del sistema (*tTA*, Tet-Off) o bé l'activació (*rtTA*, Tet-On). c) Sistema induïble del tamoxifèn. Està basat en una recombinasa Cre unida al domini d'unió del receptor d'estrògens (CreER). En absència de tamoxifèn, Cre és retinguda al citoplasma per les *heat shock proteins* (HSP) i per tant resta inactiva. La presència de tamoxifèn desplaça les HSP i permet que la recombinasa migri cap al nucli i produeixi la recombinació.

Aquests animals presenten la modificació genètica dirigida de manera constitutiva.

En altres espècies animals ha estat molt difícil o impossible establir línies de CME. En aquests casos, la generació d'animals KO o KI requereix un procés de transferència de nuclis, més complex i molt menys eficient. Aquest procés es basa en la transferència del nucli d'una cèl·lula somàtica en la qual hem introduït una modificació genètica, en un oòcit enucleat. Posteriorment l'oòcit s'activa per tal que iniciï el desenvolupament embrionari fins a generar l'animal mutant que contindrà la informació genètica amb la modificació desitjada. El primer mamífer clonat per transferència de nuclis va ser l'ovella Dolly (Campbell *et al.*, 1996).

Els animals KO i KI constitutius tenen la mutació en totes les cèl·lules de l'organisme i durant tota la vida, incloent-hi el període embrionari. Per aquest motiu, sovint presenten fenotips complexos, per la contribució de diferents tipus cel·lulars. A més, els efectes de la modificació genètica durant el període embrionari també afegeixen complexitat al fenotip i poden arribar fins i tot a provocar mort embrionària. Per superar aquestes limitacions es va desenvolupar la tecnologia de generació de KO condicionals, que permet generar modificacions específiques de teixit o induïbles, segons si es determina el tipus cel·lular o el moment de la vida de l'animal en què es produeix la modificació.

Ratolins genoanul·lats i genomodificats específics de teixit i induïbles

La generació d'animals KO i KI condicionals es basa en la utilització de sistemes de recombinases específiques de seqüència juntament amb les tècniques de recombinació homòloga en CME. El sistema de

recombinases més habitual és el Cre-LoxP, tot i que n'hi ha d'altres, com l'Flp-FRT, que funcionen de manera similar (Nagy, 2000; Zhu i Sadowski, 1998). Està format per un enzim amb activitat recombinasa (Cre) que reconeix específicament dues unitats d'una determinada seqüència de nucleòtids (*LoxP*) i les recombinava (vegeu la figura 3). Cada *LoxP* consisteix en 34 pb formats per dos extrems invertits de 18 pb i un cor central de 8 pb asimètric que hi confereix direccionalitat. El resultat de la recombinació entre dos *LoxP*

depèn de l'orientació relativa de les dues seqüències. Si es troben en la mateixa orientació, la recombinació produeix la deleció del fragment de DNA flanquejat pels dos *LoxP*, de manera que queda un únic *LoxP* en la seqüència de DNA original. Si l'orientació és inversa, es produeix la inversió de la seqüència de DNA flanquejada pels dos *LoxP* (Hamilton i Abremski, 1984).

L'obtenció de KO i KI condicionals requereix encreuar dos tipus de ratolins (vegeu la figura 3): d'una banda, un ratolí generat per recombinació homòloga en CME anomenat *floxat*, perquè s'hi han introduït dues seqüències *LoxP*, normalment en la mateixa orientació (per tal de no afectar l'expressió del gen, els *LoxP* se solen situar en regions intròniques i flanquejant un o diversos exons crítics), i, de l'altra banda, un ratolí transgènic convencional que expressa Cre sota el control d'un promotor específic de teixit o un sistema induïble; en els descendents, el patró d'expressió d'aquest promotor determinarà el tipus cel·lular i el moment en què es produirà la recombinació i, per tant, la modificació genètica.

Els sistemes induïbles es basen en el control temporal de la transcripció o activitat de Cre. Això permet produir la modificació que ens interessa en un moment determinat de la vida de l'animal. Els més utilitzats són el sistema de la tetraciclina i el del tamoxifèn (vegeu la figura 3). El sistema de la tetraciclina controla la transcripció de l'enzim Cre mitjançant l'administració a l'animal de l'antibiòtic doxiciclina, normalment a través de la beguda. Consisteix en l'expressió d'un transactivador (*tTA* en el sistema Tet-Off, o *rtTA* en el sistema Tet-On) que s'unirà al seu operador i promourà l'expressió de Cre depenent de la presència (Tet-On) o de l'absència (Tet-Off) de la doxiciclina, que actua com a efector. Per tant, l'administració de doxiciclina a l'animal permet controlar la transcripció de la recombinasa Cre i induir la modificació genètica (Gossen *et al.*, 1995).

El sistema del tamoxifèn consisteix en una proteïna Cre quimèrica, fusionada amb el domini d'unió d'un receptor nuclear d'estrògens (CreER, CreERT2) que ha perdut la capacitat d'unir-se a hormones endògenes, però que pot unir-se a agonistes d'estrògens com el tamoxifèn o a l'esteroid sintètic RU486. La CreER queda retinguda al citoplasma per la unió a les proteïnes hsp90 (*heat-shock proteins*) i, per tant, resta inactiva. L'administració de tamoxifèn o RU486 desplaça les hsp90 i permet el moviment de la CreER al nucli cel·lular, on produirà la recombinació dels dos *LoxP* (Metzger *et al.*, 1995; Feil *et al.*, 1997). La combinació dels sistemes específics de teixit i els induïbles permet un gran ventall de possibilitats d'introduir mutacions restringides a un tipus cel·lular i en un moment determinat.

Actualment, la comunitat científica disposa de recursos importants per a l'obtenció i la distribució de ratolins KO. Destaca l'International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC, <http://www.mousephenotype.org>), que té com a objectiu generar ratolins KO de tots els gens murins i, paral·lelament, actua com a repositori de ratolins i de CME modificats, que distribueix als investigadors interessats. Aquest consorci també duu a terme l'anàlisi fenotípica dels animals generats i en publica les dades obtingudes. Hi ha altres recursos per obtenir informació i ratolins, tant floxats com transgènics que expressen Cre; per exemple, The Jackson Laboratory (<http://jax.org>) o bases de dades de ratolins transgènics que expressen Cre (http://nagy.mshri.on.a/cre_new).

Noves tecnologies: nucleases específiques de seqüència modificades

Tot i que la modificació dirigida d'un locus genòmic per recombinació homòloga en CME és la tècnica més utilitzada per generar ratolins mutants, l'eficiència global del procés és baixa, econòmicament costosa i restringida bàsicament a aquesta espècie.

En els últims anys, el desenvolupament de sistemes d'edició del genoma mitjançant nucleases específiques de seqüència modificades (NESM) està representant la possibilitat de modificar el genoma de manera dirigida (Swarthout *et al.*, 2011; Joung i Sander, 2013; Cong i Zhang, 2015). L'edició del genoma mitjançant NESM es basa en els processos cel·lulars de reparació del DNA. Les NESM es dissenyen per tallar la cadena de DNA específicament en un punt del genoma. La reparació d'aquest tall es pot donar per dues vies. La primera, mitjançant un procés d'unió no homòloga d'extremes (*non-homologous end join*, NHEJ), que repara el tall a la doble cadena de DNA per inserció a l'atzar de nucleòtids. Aquesta via sol provocar insercions i delecions que tenen per resultat la disrupció del gen d'interès. La segona via és a través d'un procés de recombinació homòloga (*homologous recombination*, HR) o de reparació dirigida per homologia (*homologous direct repair*, HDR) entre el gen d'interès i una seqüència donant de DNA, un vector de recombinació o un oligonucleòtid de seqüència homòloga, que s'ha introduït a la cèl·lula juntament amb la NESM. Aquests sistemes permeten reparar el tall i introduir seqüències de DNA en la regió específica del genoma.

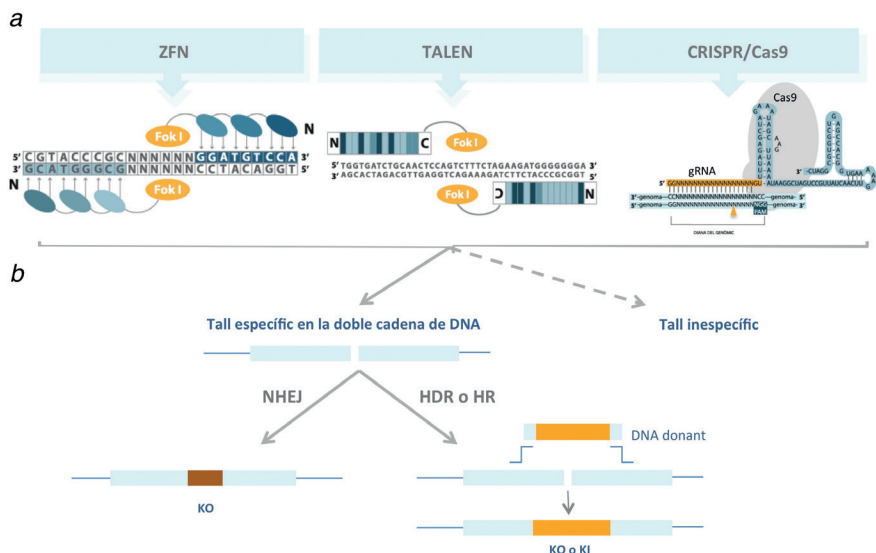
Les primeres NESM utilitzades per editar el genoma van ser les ZFN, nucleases de dit de zinc (*zinc finger nucleases*) (Urnov *et al.*, 2010). Són molècules híbrides que combinen de tres a sis dominis d'unió a DNA amb el domini endonucleasa de l'enzim FokI. Cada domini reconeix un determinat triplet de nucleòtids, de manera que la ZFN presenta especificitat per una seqüència entre nou i divuit nucleòtids. El tall de la doble cadena es produeix quan FokI dimeritza, i per això es requereixen dues ZFN independents, que s'uneixen a cada cadena de DNA en l'orientació i la distància adequades. Les principals limitacions d'aquesta tecnologia són degudes a la dificultat de dissenyar el domini d'unió per aconseguir especificitat. Mitjançant ZFN s'ha descrit un increment de l'eficiència de recombinació homòloga en CME i s'han generat ratolins KI per mi-

croinjecció pronuclear (Meyer *et al.*, 2010). També s'han generat modificacions dirigides amb ZFN en rates KO (Geurts *et al.*, 2009), així com en moltes altres espècies (Wijshake *et al.*, 2014).

El 2009 es van descriure les TALEN, formades també pel domini nucleasa FokI i una regió de reconeixement del DNA. A diferència de les ZFN, aquesta regió conté unitats repetides entre 33-35 aminoàcids, altament conservats, excepte els de la posició 12 i 13, anomenats *repeat-variable di-residues* (RVD), que confereixen especificitat de seqüència d'unió a un nucleòtid. Aquesta característica permet a les TALEN una resolució més gran del lloc de tall en el genoma. De la mateixa manera que les ZFN, les TALEN permeten editar el genoma amb elevada eficiència, però amb menys talls inespecífics. Aquestes nucleases s'han utilitzat en transgènesi per modificar el genoma d'altres espècies, com la rata, el peix zebra, la vaca o el porc (Wijshake *et al.*, 2014). Recentment s'han utilitzat TALEN per introduir modificacions genètiques en fibroblasts i generar porcs mutants per transferència nuclear, útils per a estudis de xenotrasplantament (Xin *et al.*, 2013).

El 2012 va aparèixer un nou sistema, el CRISPR/Cas9 (*clustered, regulatory interspaced, short, palindromic repeats / nuclease CRISPR associated*), una tecnologia d'edició del genoma revolucionària. Les CRISPR/Cas són essencials en la immunitat adaptativa de determinats bacteris i arqueus contra material genètic extern, com ara virus o altres patògens (Wiedenheft *et al.*, 2012). Es tracta d'una ribonucleoproteïna constituïda per l'enzim endonucleasa Cas9, que talla la doble cadena de DNA, i una guia de RNA (gRNA) responsable del reconeixement de la seqüència diana. Aquest RNA està compost per 20 pb que reconeixen la seqüència diana, més la seqüència 5'-NGG-3' coneguda com a PAM. Aquests tres nucleòtids són reconeguts per la Cas9 i són imprescindibles.

.....
 ↓ **Figura 4. Edició del genoma mitjançant nucleases específiques de seqüència modificades (NESM).** a) Estructura de les ZFN, TALEN i CRISPR/Cas9. b) Les NESM actuen generant un tall en un lloc específic de la cadena de DNA. La reparació d'aquest tall es pot produir per diferents mecanismes. Si es fa mitjançant la unió no homòloga d'extremes (NHEJ) dona lloc a petites insercions o delecions que poden portar a la generació de KO. En presència d'un vector de recombinació o d'un oligonucleòtid de seqüència homòloga, pot tenir lloc una recombinació homòloga (HR) o reparació dirigida per homologia (HDR) que permet generar KO/KI.



bles per al funcionament del sistema. Un cop reconeguda la seqüència diana, la nucleasa tallarà el DNA tres nucleòtids cadena amunt de la seqüència PAM. A diferència de les ZFN i les TALEN, aquest sistema només requereix la síntesi de gRNA. Per aquesta facilitat de disseny i obtenció, i la gran eficiència, el CRISPR/Cas s'està convertint en el sistema d'edició del genoma (Yang *et al.*, 2014).

La principal limitació de les NESM és que també produeixen talls en altres llocs a part de la seqüència diana. Això comporta la introducció de mutacions no desitjades, difícils de predir i de comprovar. Per això, els estudis actuals s'estan centrant a millorar aquests sistemes per reduir-ne els efectes adversos. Per exemple, en el cas de les CRISPR/Cas9 s'ha descrit un mutant (D10A) que converteix la nucleasa en una DNA nickase, capaç de tallar una sola cadena del DNA (Ran *et al.*, 2013). D'altra banda, també s'ha produït un CRISPR gRNA, que utilitza la nucleasa FokI en comptes de la Cas9 i, per tant, requereix actuar en forma de dímer, com les ZFN i les TALEN (Tsai *et al.*, 2014). La necessitat de reconèixer dues seqüències o de dimeritzar per poder tallar les dues cadenes de DNA permet reduir els efectes inespecífics sense disminuir l'eficiència del sistema.

Bibliografia

- BROOK, F. A.; GARDNER, R. L. (1997). «The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 5709-5712.
- CAMPBELL, K. H. [et al.] (1996). «Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line». *Nature*, 380: 64-66.
- CHAN, A. W. [et al.] (2001). «Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes». *Science*, 291: 309-312.
- CONG, L. [et al.] (2013). «Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas Systems». *Science*, 339: 819-823.
- CONG, L.; ZHANG, F. (2015). «Genome engineering using CRISPR-Cas9 system». *Methods Mol. Biol.*, 1239: 197-217.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. (1981). «Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos». *Nature*, 292: 154-156.
- FEIL, R. [et al.] (1997). «Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 237: 752-757.
- GAMA SOSA, M. A. [et al.] (2010). «Animal transgenesis: an overview». *Brain Struct. & Funct.*, 214: 91-109.
- GEURTS, A. M. [et al.] (2009). «Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases». *Science*, 325 (5939): 433.
- GIRALDO, P.; MONTOLIU, L. (2001). «Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals». *Transgenic Res.*, 10: 83-103.
- GORDON, J. W. [et al.] (1980). «Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7380-7384.
- GOSSEN, M. [et al.] (1995). «Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells». *Science*, 268: 1766-1769.
- HAMILTON, D. L.; ABREMSKI, K. (1984). «Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites». *J. Mol. Biol.*, 178: 481-486.
- JOUNG, J. K.; SANDER, J. D. (2013). «TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 14: 49-55.
- JOYNER, A. L.; SEDIVY, J. M. (2000). *Gene targeting: a practical approach*. Oxford; Nova York: Oxford University Press.
- METZGER, D. [et al.] (1995). «Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 6991-6995.
- MEYER, M. [et al.] (2010). «Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 15022-15026.
- NAGY, A. (2000). «Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring». *Genesis*, 26: 99-109.
- NIU, Y. [et al.] (2014). «Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos». *Cell*, 156: 836-843.
- PALMITER, R. D. [et al.] (1982). «Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes». *Nature*, 300: 611-615.
- PETTIT, S. J. [et al.] (2009). «Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources». *Nat. Methods*, 6: 493-495.
- POTTS, W. [et al.] (2000). «Chicken beta-globin 5'HS4 insulators function to reduce variability in transgenic founder mice». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273: 1015-1018.
- RAN, F. A. [et al.] (2013). «Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity». *Cell*, 154: 1380-1389.
- ROSENTHAL, N.; BROWN, S. (2007). «The mouse ascending: perspectives for human-disease models». *Nat. Cell Biol.*, 9: 993-999.
- SERUGGIA, D.; MONTOLIU, L. (2014). «The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals». *Transgenic Res.*, 5: 707-716.
- SMITHIES, O. [et al.] (1985). «Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination». *Nature*, 317: 230-234.
- SWARTHOUT, J. T. [et al.] (2011). «Zinc finger nucleases: A new era for transgenic animals». *Ann. Neurosci.*, 18: 25-28.
- THOMAS, K. R.; CAPECCHI, M. R. (1987). «Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells». *Cell*, 51: 503-512.
- TSAI, S. Q. [et al.] (2014). «Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing». *Nat. Biotechnol.*, 32: 569-576.
- URNOV, F. D. [et al.] (2010). «Genome editing with engineered zinc finger nucleases». *Nat. Rev. Genet.*, 11: 636-646.
- WANG, Y. [et al.] (1997). «Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice». *Nat. Biotechnol.*, 15: 239-243.
- WIEDENHEFT, B. [et al.] (2012). «RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea». *Nature*, 482: 331-338.
- WIJSHAKE, T. [et al.] (2014). «Endonucleases: new tools to edit the mouse genome». *Biochim. et Biophys. Acta*, 10: 1942-1950.
- XIN, J. [et al.] (2013). «Highly Efficient Generation of GGTA1 Biallelic Knockout Inbred Mini-Pigs with TALENs». *PLoS One*, 8, e84250.
- YANG, H. [et al.] (2014). «Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering». *Nat. Protoc.*, 9: 1956-1968.
- ZHU, X. D.; SADOWSKI, P. D. (1998). «Selection of novel, specific single-stranded DNA sequences by F1p, a duplex-specific DNA binding protein». *Nucleic Acids Res.*, 26: 1329-1336.