

EL RATOLÍ COM A SISTEMA MODEL EN BIOLOGIA

ANNA MERLOS-SUÁREZ

Programa d'Oncologia, Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona

Adreça per a la correspondència: Anna Merlos-Suárez. Institut de Recerca Biomèdica.
C. de Baldiri Reixac, 10. 08028 Barcelona. Adreça electrònica: anna.merlos@irbbarcelona.org.

RESUM

Des de l'establiment de les primeres soques de laboratori al començament del segle xx, el ratolí s'ha convertit en una eina fonamental en la recerca en biologia. Múltiples models experimentals han permès ampliar el nostre coneixement en camps com l'embriogènesi, la fisiologia o la biomedicina, entre d'altres. El desenvolupament de les tecnologies de modificació genètica ha consolidat definitivament el ratolí com el mamífer d'elecció a l'hora de caracteritzar patrons d'expressió, funcions i interaccions entre gens, així com en la modelització de malalties humanes i l'assaig de nous fàrmacs. Aquest capítol pretén oferir una visió general de les àmplies possibilitats que es deriven de l'ús del ratolí en el laboratori i inclou exemples que demostren per què és un element clau en la recerca en biologia actualment.

Paraules clau: soca, cèl·lula, expressió gènica, mutació, model transgènic.

THE MOUSE AS A MODEL SYSTEM IN BIOLOGY

SUMMARY

Since the beginning of the 20th century, when the first laboratory strains were developed, the mouse has become a central tool in biological research. Many experimental models have allowed the broadening of our knowledge in scientific fields such as embryogenesis, physiology or biomedicine. Development of genetic modification techniques has definitely established the mouse as the mammal organism of choice for the characterization of gene expression patterns, functions and interactions among genes as well as for the modeling of human diseases and drug testing. This chapter wants to offer a general view on the possibilities derived from the use of the mouse in the laboratory, and includes examples showing why it has become a key element in biological research.

Key words: strain, cell, gene expression, mutation, transgenic model.

INTRODUCCIÓ

La utilització del ratolí (*Mus musculus*) com a animal d'experimentació es remunta al segle XVII, però no va ser fins al principi del segle XX que les primeres soques que actualment s'utilitzen en el laboratori van començar a generar-se. Ja en aquell moment es va fer evident la necessitat que els animals utilitzats per a la recerca en el laboratori representessin una població el més uniforme possible per tal de garantir la fiabilitat i reproductibilitat de les observacions fetes. Així, l'any 1909 C. C. Little va establir la primera soca de ratolí endogàmica (Russell, 1978) amb l'objectiu de reduir la variabilitat genètica entre els seus individus. D'aquesta manera es generava una homogeneïtat que permetia que les úniques variables existents fossin aquelles introduïdes i controlades per l'investigador. A part de les soques endogàmiques, i utilitzant diferents sistemes d'encreuament, s'han generat també altres tipus de soques (híbrides, congènites, exogàmiques, etc.) cadascuna amb diferents característiques pel que fa a la susceptibilitat a determinades malalties, durada de la vida fèrtil,

nombre de cries per part, producció d'hormones, competència immunitària i un llarg etcètera que s'ha de considerar amb cura a l'hora d'escollir quina s'adapta millor als requisits de l'experiment que farem. La figura 1 mostra la imatge de dues de les soques més utilitzades normalment en el laboratori, la C57BL/6 i la Nude, i una llista de totes les soques de ratolí de laboratori disponibles pot trobar-se a <http://www.informatics.jax.org/>.

Però a part de la diversitat genètica, els factors ambientals als quals els animals d'experimentació estan sotmesos poden també introduir un grau de variabilitat que afecta els resultats obtinguts i la interpretació. Per aquest motiu el control de les condicions en les quals els ratolins són estabulats és fonamental. Dieta, temperatura i humitat, hores de llum, control d'infeccions per patògens o estrès són alguns dels paràmetres que es regulen de manera estricta per garantir tant la qualitat dels experiments com el benestar dels animals. Precisament, aquest últim és un altre dels aspectes que s'ha de considerar més seriosament a l'hora de treballar amb ratolins en el laboratori. Tots els protocols experi-

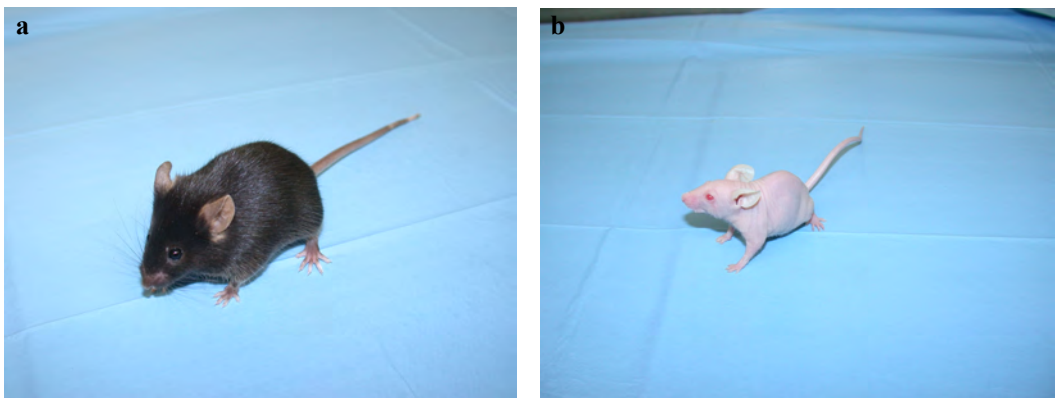


FIGURA 1. El ratolí com a model en el laboratori. La gran varietat de soques de ratolí de laboratori disponibles actualment permet l'elecció d'aquelles que s'ajusten millor al disseny experimental en funció de les seves característiques. a) Ratolí de la soca C57BL/6, normalment anomenada «Black 6». b) Ratolí immunodeficient de la soca Nude.

mentals que involucren l'ús de ratolins han de ser aprovats per un comitè ètic que valora si compleixen la legislació vigent. D'aquesta manera, es pretén assegurar que el patiment dels animals durant el procediment es redueix al màxim, així com que el nombre d'animals utilitzats és el mínim indispensable.

Són diverses les característiques que converteixen el ratolí en un dels models més emprats en la recerca en biologia. Un dels seus principals avantatges és la similitud que té amb l'ésser humà tant a escala genètica com anatòmica i fisiològica. Això se suma la seva mida petita, que en comparació de la resta de mamífers usats en el laboratori (rata, conill, porc, gos, etc.) en facilita la manipulació i estabulació. A més, la durada del cicle reproductiu (entre dinou i vint-i-un dies en funció de la soca) i l'elevat nombre de cries en cada ventrada (de quatre a catorze també depenent de la soca) fan que la formació de colònies i l'anàlisi de la descendència siguin relativament ràpids. Finalment, les tècniques de manipulació genètica han demostrat funcionar de manera molt eficient en el ratolí, fet que n'incrementa encara més el potencial com a model de laboratori. No obstant això, i com succeeix també en altres models de vertebrats, hi ha factors com la redundància genètica que de vegades en dificulten l'ús.

A continuació, es comenten les principals aplicacions del ratolí com a organisme model en biologia i s'inclouen alguns exemples que en demostren la utilitat, fent especial èmfasi en els ratolins modificats genèticament.

PRINCIPALS APLICACIONS DEL RATOLÍ EN EL LABORATORI

Aquest apartat comenta de manera breu alguns dels usos més comuns del ratolí. Les aplicacions del ratolí en el laboratori són molt àmplies i abasten l'estudi de pràcticament tots els aspectes de la biologia i patofisiologia de l'organisme. El ratolí ha resultat ser un model molt útil en camps com el desenvolupament embrionari, l'homeòstasi de teixits adults, la fisiologia o l'etologia. El gran nombre d'estudis existents en cadascun d'aquests camps dificulta resumir-los i va més enllà de l'abast d'aquest capítol. Tanmateix, per a una informació àmplia i detallada sobre aquests aspectes el llibre *The laboratory mouse* és una excel·lent referència (Hedrich *et al.*, 2006).

Assaigs preclínic

L'ús del ratolí és de gran importància en els assaigs preclínic de fàrmacs de desenvolupament nou. Abans que aquests compostos siguin aprovats per utilitzar-los en humans (assaigs clínics), la toxicitat, farmacocinètica i eficàcia han de ser avaluades en el laboratori amb l'objectiu d'establir els possibles beneficis o riscos derivats de l'administració i d'optimitzar-ne les condicions. Un dels exemples més habituals és el dels assaigs preclínic de teràpies antitumorals (Kelland, 2004). La base d'aquests assaigs és la injecció en ratolins de cèl·lules cancerígenes humanes que creixen i donen lloc a tumors similars als que desenvolupen els pacients. Els animals són aleshores tractats amb els fàrmacs en prova seguint diferents pautes i dosis d'administració, i es monitoren paràmetres com l'eficàcia en l'eliminació de cèl·lules cancerígenes o els possibles efectes secundaris. La soca de ratolí utilitzada en aquests experi-

ments és un factor crític per garantir-ne l'èxit. Els xenoempelts, o implantacions de cèl·lules procedents d'una altra espècie (en aquest cas humanes), desencadenen en l'hoste una resposta immunitària destinada a reconèixer i eliminar les cèl·lules estranyes. Així, per evitar el rebuig de les cèl·lules tumorals humanes cal utilitzar soques immunodeprimides, que no tenen la capacitat de respondre immunitàriament a antígens externs i destruir-los. Dues de les soques de ratolins immunodeprimits més utilitzades en el laboratori són la Nude (vegeu la figura 1b), que no té timus, i per tant, no té limfòcits T per una mutació en el gen *Foxn1* (Segre *et al.*, 1995), i la NOD Scid, portadora d'una mutació que afecta la funció dels limfòcits B i T (Fullop i Phillips, 1990). És important tenir en compte que a més de ser molt útils en experiments de tumorigenicitat i assaigs preclínic, aquestes soques representen en si mateixes models animals per a síndromes d'immunodeficiències humanes.

Models de malalties humanes

Una de les aplicacions que fa del ratolí un dels animals més emprats en biologia és la seva relativa similitud amb l'ésser humà i el potencial que això representa a l'hora de generar models que reproduïen de manera fidel malalties humanes i que permetin tant l'estudi del desenvolupament com l'assaig de teràpies experimentals. La generació d'un model acurat de malaltia humana requereix, en molts casos, la manipulació genètica dels animals (vegeu més endavant). Això només és possible quan les alteracions gèniques responsables d'iniciar la malaltia són conegudes, almenys en part, i suposa a més un disseny experimental molt complex i una important inversió econòmica. No obstant això,

hi ha també models de malalties generats sense necessitat d'alterar el material genètic de l'animal i mitjançant, per exemple, l'administració de substàncies (toxines, hormones, etc.) o intervencions quirúrgiques que induïen condicions comparables a les descrites en certes malalties. Aquest és el cas d'alguns models de pancreatitis, inflamació del pàncrees que quan cursa de manera crònica és un possible factor de risc per al desenvolupament de càncer de pàncrees. L'administració d'anàlegs hormonals com la ceruleïna o l'obstrucció del conducte pancreàtic mitjançant el lligament provoquen lesions equivalents a les que pateixen els pacients de pancreatitis i proporcionen un model a partir del qual podem estudiar, per exemple, les possibles estratègies per a la regeneració d'aquest òrgan (Sakaguchi *et al.*, 2006). Un altre model molt utilitzat en el laboratori és el de la colitis ulcerativa, que és induïda mitjançant l'administració en l'aigua d'un potent agent inflamatori (dextran sodi sulfat, DSS) que provoca l'erosió de l'epiteli colònic i reproduceix així la simptomatologia dels pacients d'aquesta malaltia (Okayasu *et al.*, 1990).

Producció d'anticossos monoclonals

La producció d'anticossos monoclonals destinats a la detecció o purificació de determinats antígens, o fins i tot en alguns casos al tractament de certes malalties, se serveix també del ratolí com una de les seves principals eines. La tecnologia dels anticossos monoclonals es va desenvolupar fa més de trenta anys (Schwaber i Cohen, 1973) i representa una de les aplicacions més importants del ratolí en el laboratori.

RATOLINS MODIFICATS GENÈTICAMENT

Els ratolins modificats genèticament permeten estudiar pràcticament tots els aspectes de la fisiologia i patologia animal a escala dels gens que hi són implicats. Aquest avanç ha esdevingut possible gràcies al desenvolupament de la tecnologia del DNA recombinant, que permet la manipulació del genoma de manera que es poden mutar (afegir, substituir o eliminar) seqüències, en funció de quines siguin les preguntes que l'investigador es planteja i la informació que es vol obtenir. A continuació es comenten els diferents tipus de modificació genètica existents i la metodologia per generar animals modificats genèticament i algunes de les seves aplicacions.

Mutagènesi a l'atzar

La mutagènesi a l'atzar, com el seu nom indica, consisteix en l'alteració de seqüències genòmiques que no han estat prèviament determinades per l'investigador. Aquesta metodologia s'empra quan l'objectiu de l'estudi és identificar gens implicats en un determinat procés biològic, sense haver fet una decisió prèvia sobre els gens que es volen investigar. Al contrari de les tècniques que es comenten més endavant, en aquest cas el subjecte d'interès no és un gen determinat sinó un fenotip, i per tant l'investigador seleccionarà per a l'anàlisi aquells gens que, en ser mutats, afecten el fenotip d'estudi (assaig basat en el fenotip). Tècnicament, això s'aconsegueix mitjançant l'administració d'un agent (químic o radiació) que indueix mutacions en el genoma del ratolí de manera aleatòria. El mutagen químic més àmpliament utilitzat és l'etilnitrosourea (ENU), un compost alquilant que provoca mutacions puntuals

en el DNA (Russell *et al.*, 1979). Si aquestes mutacions recauen en la seqüència corresponent a un gen o en una de les regions que en controlen l'expressió, es pot produir un guany o pèrdua de funció, de manera que les vies de senyalització o processos biològics en els quals participa aquest gen es poden veure afectats. Les mutacions que afectin les cèl·lules germinals de l'animal tractat són transmises a la seva descendència, de manera que cada ratolí fill incorpora una mutació única i diferent de la dels seus germans de ventrada. L'anàlisi del fenotip d'interès en cadascun d'aquests animals genèticament manipulats permet identificar aquelles mutacions que provoquen una alteració en aquest fenotip, i per tant, els gens que hi estan involucrats (Nolan *et al.*, 2000). Un exemple de la utilitat de la mutagènesi a l'atzar són els estudis fets pel grup de K. V. Anderson, en els quals el procés biològic d'interès és la morfogènesi durant el desenvolupament embrionari. Amb l'objectiu d'identificar gens que participen en aquest procés es va administrar ENU a un grup de ratolins que posteriorment es van encreuar amb animals salvatges per obtenir-ne descendència. Els investigadors van analitzar els embrions derivats d'aquests encreuaments i van seleccionar aquells que presentaven anomalies morfològiques en comparació d'embrions salvatges. Mitjançant tècniques de seqüenciació i lligament genètic, es van identificar quaranta-tres gens que en ser mutats generen defectes en la morfogènesi. Cal destacar que trenta-vuit d'aquests quaranta-tres gens no havien estat estudiats prèviament, cosa que demostra el poder d'aquesta tècnica a l'hora d'identificar i relacionar nous gens amb processos i vies de senyalització coneguts (García-García *et al.*, 2004).

L'acció mutagènica de l'ENU ha estat utilitzada per al cribratge de gens descrita a

dalt, i a més per a la inducció de tumorigènesi en animals amb alteracions genètiques, amb l'objectiu d'establir si aquestes proporcionen predisposició al desenvolupament tumoral (Mitsumori *et al.*, 2000).

Ratolins transgènics

Una de les aproximacions experimentals més utilitzades a l'hora de caracteritzar la funció d'un gen es basa a induir-ne la sobreexpressió introduint a l'atzar en el ge-

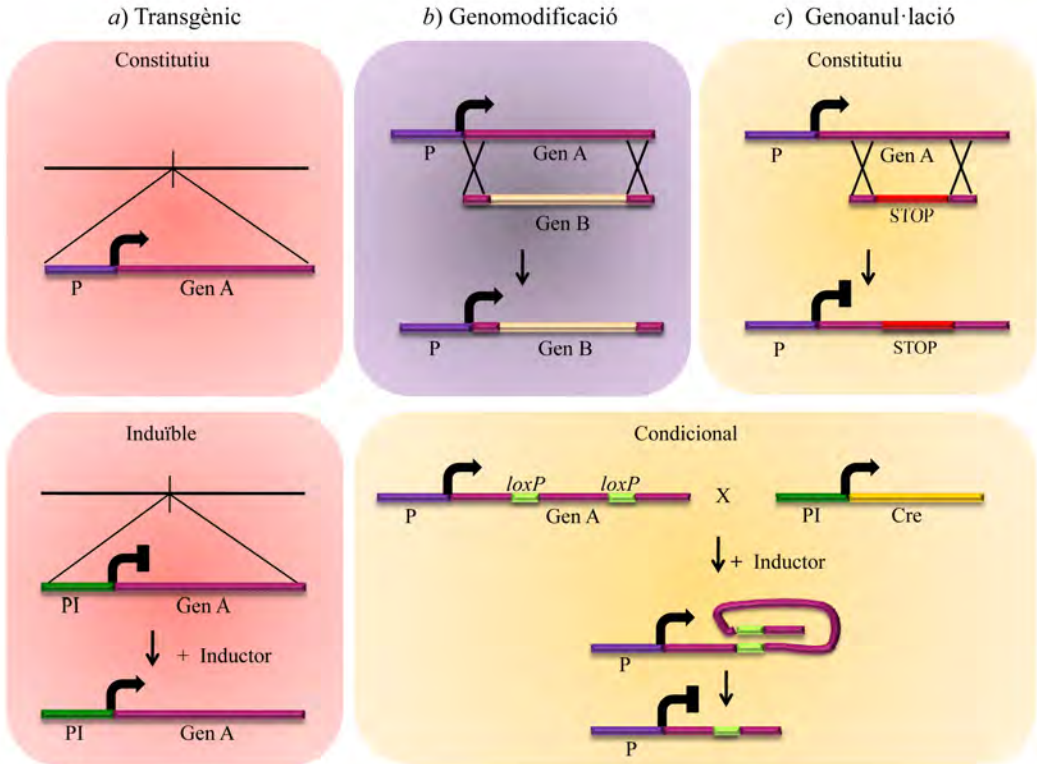


FIGURA 2. Estratègies de manipulació genètica per a la generació de ratolins model en el laboratori. Diferents estratègies basades en la tecnologia del DNA recombinant permeten modificar de manera controlada l'expressió gènica en el tipus cel·lular i moment del desenvolupament que vulguem. a) La transgènesi consisteix en la inserció en el genoma del ratolí d'un gen heteròleg (transgèn) acompanyat d'una regió reguladora, o promotor, que en controla l'expressió. Aquesta inserció implica un fenomen de recombinació no homòloga (a l'atzar), de manera que el lloc del genoma en el qual s'integrarà el gen no és conegut ni pot ser escollit *a priori*. Quan el promotor que acompanya el transgèn és induïble, l'expressió només tindrà lloc en presència de l'agent inductor. b) La tècnica coneguda com a genomodificació comporta la substitució d'una de les còpies d'un gen endogen per un gen heteròleg (gen reporter, toxina, etc.). Aquesta estratègia requereix un procés de recombinació homòloga (marcada amb dues creus a la figura) que garanteix que el gen s'insereix en el locus que volem i reproduirà el patró d'expressió del gen endogen. c) La genoanul·lació d'un gen consisteix en l'eliminació, parcial o total, de la seva seqüència amb l'objectiu de silenciar-ne l'expressió o la funcionalitat de la proteïna que codifica. En un model de genoanul·lació constituti el gen és eliminat en totes les cèl·lules de l'organisme mitjançant recombinació homòloga. En una genoanul·lació condicional, en canvi, el tipus cel·lular i moment de la delecció són controlats mitjançant l'expressió de la Cre-recombinasa sota el control d'un promotor específic de tipus cel·lular o induïble. P: promotor; PI: promotor induïble.

noma una o diverses còpies addicionals de la seqüència (transgèn) (vegeu la figura 2a). D'aquesta manera, i analitzant el fenotip de l'animal transgènic, és possible identificar els processos biològics en els quals participa el gen. Una variant d'aquesta tècnica consisteix a introduir mutacions en la seqüència del transgèn amb l'objectiu de generar una versió modificada de la proteïna que codifica normalment. Tal modificació pot donar lloc a una activitat constitutiva de la proteïna, independent dels mecanismes de regulació propis de la cèl·lula que l'expressa o, al contrari, una proteïna inactiva que a més interfereixi amb la forma salvatge endògena (*dominant negatiu*). En aquest últim cas, el resultat final és l'equivalent a una pèrdua de funció del gen, cosa que també aporta informació sobre les vies en les quals està involucrat.

La seqüència codificant d'un gen ha d'anar acompanyada d'una regió reguladora (*promotor*), que és fonamental per determinar en quin moment i teixit s'expressa el gen. L'elecció del promotor que acompanya el transgèn aporta, doncs, molta flexibilitat al disseny experimental, i permet també algunes variacions. El promotor escollit pot ser específic del tipus cel·lular en el qual el gen d'interès s'expressa normalment, però alternativament és possible l'ús d'un promotor corresponent a un tipus cel·lular en el qual el gen mai no és actiu amb l'objectiu d'analitzar l'efecte de l'expressió ectòpica. L'exemple més ampli d'aquest cas és la utilització d'un promotor ubic, com per exemple el de l'actina, que s'expressa en totes les cèl·lules de l'organisme, i per tant permet analitzar els efectes de l'expressió del gen d'interès en tots els teixits. Finalment, l'ús d'un promotor induïble (només actiu en presència d'un compost d'administració externa) fa possible l'expressió del transgèn no solament en el lloc sinó també en el moment que volem (em-

brió, nounat, adult, etc.) (vegeu la figura 2a).

L'expressió induïble d'una forma constitutivament activa de l'oncogèn *KRas* (*KRas G12D*) és un exemple clàssic de la utilitat dels animals transgènics a l'hora d'estudiar els mecanismes involucrats en la iniciació de càncers com el de pàncrees (Aguirre *et al.*, 2003).

Ratolins genomodificats

La genomodificació consisteix també en la inserció d'un gen heteròleg en el genoma però en aquest cas, i a diferència de la transgènesi, aquesta inserció no es fa a l'atzar, sinó que és dirigida a un locus determinat. Això és possible gràcies a un procés de recombinació homòloga (vegeu la figura 2b). D'aquesta manera el gen introduït s'expressa sota el control del promotor del locus escollit, substitueix el gen endogen i en reproduïx el patró d'expressió espacial i temporal. Aquests models acostumen a mantenir-se en heterozigosi (se substitueix una sola còpia del gen endogen), ja que habitualment una sola còpia del gen heteròleg és suficient per a la seva funció, i d'altra banda la substitució dels dos al·lels endògens podria comprometre la viabilitat de l'animal. Una de les aplicacions d'aquesta tècnica és determinar el patró d'expressió del gen substituït. Quan no hi ha anticossos per a la detecció de la proteïna codificada pel gen estudiat, freqüentment aquest se substitueix per un gen reporter —per exemple, proteïna fluorescent verda (GFP) o lacZ— que permet visualitzar en quin moment del desenvolupament i tipus cel·lular és actiu el promotor del gen d'interès. Un exemple d'aquest cas és el del gen *Lgr5*. *Lgr5* és actiu en les cèl·lules troncales del tracte gastrointestinal (estómac, intestí prim i còlon) i per estudiar-ne en detall

l'expressió els investigadors van generar un model genomodificat en el qual el gen reporter *GFP* es va inserir sota el control del promotor de *Lgr5*, de manera que va interrompre la seqüència del gen endogen i en va eliminar així l'expressió (Barker *et al.*, 2007). El gen *GFP* codifica la proteïna fluorescent verda, que permet identificar les cèl·lules que l'expressen mitjançant la visualització amb microscòpia de fluorescència (vegeu la figura 3a). Aquesta és, per tant, una manera indirecta de monitorar l'expressió del gen.

Un altre dels casos en què la tècnica de la genomodificació ha mostrat ser de gran utilitat és l'ablació celular. Una de les maneres d'estudiar la funció d'un determinat tipus celular en un teixit és analitzar les conseqüències que en té l'eliminació sobre el desenvolupament, la fisiologia o el comportament de l'animal. Aconseguir l'ablació d'un tipus celular concret és possible gràcies a l'expressió d'un gen letal (per exemple, el que codifica la toxina diftèrica) en les cèl·lules que es volen eliminar (Palmiter *et al.*, 1987). Amb aquest objectiu, el

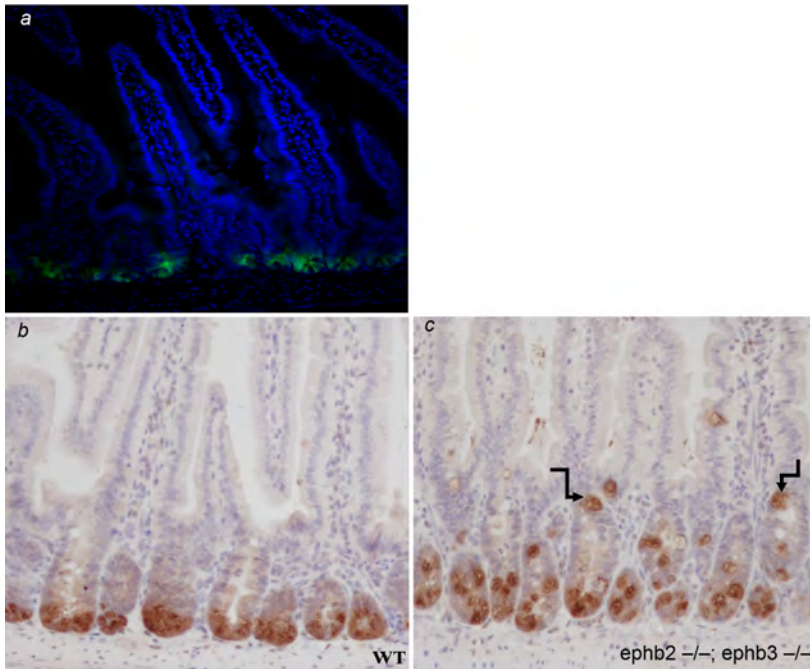


FIGURA 3. Exemples de ratolins modificats genèticament. a) Model genomodificat en el qual el gen de la proteïna fluorescent verda (GFP) ha estat introduït en el locus del gen *Lgr5* (*Lgr5-EGFP*). Una secció de l'intestí prim d'aquest animal mostra que el promotor de *Lgr5* s'expressa específicament a les cèl·lules mare intestinals que es localitzen al fons de les criptes (cèl·lules verdes). b) Secció del budell prim d'un animal control (WT). Les cèl·lules de Paneth (cèl·lules diferenciades marcades de color marró per a l'expressió del gen del lisozim) es localitzen al fons de la cripta, juntament amb les cèl·lules mare. c) En un animal genoanul·lat doble per als gens *ephb2* i *ephb3* (*ephb2*^{-/-}; *ephb3*^{-/-}) les cèl·lules de Paneth no es localitzen correctament al fons de la cripta intestinal (fletxes negres), cosa que demostra que aquests dos gens són necessaris per al posicionament correcte d'aquest tipus celular.

gen letal s'insereix en el genoma específicament sota el control d'un promotor actiu únicament en les cèl·lules d'estudi, i substitueix el gen que controla normalment aquest promotor. Les cèl·lules moriran en el moment en què el gen letal comenci a expressar-se i aleshores l'efecte de l'eliminació podrà ser analitzat. Una modificació d'aquesta estratègia és la inserció del gen que codifica el receptor de la toxina diftèrica, en lloc de la toxina mateixa. Aquest sistema permet eliminar les cèl·lules d'interès en el moment que vulguem, a través de l'administració controlada de la toxina. Aquest model s'ha utilitzat, entre molts altres casos, per estudiar la regeneració de les cèl·lules β -pancreàtiques (Thorel *et al.*, 2010) o per identificar les neurones responsables del control de la ingesta en ratolins adults (Luquet *et al.*, 2005).

Ratolins genoanul·lats

La genoanul·lació, com indica el seu nom, comporta l'eliminació (total o parcial) dels dos allels d'un gen endogen i permet, per tant, establir quina és la seva funció per defecte. La generació de ratolins genoanul·lats es basa també en la tecnologia de la recombinació homòloga, que permet silenciar el gen que es vol estudiar mitjançant la inserció d'un fragment de DNA heteròleg que interromp la seqüència i fa que el gen no es transcriu o es transcriu amb alteracions que el fan inactiu (vegeu la figura 2c). Els primers models de genoanul·lació en ratolí van ser generats gràcies als treballs dels investigadors M. Capecchi, M. Evans i O. Smithies (Thomas i Capecchi, 1987; Doetschman *et al.*, 1987), que van obtenir el Premi Nobel de Medicina l'any 2007 pel desenvolupament d'aquesta tecnologia i les àmplies aplicacions que ha tingut fins avui dia.

Un exemple clar de la utilitat d'aquesta tècnica a l'hora de definir el paper d'un gen *in vivo* és el de la proteïna ciclina A2, involucrada en la regulació del cicle cel·lular. La deleció del gen que codifica aquesta proteïna demostra que la seva funció és indispensable durant el desenvolupament embrionari, ja que els animals genoanul·lats moren abans de néixer (Murphy *et al.*, 1997).

Així mateix, i com s'ha comentat anteriorment, hi ha diversos exemples d'animals genoanul·lats que serveixen com a model de malalties humanes. Un dels més ben caracteritzats és el de la fibrosi quística, descrit pel grup de M. J. Evans. En generar una deleció de tan sols tres parells de bases en el gen *cftr* els investigadors van aconseguir reproduir la malaltia humana, en la qual la proteïna codificada per aquest gen es transcriu però no és funcional a causa de l'absència d'un aminoàcid en la seva seqüència (Colledge *et al.*, 1995).

Els models genoanul·lats comentats fins ara comporten la inactivació de la funció del gen en la línia germinal, fet que implica que aquest no s'expressa (o ho fa de manera no funcional) en cap de les cèl·lules de l'organisme al llarg de tota la seva vida. Per aquest motiu reben també el nom de *genoanul·lats constitutius*. Els models *genoanul·lats condicionals*, en canvi, estan dissenyats perquè el gen d'interès sigui eliminat únicament en el tipus cel·lular o teixit que es vol estudiar i s'evitin així interferències en els resultats degudes a l'efecte de la deleció en altres òrgans. La generació de genoanul·lats condicionals es basa en la tecnologia de la recombinació homòloga mitjançant la recombinasa Cre (Gu *et al.*, 1994). Breument, el gen que es vol deleccionar (o alguna de les seves parts) és flanquejat per dues seqüències de DNA anomenades *lox P* que són reconegudes i recombinades per la recombinasa Cre en

les cèl·lules que l'expressen. Aquesta recombinació provoca l'eliminació del fragment del gen que es troba entre els llocs *loxP*, de manera que se n'interromp així la seqüència i s'impedeix la transcripció de la proteïna corresponent (vegeu la figura 2c). Per tant, l'expressió del gen que codifica la recombinasa Cre sota el control d'un promotor específic del tipus cel·lular d'interès permet la deleció del gen només en aquestes cèl·lules. En el nostre grup hem utilitzat aquest sistema per descriure com les interaccions entre els receptors EphB i els seus lligands ephrinB suprimeixen la progressió del càncer colorectal (Cortina *et al.*, 2007). El gen *efnB1* es va delecionar en les cèl·lules de l'intestí gràcies a l'expressió de la Cre-recombinasa sota el control del promotor *Villin*, que és actiu específicament en aquestes cèl·lules. L'encreuament d'aquests animals amb una soca susceptible a desenvolupar tumors (ratolins APC Min/+) va revelar un fenotip de tumorigènesi accelerada causada per l'expansió de les cèl·lules tumorals en absència d'ephrinB1.

Finalment, la generació de *genoanullats induïbles* permet controlar no solament el lloc (tipus cel·lular), sinó també el moment en el qual el gen és delecionat. Això s'aconsegueix expressant la Cre-recombinassa sota el control d'un promotor que només és actiu en presència d'un agent inductor, com s'ha comentat anteriorment (vegeu la figura 2c).

Malgrat les moltes possibilitats que ofereixen els models *genoanullats*, en alguns casos la utilització es veu complicada a causa del fenomen de la redundància, que té lloc quan la funció del gen delecionat és compensada per un altre gen, que impossibilita així la identificació del fenotip causat per l'absència del primer. De vegades és possible predir la identitat del gen redundant, que acostuma a ser un membre de la mateixa família del gen delecionat. Quan

això succeeix, aquest segon gen pot ser silenciats a la vegada que el primer i generar així un model *genoanullat doble*. Precisament l'ús de models *genoanullats dobles* ha fet possible identificar els mecanismes a través dels quals s'organitzen les cèl·lules de l'epiteli intestinal seguint una jerarquia que separa els compartiments proliferatiu i diferenciat per assegurar la localització i migració correctes de tots els tipus cel·lulars en l'epiteli (Batlle *et al.*, 2002).

Tècniques per a la generació d'animals genèticament modificats

La transferència del DNA recombinant que es vol introduir en el genoma del ratolí pot aconseguir-se fonamentalment a través de dues tècniques que es comenten breument a continuació.

— *Transformació de cèl·lules troncales embrionàries (cèl·lules ES)*. Les cèl·lules ES constitueixen la massa interna del blastocist, que esdevé finalment l'embrió. Aquestes cèl·lules poden ser aïllades i mantingudes en cultiu, cosa que en permet la manipulació genètica. Les cèl·lules ES són transfectades amb el DNA recombinant que es vol introduir en el genoma del ratolí i posteriorment injectades en un blastocist que s'implanta a l'úter d'una mare adoptiva. L'embrió que es desenvolupa a partir d'aquest blastocist conté una barreja de cèl·lules salvatges i cèl·lules modificades, i dona lloc així a un animal quimèric. Si alguna de les cèl·lules modificades ha generat gàmetes, un determinat percentatge de la descendència que resulta d'encreuar l'animal quimèric amb un animal salvatge (F1) conté ja una còpia (heterozigot) del gen modificat en totes les seves cèl·lules (vegeu la figura 4a). Per obtenir animals homozigots (dues còpies de la modificació genètica) els animals de la F1 s'encreuen entre ells per

produir una segona generació (F2) en la qual el 25 % dels animals portaran els dos al·lels del gen modificats.

— *Injecció de pronuclis*. En aquest cas el DNA recombinant s'injecta en un dels pronuclis d'òvuls fertilitzats. Aquests òvuls són aleshores implantats en una mare adoptiva i donen lloc a una descendència que és analitzada igual que en el cas anterior, per determinar la presència del gen recombinant (vegeu la figura 4b).

Noves tecnologies

Basats en combinacions i modificacions de les tècniques que es descriuen a dalt, nous models de ratolí estan sent generats per permetre la realització d'experiments d'una gran sofisticació, com el marcatge genètic de cèl·lules individuals dintre d'un teixit i el monitoratge consegüent de la seva descendència (*seguiment de llinatge*). Aquests experiments obren la porta a l'es-

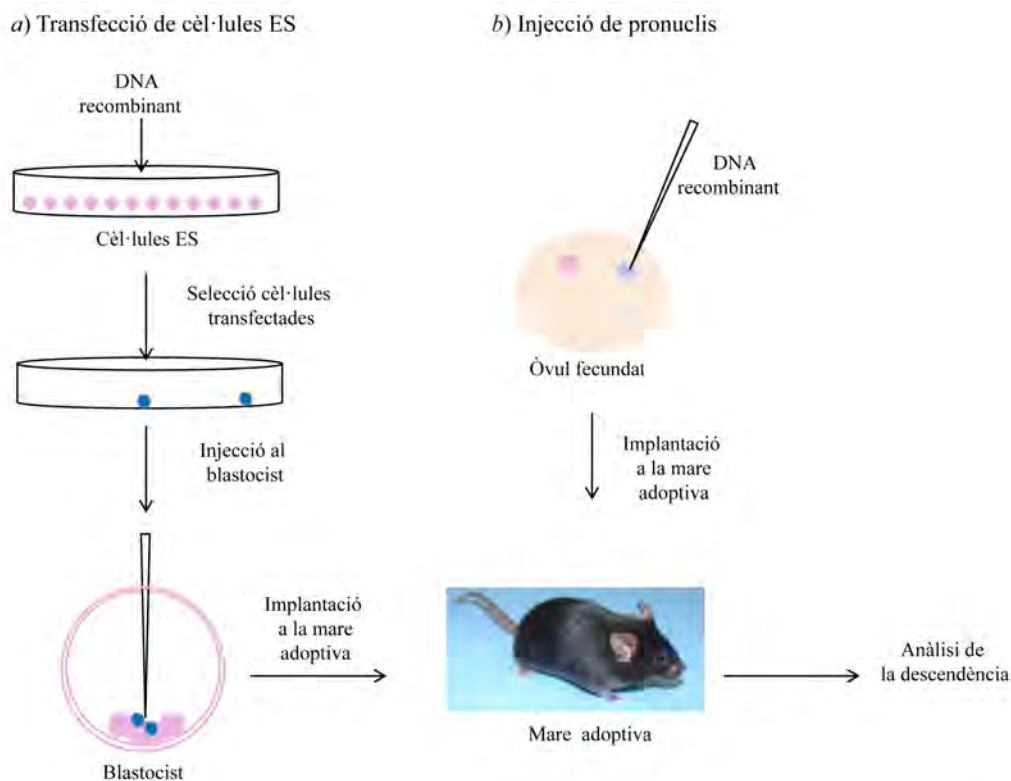


FIGURA 4. Tecnologia per a la generació d'animals modificats genèticament. Els diferents tipus de manipulació genètica descrits a la figura 2 s'aconsegueixen mitjançant la introducció del DNA heteròleg en les cèl·lules precursors que donaran lloc a l'embrió. Una manera de fer-ho és transfectant cèl·lules troncales embrionàries (cèl·lules ES) amb el material genètic que volem (a). Les cèl·lules que incorporen el DNA exogen són seleccionades mitjançant un marcador (cèl·lules blaves) i s'injecten en la massa cel·lular interna de blastocists de ratolí, que seran llavors implantats en una mare adoptiva, on es desenvoluparan. Alternativament, el DNA recombinant pot ser injectat en un dels pronuclis d'òvuls fertilitzats, els quals s'implanten també en una mare adoptiva (b). En ambdós casos, la descendència obtinguda és analitzada per identificar els animals que han incorporat el material genètic introduït.

tudi de les dinàmiques d'homeòstasi, la interacció entre tipus cel·lulars i la regeneració en diferents òrgans amb un grau de resolució impossible d'assolir amb les tècniques disponibles fins al moment (Livet *et al.*, 2007).

CONCLUSIONS

Gràcies als descobriments de la tecnologia del DNA recombinant i la manipulació de cèl·lules ES des del final del segle passat ha esdevingut possible la generació de ratolins modificats genèticament. Això ha representat un salt qualitatiu que ha permès modelitzar moltes malalties humanes i dissenyar estratègies efectives per prevenir-les i curar-les. La ràpida i constant evolució d'aquest camp fa fàcil preveure que durant aquest segle continuarem avançant en el nostre coneixement sobre les malalties que ens afecten, i que el ratolí seguirà tenint, com fins ara, un paper fonamental.

AGRAÏMENTS

Agraïeix a Eduard Batlle, Francisco Barriola i Andreu Casali els seus comentaris sobre el text, i a Xavier Hernando i Sergio Palomo les fotografies que s'inclouen en les figures.

BIBLIOGRAFIA

- AGUIRRE, A. J.; BARDEESY, N.; SINHA, M.; LOPEZ, L.; TUVESON, D. A.; HORNER, J.; REDSTON, M. S.; DEPINHO, R. A. (2003). «Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma». *Genes Dev.*, 17: 3112-3126.
- BARKER, N.; ES, J. H. VAN; KUIPERS, J.; KUJALA, P.; BORN, M. VAN DEN; COZIJSSEN, M.; HAEGBARTH, A.; KORVING, J.; BEGTHEL, H.; PETERS, P. J.; CLEVERS, H. (2007). «Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5». *Nature*, 449: 1003-1007.
- BATLLE, E.; HENDERSON, J. T.; BEGTHEL, H.; BORN, M. VAN DEN; SANCHO, E.; HULS, G.; MEELDIJK, J.; ROBERTSON, J.; WETERING, M. VAN DE; PAWSON, T.; CLEVERS, H. (2002). «Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB». *Cell*, 111: 251-263.
- COLLEDGE, W. H.; ABELLA, B. S.; SOUTHERN, K. W.; RATCLIFF, R.; JIANG, C.; CHENG, S. H.; MACVINISH, L. J.; ANDERSON, J. R.; CUTHBERT, A. W.; EVANS, M. J. (1995). «Generation and characterization of a delta F508 cystic fibrosis mouse model». *Nat. Genet.*, 10: 445-452.
- CORTINA, C.; PALOMO-PONCE, S.; IGLESIAS, M.; FERNÁNDEZ-MASIP, J. L.; VIVANCOS, A.; WHISSELL, G.; HUMÀ, M.; PEIRÓ, N.; GALLEGO, L.; JONKHEER, S.; DAVY, A.; LLORETA, J.; SANCHO, E.; BATLLE, E. (2007). «EphB-ephrin-B interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells». *Nat. Genet.*, 39: 1376-1383.
- DOETSCHMAN, T.; GREGG, R. G.; MAEDA, N.; HOOPER, M. L.; MELTON, D. W.; THOMPSON, S.; SMITHIES, O. (1987). «Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells». *Nature*, 330: 576-578.
- FULLOP, G. M.; PHILLIPS, R. A. (1990). «The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair». *Nature*, 347: 479-482.
- GARCÍA-GARCÍA, M. J.; EGGENSWILER, J. T.; CASPARY, T.; ALCORN, H. L.; WYLER, M. R.; HUANGFU, D.; RAKEMAN, A. S.; LEE, J. D.; FEINBERG, E. H.; TIMMER, J. R.; ANDERSON, K. V. (2005). «Analysis of mouse embryonic patterning and morphogenesis by forward genetics». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 5913-5919.
- GU, H.; MARTH, J. D.; ORBAN, P. C.; MOSSMANN, H.; RAJEWSKY, K. (1994). «Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting». *Science*, 265: 103-106.
- HEDRICH, H.; BULLOCK, G. I.; PETRUSZ, P. (2006). *The Laboratory Mouse*. San Diego: Elsevier Press.
- KELLAND, L. R. (2004). «Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development». *Eur. J. Cancer*, 40: 827-836.
- LIVET, J.; WEISSMAN, T. A.; KANG, H.; DRAFT, R. W.; LU, J.; BENNIS, R. A.; SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. (2007). «Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system». *Nature*, 450: 56-62.

- LUQUET, S.; PEREZ, F. A.; HNASKO, T. S.; PALMITER, R. D. (2005). «NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates». *Science*, 310: 683-685.
- MITSUMORI, K.; ONODERA, H.; SHIMO, T.; YASUHARA, K.; TAKAGI, H.; KOUJITANI, T.; HIROSE, M.; MARYAMA, C.; WAKANA, S. (2000). «Rapid induction of uterine tumors with p53 point mutations in heterozygous p53-deficient CBA mice given a single intraperitoneal administration of N-ethyl-N-nitrosourea». *Carcinogenesis*, 21: 1039-1042.
- MURPHY, M.; STINNAKRE, M. G.; SENAMAUD-BEAUFORT, C.; WINSTON, N. J.; SWEENEY, C.; KUBELKA, M.; CARRINGTON, M.; BRÉCHOT, C.; SOB CZAK-THÉPOT, J. (1997). «Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene». *Nat. Genet.*, 15: 83-86.
- NOLAN, P. M. [et al.] (2000). «A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse». *Nat. Genet.*, 25: 440-443.
- OKAYASU, I.; HATAKEYAMA, S.; YAMADA, M.; OHKUSA, T.; INAGAKI, Y.; NAKAYA, R. A. (1990). «Novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice». *Gastroenterology*, 98: 694-702.
- PALMITER, R. D.; BEHRINGER, R. R.; QUAIFFE, C. J.; MAXWELL, F.; MAXWELL, I. H.; BRINSTER, R. L. (1987). «Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene». *Cell*, 50: 435-443.
- RUSSELL, E. S. (1978). «Origins and History of Mouse Inbred Strains: Contributions of Clarence Cook Little». A: MORSE, H. C. [ed.]. *In origins of inbred mice*. Nova York: Academic Press, p. 33-44.
- RUSSELL, W. L.; KELLY, E. M.; HUNSICKER, P. R.; BANGHAM, J. W.; MADDUX, S. C.; PHIPPS, E. L. (1979). «Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5818-5819.
- SAKAGUCHI, Y.; INABA, M.; KUSAFUKA, K.; OKAZAKI, K.; IKEHARA, S. (2006). «Establishment of animal models for three types of pancreatitis and analyses of regeneration mechanisms». *Pancreas*, 33: 371-381.
- SCHWABER, J.; COHEN, E. P. (1973). «Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types». *Nature*, 244: 444-447.
- SEGRE, J. A.; NEMHAUSER, J. L.; TAYLOR, B. A.; NADDEAU, J. H.; LANDER, E. S. (1995). «Positional cloning of the nude locus: genetic, physical, transcription maps of the region and mutations in the mouse and rat». *Genomics*, 28: 549-559.
- THOMAS, K. R.; CAPECCHI M. R. (1987). «Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells». *Cell*, 51: 503-512.
- THOREL, F.; NÉPOTE, V.; AVRIL, I.; KOHNO, K.; DESGRAZ, R.; CHERA, S.; HERRERA, P. L. (2010). «Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss». *Nature*, 464: 1149-1154.