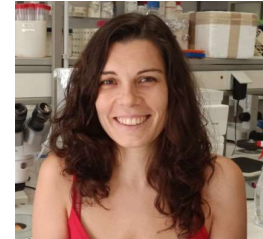


SEBBM DIVULGACIÓN

LA CIENCIA AL ALCANCE DE LA MANO

La ingeniería genética aplicada a la investigación: cómo generar ratones knock out (KO) con el sistema Cre-LoxP

DOI: https://doi.org/10.18567/sebbmdiv_R.202409



Teresa Rubio-Tomás
IMBB-FORTH, Heraklion, isla de Creta, Grecia

Biografía

Teresa Rubio-Tomás es investigadora postdoctoral en el *Institute of Molecular Biology and Biotechnology (IMBB) of the Foundation for Research and Technology Hellas (IMBB-FORTH)*, en Grecia. Es licenciada en Biología y tiene un máster en investigación biomédica por la Universidad Pompeu Fabra (UPF), Barcelona. Realizó su doctorado en el centro de investigación Alexander Fleming, a las afueras de Atenas (Grecia) en el marco de la red de colaboraciones europeas *Marie Curie ITN*, obteniendo el título de doctora en Biología por la Universidad de Creta (Grecia). Al mismo tiempo, cursó el máster de profesorado de Secundaria en la Universidad Internacional de La Rioja (UNIR), debido a su gran interés por la educación. Tras una primera estancia postdoctoral en el *Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)-Hospital Clínic (Barcelona)*, a finales de 2021 se incorporó al grupo de Neurogenética y envejecimiento liderado por el profesor Nektarios Tavernarakis en Heraklion, la capital de la isla de Creta (Grecia), para continuar su carrera investigadora centrando su línea de investigación en la relación entre el metabolismo, el envejecimiento y la epigenética. Además, Teresa participa como docente en la Universidad de Creta, forma parte de la editorial de las revistas científicas *Experimental and Molecular Pathology* y *Science Talks* y colabora en actividades de divulgación científica. Su trayectoria científica ha estado siempre ligada al estudio del metabolismo y el sistema gastrointestinal, con especial interés en el hígado y las enfermedades hepáticas, usando principalmente ratones, gusanos *Caenorhabditis elegans (C. elegans)* y muestras humanas.

<https://www.linkedin.com/in/teresa-rubio-tom%C3%A1s-ph-d-797674145/>

Resumen

La investigación en ciencias experimentales y, concretamente, en ciencias biológicas se basa en formular hipótesis y testarlas mediante experimentos. Con mucha frecuencia, los científicos se interesan por el papel de un gen y la proteína para la que codifica en un proceso biológico concreto, sea en el contexto de la salud o la enfermedad. Para ello, está muy extendido el uso de animales knock out (KO). Este artículo se centra en el concepto de KO, concretamente en los ratones KO generados mediante el sistema Cre-LoxP y su uso en la investigación.

Summary

Research in experimental sciences and, specifically, in biological sciences, is based on formulating hypotheses and testing them through experiments. Very often, scientists are interested in the role of a gene and the protein it encodes for in a specific biological process, whether in the context of health or disease. For this, the use of knock out (KO) animals is very widespread. This article focuses on the concept of KO, specifically on KO mice generated by means of the Cre-LoxP system and their use in research.

La tarea de los investigadores en ciencias experimentales es la de contestar a lo que llamamos "pregunta científica" mediante experimentos cuidadosamente diseñados para obtener la respuesta. En el campo de las ciencias biológicas muchas de estas preguntas se formulan de la siguiente forma: "¿Qué papel juega la proteína A en el proceso biológico X?". En este caso, vamos a elegir el cáncer de hígado como proceso biológico patológico, es decir, una enfermedad. Una vez formulada la pregunta, de acuerdo con el método científico, debemos formular una hipótesis. En este caso podría ser: "la proteína A protege contra el cáncer de hígado". El escenario contrario, es decir, "la proteína A promueve el crecimiento del cáncer de hígado" es, lógicamente, posible.

Una forma comúnmente aceptada de confirmar o desmentir esta hipótesis y así responder a la pregunta científica es mediante el uso de modelos animales, por ejemplo, ratones, modificados genéticamente. Es muy habitual el uso de los llamados ratones knock out (KO) [1].

¿Qué es un KO y para qué sirve? "Knockear (noquear)" un gen es eliminarlo, como en un partido de boxeo u otros deportes de contacto en los que se elimina al contrincante noqueándolo. Uno de los métodos de ingeniería genética para generar un ratón KO es el sistema Cre-LoxP, que consiste en varias secuencias de ADN exógeno (transgenes,

es decir, ADN que no se encuentra de forma natural en el genoma del ratón) que se inyectan en el cigoto, es decir, al inicio del desarrollo embrionario del ratón [2].

Como su nombre indica, necesitamos que haya Cre y LoxP para poder knockear un gen mediante el sistema Cre-LoxP. Los sitios LoxP son pequeñas secuencias de 34 pares de bases que se colocan a ambos lados del gen que queremos knockear (el gen A) y

que no están presentes de forma natural en el ADN "normal" del ratón (véase el cambio de la **Figura 1** a la secuencia de la parte superior de la **Figura 2**).

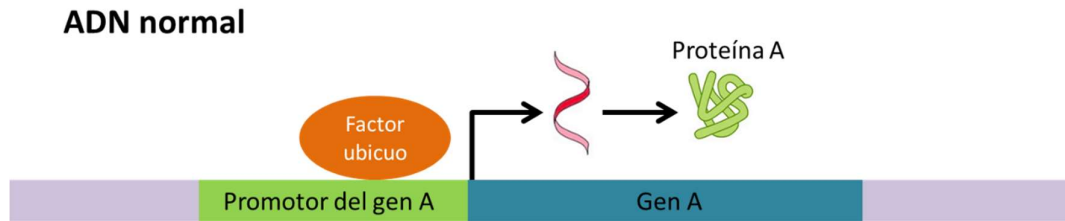


Figura 1. El ADN normal, que no contiene ninguna secuencia exógena o transgén. Un factor de transcripción ubiquo (que se encuentra en todos los tejidos y tipos celulares del cuerpo del ratón) se une al promotor del gen A, activando así su transcripción a mRNA y posterior traducción, generando la proteína A.

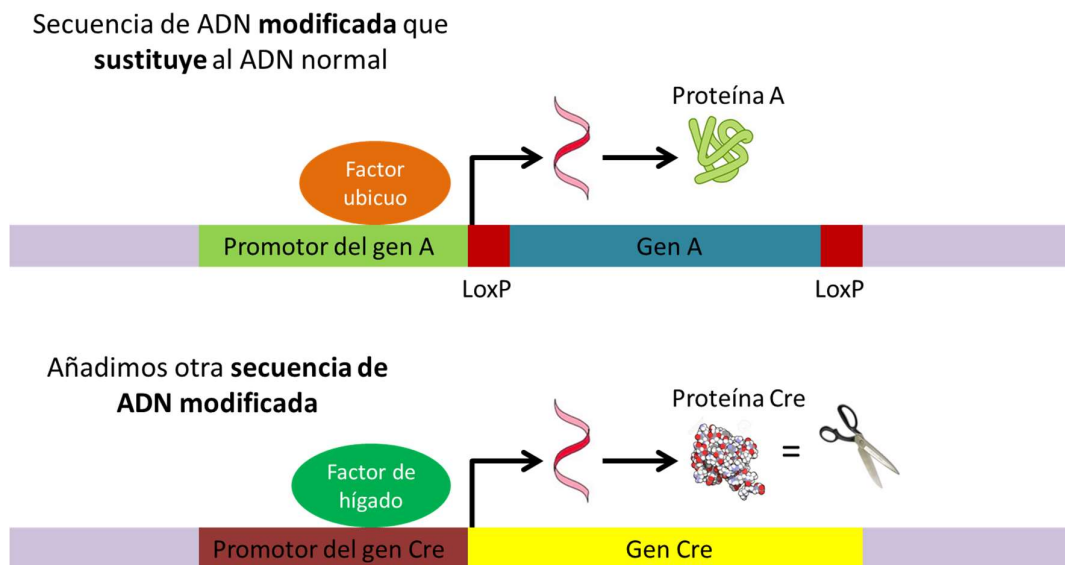


Figura 2. Por un lado, la secuencia del gen A, que codifica para la proteína A, se encuentra flanqueada por los sitios LoxP. Por otro lado, se incorpora la secuencia codificante para la proteína Cre.

La proteína Cre es una enzima que reconoce los sitios LoxP y los corta (como unas tijeras moleculares). En el ejemplo que nos ocupa Cre solamente está presente en el hígado, pues su promotor se activa mediante la unión de un factor de transcripción que únicamente existe en el hígado (en contraste con los factores de transcripción ubiquos), tal y como muestra la parte inferior de la **Figura 2**. Podemos observar el proceso de "corte" de la enzima Cre en la **Figura 3**, mediante recombinación homóloga. Como ya hemos mencionado este proceso solamente ocurre en el hígado, de forma que obtenemos un ratón KO para la proteína A en el hígado, pero "normal" en el resto de tejidos, al que llamamos "ratón KO específico de hígado" [3].

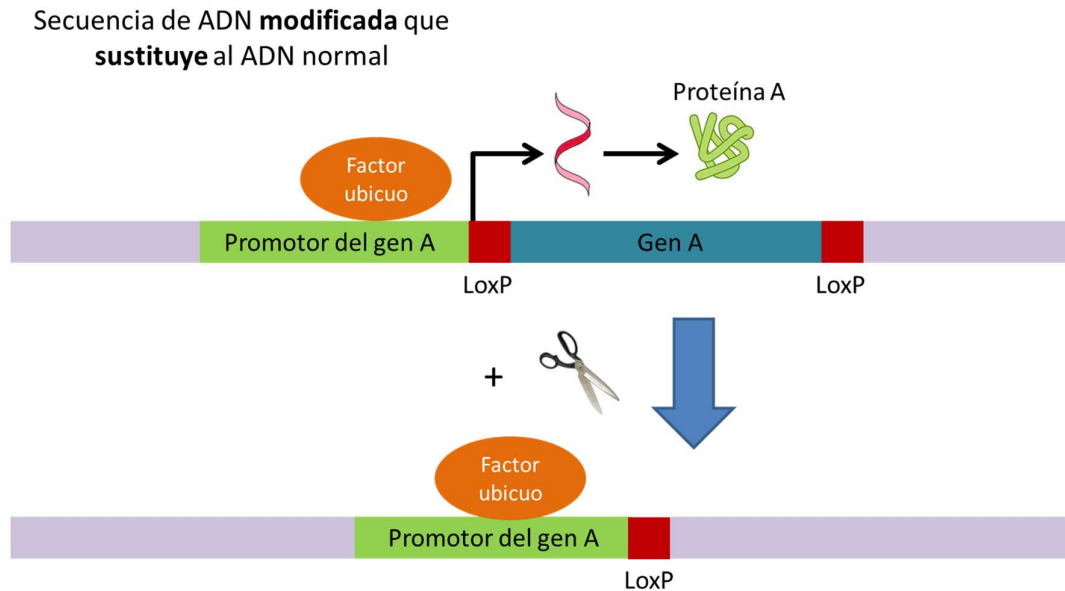


Figura 3. La enzima Cre (tijeras) elimina la secuencia flanqueada por sitios LoxP mediante recombinación homóloga.

Podemos estudiar este ratón comparándolo con el ratón “normal” (de fenotipo salvaje o *wild-type* en inglés). Podemos inyectarle sustancias tóxicas que producen cáncer de hígado y observar el desarrollo del cáncer. La interpretación de resultados sería la siguiente: en caso de que el ratón KO no desarrolle cáncer de hígado o el crecimiento del cáncer sea más lento que en el ratón “normal”, podemos afirmar que la proteína A promueve el crecimiento del cáncer, y, en cambio, si el ratón KO desarrolla un cáncer de hígado más agresivo o de forma más rápida que el ratón “normal”, la conclusión sería la opuesta: la proteína A ejerce un papel protector en el contexto del cáncer de hígado. Es decir, al ser un KO, para entender la función de la proteína A debemos pensar al revés (qué ocurre cuando la eliminamos).

El uso de animales KO ha supuesto grandes avances para la ciencia, entre los que destaca el famoso caso de la leptina, una proteína presente en el cerebro que nos indica cuándo estamos saciados. Los ratones KO para la leptina desarrollan obesidad, pues no sienten saciedad y comen constantemente. La ausencia de leptina se ha observado también en pacientes [4,5].

En conclusión, los animales KO son una herramienta fundamental para la investigación en biología.

Referencias

1. <https://www.nature.com/scitable/definition/knockout-mouse-284/>
2. Kim, H. et al. (2018) 'Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes', *Laboratory Animal Research*, 34(4), pp. 147–159. doi:10.5625/lar.2018.34.4.147
3. Zheng, H. chuan, Xue, H. and Yun, W.J. (2023) 'An overview of mouse models of hepatocellular carcinoma', *Infectious Agents and Cancer*, 18(1), pp. 1–17. doi:10.1186/s13027-023-00524-9.
4. <https://www.britannica.com/video/183137/discovery-leptin-protein-mice-connection-obesity-diabetes>
5. Wang, B., Chandrasekera, P. and Pippin, J. (2014) 'Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes', *Current Diabetes Reviews*, 10(2), pp. 131–145. doi:10.2174/1573399810666140508121012.