

MAPEO DE GENES EN EL RATÓN

El ratón es considerado por muchos investigadores como un modelo animal casi perfecto porque, además de su corto tiempo generacional, fácil mantenimiento y alta *performance* reproductiva, tiene varias características que, cuando se las considera en conjunto, lo hacen un modelo único para la genética experimental. De estas, hay tres que vale la pena hacer resaltar:

1. Es posible obtener cepas que son virtualmente homocigotas para todos sus loci por medio de la cruce repetida entre hermanos (endocria). Muchas de esas cepas han sido establecidas en las últimas décadas y presentan la ventaja, para los mapeos de genes, de producir un solo tipo de gametas. Estas cepas, denominadas consanguíneas (*inbred strains*, en inglés), están constituidas por animales genéticamente idénticos y con estabilidad genética a largo plazo, lo que asegura la repetibilidad de los experimentos¹.

2. El ratón es inusual en el sentido de que es posible criar híbridos viables y fértiles acoplando las cepas de laboratorio antes mencionadas (derivadas de las especies *Mus musculus domesticus* o *Mus musculus musculus*) con varias especies murinas derivadas de animales salvajes (por ejemplo *Mus spretus*). Cruzamientos de este tipo han sido muy utilizados para establecer mapas de ligamiento porque permiten la segregación de un gran número de polimorfismos genéticos en una sola cruce².

3. El extenso conocimiento de los estadios tempranos de la embriogénesis del ratón ha permitido el desarrollo de técnicas que producen alteraciones heredables del genoma casi "a pedido". En el ratón es relativamente fácil producir en forma eficiente animales transgénicos inyectando secuencias de ADN dentro del pronúcleo de un huevo fertilizado. Es posible incluso substituir, en la línea germinal, la copia normal de un gen dado por una "mutante", vía la técnica de recombinación homóloga en células primordiales embrionarias (*ES cells*). La transgénesis y la recombinación homóloga han reforzado el papel fundamental del ratón como modelo en biomedicina porque se trata del único mamífero en el cual se puede evaluar en forma experimental el rol biológico de secuencias de ADN de función desconocida. El ratón ha sido utilizado por los genetistas desde los primeros experimentos realizados por Cuénot, quien en 1902 informó que las leyes de Mendel podían ser aplicadas también a esta especie. Desde entonces, cientos de mutaciones han sido descritas y localizadas en algún cromosoma murino en particular, lo que llevó al rápido desarrollo de mapas genéticos de cierto nivel de densidad. Ya para 1980 el ratón tenía el mapa genético más completo y extenso de todos los mamíferos, incluido el hombre. Con la llegada de las técnicas de biología molecular, en especial el ADN recombinante, el ratón perdió este liderazgo en manos de la genética humana, pero al mismo tiempo quedó en claro la enorme complementación entre estas dos especies desde muchos puntos de vista, en particular, los mapeos de genes³.

El genoma murino y su mapa genético

El ratón de laboratorio "estandar" tiene un cariotipo de 40 cromosomas (19 autosómicos más el par sexual). Los cromosomas murinos son difíciles de diferenciar en los preparados citogenéticos porque, contrariamente a los humanos, son todos acrocéntricos y muestran una graduación continua en el tamaño. El contenido de ADN del genoma haploide del ratón es de 3 picogramos (3×10^{-12} g) que sería un equivalente a $2,7 \times 10^9$ pares de bases (pb). Según los cálculos actuales, no más del 5-8% del contenido de ADN es "funcional" mientras que el resto está representado por secuencias de baja complejidad y una gran variedad de secuencias repetitivas de distintos tamaños. Algunas de éstas, particularmente las cortas, han sido muy útiles para la construcción de mapas genéticos. Según las estimaciones más recientes, el genoma murino contendría entre 50.000 y 100.000 genes, de los cuales sólo un pequeño porcentaje ha sido identificado, fundamentalmente por la existencia de mutaciones o por trabajos de genética molecular.

La forma más racional de desarrollar un mapa genético del genoma del ratón es hacerlo en forma gradual, paso a paso, primero ubicando una serie de loci de referencia (*anchor loci*), o de marcadores, e ir aumentando progresivamente el número de los mismos en los espacios desiertos hasta lograr un "andamio" sólido. Con este enfoque escalonado y, teniendo en cuenta que el número de marcadores a disposición es suficientemente grande, es posible hoy en día realizar mapas de alta densidad en el ratón. De hecho, ésta es la estrategia que vienen utilizando los genetistas desde comienzos del siglo veinte, cuando J.B. Haldane y colaboradores informaron en *Journal of Genetics* que las mutaciones del color del pelaje, albino (c) y *pink-eyed dilution* (p), estaban ligadas⁴.

Hay tres clases de mapas que interesan a los genetistas:

1. Mapas de ligamiento. El establecimiento de mapas de ligamiento (*linkage maps*) se basa en el hecho de que, durante la meiosis, los loci que se encuentran en diferentes cromosomas se separan al azar en las gametas mientras que los que se encuentran en un mismo cromosoma tienden a cosegrecar, a menos que un evento de recombinación (*cross-over*) rompa esa asociación "parental". La probabilidad de que dos genes sean separados por un evento de recombinación dependerá de la distancia que hay entre ellos. Esto se ve reflejado en la elección de la unidad de mapeo, el centiMorgan (cM), que corresponde al 1% de probabilidad de producir una gameta recombinante luego de una meiosis. Un mapa de ligamiento es, en otras palabras, un diagrama de los rearrreglos lineales de los genes localizados en un cromosoma dado. La densidad de un mapa genético estará correlacionada con el número de polimorfismos que segregan en una cruce particular mientras que su resolución depende del número de gametas (= número total de meiosis) analizados en la progenie. La longitud total del mapa de ligamiento del ratón ha sido estimada por diversos investigadores, usando diferentes enfoques, en el orden de los 1550 a 1600 cM. Esto quiere decir que, en promedio, 1 cM en el genoma del ratón corresponde a 1700 kilobases (kb), mientras que en el humano (en el cual la frecuencia de recombinación es mucho mayor) esta cifra es equivalente a 1000 kb⁴.

2. Mapas cromosómicos. Mientras que los mapas de ligamiento requieren la realización de protocolos con cruces de animales, los mapas cromosómicos se logran usando técnicas que no incluyen la reproducción sexual como son la *hibridación in situ* (poco utilizada en ratones porque es más fácil y práctico realizar esquemas reproductivos), los *híbridos de células somáticas* (muy usados para localizar genes humanos) y los *mapas de delección* (es uno de los métodos más interesantes para desarrollar rápidamente un mapa preciso de una pequeña región cromosómica).

3. Mapas físicos. Un mapa físico (*physical map*) es la representación real del alineamiento de los genes en un cromosoma. El orden de los genes es el mismo que el dado por los mapas de ligamiento, pero las distancias son medidas en kb o megabases (Mb). Estos mapas constituyen un paso crucial en la caracterización estructural y funcional del genoma. Pueden lograrse por diversos métodos pero el más conveniente es el ordenamiento de sets de clones superpuestos (*contigs*), ya sean éstos clonados en fagos (P1 en general), cósmidos, cromosomas artificiales de bacterias (BACs) o cromosomas artificiales de levaduras (YACs). Siguiendo esta estrategia, la realización de un mapa físico es un "segundo paso" una vez establecido el mapa de ligamiento³.

Integración de mapas (mapas consenso)

Para una cruce de animales determinada, se puede establecer un mapa de ligamiento exclusivamente para los marcadores que segregan en la misma pero, lamentablemente, el número de esos marcadores es muchas veces limitado. Esta limitante se extiende también al polimorfismo entre las cepas parentales (o las técnicas utilizadas para detectarlo). En este sentido, la utilización de secuencias de ADN conocidas como *microsatélites* o *SSLP* (*simple sequence length polymorphism*) como marcadores moleculares facilitó enormemente los trabajos de mapeo debido a la posibilidad de amplificación de estos pequeños segmentos por medio de la técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) y a su disponibilidad (hay más de 6000 descriptos, lo que asegura un marcador cada 450 kb). Aproximadamente, el 50% de los microsatélites descriptos hasta el momento en el ratón muestra polimorfismo entre las distintas cepas de laboratorio, aunque ese porcentaje se eleva al 77% entre la cepa C57B1/6 y *M.m. castaneus*, y al 90% si se trata de *M. spretus*⁵. Aunque se han usado ocasionalmente técnicas no sexuales en mapeos genéticos del ratón, la mayoría de la información ha provenído, sin ninguna duda, del uso de cruces informativas de ratones como las *retrocruzas*

(*backcross*), las *intercruzas* (*intercross*) y las *retrocruzas interespecíficas*. La utilización de especímenes salvajes del mismo género *Mus* (pero de otras especies) para cruzar con las cepas de laboratorio clásicas y obtener parentales más polimórficos dió resultados exitosos y llevó los mapeos murinos a una nueva era. La primera especie salvaje utilizada con este propósito fue *Mus spretus* originaria del mediterráneo.

Es muy importante combinar los resultados obtenidos en distintas cruzas independientes en un "mapa consenso" (cuando los datos obtenidos poseen marcadores en común). Para ayudar a la integración de los diversos mapas genéticos, los genetistas han definido un set de loci de referencia (marcadores universales con homólogos en varias especies) que se encuentran uniformemente distribuidos en todos los cromosomas y son, a la vez, muy polimórficos⁶. Los mapas consenso actualizados para el genoma del ratón son publicados periódicamente en las revistas *Mammalian Genome* y *Mouse Genome*, y pueden obtenerse a través de la red Internet (<http://www.jax.org>.) en la base de datos *Mouse Genome Database* (MGD) del *Jackson Laboratory*.

Son varios los programas de mapeo a gran escala que se han venido desarrollando en los últimos 10 años en el genoma del ratón. Históricamente, los dos más importantes son los llevados a cabo en el *Instituto Pasteur, París* y en el *Frederick Cancer Research and Development Center, Maryland, USA*, sumándose en la actualidad los programas del *Jackson Laboratory, Maine, USA*, el *Mouse Genome Project* del *National Center for Human Genome Research, NIH/DOE, Maryland, USA* y el programa en colaboración entre el *MRC británico* y el *Instituto Pasteur (European Collaborative Interspecific Backcross o EUCIB)*. El panel de retrocruzas del EUCIB es en la actualidad el más grande del mundo con un número de 982 muestras de ADN evaluadas para loci de referencia a lo largo del genoma⁷.

Aplicaciones de los mapas genéticos del ratón

Estudios de evolución del genoma

La distribución de los genes responde a cambios producidos durante la evolución del genoma en diferentes momentos de la historia de la especie. Estos mecanismos aún no son bien conocidos pero, con el desarrollo de buenos mapas genéticos, se podrá comprender mejor lo ocurrido durante la evolución de estas secuencias (por ejemplo, la duplicación de un gen ancestral que codifica para la amilasa en el cromosoma 3 del ratón dió como resultado dos copias del gen, *Amy1* y *Amy2*, siendo el primer gen activo en las glándulas salivales y el segundo en el páncreas).

Establecimiento de homologías cromosómicas entre especies

De los 3.000 genes mapeados actualmente en el ratón, hay alrededor de 1.800 genes homólogos con genes humanos y se observó que existen grupos de genes que muestran el mismo orden lineal en ambas especies (grupos sinténicos)⁸. Cada uno de estos grupos constituye un segmento cromosómico conservado resultando en homologías inter-específicas. Actualmente hay 185 segmentos de este tipo reconocidos en el genoma murino, con tamaños que van desde 1 cM a más de 50 cM. La longitud total de todos estos segmentos conservados es aproximadamente 1.050 cM, lo que correspondería al 65% del genoma del ratón. Estos mapas comparativos pueden usarse para predecir ligamientos entre genes y para identificar "genes candidato" para enfermedades genéticas en ambas especies. La identificación del gen *obese* responsable de fenómenos de obesidad en el ratón y el hombre es un ejemplo reciente de este tipo de trabajos⁹. Asimismo, estas homologías aportarán datos para el ambicioso proyecto de la secuenciación completa del genoma humano (*Human Genome Project*) lanzado en 1988. En la actualidad, se encuentran terminadas las secuencias genómicas completas correspondientes a 141 virus, 51 organelas, 2 eubacterias (*Haemophilus influenzae* y *Mycoplasma genitalium*), 1 arcobacteria (*Methanococcus jannaschii*) y 1 eucariota (la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) siendo este último, con 12 Mb, el genoma más grande secuenciado hasta el momento¹⁰. Un mapa de este tipo para el genoma humano estará disponible recién en el año 2005, siempre que se cumpla con lo proyectado. En vistas al tremendo valor que tendría un mapa de estas características para la biomedicina, no es razonable esperar hasta ese momento para comenzar a diseñar dicho mapa. Es por eso que se está trabajando actualmente en construir mapas en base

a fragmentos cortos de ADNc, amplificados por PCR a partir de extremos no-traducidos de ARNm, denominados EST's (*expressed sequence tags*). La colección pública de ESTs es actualmente de 450.000 secuencias, entre las cuales se encuentran representados el 80% de los genes humanos. Asimismo, se está trabajando en la localización de EST's humanos, utilizando los mismos *primers*, en el genoma de la rata y el ratón, lo que permitirá descubrir nuevas homologías. Finalmente, el último mapa génico humano (publicado en el año 1996 por el consorcio internacional a cargo del proyecto)¹¹ contiene 16.000 loci mapeados, representados por secuencias de ADNc.

Fernando Benavides¹, Jean-Louis Guénet²

¹ Instituto de Investigaciones Hematológicas,
Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires;

² Unité de Génétique des Mammifères,
Institut Pasteur, France

1. Doolittle D, Davisson M, Guidi J, Green M. Catalog of mutant genes and polymorphic loci. *Inc: Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*. M.F. Lyon, S. Rastan, S. Brown (eds), Oxford: Oxford University Press, 1996.
2. Guénet J-L, Simon D, Avner P. The use of interspecific mouse crosses for gene localization: present status and future perspectives. *Curr Top Microbiol Immunol* 1988; 137: 13-7.
3. Silver L (ed). *Mouse Genetics. Concepts and applications*. Oxford: Oxford University Press, 1995.
4. Guénet J-L. The Mouse Genome. In: *Genomes, Molecular Biology and Drug Discovery*, New York: Academic Press, 1996; 27-51.
5. Love J, Knight A, McAleer M, Todd J. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analyzed microsatellites. *Nucleic Acid Res* 1990; 18: 4123-30.
6. Lyon M, Cocking Y., Gao X. Mouse chromosome atlas. *Mouse Genome* 1996; 94: 29-73.
7. Breen M, Deakin L, MacDonald B, et al. Towards high resolution maps of the mouse and human genomes-A facility for ordering markers to 0.1 cM resolution. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 621-7.
8. Nadeau J, Davisson M, Doolittle D, et al. Comparative map for mice and humans. *Mammalian Genome* 1992; 3: 480-536.
9. Zhang Y, Proença R, Maffei M, Barone M, Friedman J. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32.
10. Goffeau A, Barrell B, Bussey H, et al. Life with 6.000 genes. *Science* 1996; 274: 546-67.
11. Schuler G, Boguski M, Stewart E, et al, A gene map of the human genome. *Science* 1996; 274: 540-5.

--

If we do not plant the tree of knowledge when young, it will give us no shade when we are old.

Si no plantamos el árbol de la sabiduría cuando jóvenes, no podrá prestarnos su sombra en la vejez.

Lord Chesterfield (1694 - 1773)

Letters to his son, 1747