



Ciclo de Seminarios nuevas técnicas de mejoramiento genético de plantas. Secretaría Ejecutiva CIBIOGEM

EDICIÓN DE GENOMAS CON NUCLEASAS SITIO-DIRIGIDAS



Dr Yuri Jorge Peña Ramírez
Ecosur Campeche

CONTENIDO:

- Qué es la edición de genomas
- Herramientas para la edición de genomas
 - Nucleasas de dedos de zinc (ZFN)
 - Nucleasas tipo activadores de transcripción (TALEN)
 - Nucleasas de Secuencias Palindrómicas Repetidas Inversas (CRISPR-Cas)
- OGMs en desarrollo empleando esta tecnología
- Retos para su detección y monitoreo

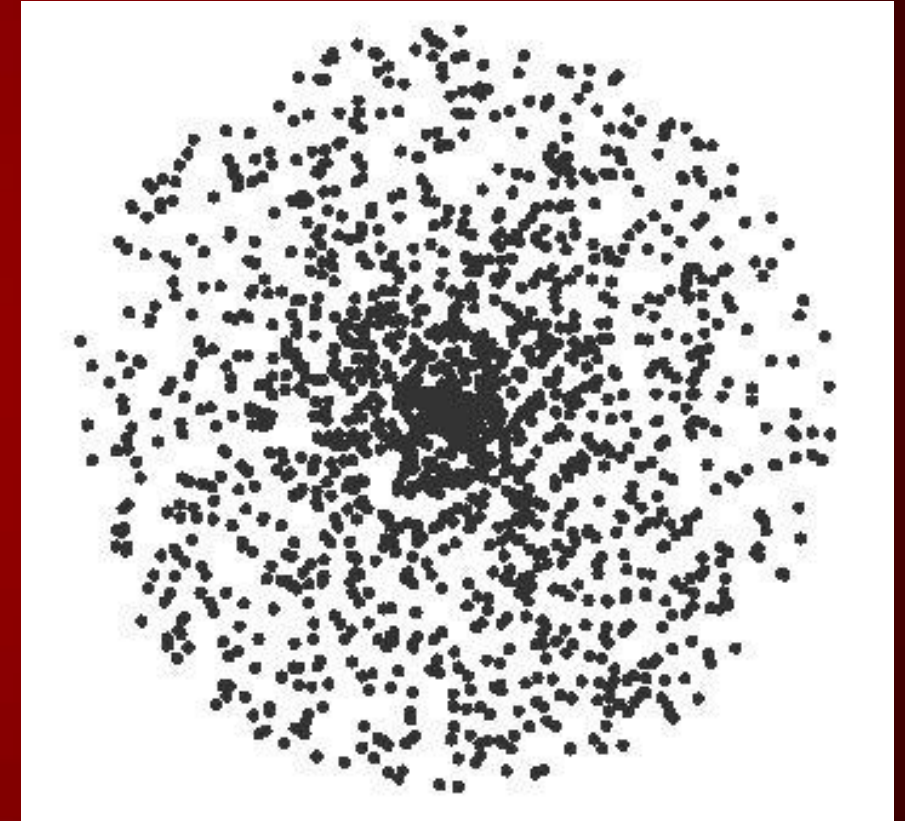
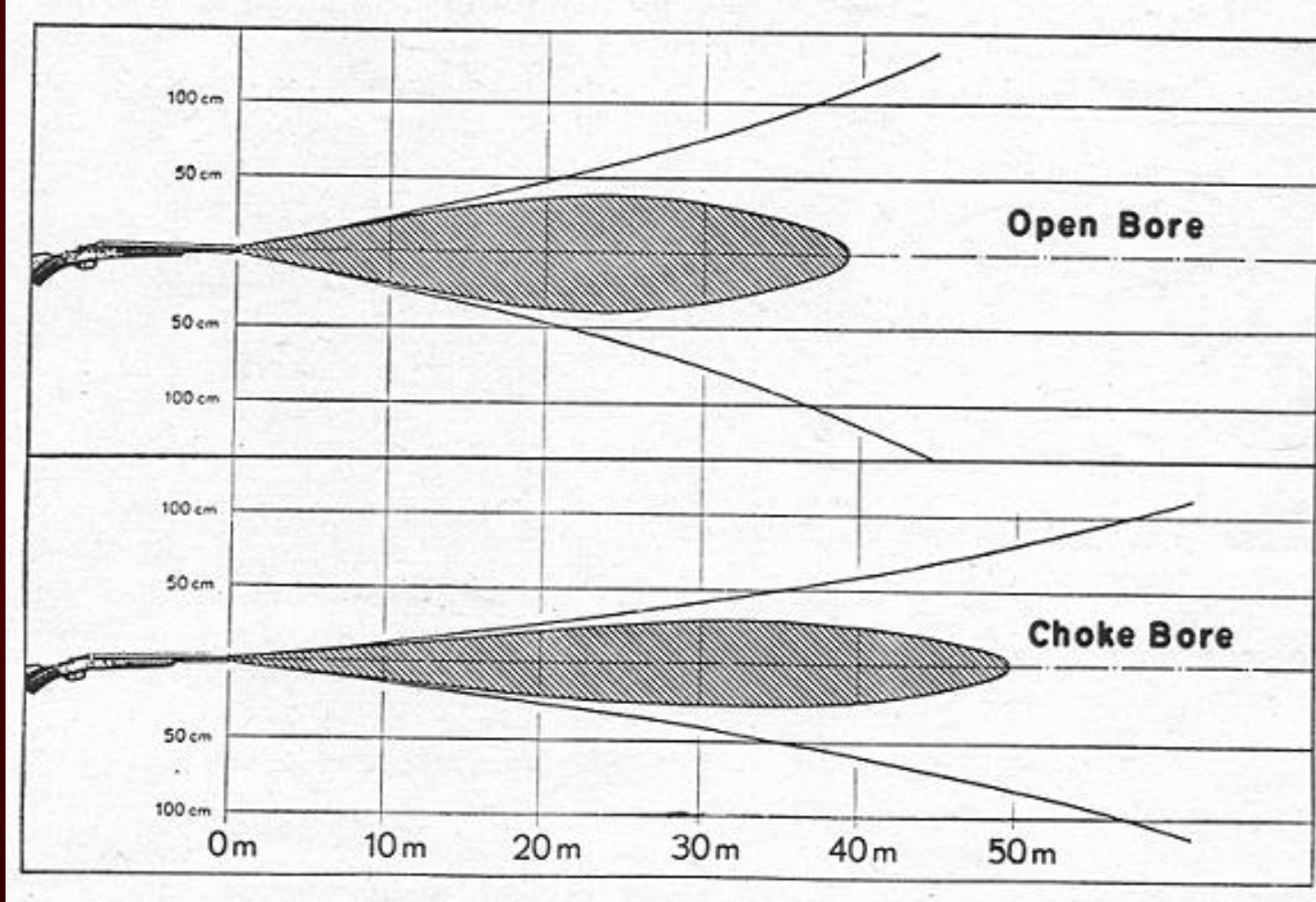
¿QUÉ ES LA EDICIÓN DE GENOMAS?



CAZANDO PATOS



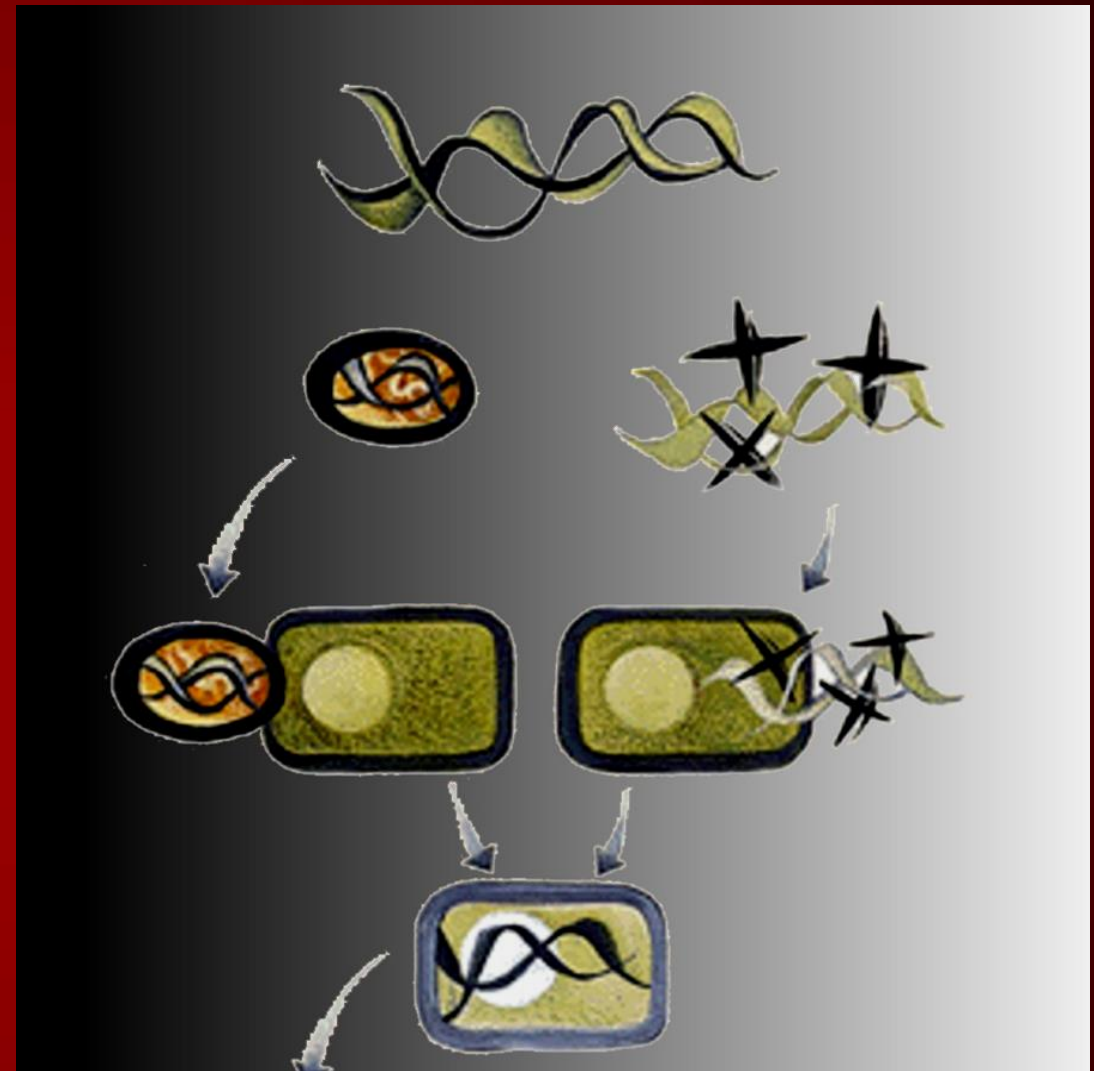
CAZANDO PATOS



CAZANDO UNA PLANTA GM

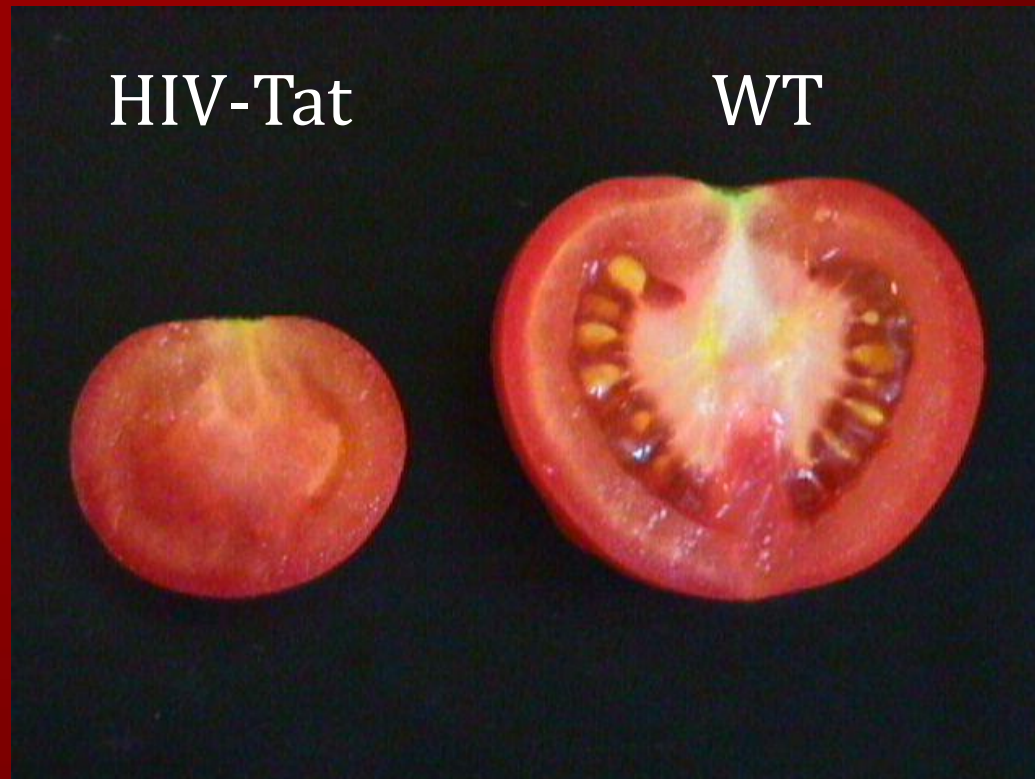
En los métodos tradicionales de generación de plantas GM (Agrobacterium y Biobalística), el sitio de inserción del transgén no puede ser controlado.

La inserción puede ser incluso múltiple y ocurre en sitios al azar del genoma.



EL PROBLEMA DE UN MÉTODO AL AZAR

- Consumo de tiempo seleccionando el evento deseado
- Efectos pleiotrópicos
- Silenciamiento
- Etc.



MAYOR PRECISIÓN ES MEJOR

La edición de genomas emplea herramientas que incrementan sustancialmente la precisión y eliminan muchos de los problemas de las técnicas tradicionales



¿QUÉ ES LA EDICIÓN DE GENOMAS?

La edición de genomas se refiere a un tipo de ingeniería genética en el que manipulan directamente secuencias en el genoma.

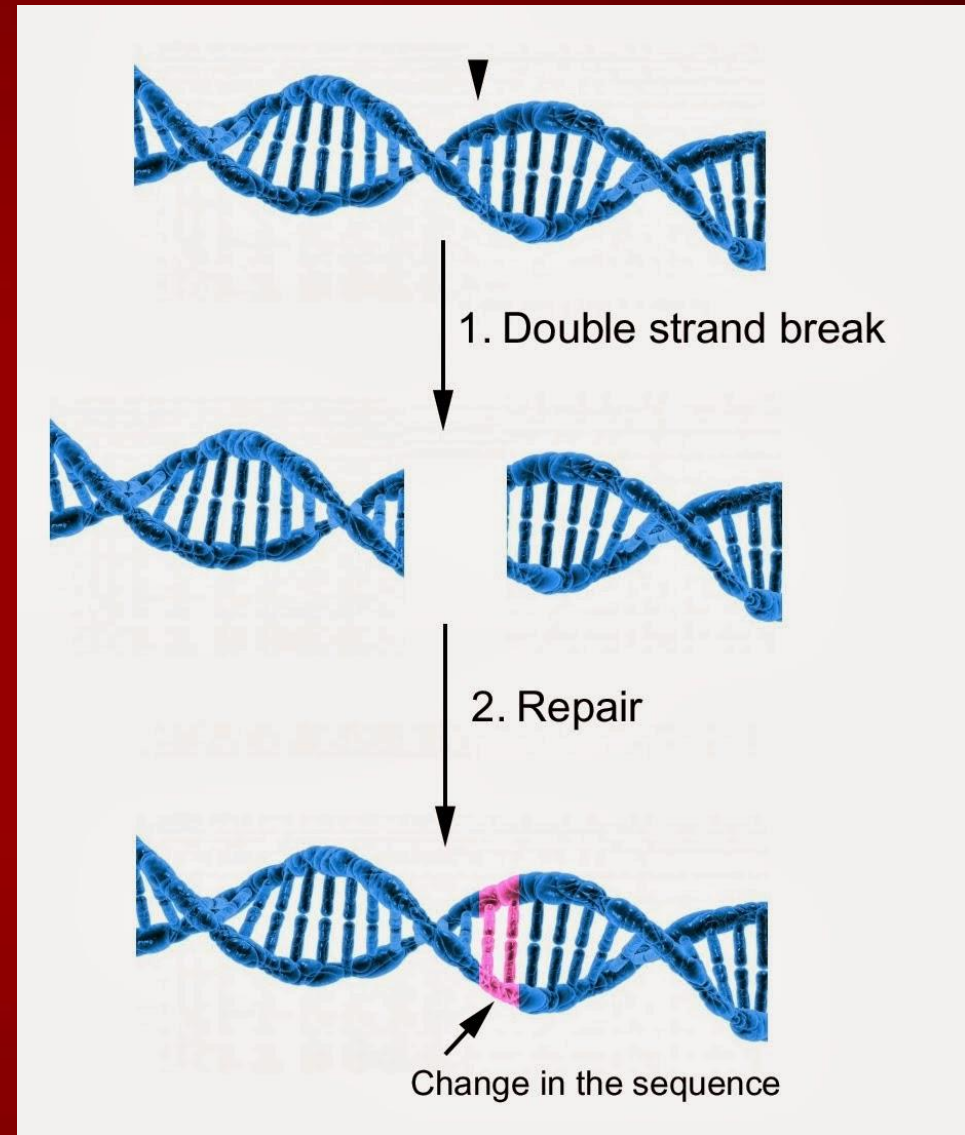
A diferencia de las técnicas previas, esta manipulación se dirige a **sitios específicos**.



EN GENERAL:

Se realiza a partir del corte del ADN en ambas cadenas en secuencias específicas y únicas en un genoma...

..seguido de procesos de reparación por recombinación homóloga o no-homóloga



HERRAMIENTAS PARA LA EDICIÓN DE GENOMAS



TECNOLOGÍAS ACTUALES

- Nucleasas de dedos de zinc (ZFN)
- Nucleasas tipo activadores de transcripción (TALEN)
- Nucleasas de Secuencias Palindrómicas Repetidas Inversas (CRISPR-Cas)

NUCLEASAS DE DEDOS DE ZINC

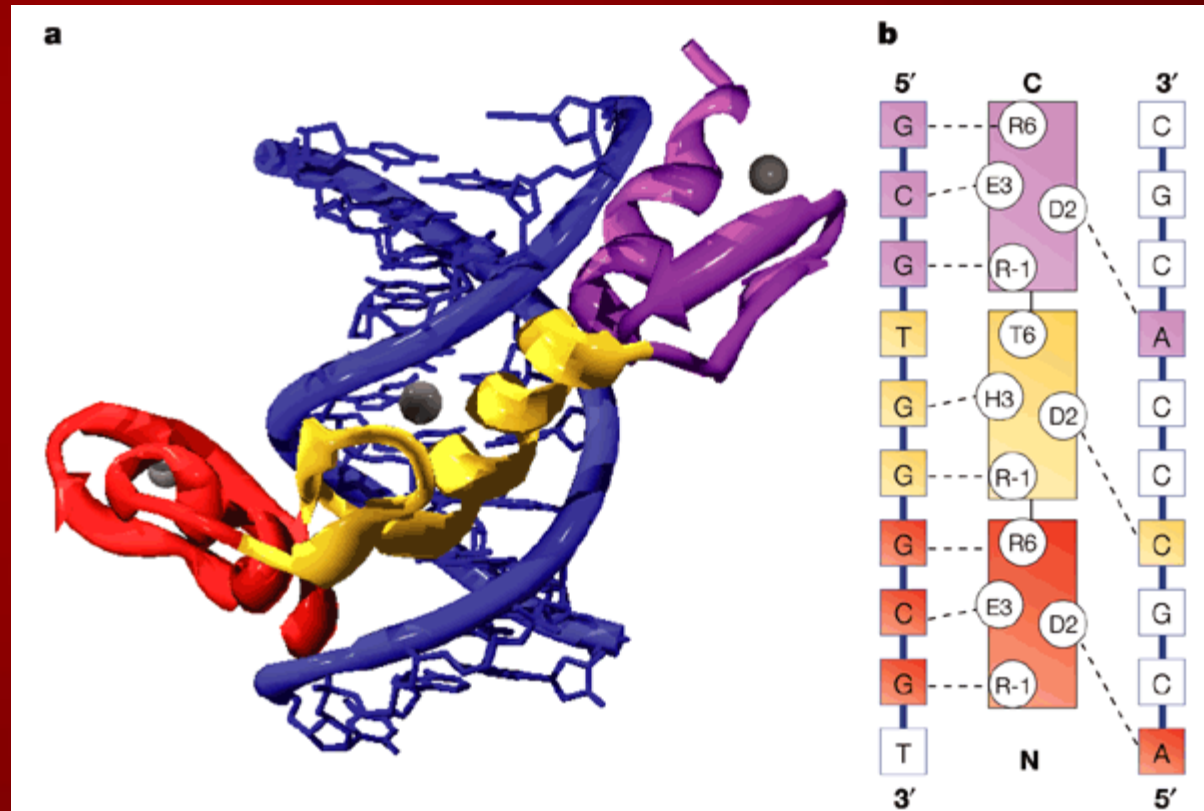


ZFNS O ZN

Las nucleasas de dedos de Zinc se componen de dos partes:

1) Los dedos de Zinc

Son dominios de naturaleza proteica capaces de reconocer un trinucleótido de una secuencia específica

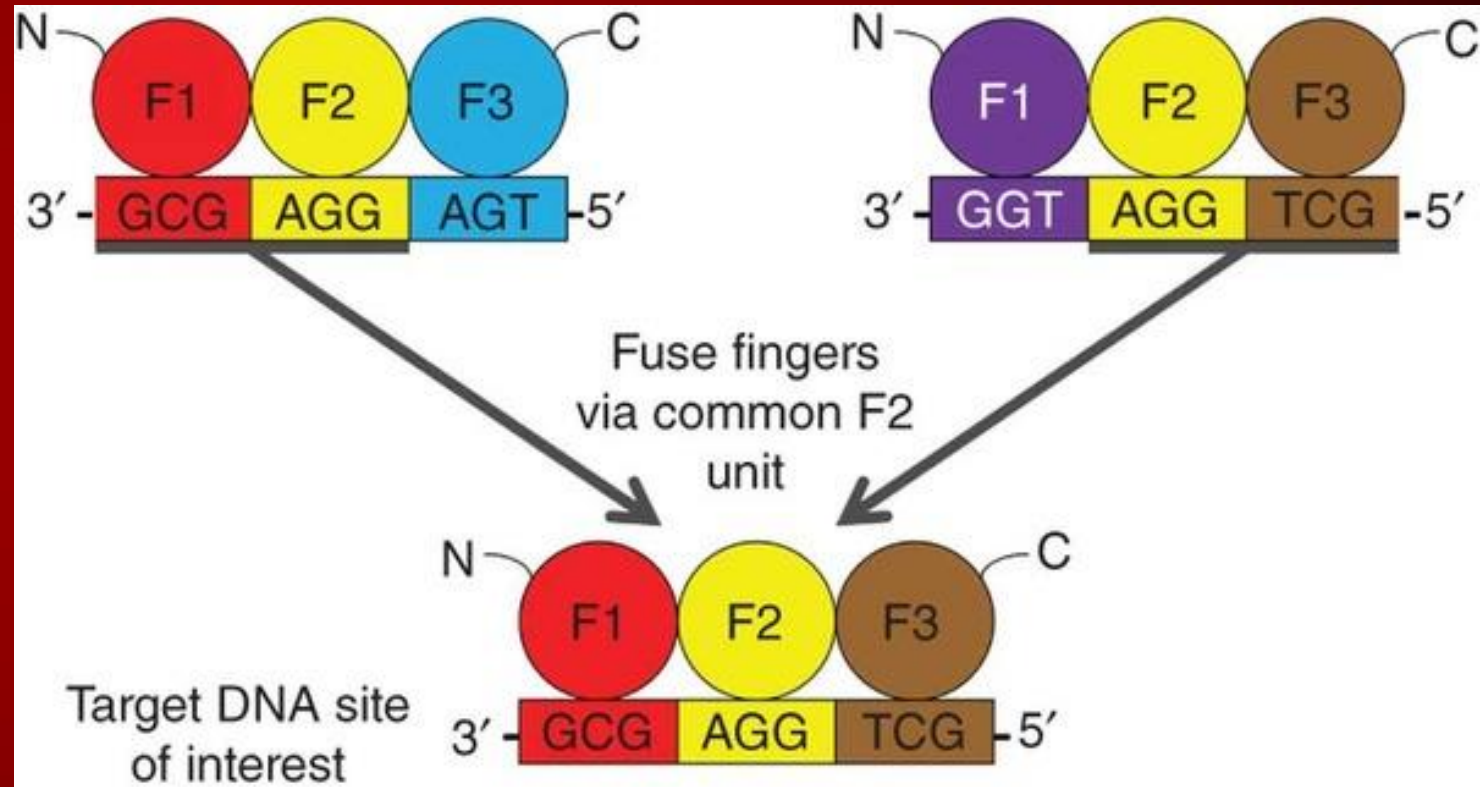


ZFNS O ZN

Las nucleasas de dedos de Zinc se componen de dos partes:

1) Los dedos de Zinc

Pueden manipularse de manera modular para dirigir su unión a una secuencia en particular



ZFNS O ZN

Las nucleasas de dedos de Zinc se componen de dos partes:

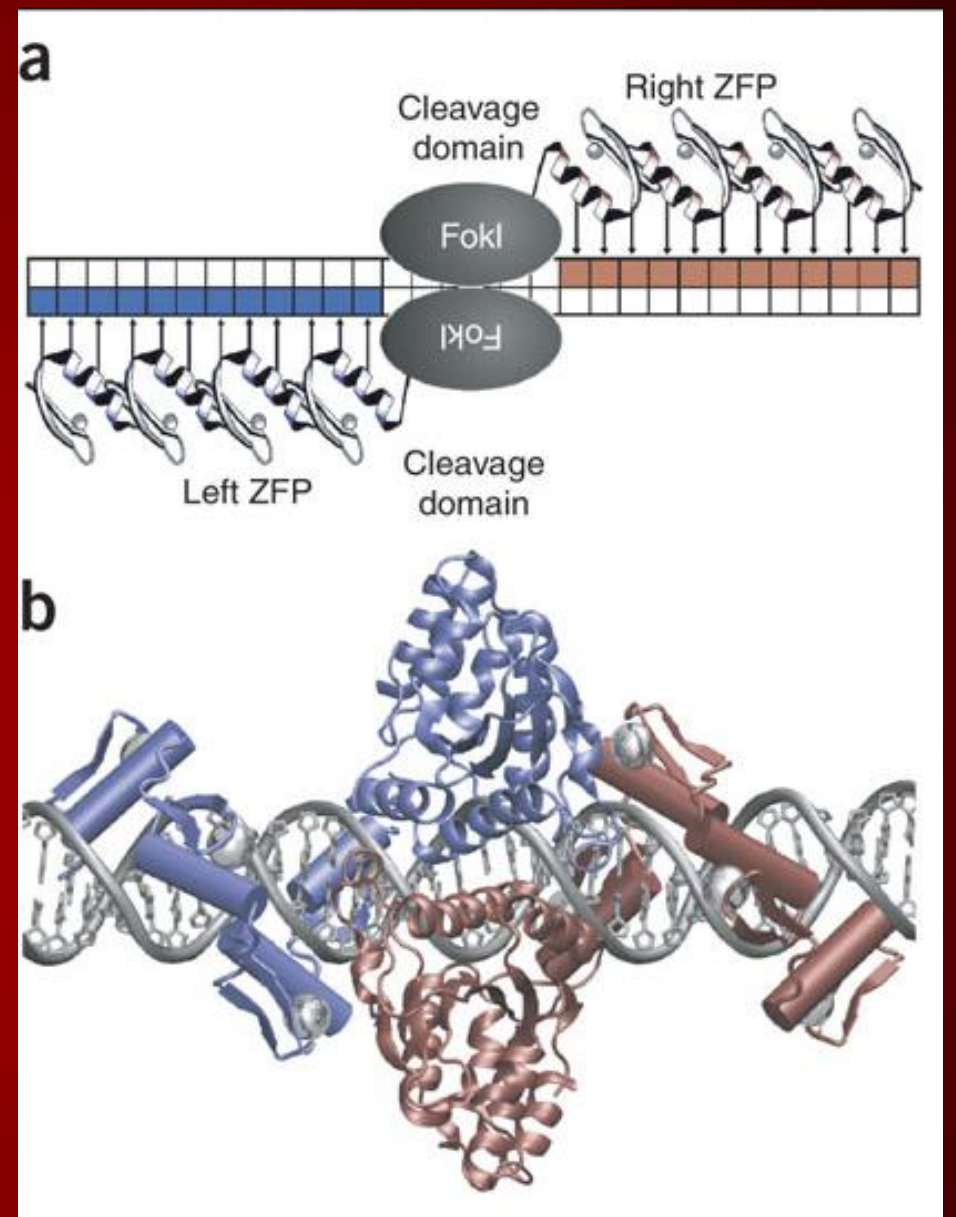
- 1) Los dedos de Zinc
- 2) La nucleasa FokI

Es una nucleasa de *Flavobacterium okeanoikoites* que ha sido modificada para generar un corte secuencia-independiente

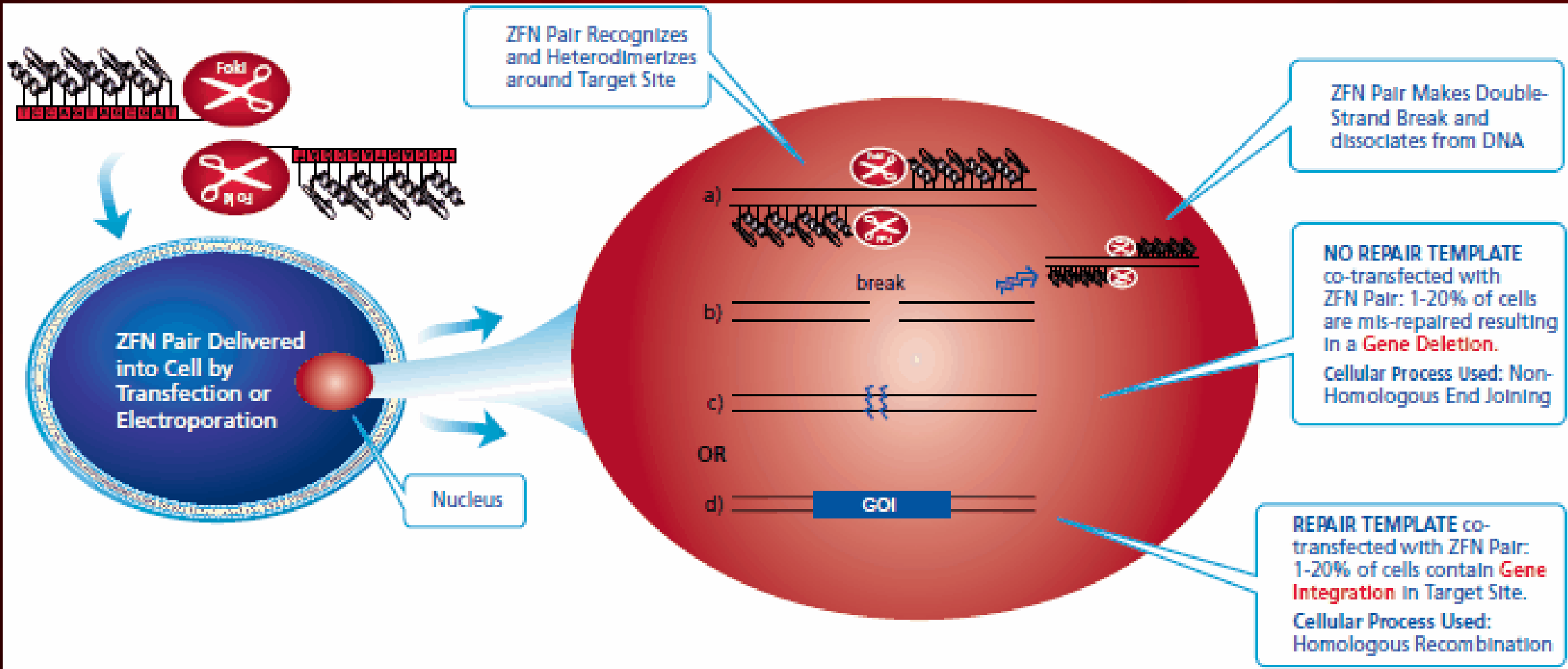


ZFNs O ZN

Los dominios de dedos de Zinc, fusionados a la nucleasa FokI, trabajan juntos para unir secuencias específicas de 18 pb (probabilísticamente únicas en el genoma)



ZFNs O ZN

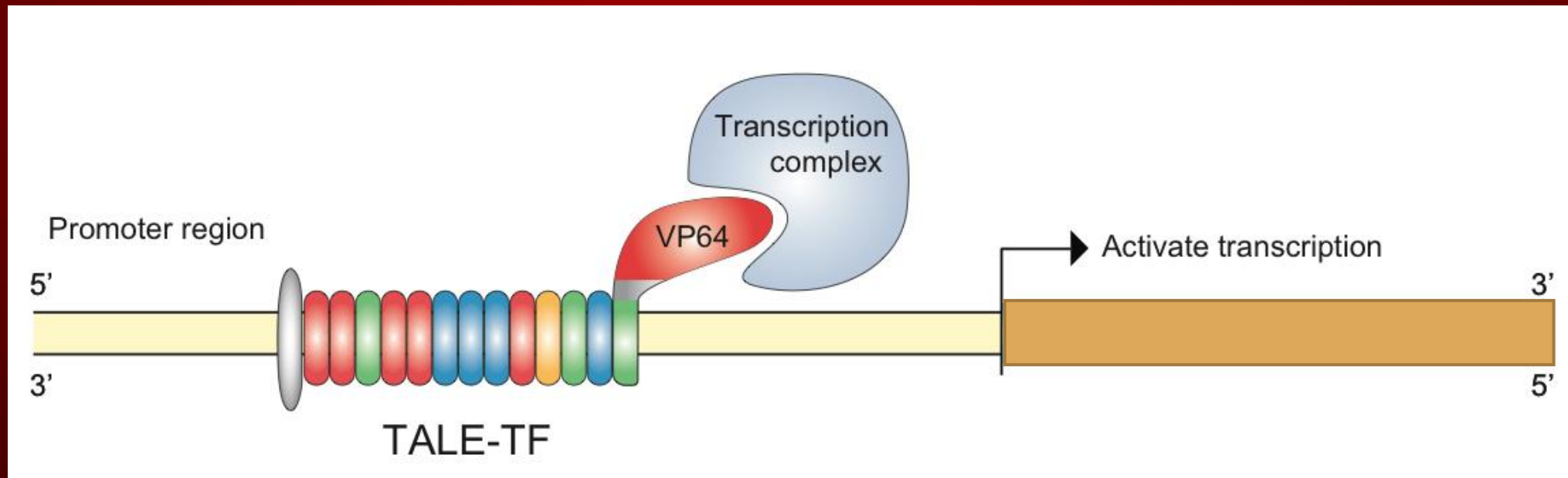


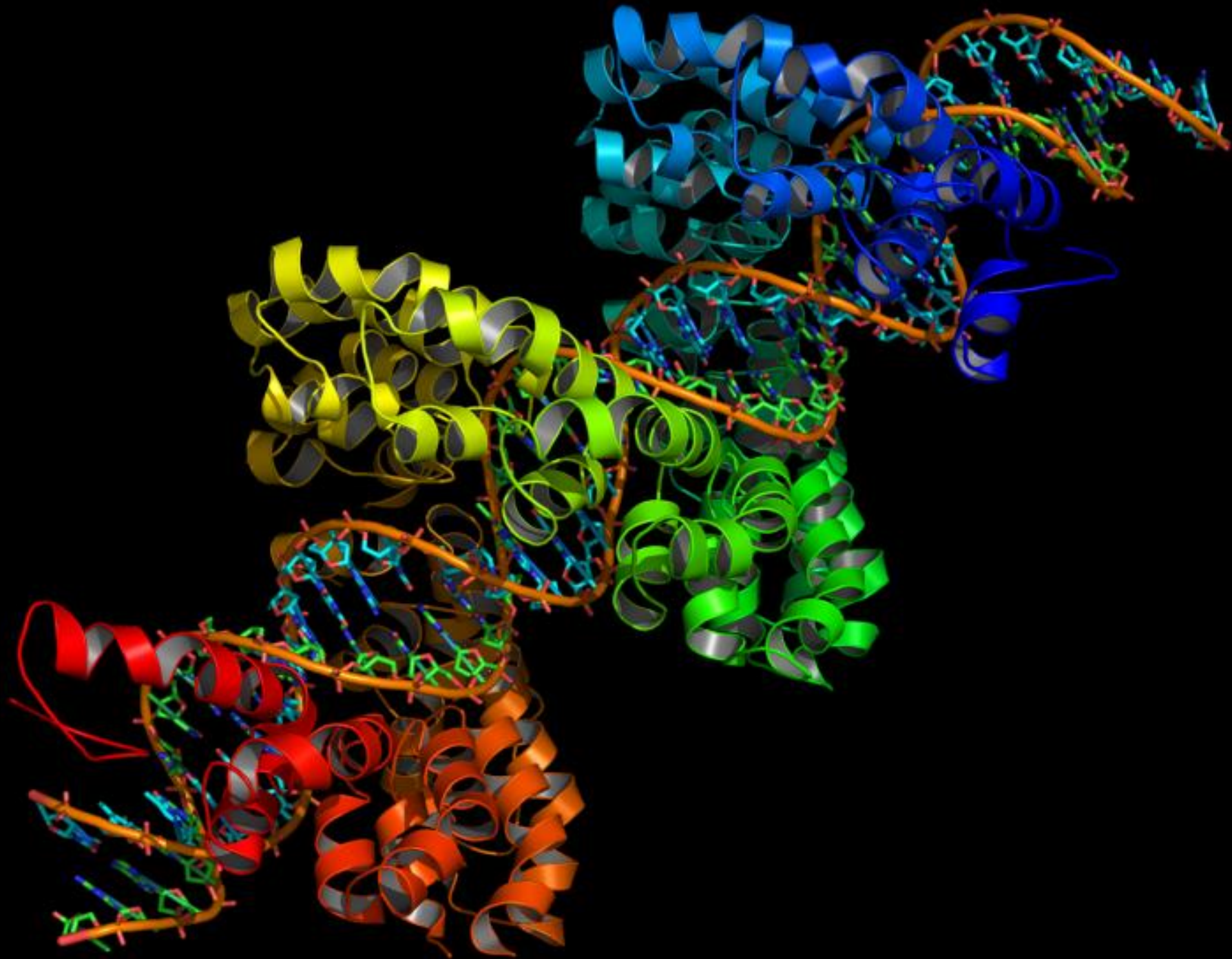
TALENS

Transcription Activator Like Effector NucleaseS

TRANSCRIPTION ACTIVATOR LIKE EFFECTORS

- Son sistemas originalmente caracterizados en *Xantomonas* en donde las proteínas TALE son secretadas cuando infectan una gran variedad de plantas activando en éstas genes que ayudan a la patogénesis.





INGENIERÍA DE TALEs

Se pueden generar secuencias personalizadas de TALEs para reconocer secuencias genómicas únicas

THE TALE CODE

Di-Amino acid	Nucleotide bound
---------------	------------------

NI = A

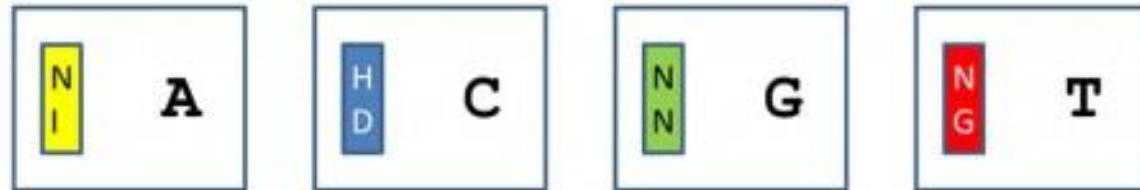
NG = T

HD = C

NN = G/A

B.

Individual TALE repeat domains



Assemble modules

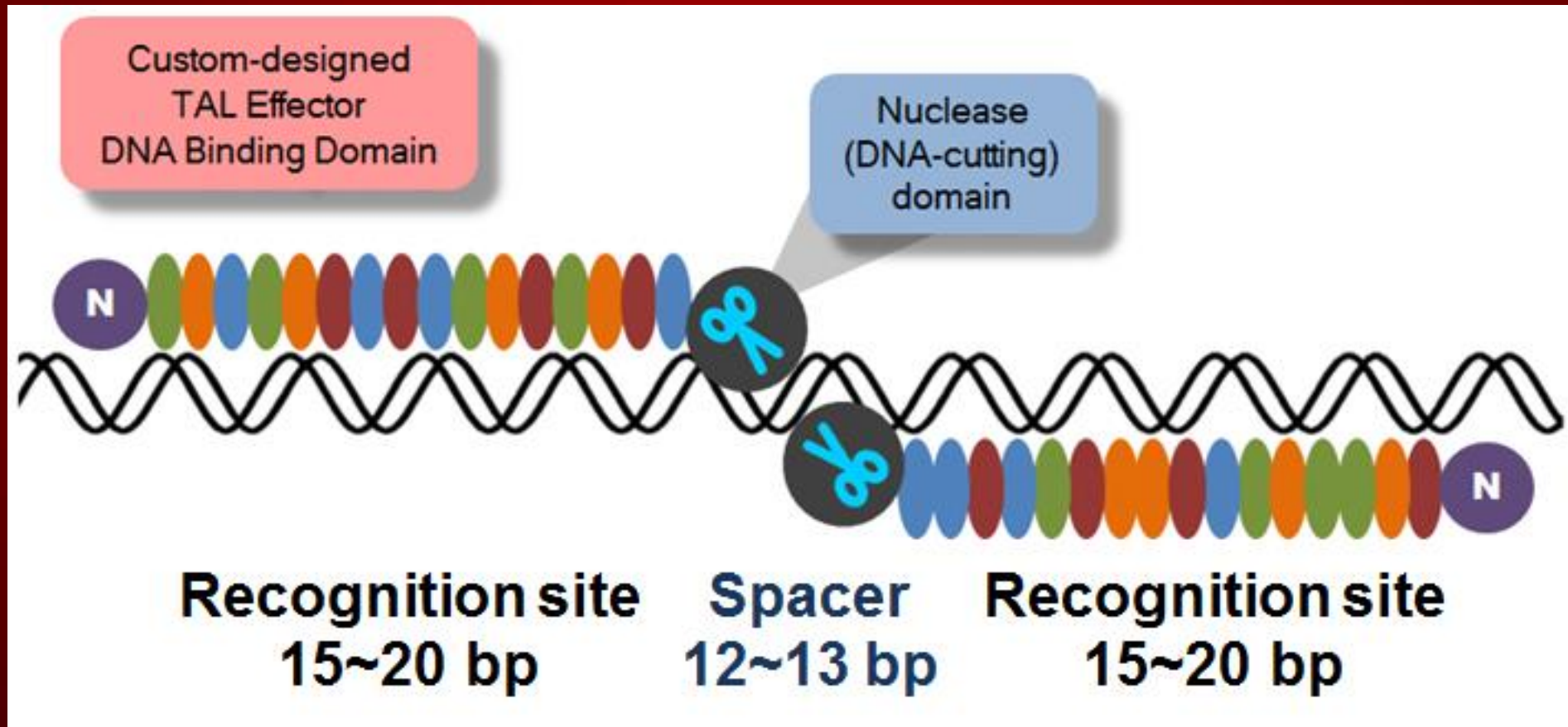


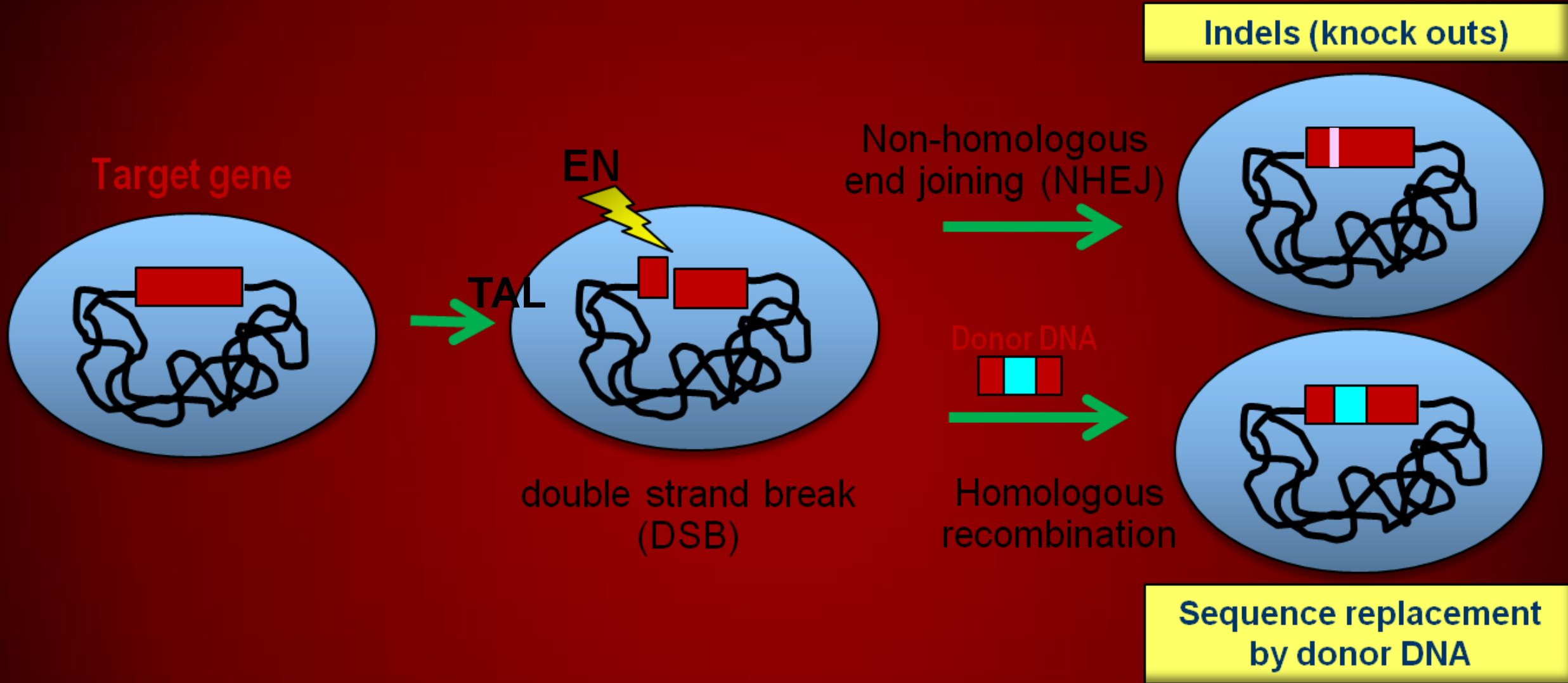
†TTACTGCTGCTCCCGCT

Engineered TALE repeat array

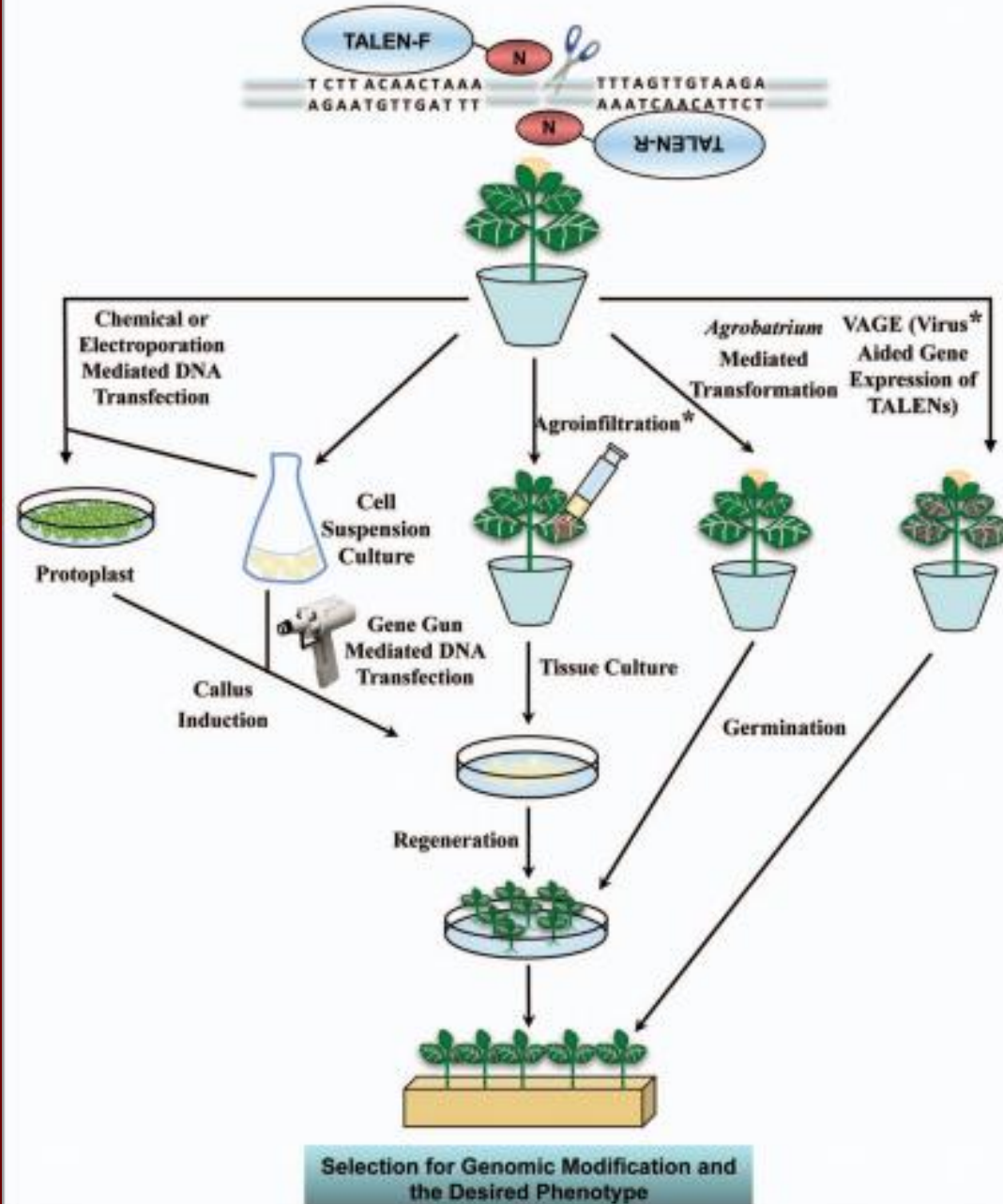
INGENIERÍA DE TALEs

A la secuencia de TALEs personalizada se puede fusionar la nucleasa FokI para generar el dímero funcional de corte





TALENs *in silico* Design, Synthesis and *in vitro* Assembly



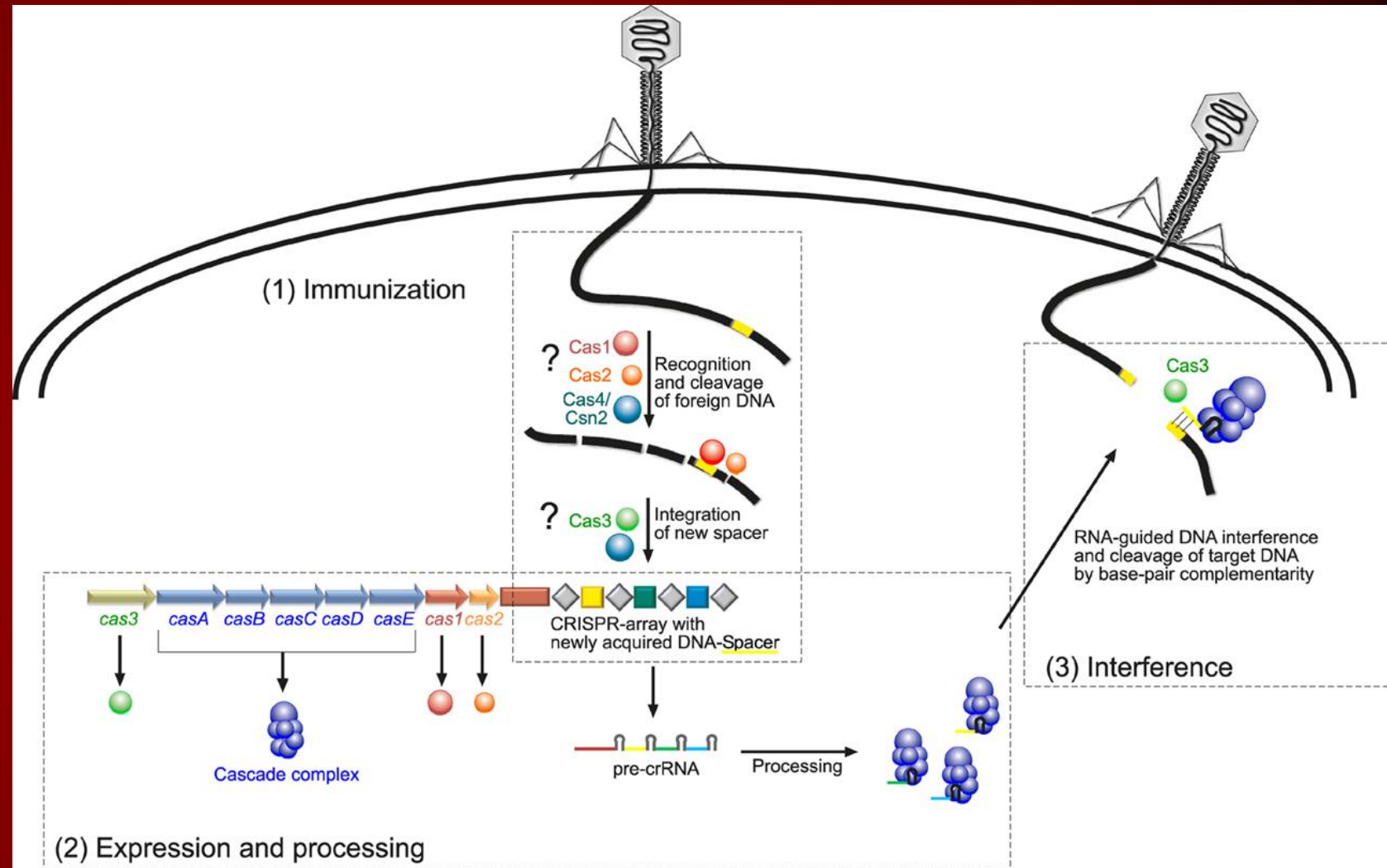
CRISPR / CAS9

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CRISPR / CAS

Los CRISPR han sido encontrados en el 40% de las eubacterias y 90% de las arqueas secuenciadas.

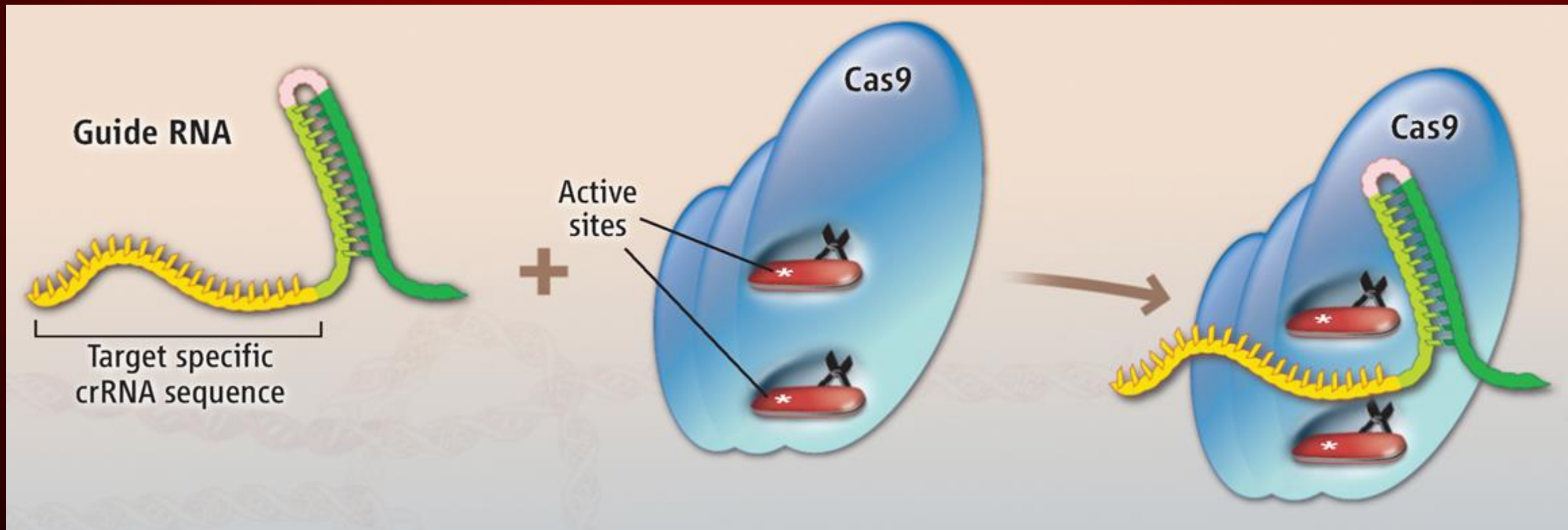
Es un “sistema inmune” de las bacterias para defenderlas del ataque de bacteriófagos



COMPONENTES DEL SISTEMA CRISPR / CAS9

El sistema CRISPR se compone de dos partes

- 1) Un componente protéico CAS9 con actividad de nucleasa
- 2) Un RNA guía que brinda especificidad al sistema

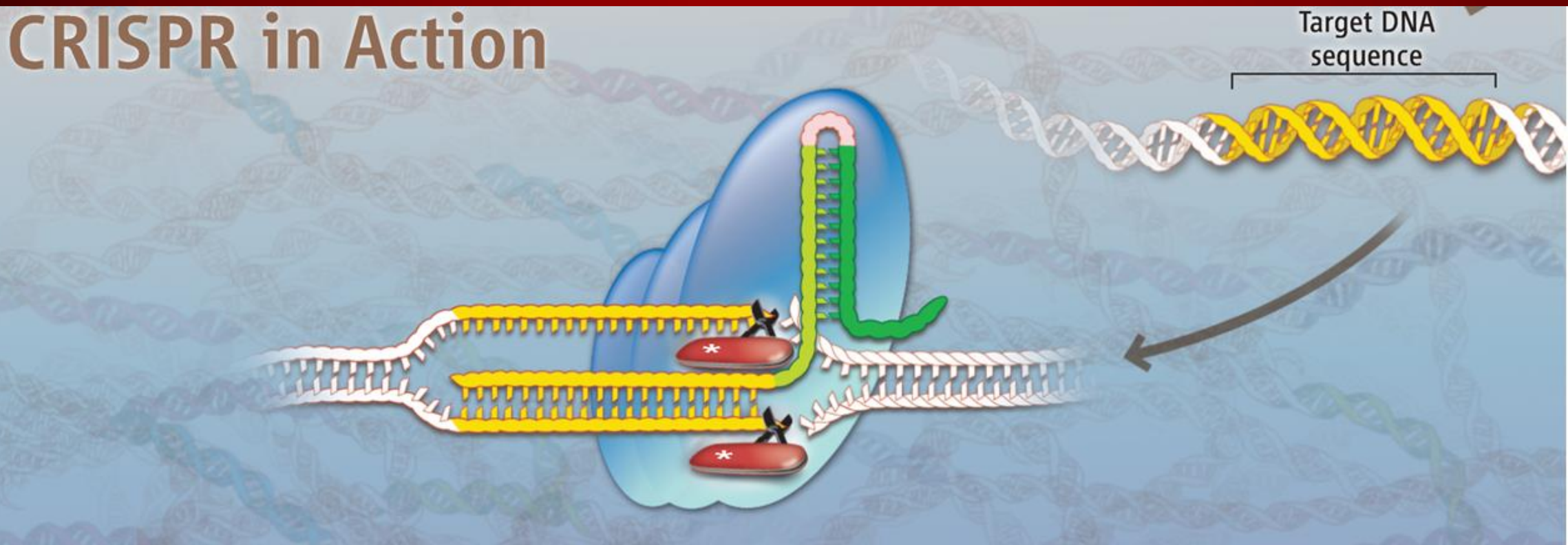


ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA CRISPR / CAS9

El sistema CRISPR se compone de dos partes

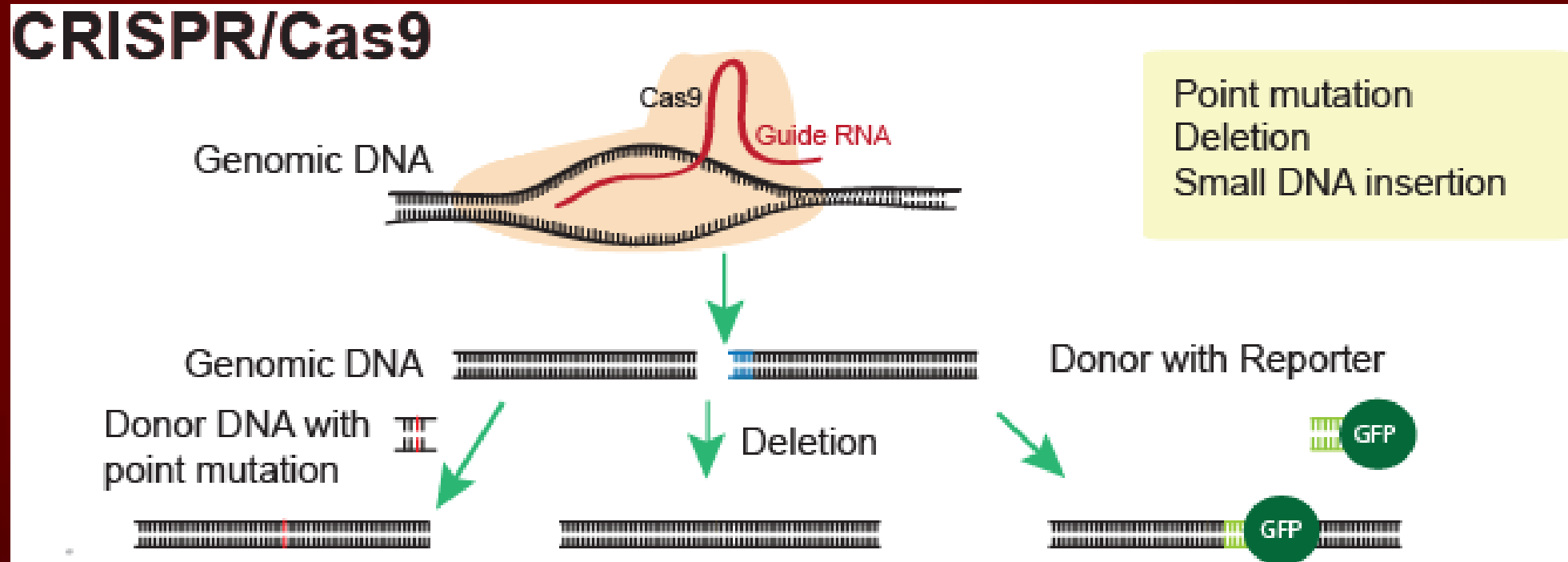
- 1) Un componente protéico CAS9 con actividad de nucleasa
- 2) Un RNA guía que brinda especificidad al sistema

CRISPR in Action



USO DE CRISPR / CAS9

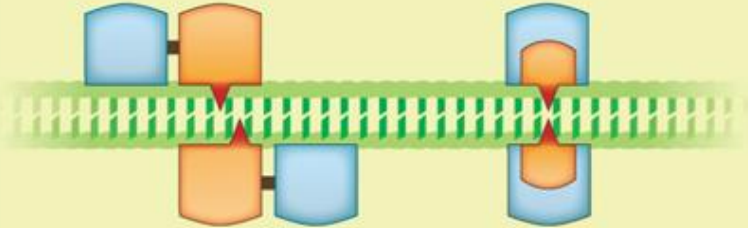
Al igual que en los sistemas anteriores la edición con CRISPR puede emplearse para generar mutaciones puntuales, deleciones o inserciones cortas



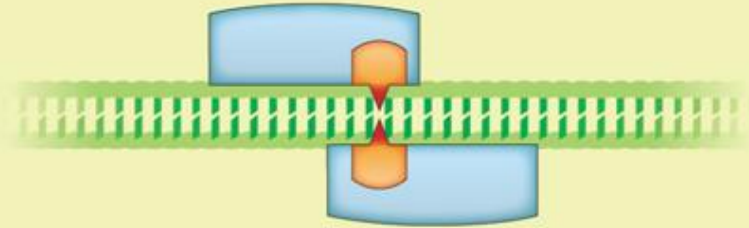
EN RESUMEN

NATURAL

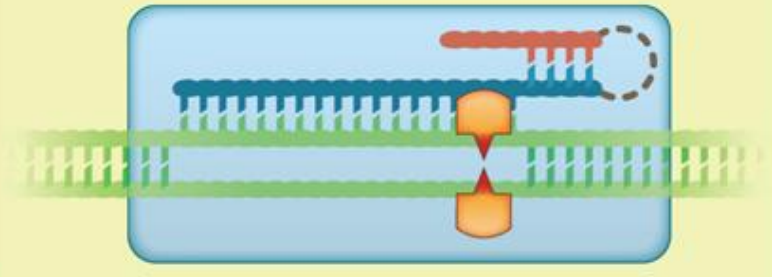
A Restriction nucleases



B Homing endonuclease

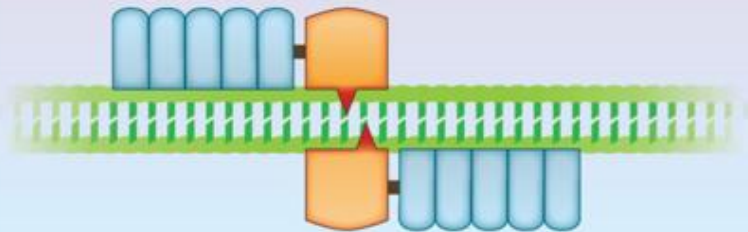


C CRISPR-associated nuclease

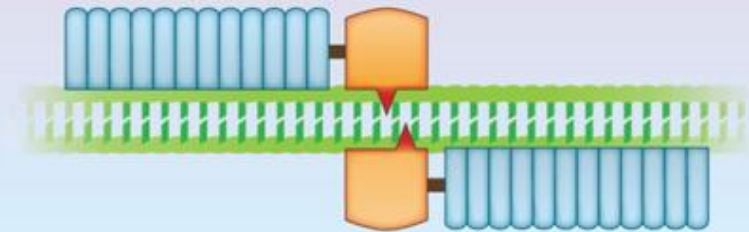


SYNTHETIC

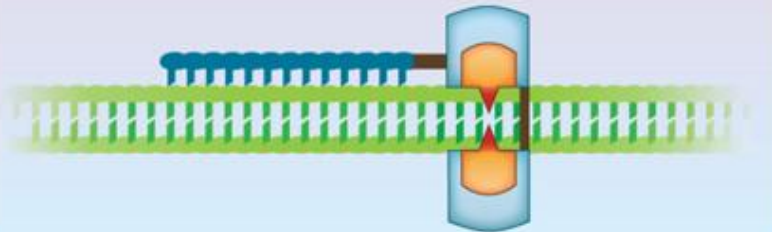
D Zinc finger nuclease



E TAL effector nuclease

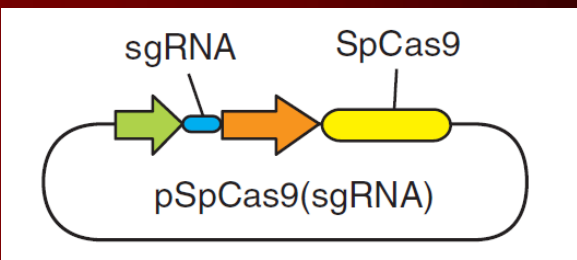
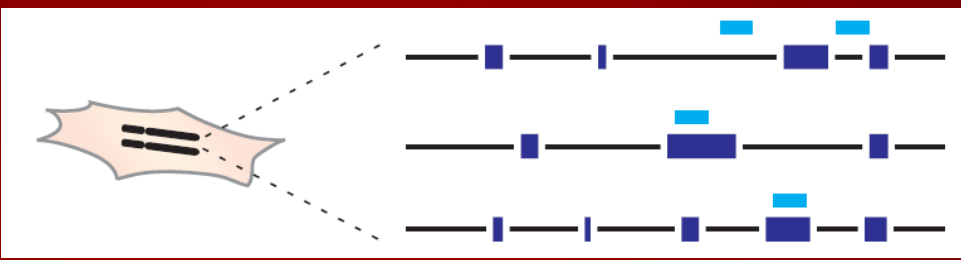


F TFO nuclease

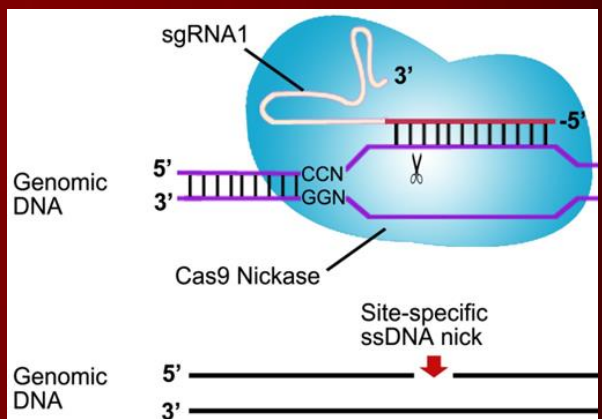


VENTAJAS DE LAS CRISPR / CAS

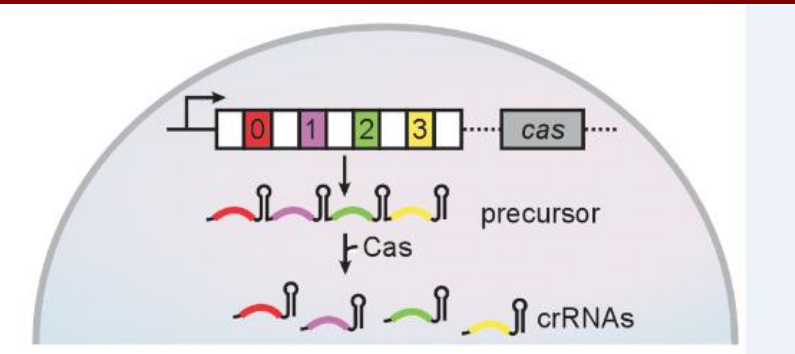
Facilidad de personalización. (Oligo de 20 nt).



Tipos de corte



Ediciones múltiples



OGMS EN DESARROLLO



ORGANISMOS EN DESARROLLO USANDO ZFN

Organism	Gene	ZFN development method*	Refs
<i>Gene disruption</i>			
Fruitflies	<i>yellow</i>	Modular assembly	2
	<i>rosy, brown</i>	Modular assembly	60
CHO cells	<i>Dhfr</i>	Two-finger modules	48
	<i>Dhfr, Glul</i>	Two-finger modules	50
	<i>Fut8</i>	Two-finger modules	92
	<i>Bax, Bak1</i>	Two-finger modules	49
Zebrafish	<i>kdr</i>	Bacterial one-hybrid	36
	<i>golden, no tail</i>	Two-finger modules	35
	<i>tfr2, dat, telomerase, hif1aa, gridlock</i> (also known as <i>hey2</i>)	OPEN	37
	<i>cxcr4a</i>	Modular assembly	93
Human T cells	<i>CCR5</i>	Two-finger modules [†]	76
Hek293 cells	<i>CCR5</i>	Modular assembly	17
Rats	<i>Rab38, IgM</i>	Two-finger modules	38
	<i>Il2rg</i>	Two-finger modules	39
SupT1 cells	<i>CXCR4</i>	Two-finger modules	94
K562 cells, HeLa cells	<i>PPP1R12C</i> (the <i>AAVS1</i> locus), <i>TP73</i> , <i>MAP3K14</i> , <i>EP300</i> , <i>BTK</i> , <i>CARM1</i> , <i>GNAI2</i> , <i>TSC2</i> , <i>RIPK1</i> , <i>KDR</i> , <i>NR3C1</i>	Two-finger modules	47

ORGANISMOS EN DESARROLLO USANDO ZFN

Organism	Gene	ZFN development method*	Refs
Gene correction			
Fruitflies	<i>yellow</i>	Modular assembly	3
	<i>rosy</i>	Modular assembly	60
	<i>coilin, pask</i>	Modular assembly	34
K562 cells, human T cells	<i>IL2RG</i>	Two-finger modules [†]	61
K562 cells	<i>IL2RG, VEGF, HOXB13, CFTR</i>	OPEN	62
Tobacco	<i>SuRA, SuRB</i> (acetolactate synthase genes)	OPEN	63
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ABI4, KU80</i>	Modular assembly	42
	<i>ADH1, TT4</i>	OPEN	41
Mouse ES cells	<i>H3f3b</i>	Two-finger modules	67
Gene addition			
K562 cells	<i>IL2RG</i>	Two-finger modules [†]	66
Human ES cells	<i>IL2RG, CCR5</i>	Two-finger modules [†]	68
	<i>PIGA</i>	OPEN	70
	<i>OCT4</i> (also known as <i>POU5F1</i>), <i>PPP1R12C</i> (AAVS1 locus), <i>PITX3</i>	Two-finger modules	71
Tobacco	Chitinase	Two-finger modules	74
Maize	<i>lpk1, Zein protein 15</i>	Two-finger modules [†]	75
Human tissue culture cells	<i>PPP1R12C</i> (AAVS1 locus)	Two-finger modules [†]	72
Mouse ES cells	<i>H3f3b</i>	Two-finger modules	67

OTROS OGMS EN DESARROLLO EMPLEANDO TALENS Y CRISPR/CAS

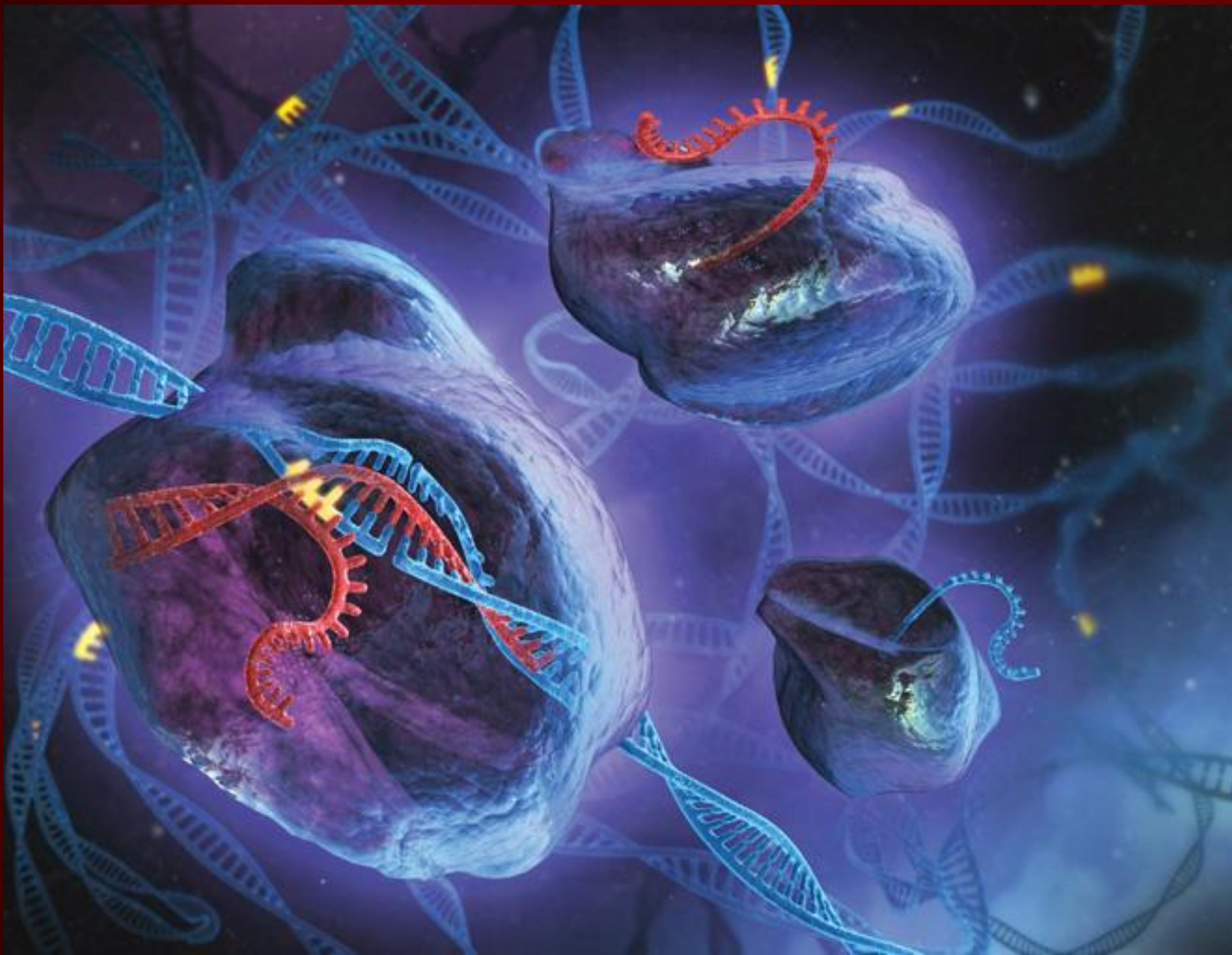


RETOS PARA SU DETECCIÓN Y MONITOREO



LOS EVENTOS DE EDICIÓN DE GENOMAS PUEDEN SER MUY SUTILES

- InDels pequeños (hasta de 1 base)
- Inserciones de genes estructurales (Cisgenes, transgenes o secuencias sintéticas)
- Uso de reguladores internos o solo la modificación de éstos





POR SU ATENCIÓN, MUCHAS GRACIAS!!!

Yuri Jorge Peña Ramírez

Contacto:

Correo electrónico: ypena@ecosur.mx

Teléfono: 981 1273720 ext 2306

Web personal www.cultivo.com.mx

Twitter: @Biotec_Forestal