

Ingeniería Genética II

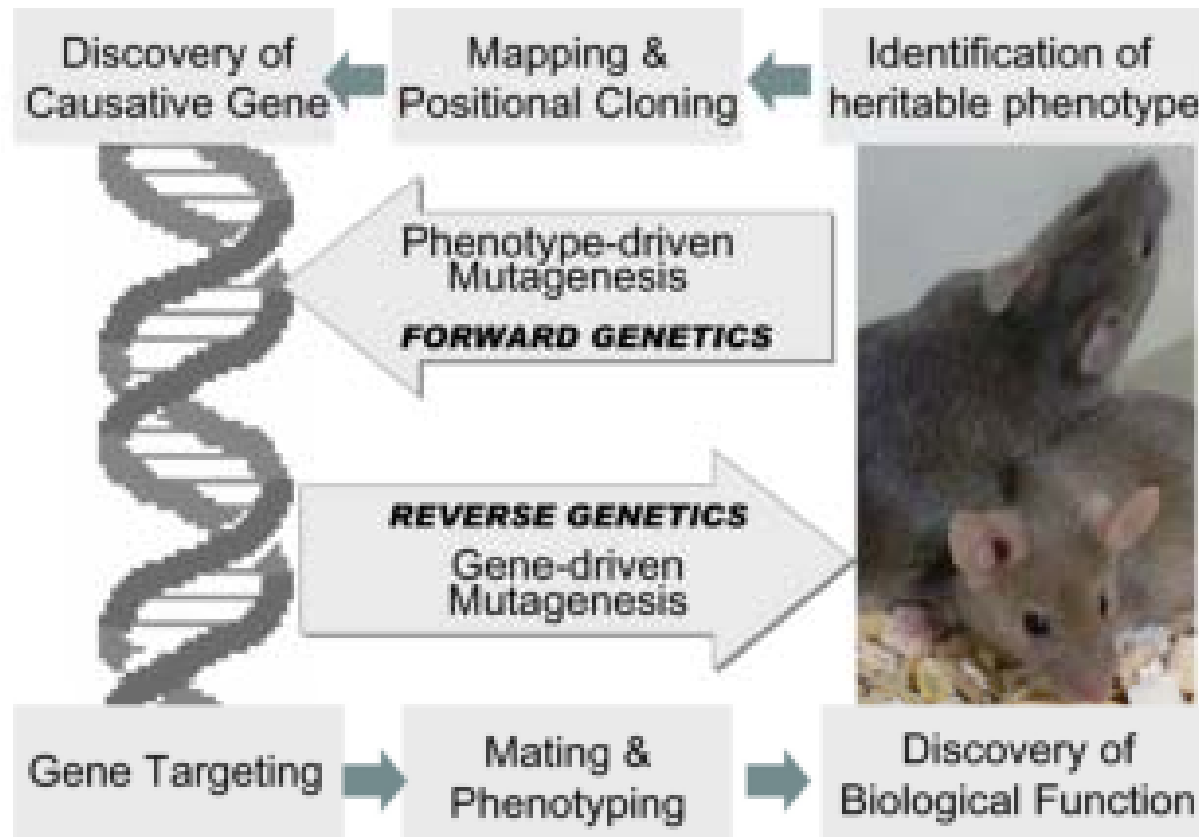
Unidad XII

Mutagénesis de genomas

Mutagénesis de genomas

- La **manipulación** de los **genomas** es un área de amplio desarrollo dentro de la **ingeniería genética**.
- El **agregado** de **secuencias**, la **eliminación** de otras o la **reorganización** de las existentes puede derivar en la **generación** de **conocimiento biológico** y/o en el **desarrollo de especies** con **aptitudes valiosas** como bienes para el ser humano.
- La **mutagénesis genómica** puede ser encarada de manera **dirigida** o **al azar**, persiguiendo en cada caso objetivos diferentes.
- Hoy en día existen **aproximaciones metodológicas mejoradas** que posibilitan acelerar las etapas que involucran estos procedimientos.
- Cabe aclararse que la **mutagénesis dirigida** es una aproximación de **genética reversa** (*reverse genetics*), mientras que la **mutagénesis al azar** aplica los conceptos de la **genética directa** (*forward genetics*).

Mutagénesis de genomas



***¿Cuáles son los
procedimientos para realizar
una mutagénesis genómica
dirigida?***

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

- La **mutagénesis genómica dirigida** involucra la **introducción** (*knock in*) o **afectación** (*knock out*) de **información genética** en un **locus definido** de un genoma dentro de una célula viva.
- En cualquiera de los casos, es necesaria la **utilización** de **actividad recombinogénica endógena** de la célula.
- Existen **diversas aproximaciones**:

- **Recombinación homóloga**
- **Nucleasas *Zinc Finger***
- **TALEN**
- **CRISPR/Cas9**

***¿Cuáles son los
procedimientos para realizar
una mutagénesis genómica
dirigida?***

Recombinación homóloga

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga**

- Esta **tecnología** se basa en la **actividad recombinogénica endógena** de la materia viva, generalmente utilizada para **reparar *Double Strand Breaks* (DSB)**.
- Aprovechando lo anterior, la existencia de **secuencias idénticas entre moléculas** de dsDNA puede **derivar** en el **intercambio de cadenas** y en la consecuente **incorporación de secuencias exógenas**.
- Esta **tecnología requiere** construir una **quimera** que contenga las secuencias del **locus diana** **flanqueando** el **fragmento** que se quiere **introducir** (como mínimo, contiene una ventaja para luego poder seleccionar al mutante).
- Una de las **principales limitantes** es la **escasa probabilidad** con que sucede este evento (a veces, 1 en 1.000.000).

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga**

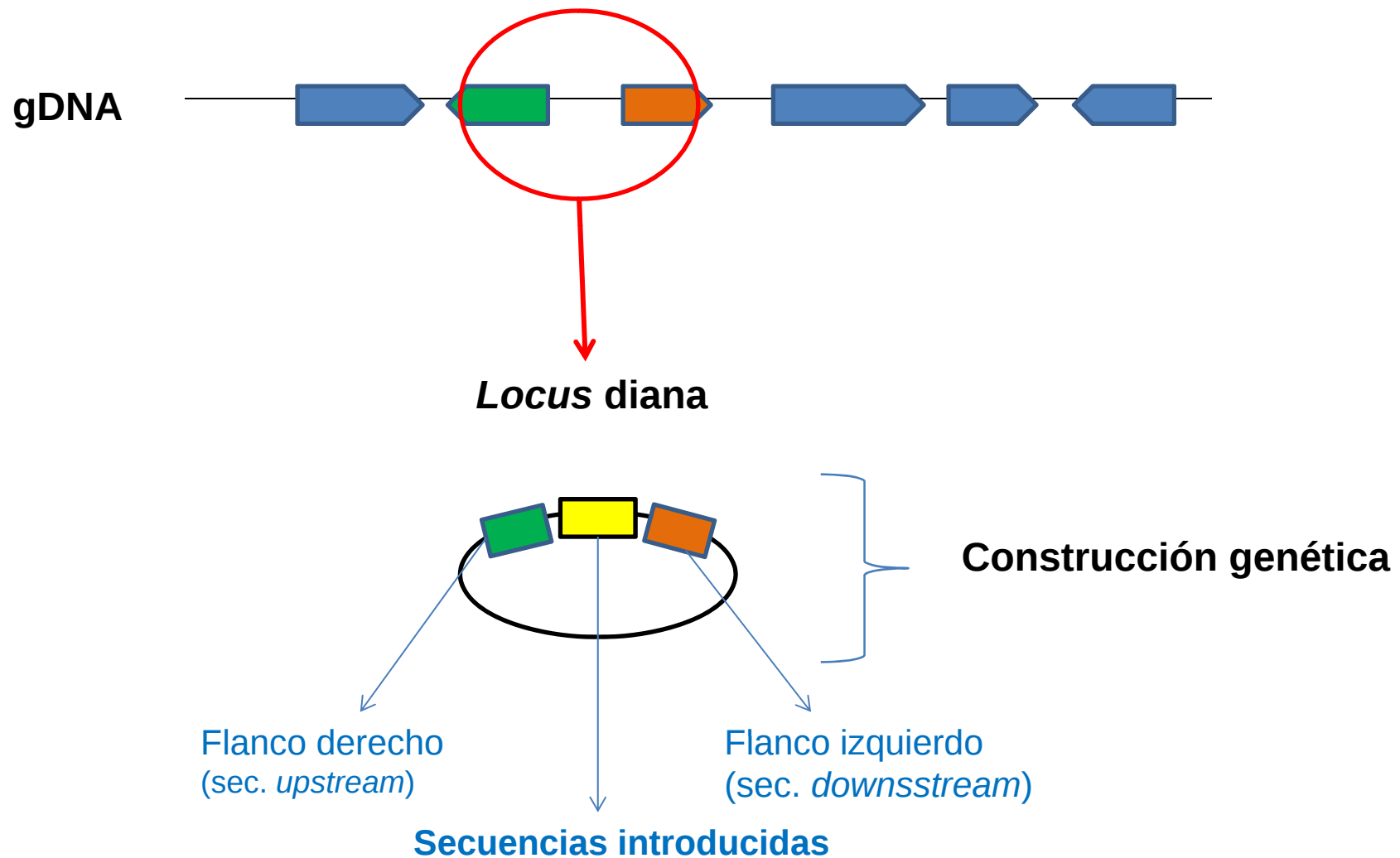
gDNA



Objetivo 1: introducir secuencias en el genoma

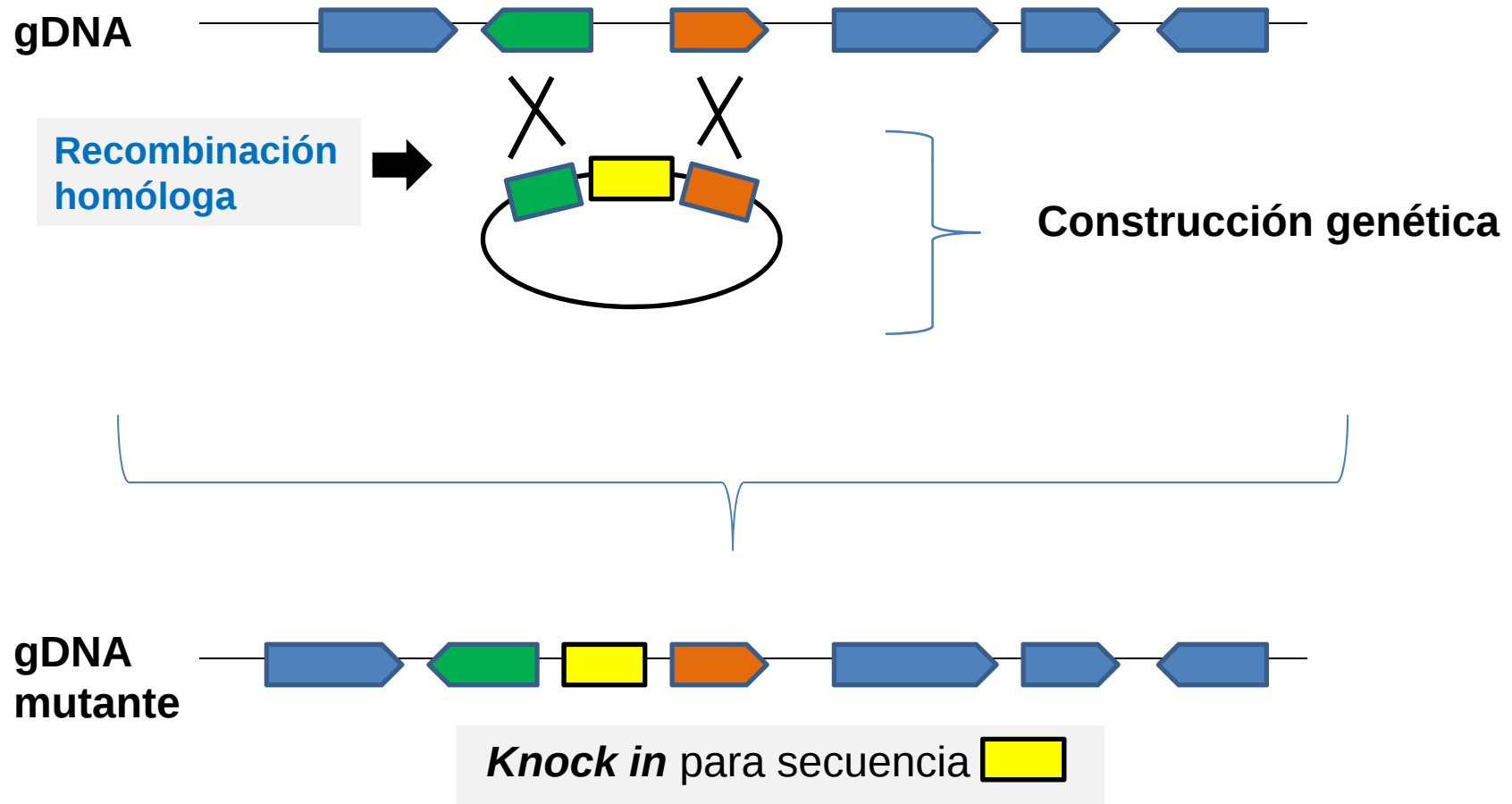
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga**



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga**



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga**

gDNA

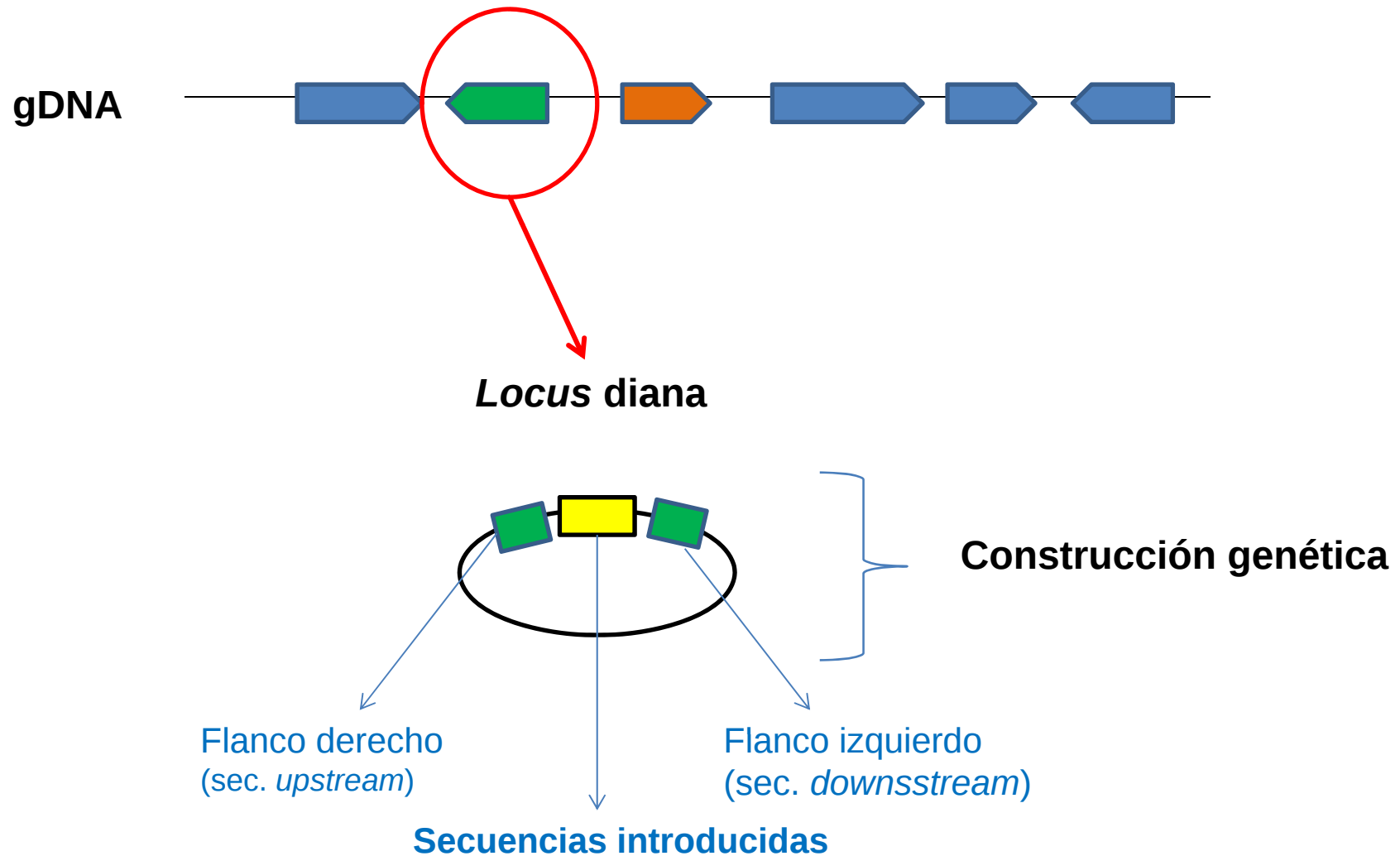


Objetivo 2: Afectar el gen



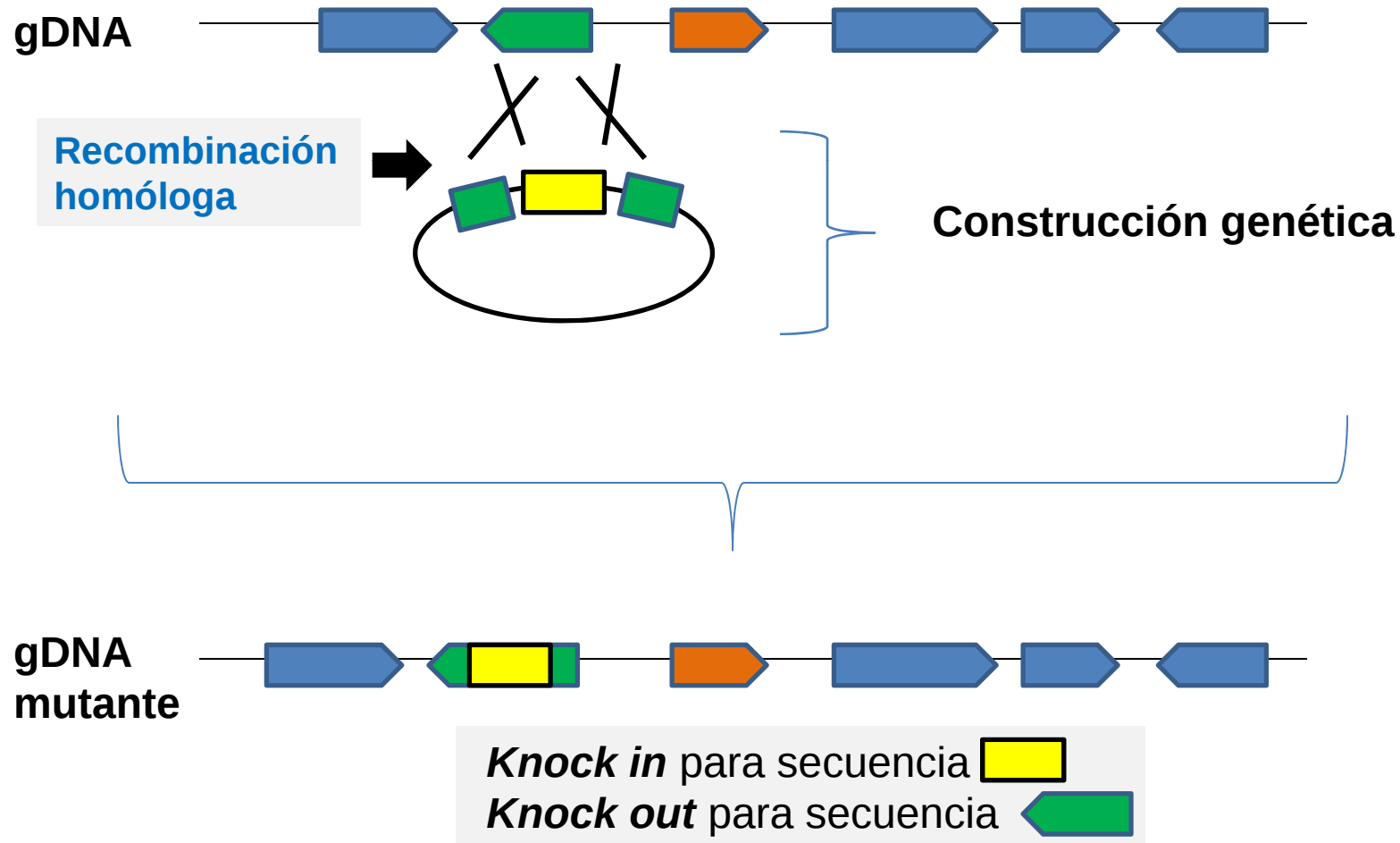
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga**



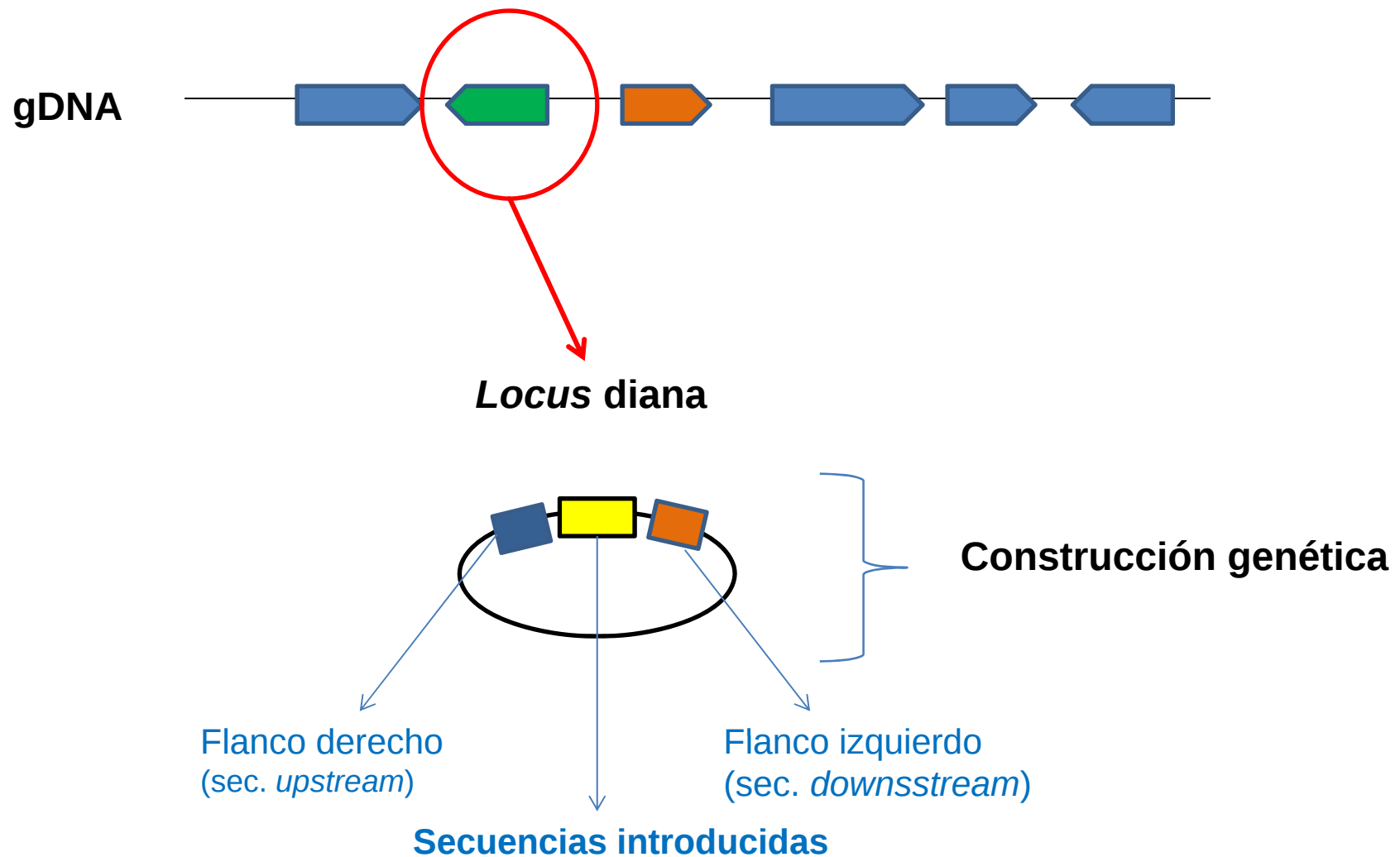
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga**



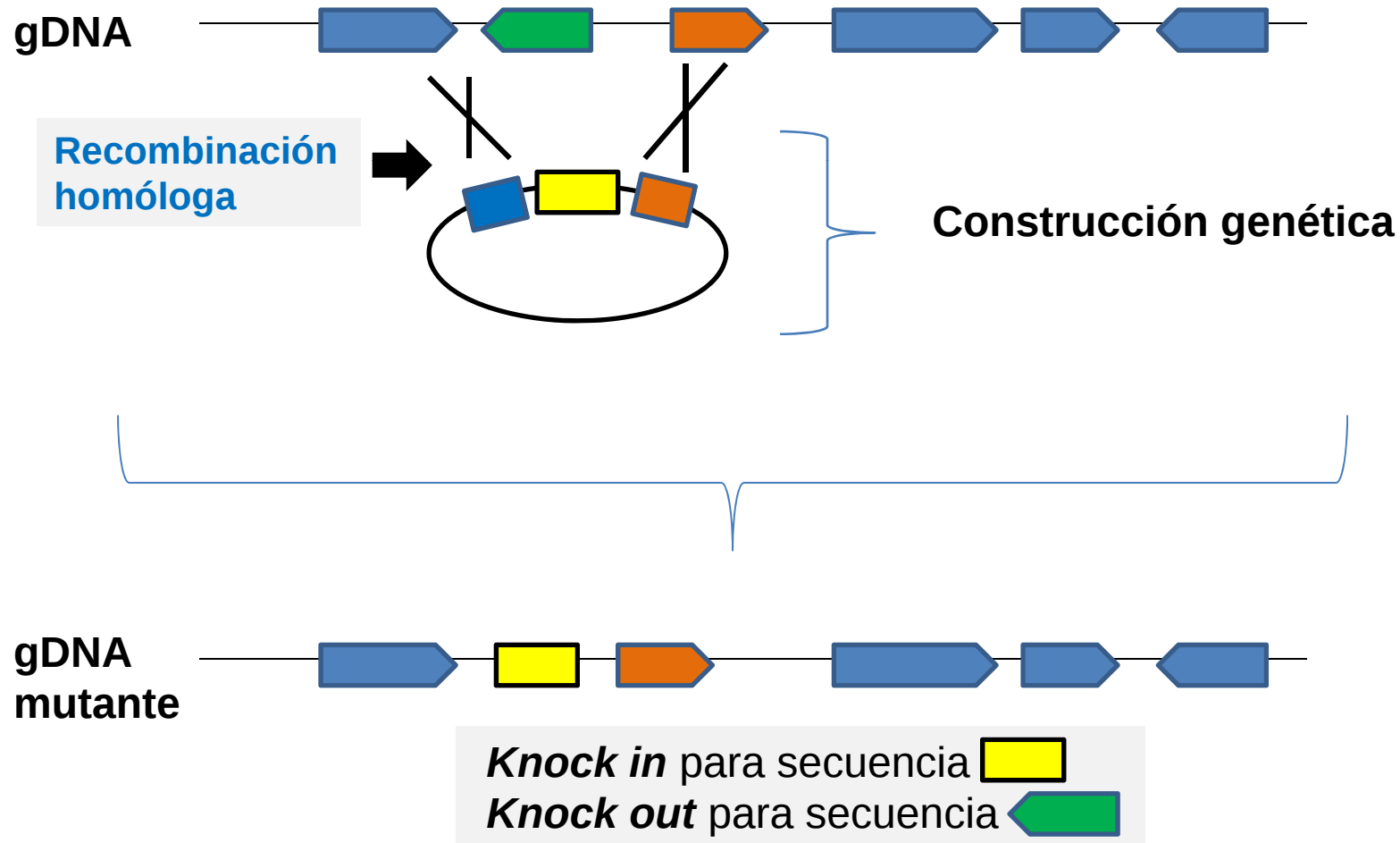
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga**



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga**



***¿Cuáles son los
procedimientos para realizar
una mutagénesis genómica
dirigida?***

Nucleasas Zinc Finger

Mutagénesis de genomas

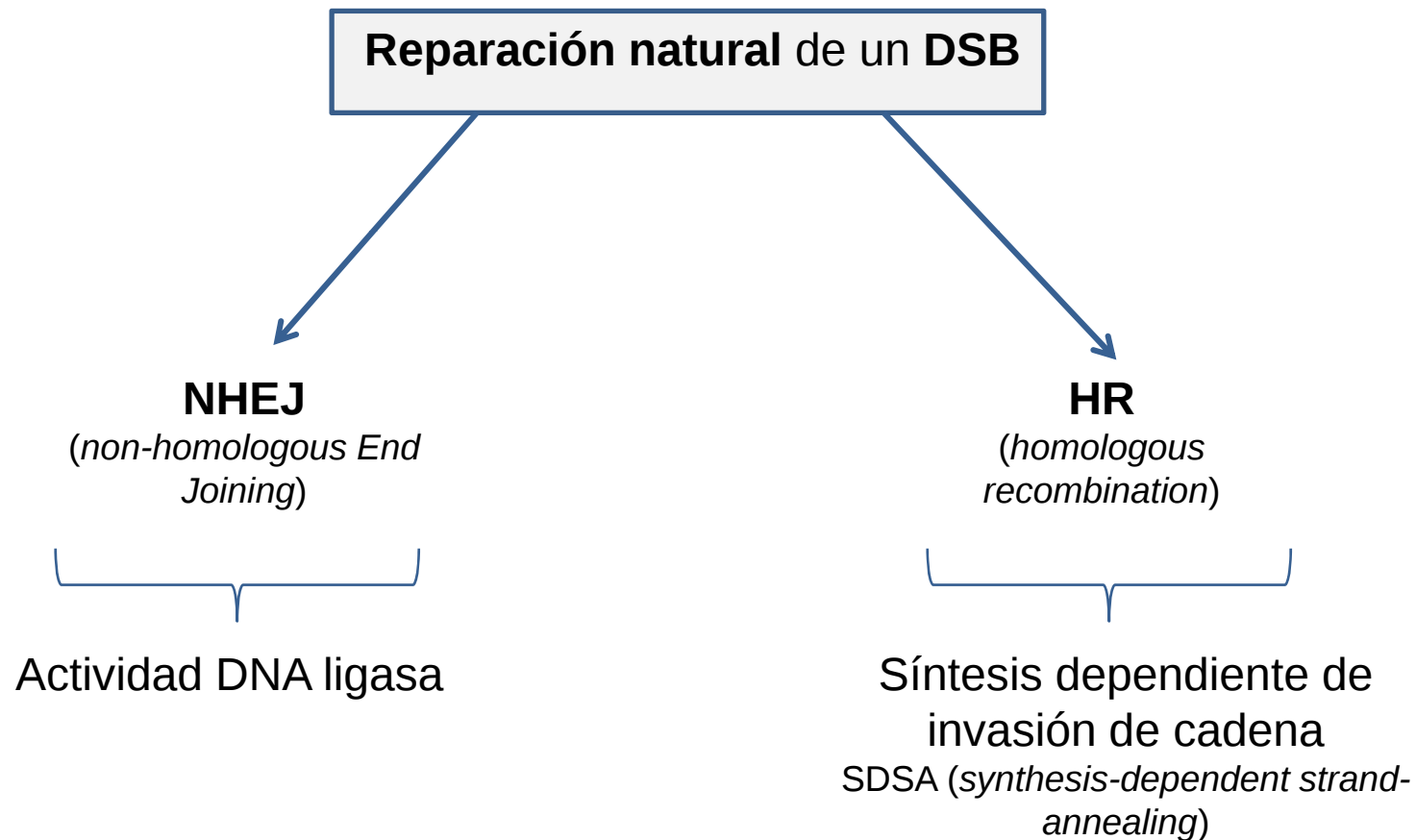
Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**

- La tecnología de **recombinación homóloga** es **funcional** pero muy **poco eficiente**.
- **Cuando** el *locus* **diana** que es **aceptor** de la **mutación** **sufre** un **DSB**, se ha observado que la **eficiencia mejora** más de 50.000 veces.
- Lamentablemente, es muy **difícil encontrar sitios únicos** en las secuencias del **gDNA** para valerse de esta situación y aprovecharla.
- Es así que surgen las **nucleasas Zinc Finger**, proteínas diseñadas para **cortar** en **secuencias** de DNA **específicas***.

*Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 1156–1160.

Mutagénesis de genomas

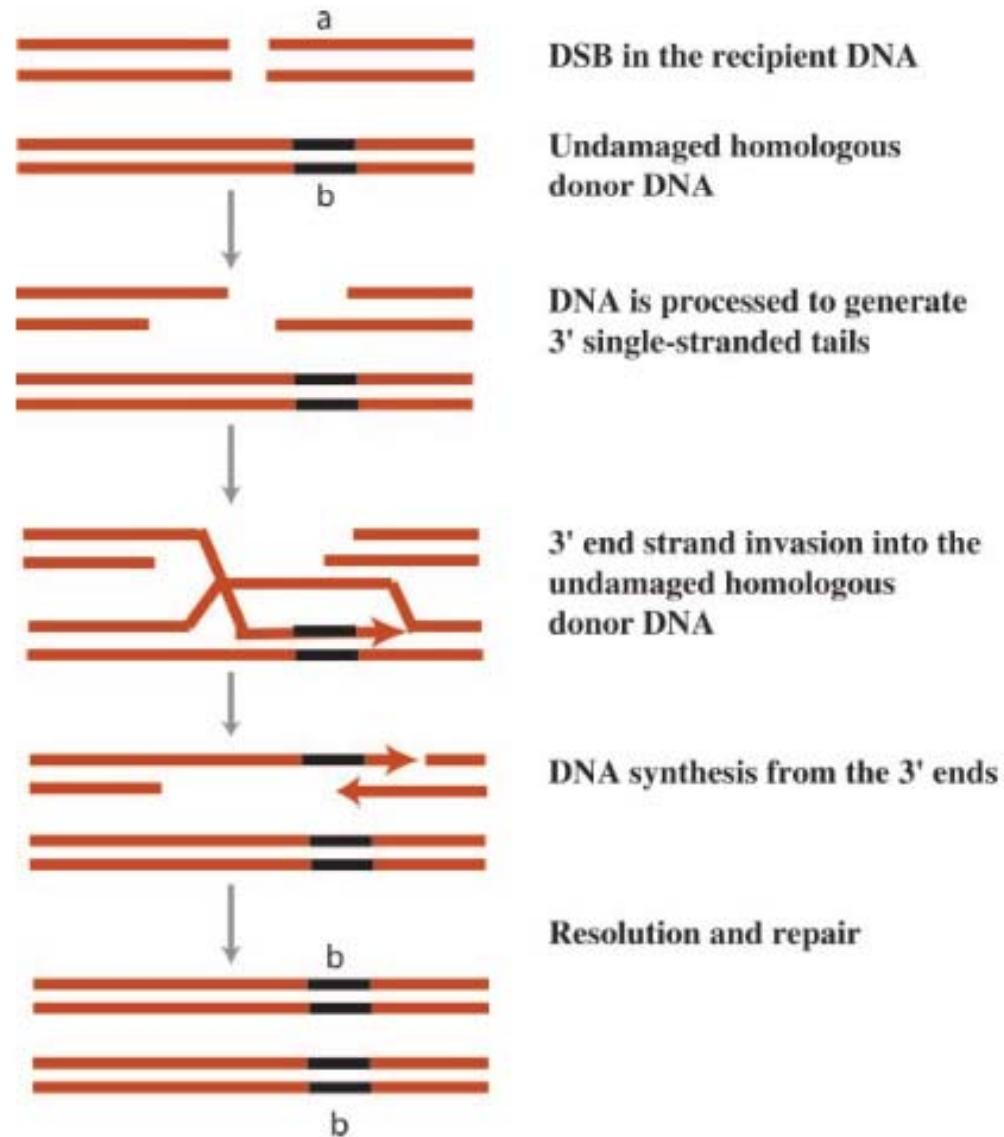
Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**

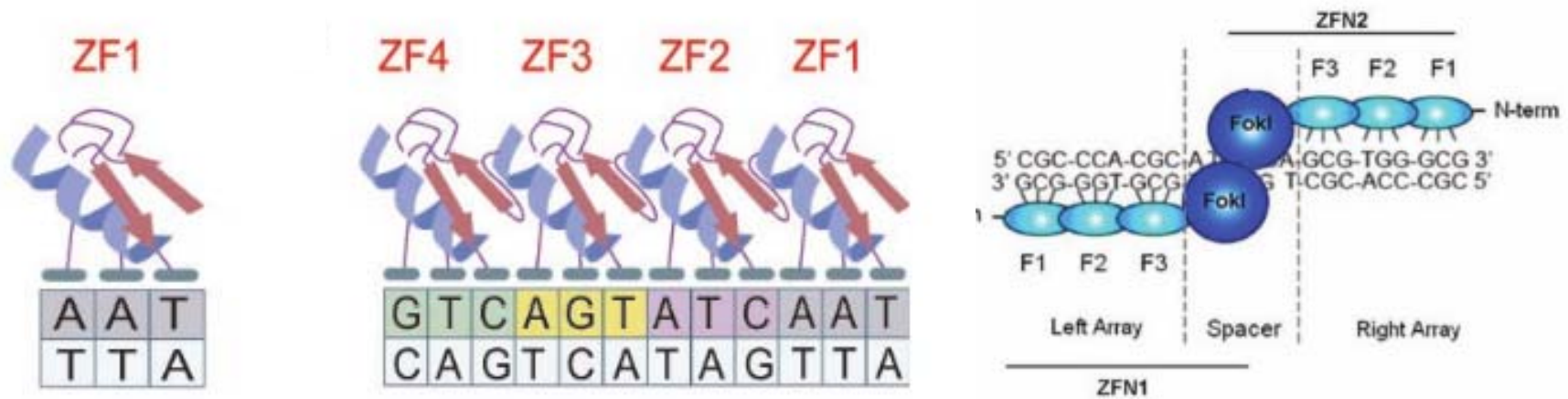
SDSA



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**

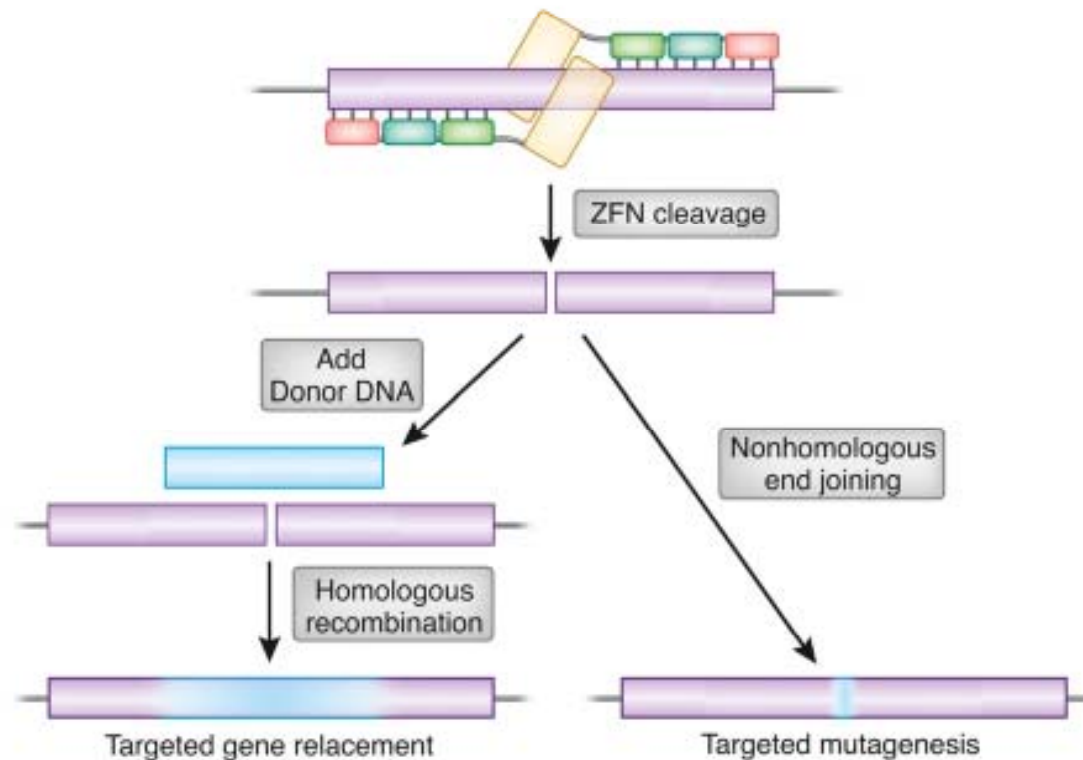
Las **nucleasas Zinc Finger** son proteínas generadas *ad hoc* con **motivos de unión específica** a una secuencia y con otro motivo con actividad **endonucleasa**



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**

Las **nucleasas Zinc Finger** permiten mutagenizar aumentando la eficiencia de la recombinación homóloga, o mediante NHEJ



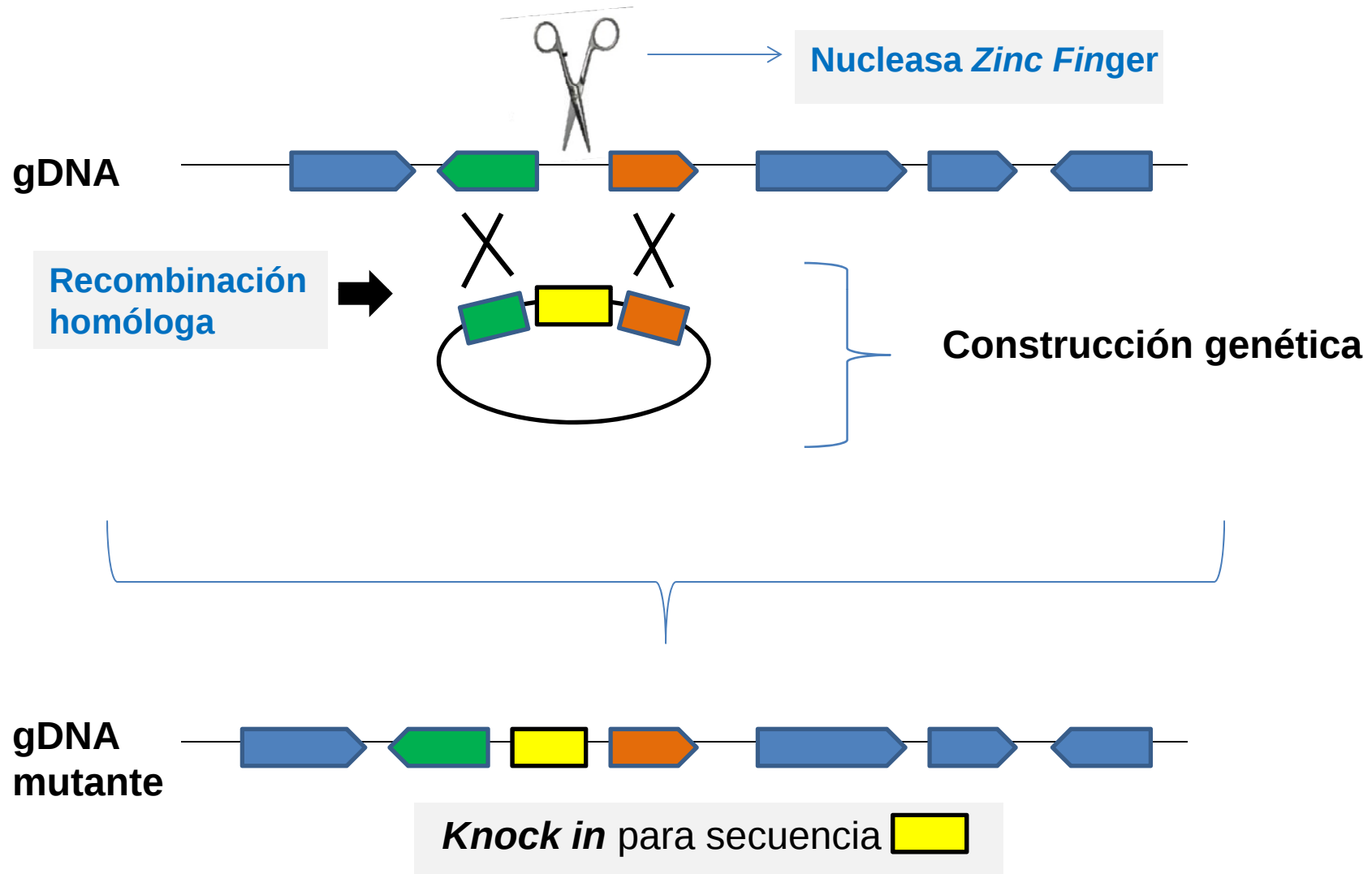
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**

- El **procedimiento incluye el diseño** de una **nucleasa** específica para la **secuencia diana** que se desea mutagenizar por recombinación homóloga.
- Para ello, es necesario generar la ***nucleasa Zinc Finger*** adecuada.
- Todavía no se describieron afinidades para muchas secuencias, pero se utilizan **estrategias** de ***Phage display*** y adaptaciones del **Y1H** para el **desarrollo** de estas **herramientas**.
- Las ***nucleasas Zinc Finger*** también han sido **postuladas** y evaluadas como sistemas que afectan la información genética conduciendo al desarrollo de ***knock outs*** por **producir DSB** y **despertar** la actividad **NHEJ**.

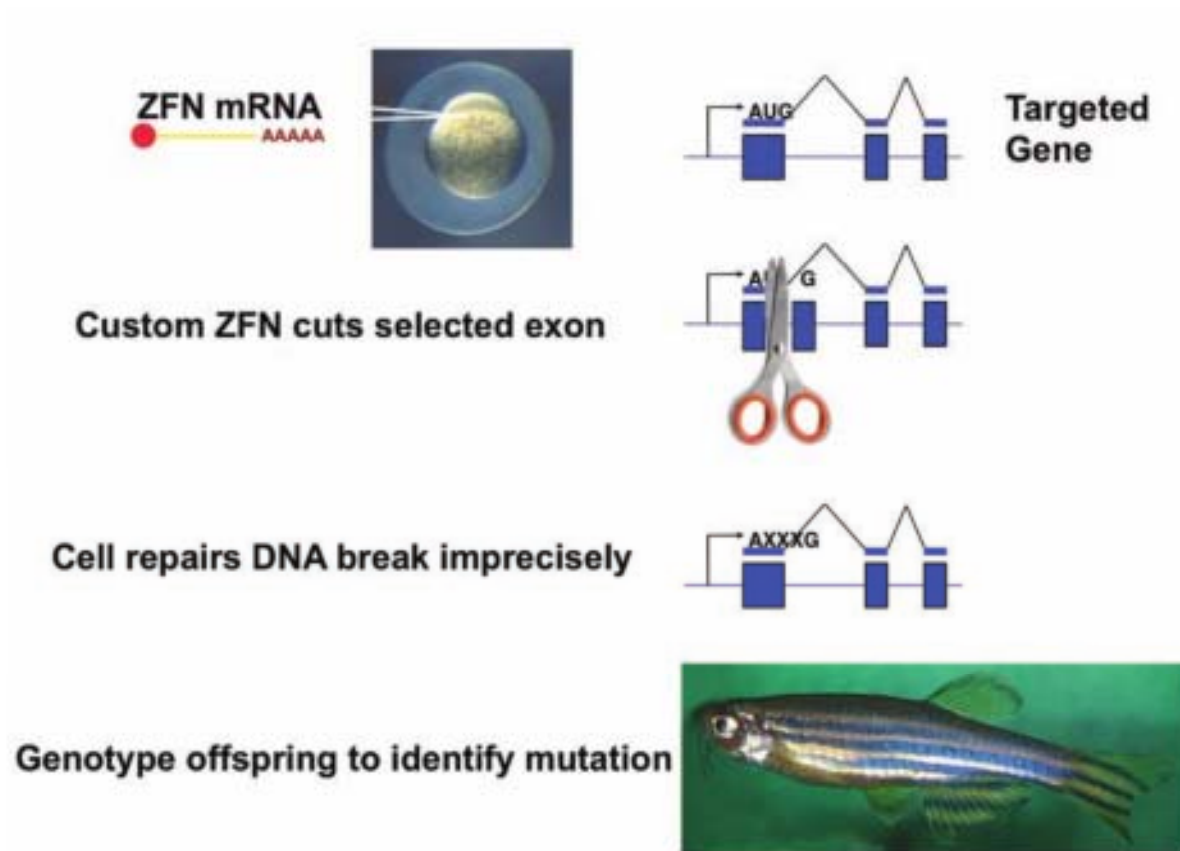
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**



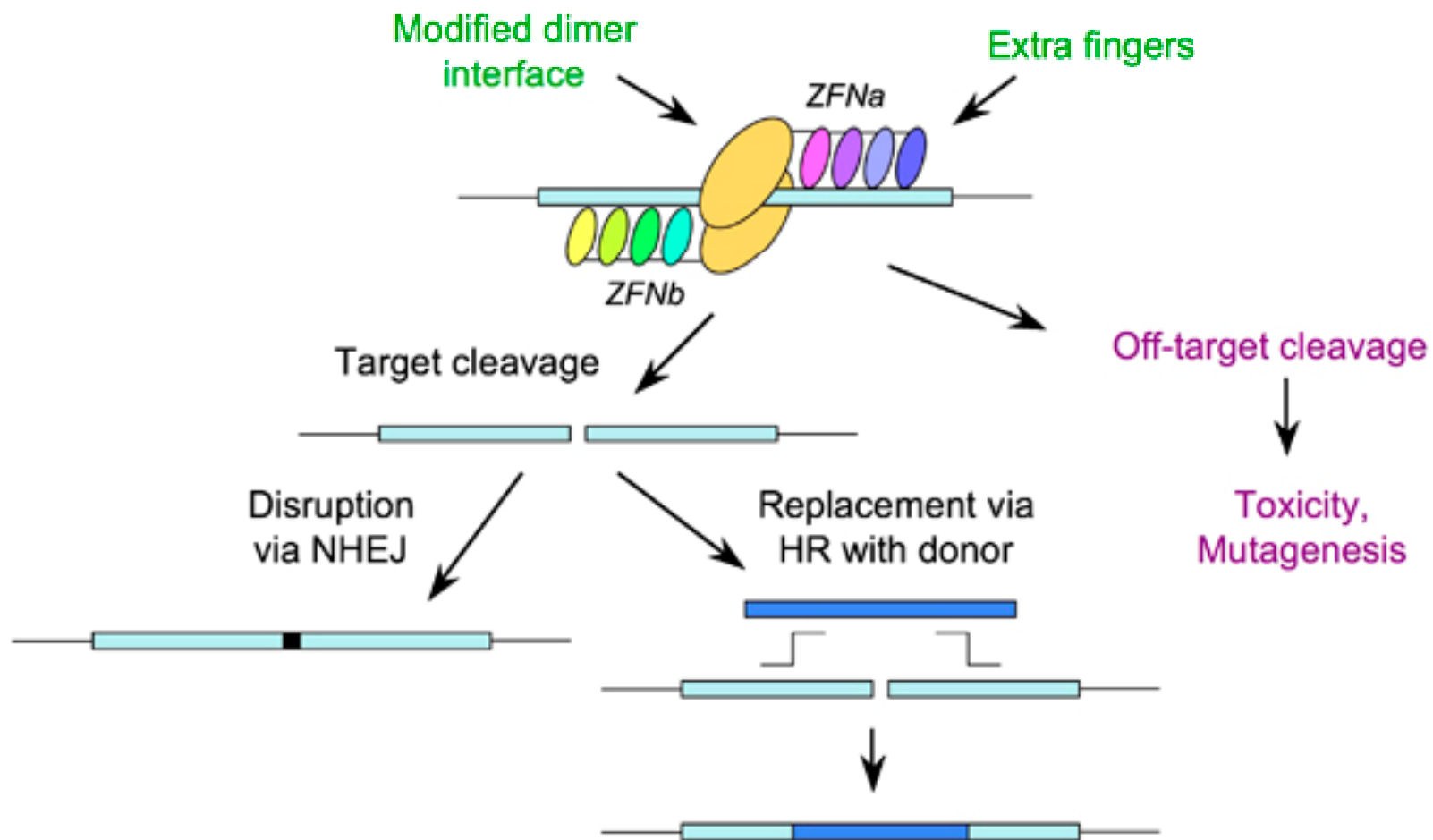
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: *Nucleasas Zinc Finger*



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**



***¿Cuáles son los
procedimientos para realizar
una mutagénesis genómica
dirigida?***

TALEN

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **TALEN**

- Dado que la **tecnología de ZFN** (*Zinc Finger Nucleases*) demostró mejorar las eficiencias de los procesos de mutagénesis genómica, surgieron **nuevas aproximaciones similares**.
- Así, se **introdujeron** las **TALEN** (*Transcription Activator-like Nucleases*)*, las cuales son nucleasas que aportan ventajas sobre las ZFN.
- Las TALEN son **proteínas quiméricas** que consisten en un **dominio de unión a DNA** (derivado de factores de transcripción de la familia **TAL** – *transcriptor activator-like*- de bacterias *Xanthomonas*), **y otro** de actividad **nucleasa** no específico (derivado de la endonucleasa **Fok I**).
- Las **bacterias *Xanthomonas*** infectan plantas y utilizan a estos **factores de transcripción** para **modular la expresión génica** del hospedador que atacan.

*Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, et al. (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res 39: e82.

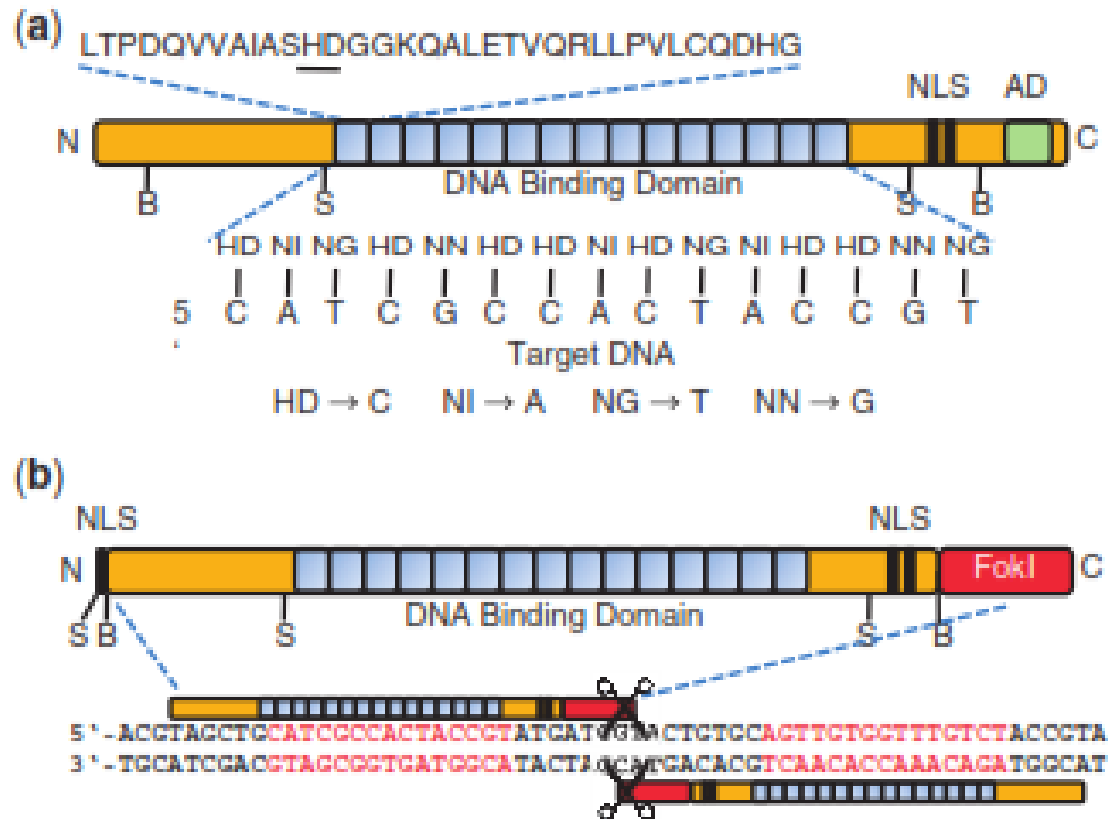
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **TALEN**

- El diseño de las **TALEN** permite **mayor versatilidad** de aplicación que las ZFN.
- Es necesario generar **dos nucleasas por un DSB**.
- El **dominio de unión a DNA** tiene un **segmento** de **di-aminoácidos** denominado **RVD** (*Repeat-Variable Di-residue*) que determinan la secuencia de reconocimiento, dentro de motivos repetidos de 34 residuos.
- Se **disponen** de **sistemas moleculares** para la **generación** de **proteínas TALEN** a medida del cliente.

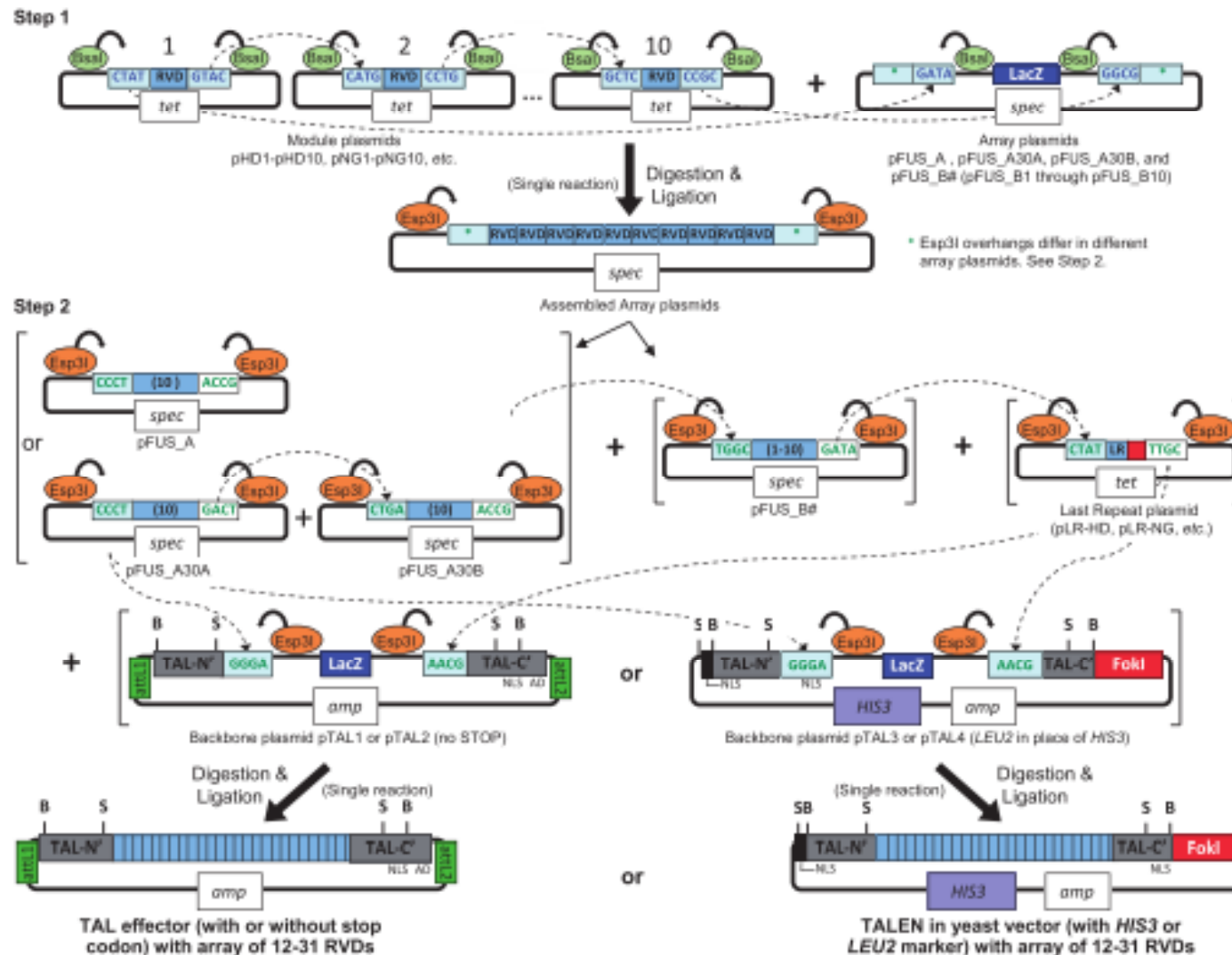
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **TALEN**



Mutagénesis de genomas

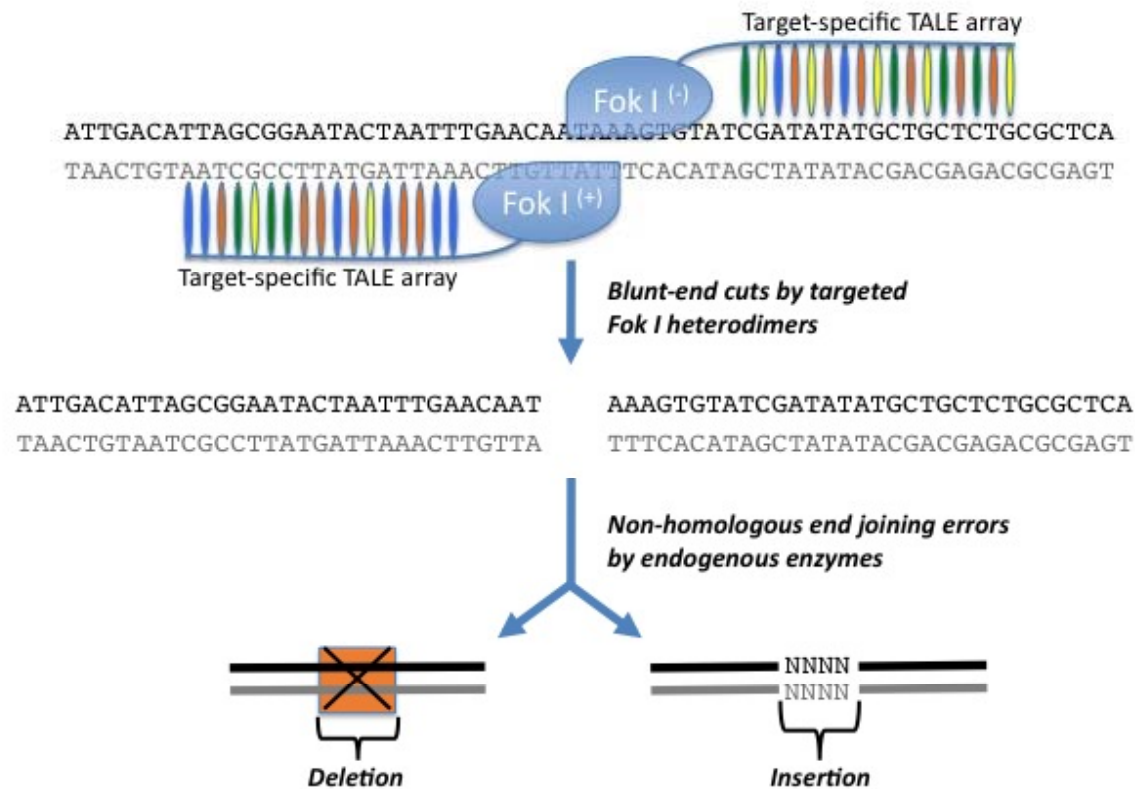
Aproximaciones dirigidas: **TALEN**



Sistema Golden Gate para generar proteínas TALEN

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **TALEN**



***¿Cuáles son los
procedimientos para realizar
una mutagénesis genómica
dirigida?***

CRISPR/Cas9

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: CRISPR/Cas9

- En vistas que la tecnología de **introducir DSB** en posiciones específicas del genoma **estimulan** los **procesos mutagénicos**, **surgieron otras aproximaciones** que tienen la misma funcionalidad.
- Entre ellas, el sistema **CRISPR/Cas9** es originario de ***Streptococcus pyogenes*** y está **conformado** por una **nucleasa (Cas9)** que es guiada a una secuencia diana específica por un **complejo de 2 RNAs pequeños** (el **CRISP RNA** –denominado crRNA- que contiene la secuencia diana, y otro conocido como transactivador común –**common transactivating CRISPR RNA** – denominados tracrRNA). **CRISP** es la **abreviatura** de ***Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats***.
- El **sistema** adaptado para **ingeniería genética** está formado por el **polipéptido Cas9** y por un **único RNA** denominado chiRNA o **RNA guía** (gRNA) comprendiendo todas las secuencias críticas.

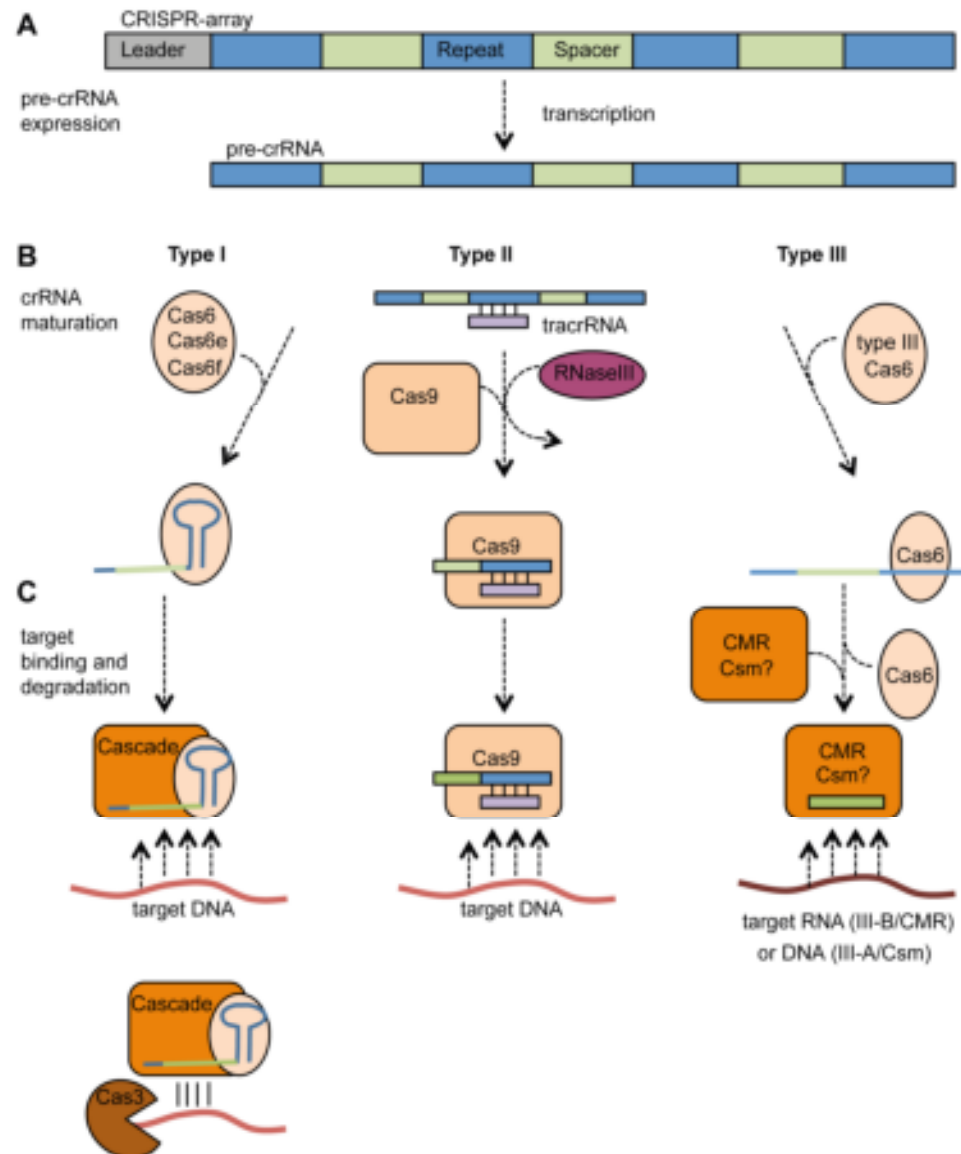
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **CRISPR/Cas9**

- El sistema **CRIPR/Cas** se **encuentra** en muchísimas **bacterias y arqueas**, y conforma un **mecanismo de defensa** contra **DNAs y RNAs exógenos** (plásmidos y genomas virales).
- Básicamente, es un **mecanismo de interferencia de carácter adaptativo**, por lo que algunos lo consideran un ejemplo de “lamarckismo”.
- **CRISPR/Cas** comprende **un gen** constitutivo que **produce un RNA y genes asociados** que **expresan** proteínas **Cas** (nucleasas).
- El **gen del RNA** es el **arreglo CRISPR** (CRISPR array), el cual contiene **múltiples repeticiones** de entre 23-47 pb que se **alternan** con **secuencias espaciadoras** de longitud similar.
- Las **secuencias espaciadoras** **derivan** de los **ácidos nucleicos exógenos**, y son **incorporados al genoma** mediante mecanismos no completamente descriptos. Estas secuencias serán las **guías** para **eliminar los ácidos nucleicos invasores**.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: CRISPR/Cas9

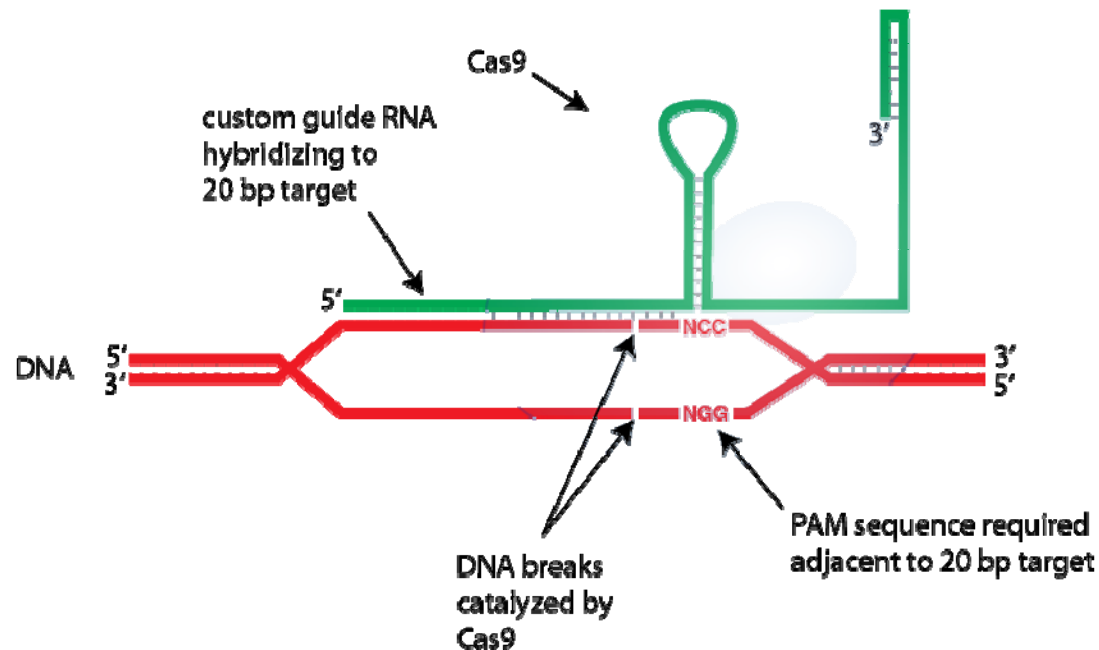


Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **CRISPR/Cas9**

- El sistema **CRISPR/Cas9** requiere del **diseño del gRNA** conteniendo unos **20 nt** propios del **DNA diana**, los cuales tienen que estar **upstream** a un trinucleótido **NGG** (secuencia PAM).
- La **proteína Cas9** presenta **dos dominios nucleasa** (HNH y RuvC-like) que se encargarán de hidrolizar las dos cadenas del DNA diana.

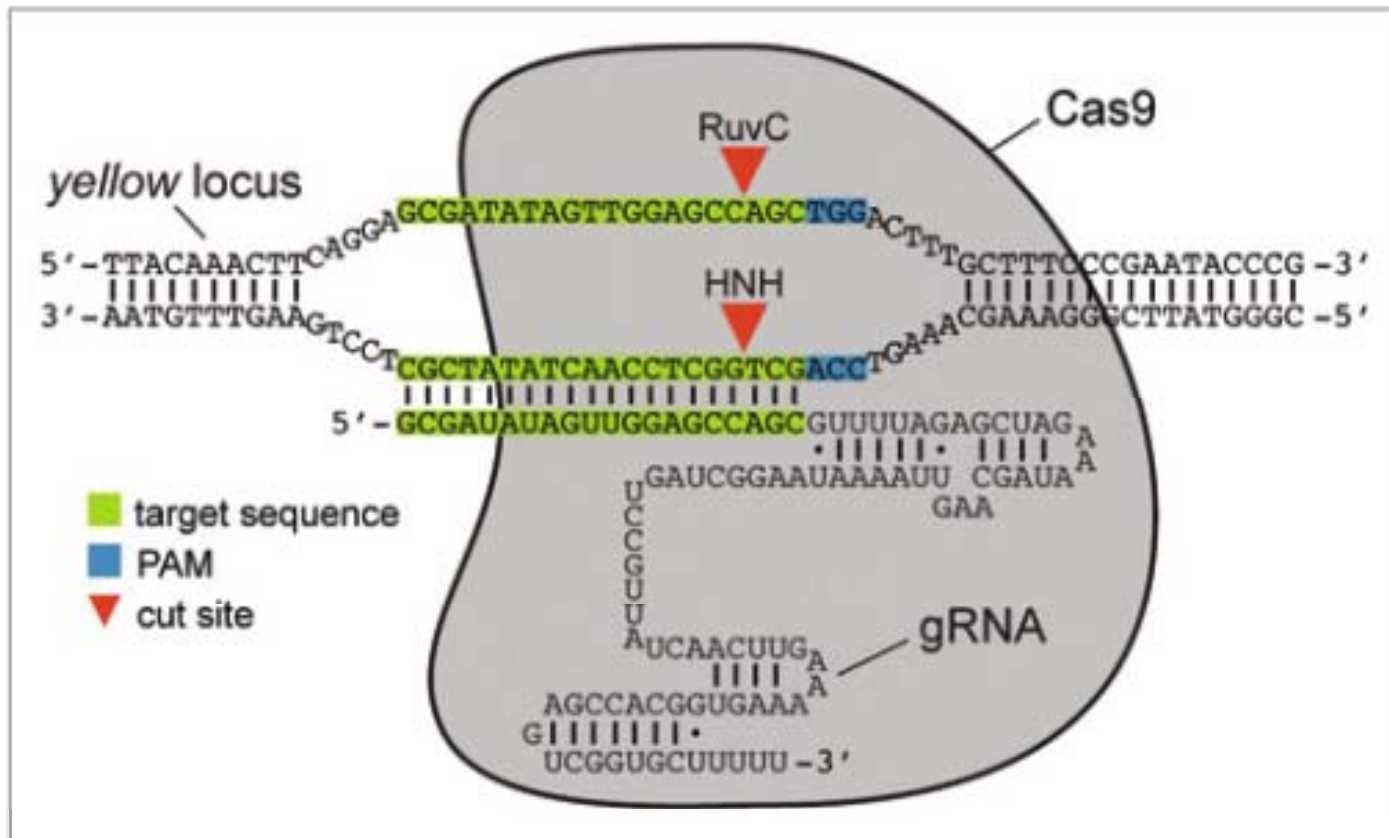
CRISPR/Cas



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **CRISPR/Cas9**

Ejemplo de una aplicación...



Mutagénesis de genomas

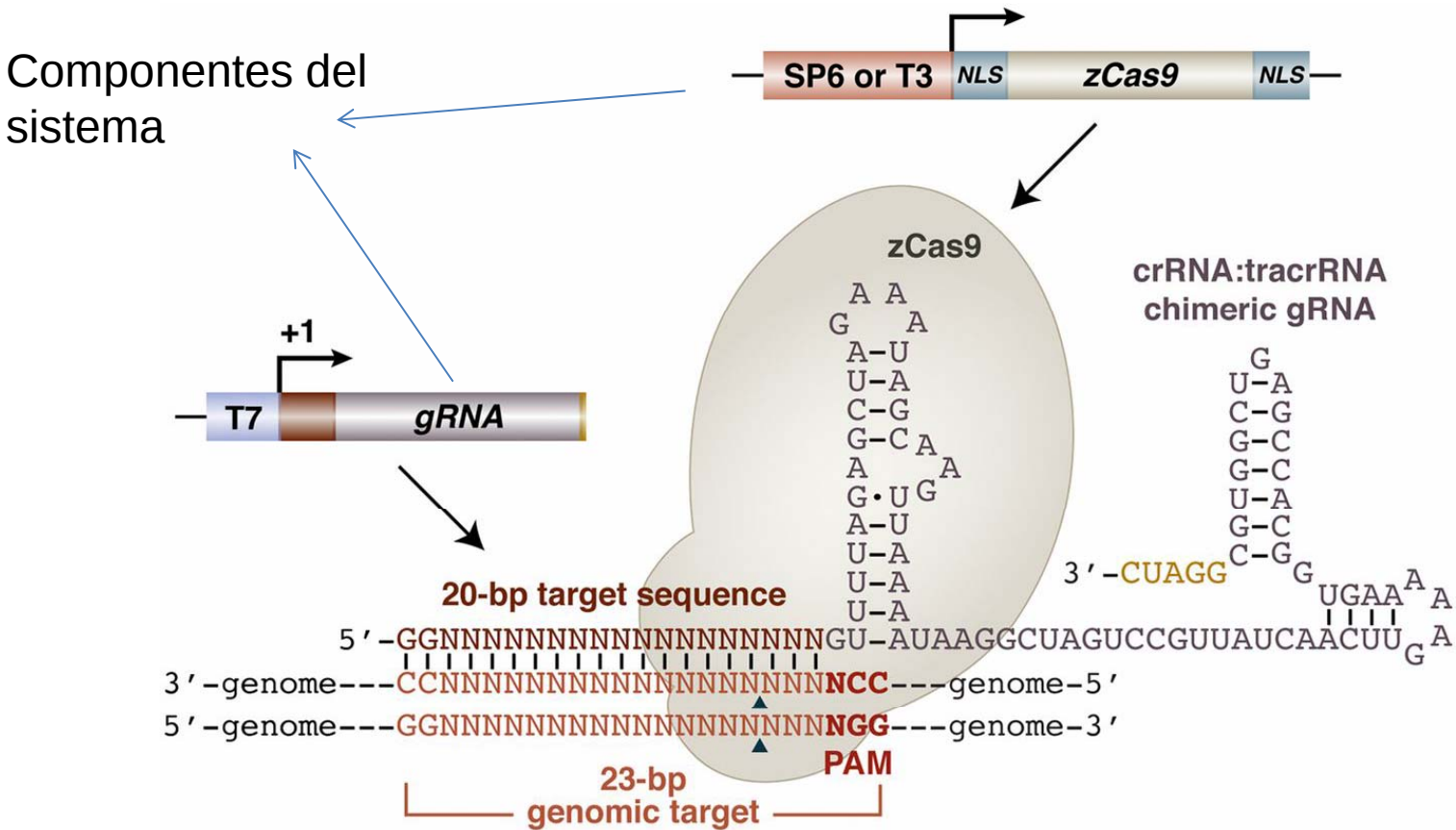
Aproximaciones dirigidas: **CRISPR/Cas9**

- Existen **software** que colaboran en el **diseño de los gRNA** (por ejemplo, <http://www.e-crisp.org/E-CRISP/index.html>)



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **CRISPR/Cas9**



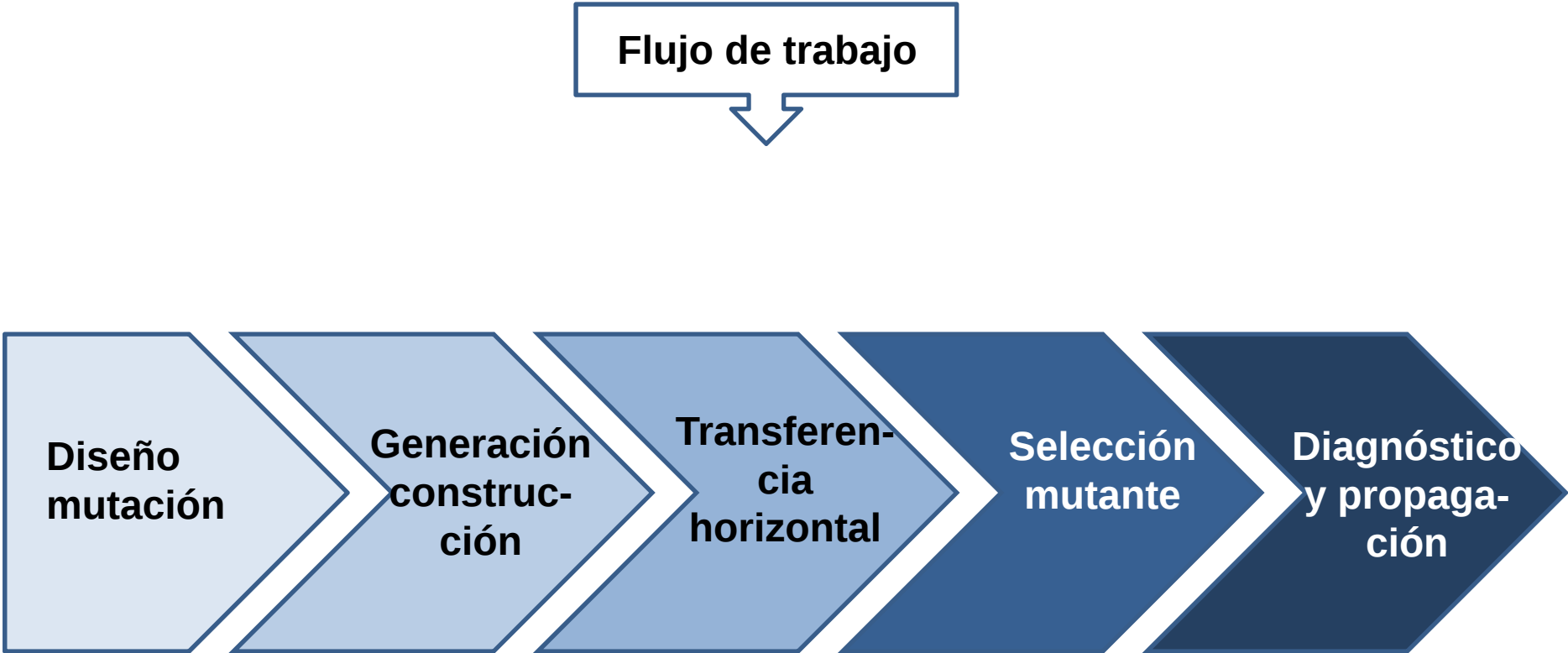
El sistema **CRIPR/Cas9** es hasta el momento el **más simple y eficiente método** para estimular **mutaciones NHEJ**, y/o para **incrementar la eficiencia** de procedimientos de incorporación de transgenes mediante **recombinación homóloga**.

***¿Cuál es el flujo de trabajo
para realizar una mutagénesis
dirigida?***

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Flujo de trabajo



**Diseño
mutación**

**Generación
construc-
ción**

**Transferen-
cia
horizontal**

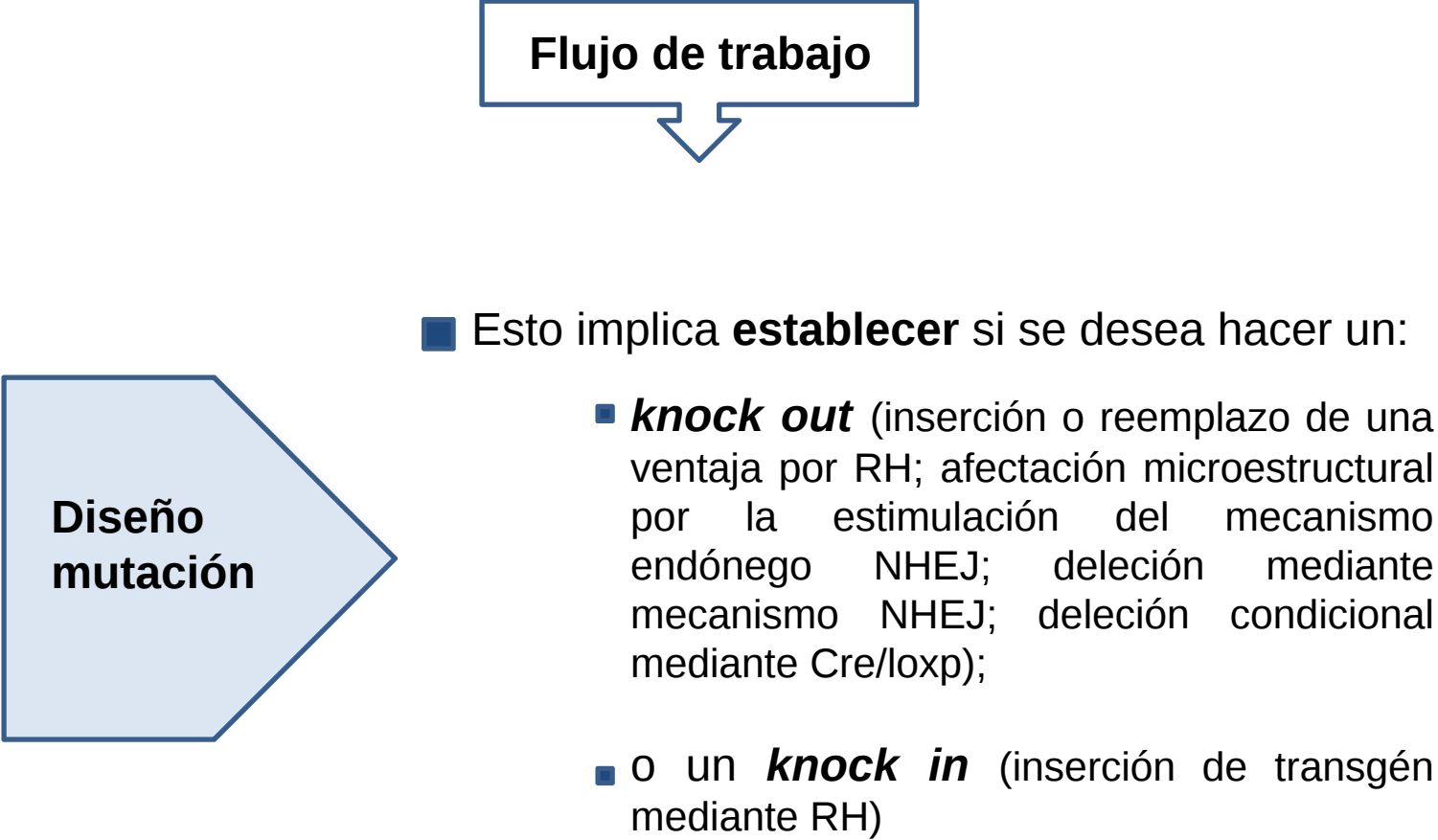
**Selección
mutante**

**Diagnóstico
y propaga-
ción**

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Flujo de trabajo



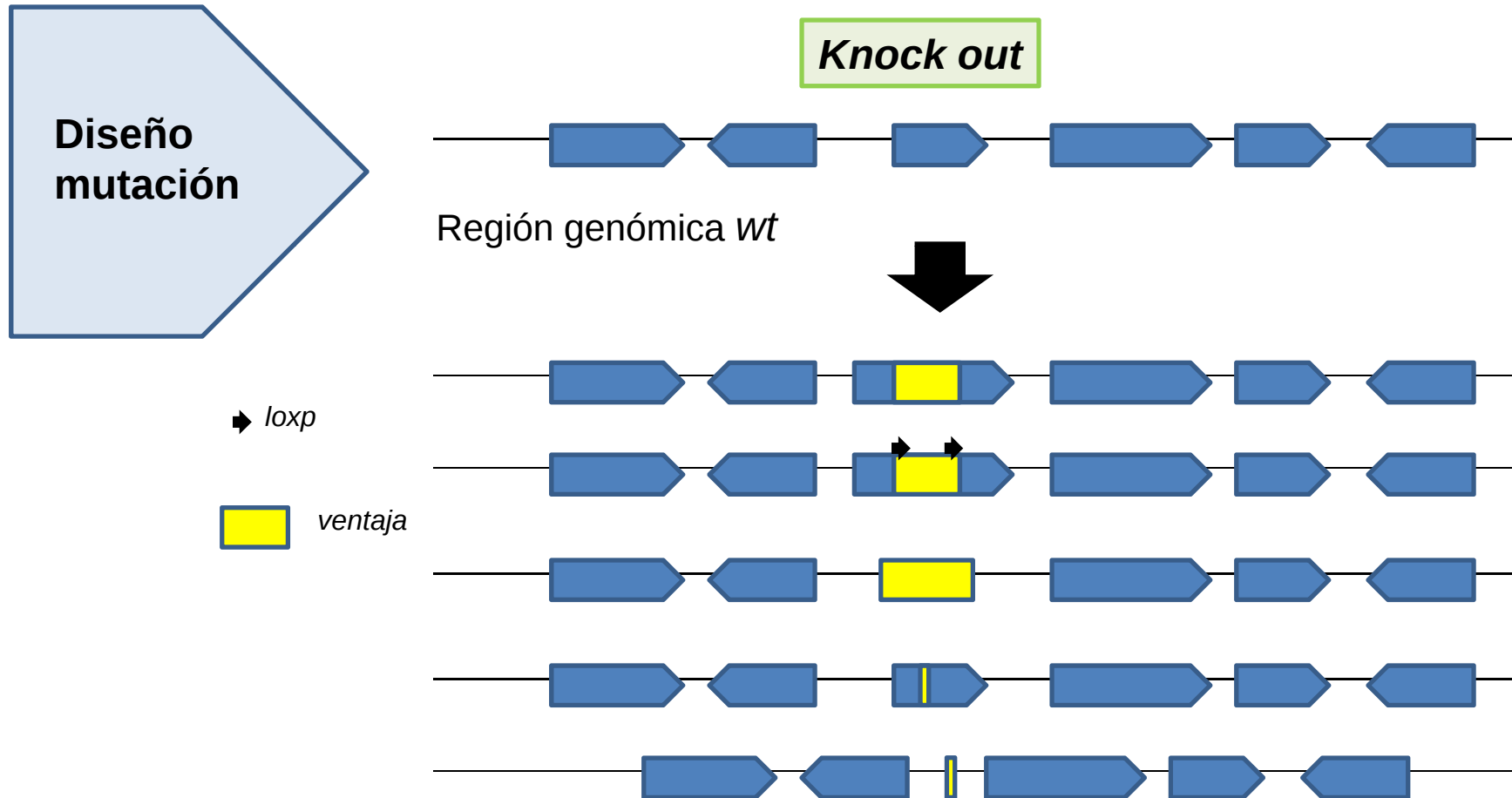
Diseño
mutación

■ Esto implica **establecer** si se desea hacer un:

- ***knock out*** (inserción o reemplazo de una ventaja por RH; afectación microestructural por la estimulación del mecanismo endógeno NHEJ; delección mediante mecanismo NHEJ; delección condicional mediante Cre/loxp);
- o un ***knock in*** (inserción de transgén mediante RH)

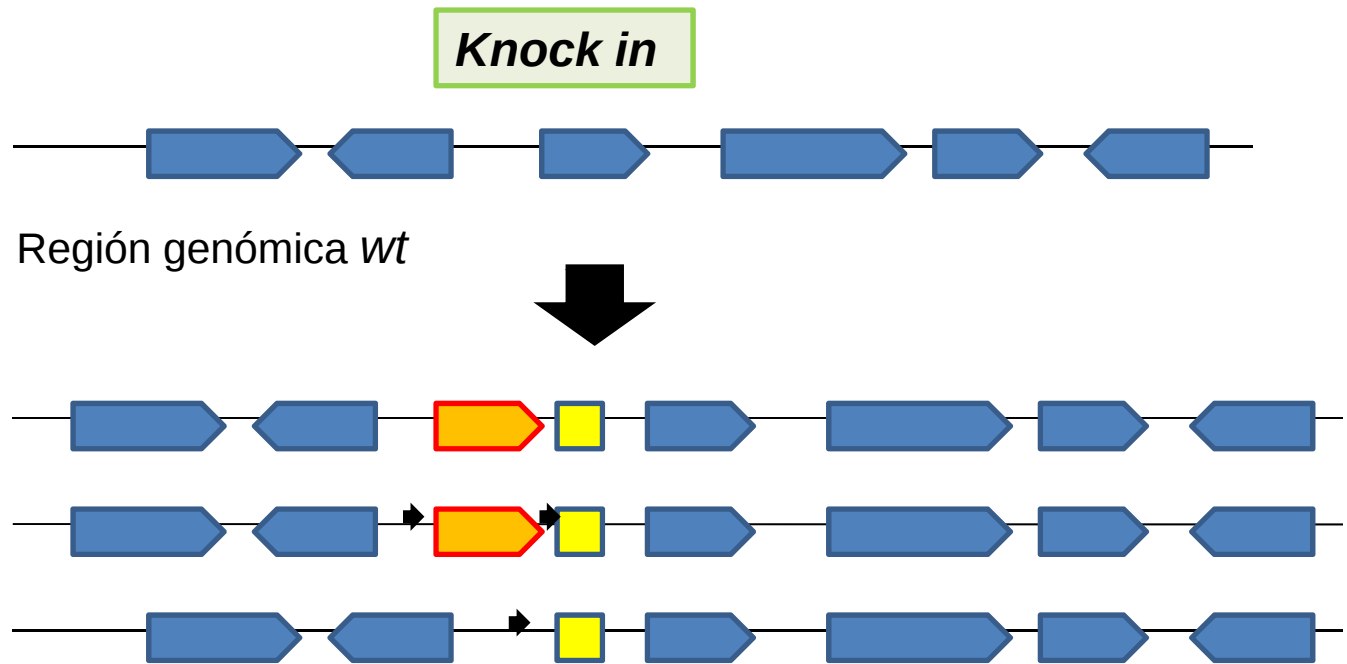
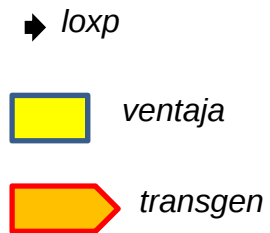
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas



Mutagénesis de genomas

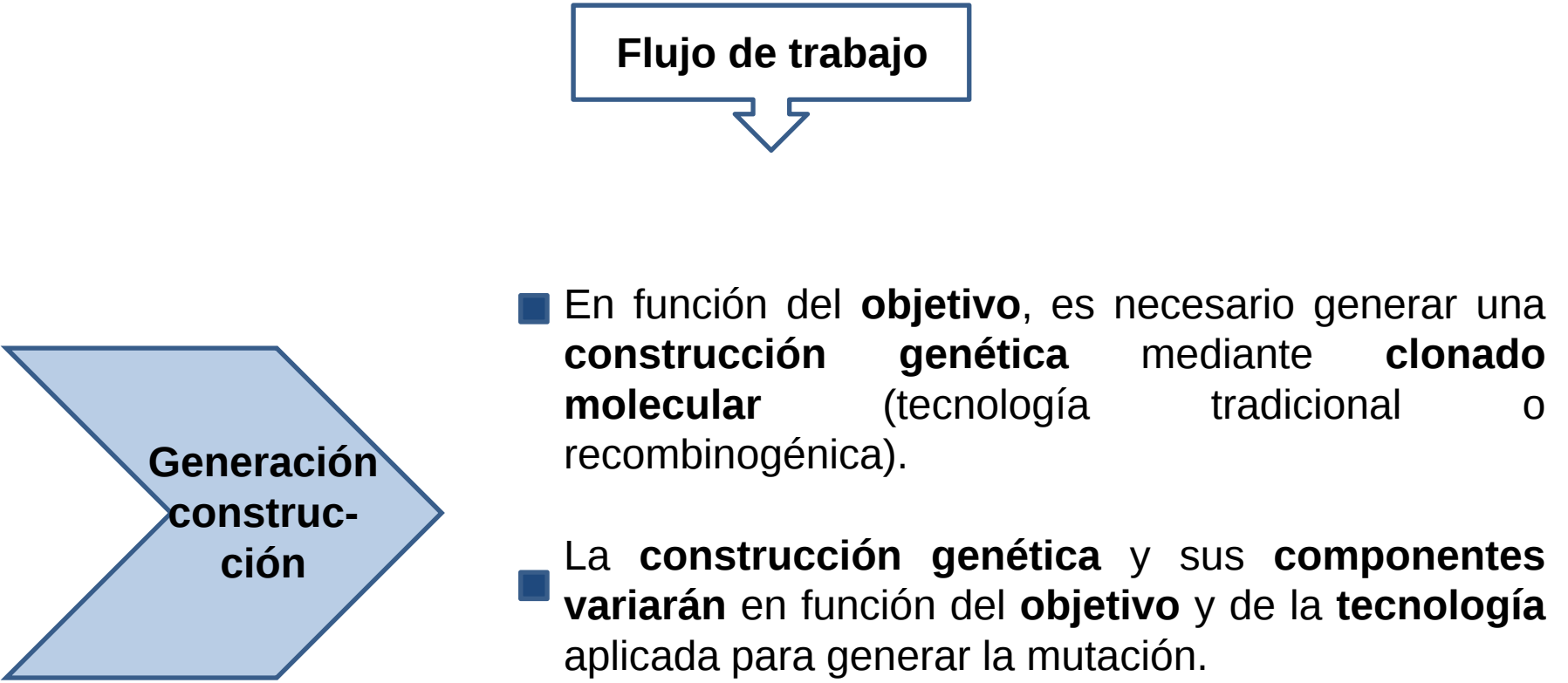
Aproximaciones dirigidas



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Flujo de trabajo

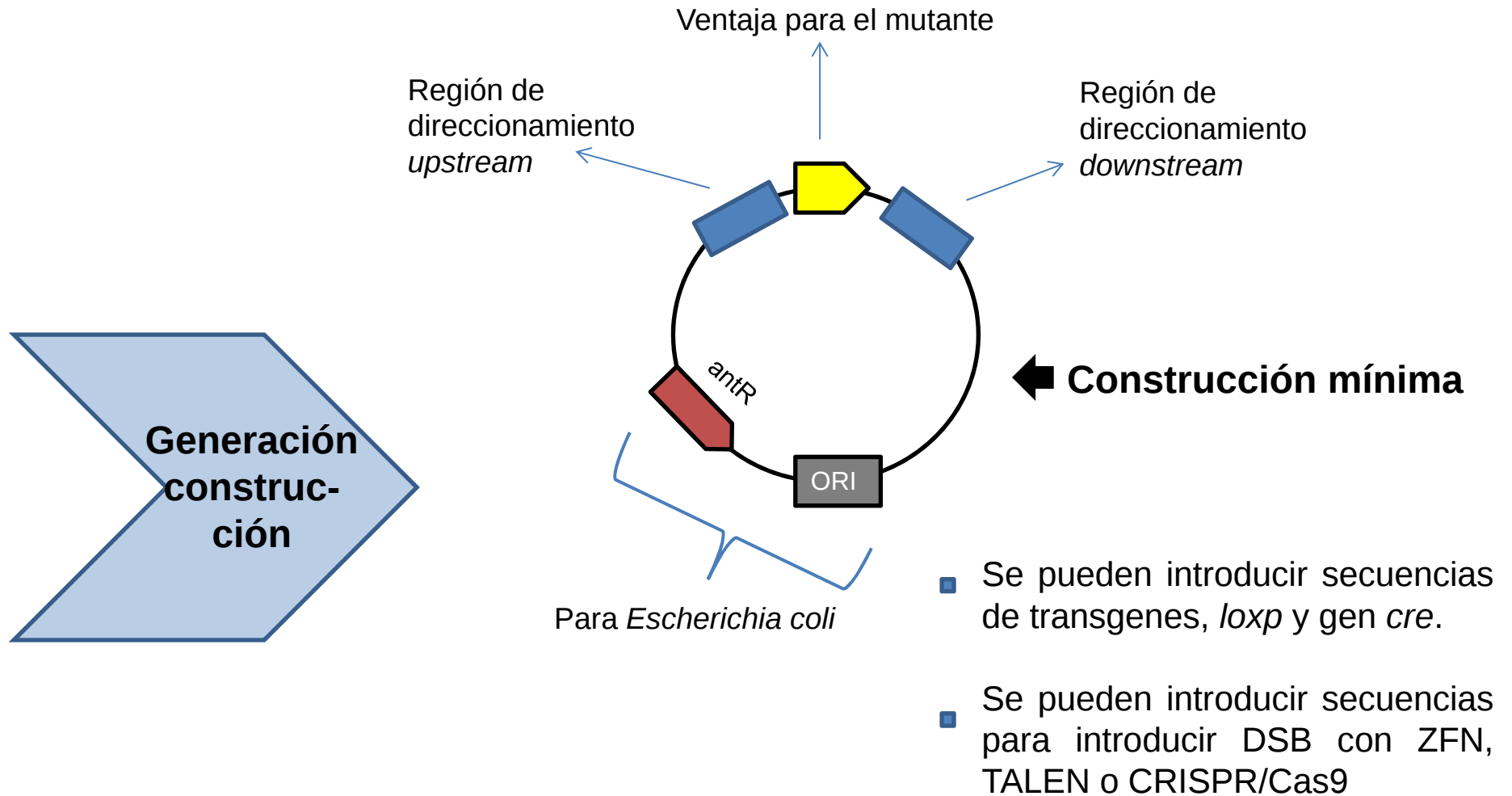


Generación
construc-
ción

- En función del **objetivo**, es necesario generar una **construcción genética** mediante **clonado molecular** (tecnología tradicional o recombinogénica).
- La **construcción genética** y sus **componentes variarán** en función del **objetivo** y de la **tecnología** aplicada para generar la mutación.

Mutagénesis de genomas

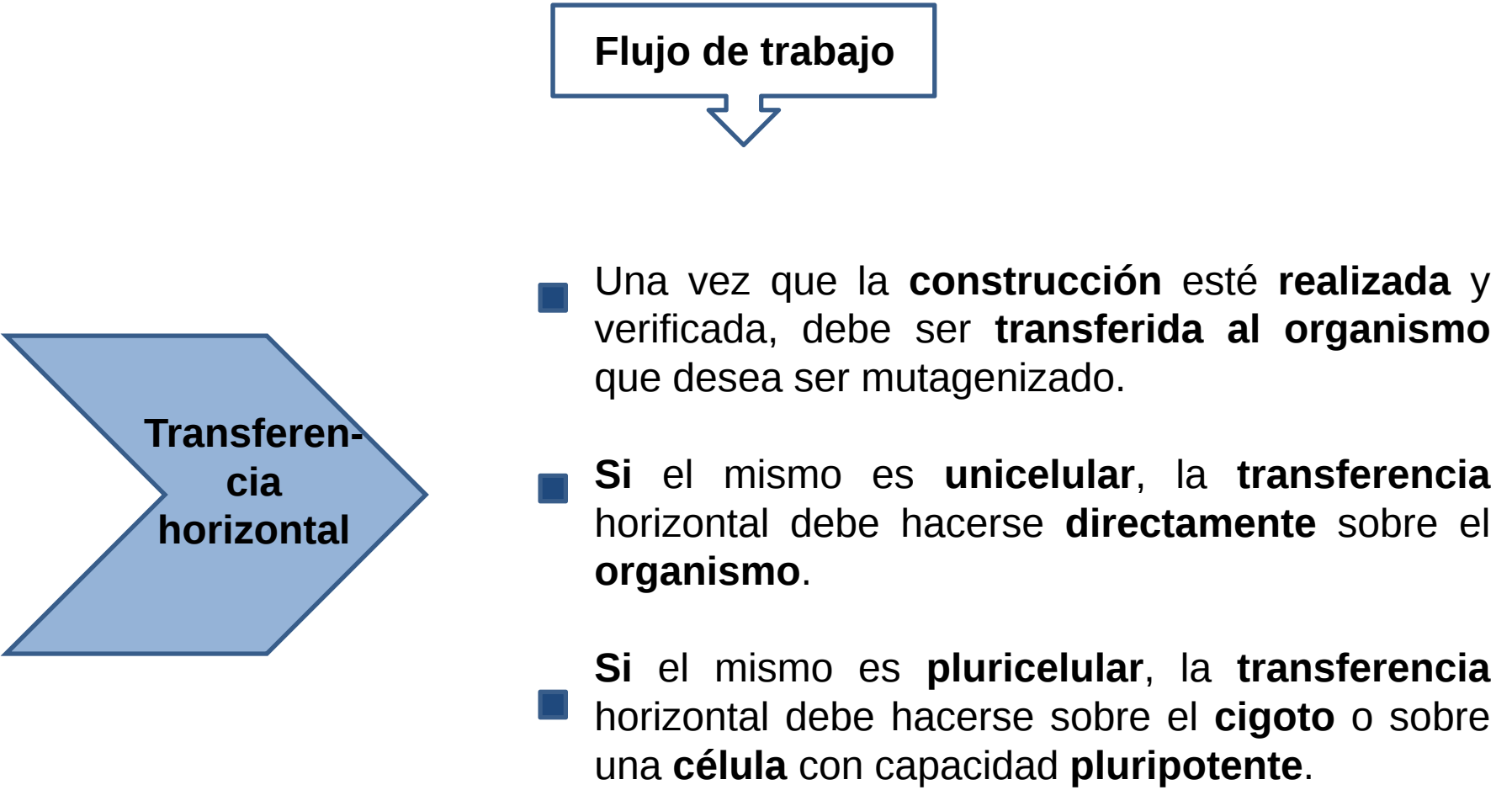
Aproximaciones dirigidas



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Flujo de trabajo

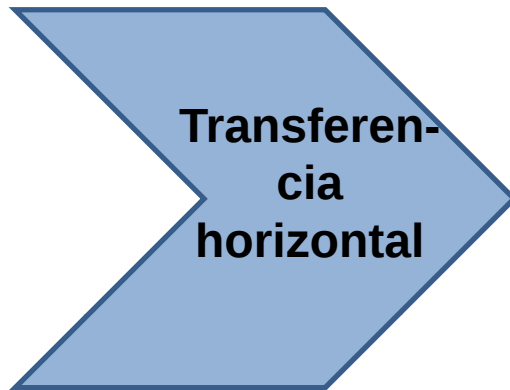


Transferencia
horizontal

- Una vez que la **construcción** esté **realizada** y verificada, debe ser **transferida al organismo** que desea ser mutagenizado.
- Si el mismo es **unicelular**, la **transferencia horizontal** debe hacerse **directamente** sobre el **organismo**.
- Si el mismo es **pluricelular**, la **transferencia horizontal** debe hacerse sobre el **cigoto** o sobre una **célula** con capacidad **pluripotente**.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

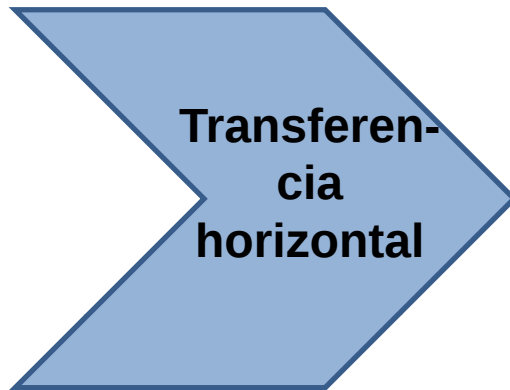


Bacterias/Arqueas/Eucariotas unicelulares

- Es necesario contar con **cultivos del organismo** que se desea modificar.
- Los **procedimientos tradicionales** incluyen la **transformación por electroporación**, por **medio de polímeros catiónicos y/o lipídicos**, o por **shock** térmico o químico.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas



A white rectangular box with a blue border. Inside the box, the text "Eucariotas pluricelulares" is written in black. A blue arrow points downwards from the bottom center of the box.

Eucariotas pluricelulares

- Es necesario contar con **células aisladas** del organismo **o** con **cigotos**.
- Los **procedimientos tradicionales** incluyen la **microinyección** (cuando son cigotos) **o** diferentes **procedimientos de transfección** (cuando son células aisladas).

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

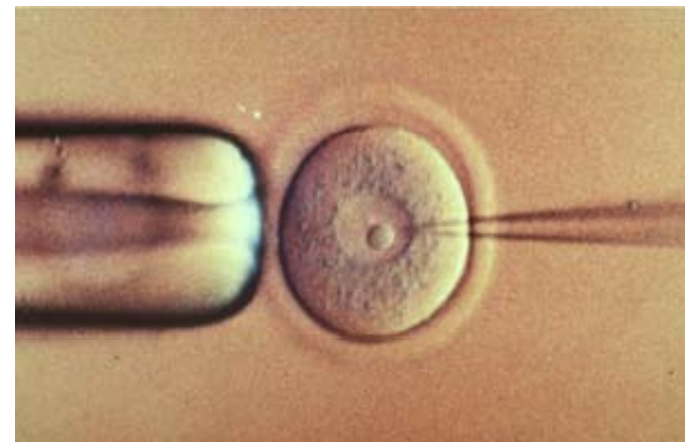
Transferen-
cia
horizontal



microinyector



microinyección



microinyección

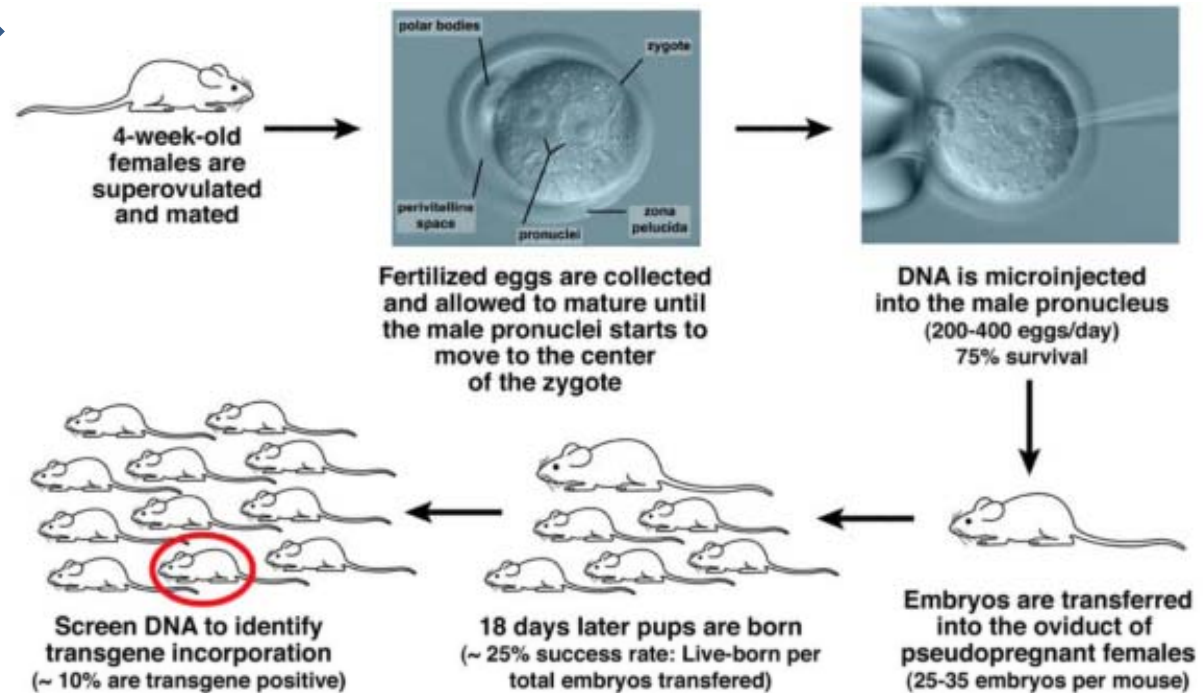
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Ejemplo de *pronuclear-injection* (PI) de cigotos

Transferencia horizontal

Selección mutante



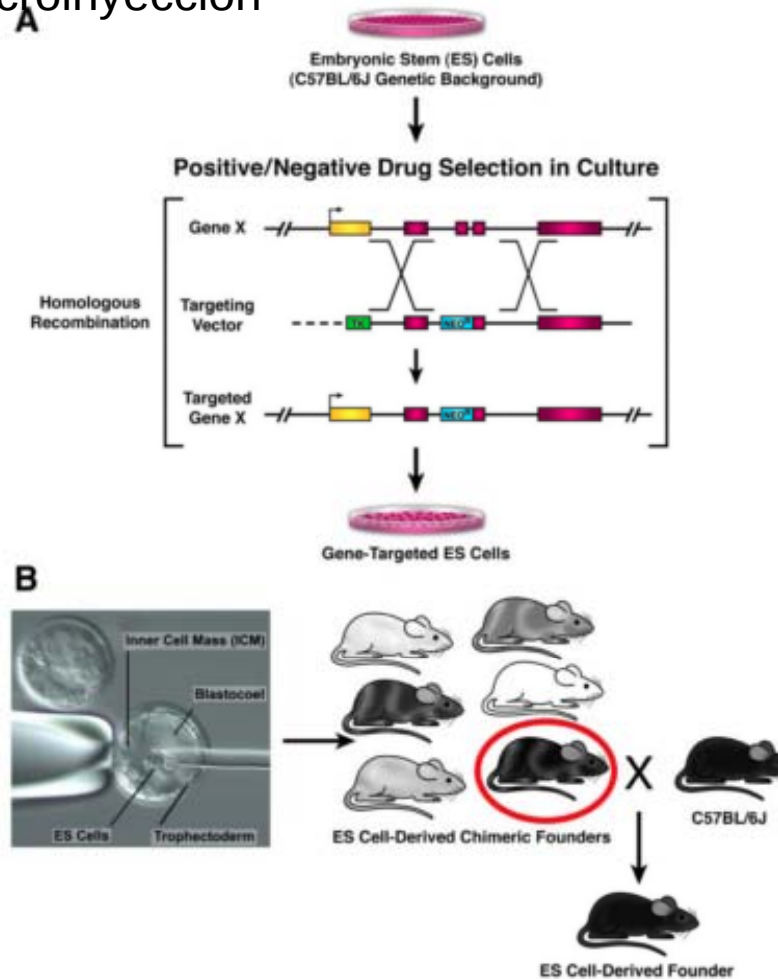
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Transferencia
horizontal

Selección
mutante

Ejemplo de modificación de células ES en cultivo y microinyección



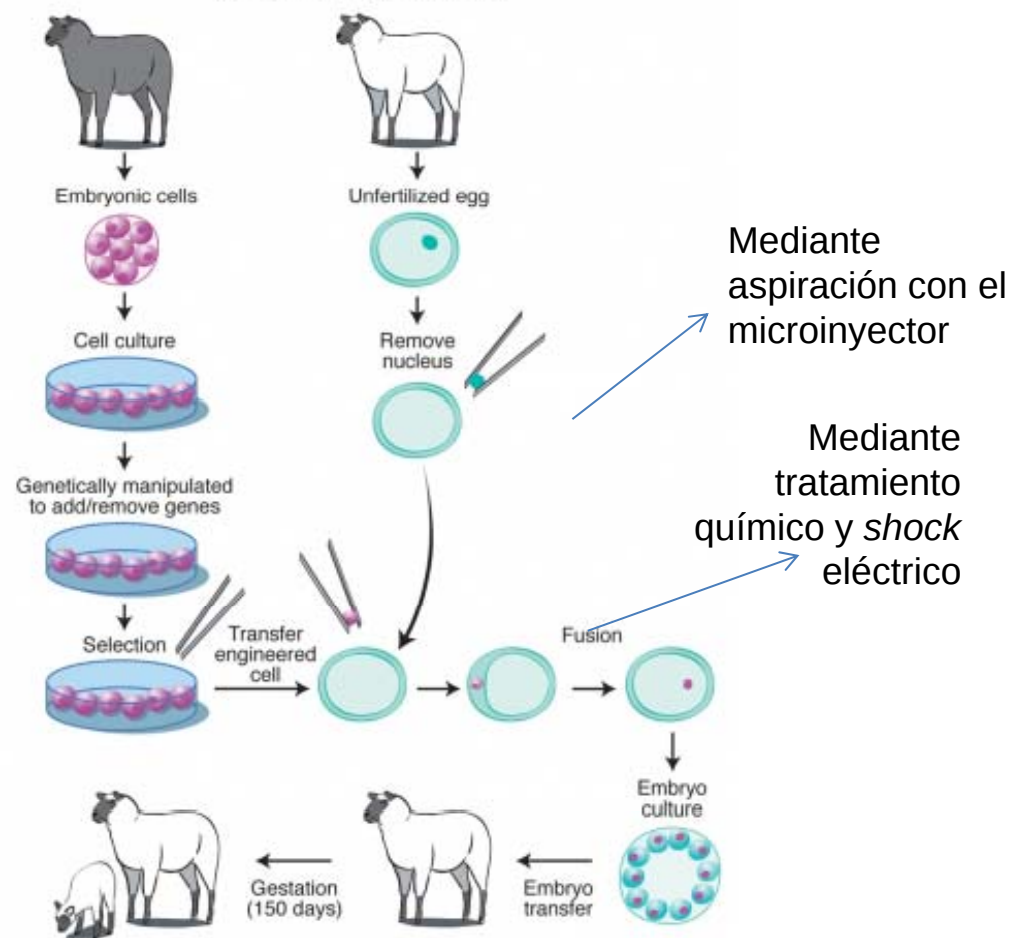
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Ejemplo de modificación de células en cultivo y clonación.

Transferencia horizontal

Selección mutante

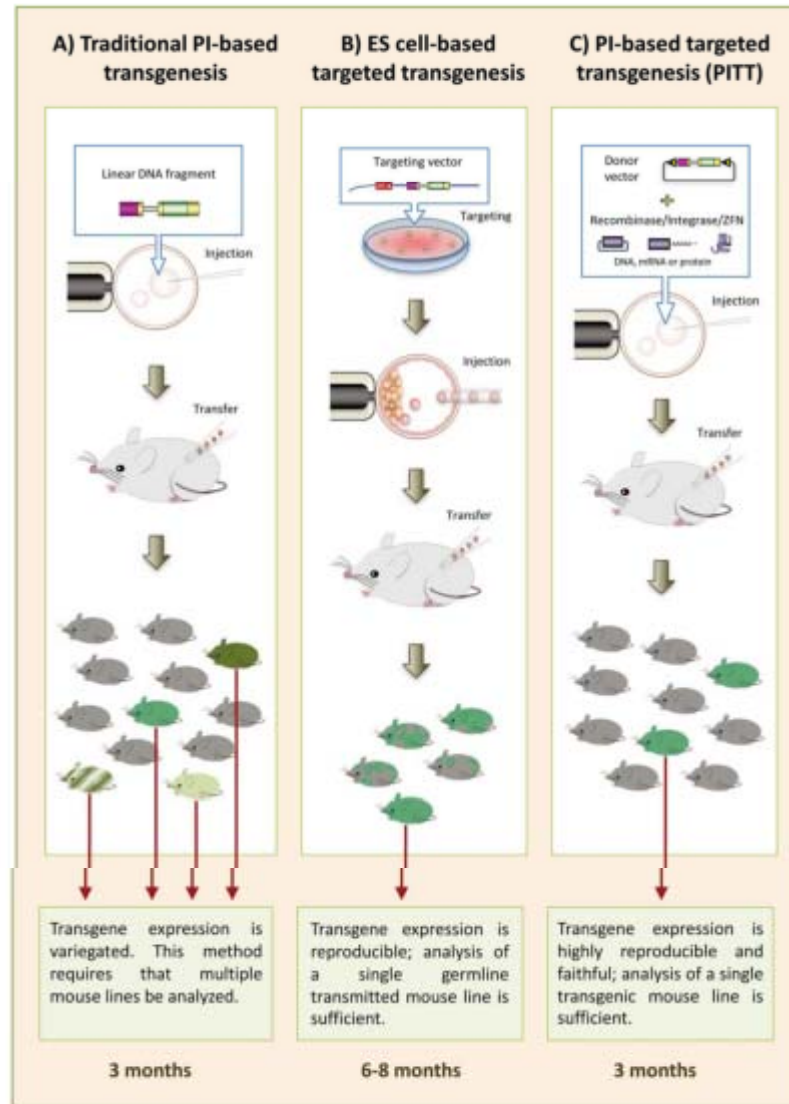


Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Transferencia
horizontal

Selección
mutante



Metodologías de
transferencia
para animales

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas



Selección
mutante

- Los **organismos mutantes** (o **células modificadas**) se **seleccionan** en función de la **ventaja incorporada** (resistencia a antibióticos, proteínas indicadoras).
- Para los **unicelulares**, y para los **pluricelulares modificados como ES**, suele utilizarse **genes de resistencia a antibióticos** como ventajas.
- Para las **microinyecciones de cigotos** se suelen utilizar como ventajas **genes** que codifican **proteínas indicadoras**.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas



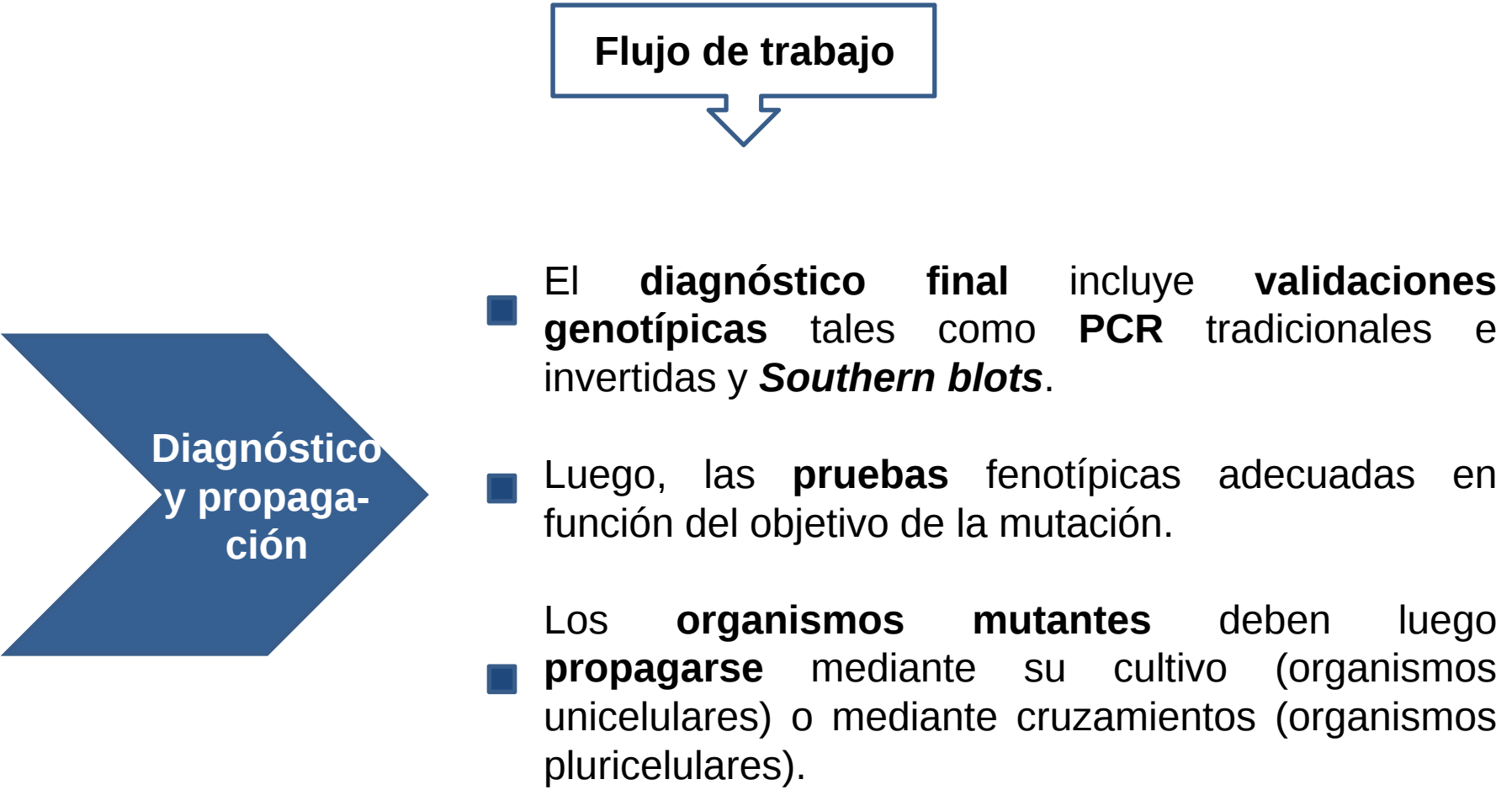
Selección
mutante

- Muchas veces, **si no se quieren dejar rastros** de la **mutación** en el genoma (gen de la ventaja, por ejemplo), se procede a hacer **otra mutagénesis** genómica sobre el **mismo locus**.
- En **tales aproximaciones**, en el **casete inicial** debe ponerse un **marcador de selección negativa** (gen suicida), como el **gen HSV-tk** (gen *Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase*).
- Este gen da **sensibilidad al ganciclovir**, y por ende, sólo sobreviven células que no lo poseen.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Flujo de trabajo

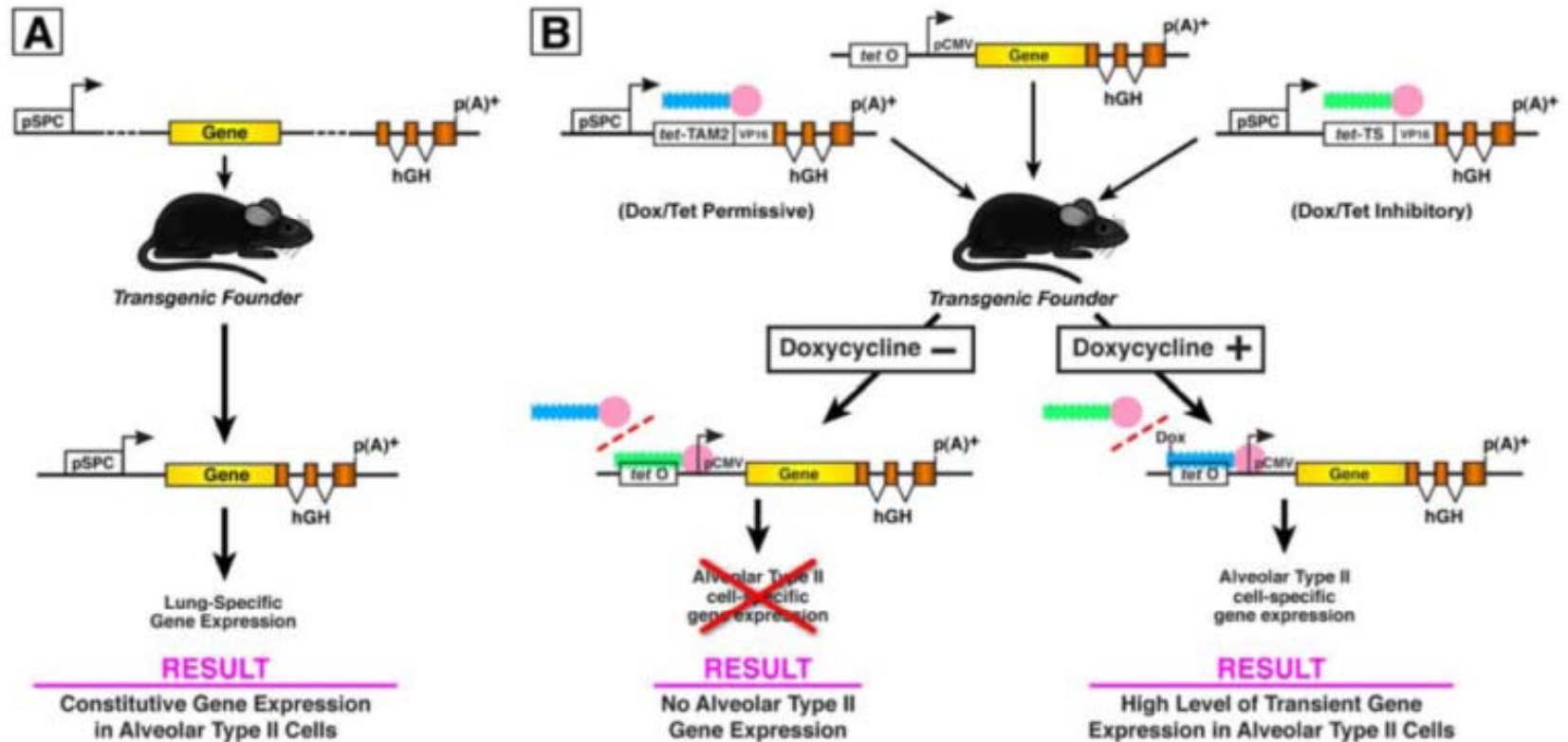


Diagnóstico
y propaga-
ción

- El **diagnóstico final** incluye **validaciones genotípicas** tales como **PCR** tradicionales e invertidas y ***Southern blots***.
- Luego, las **pruebas** fenotípicas adecuadas en función del objetivo de la mutación.
- Los **organismos mutantes** deben luego **propagarse** mediante su cultivo (organismos unicelulares) o mediante cruzamientos (organismos pluricelulares).

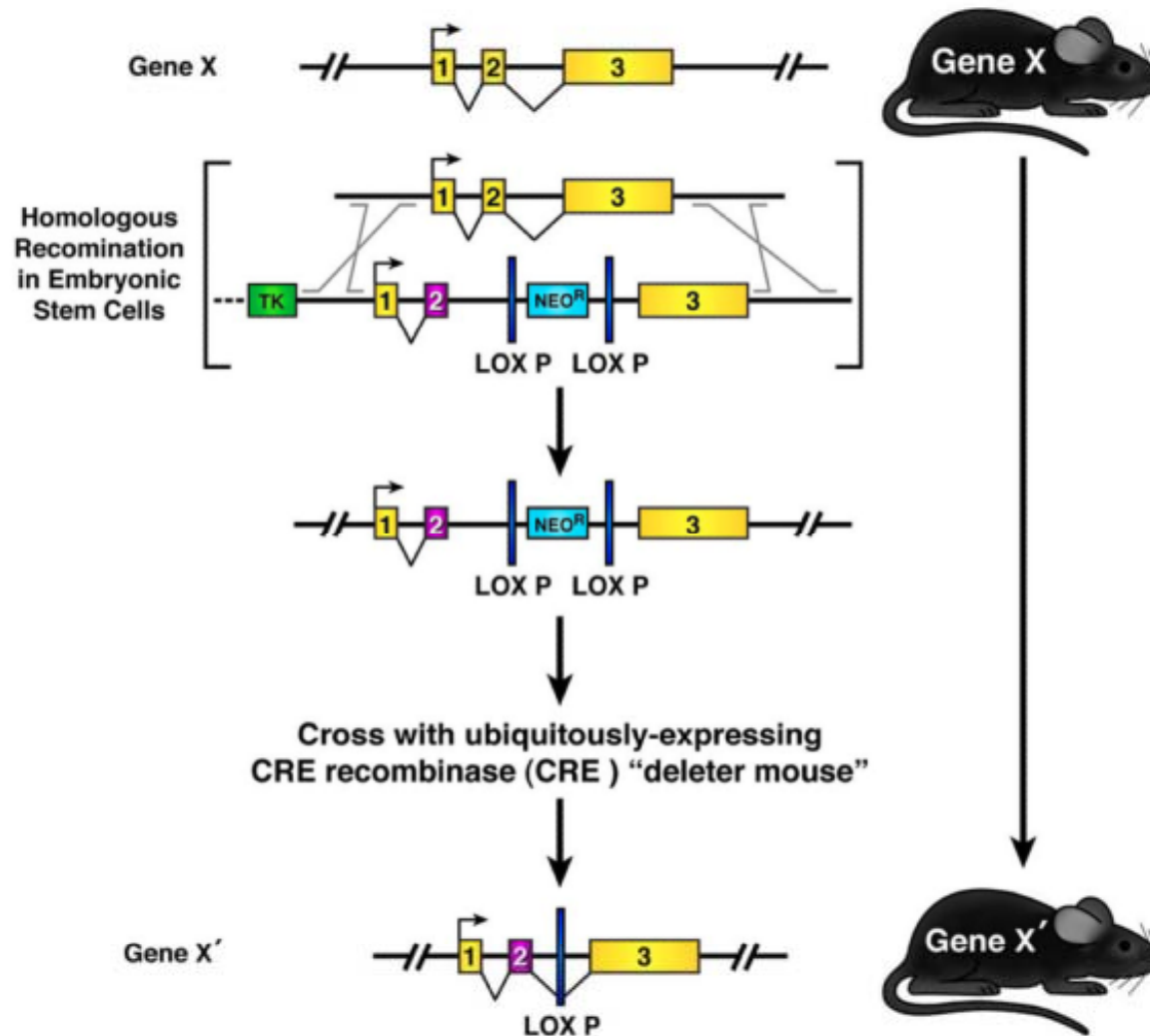
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: ejemplos en ratón



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: ejemplos en ratón



***¿Cómo es la mutagénesis
genómica al azar?***

Mutagénesis de genomas

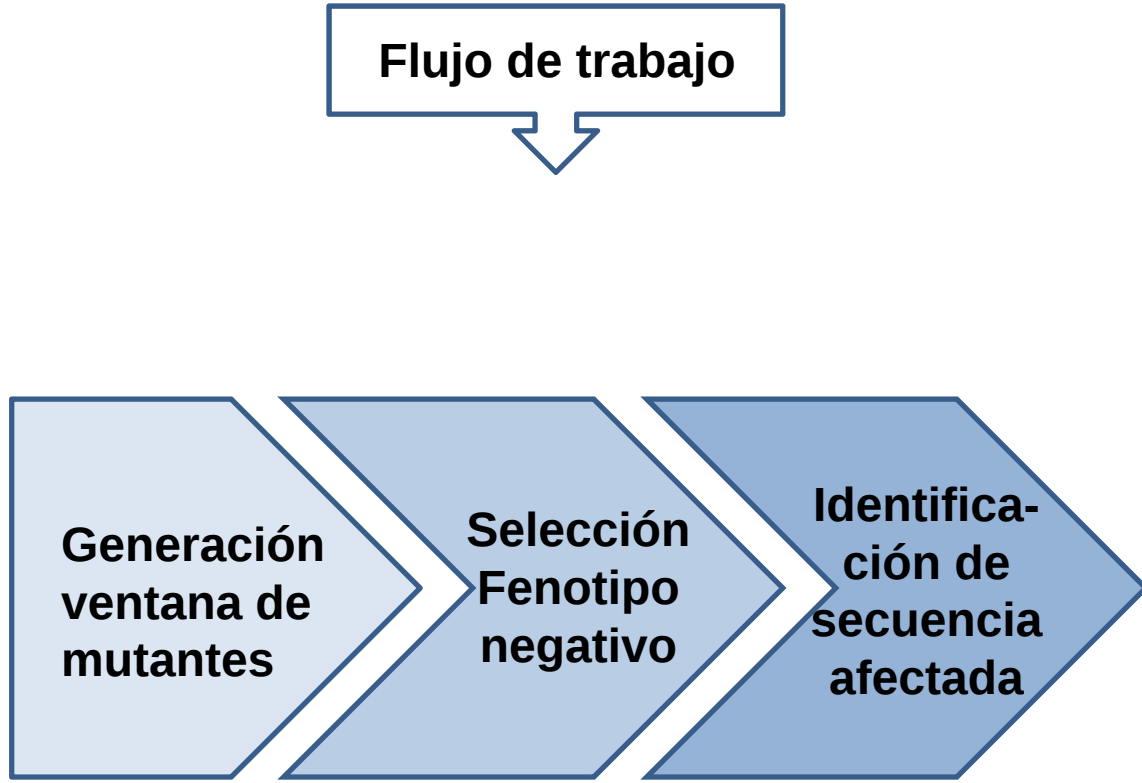
Aproximaciones al azar

- La **genómica funcional**, disciplina de la biología molecular que intenta describir los genes, sus productos e interacciones, puede ser **abordada** por medio de **diferentes aproximaciones**.
- Entre ellas, la **generación de ventanas de mutantes** es una de las principales herramientas para comprender la función génica.
- Esto implica la **realización de mutantes al azar**, lo que implica, generar individuos o líneas de individuos que portan mutaciones **del tipo *knock out*** para genes diferentes.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar

Flujo de trabajo



Generación
ventana de
mutantes

Selección
Fenotipo
negativo

Identifica-
ción de
secuencia
afectada

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar

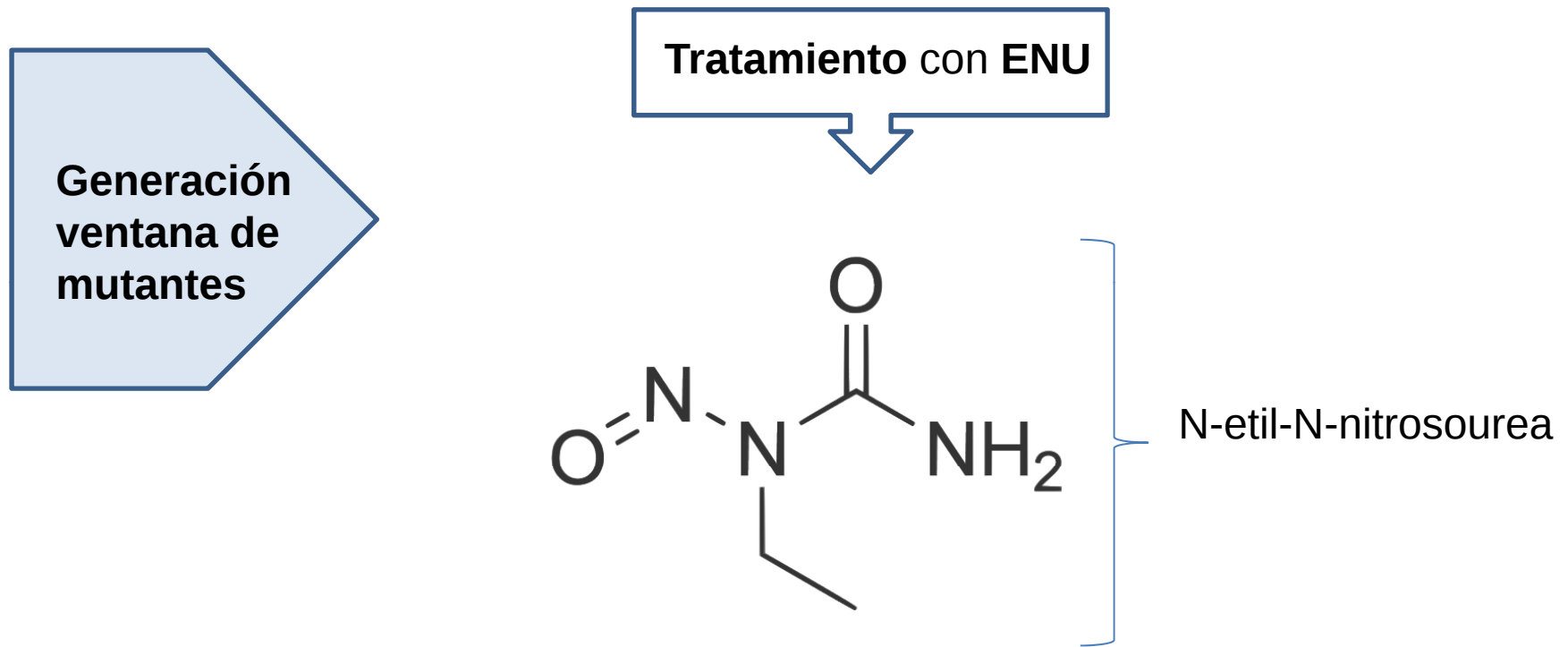


**Generación
ventana de
mutantes**

- Los **procedimientos** más utilizados para generar **ventanas de mutantes** son:
 - *Tratamiento con ENU*
 - *Utilización de transposones*
 - *Utilización de retrovirus*

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar



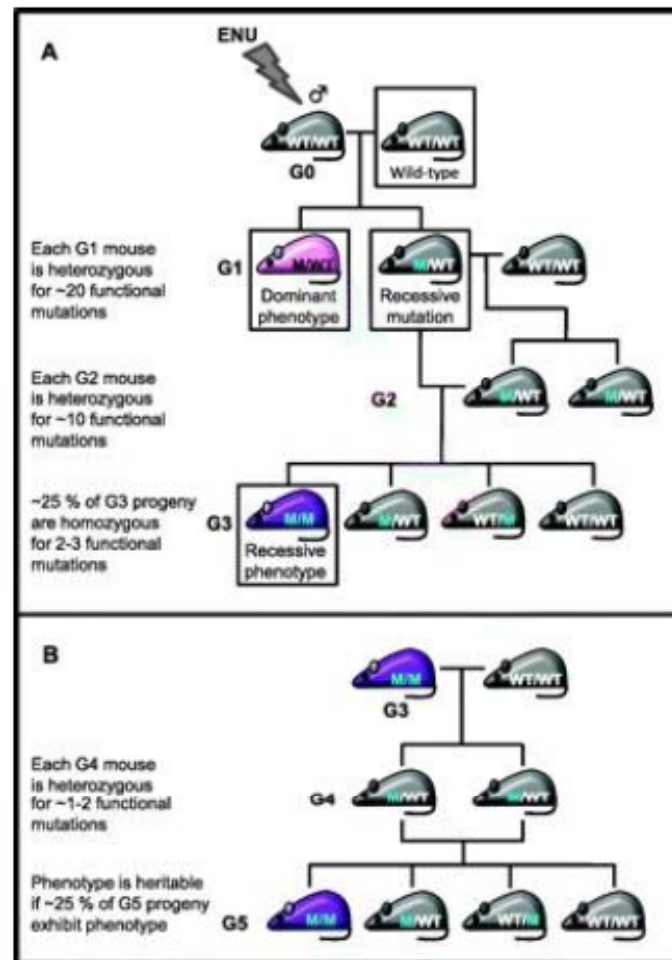
- **ENU** es un **compuesto alquilante** que transfiere su grupo etilo a cualquier oxígeno o nitrógeno nucleofílico de los ácidos nucleicos.
- Esto forma aductos de DNA que **derivan en un mal apareamiento de las hebras**, que si no son reparadas correctamente, se introducen como **mutaciones puntuales**.

Aproximaciones al azar

Tratamiento con ENU

Generación ventana de mutantes

Selección
➤ **Fenotipo negativo**



Ejemplo en ratones.

La selección posterior se hace mediante un relevamiento de signos característicos (morfológicos, fisiológicos, comportamentales), los cuales deben estar alterados respecto al control:

- Actividad nula (null)
- Actividad reducida (hypomorphic)
- Actividad incrementada (hypermorphic)

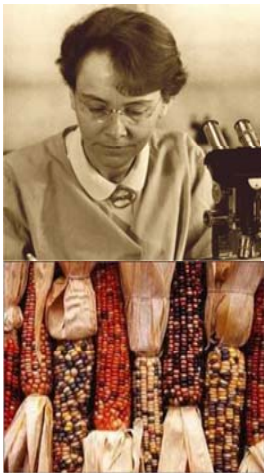
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar

Transposones

Generación
ventana de
mutantes

- Se utilizan transposones de clase II, modificados por ingeniería genética de modo tal de constituir **sistemas de 2 componentes** (un *DNA Dnonor* y un *Helper*).
- Existen **sistemas binarios de transposones mutagénicos** para **diversas especies**, muchos de los cuales son universales.
- La **elección del transposón** a utilizar en un organismo requiere el conocimiento previo de que **no exista actividad** del mismo en el **genoma *wild type***, y que la **secuencia diana** de inserción sea de **ocurrencia frecuente**.
- El **sistema binario** se **introduce** en la célula mediante **procedimientos** ya mencionados para **mutagénesis dirigida**.

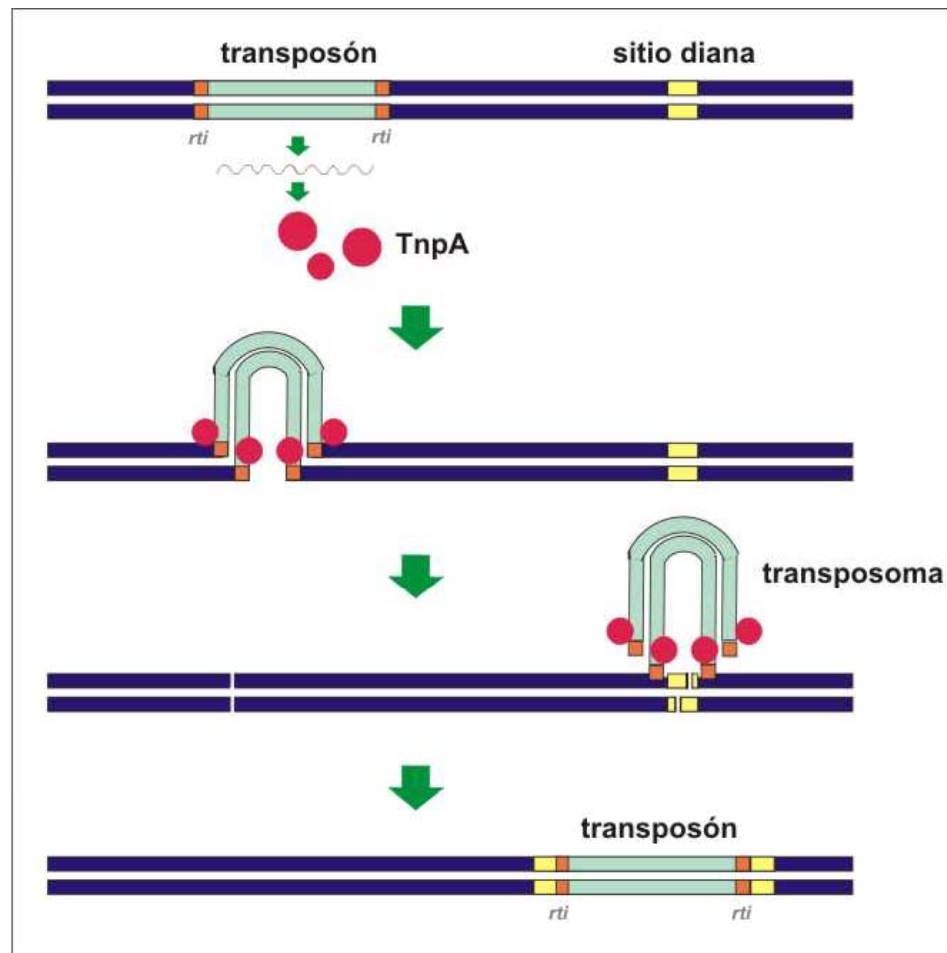
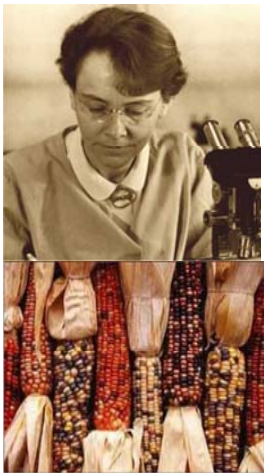


Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar

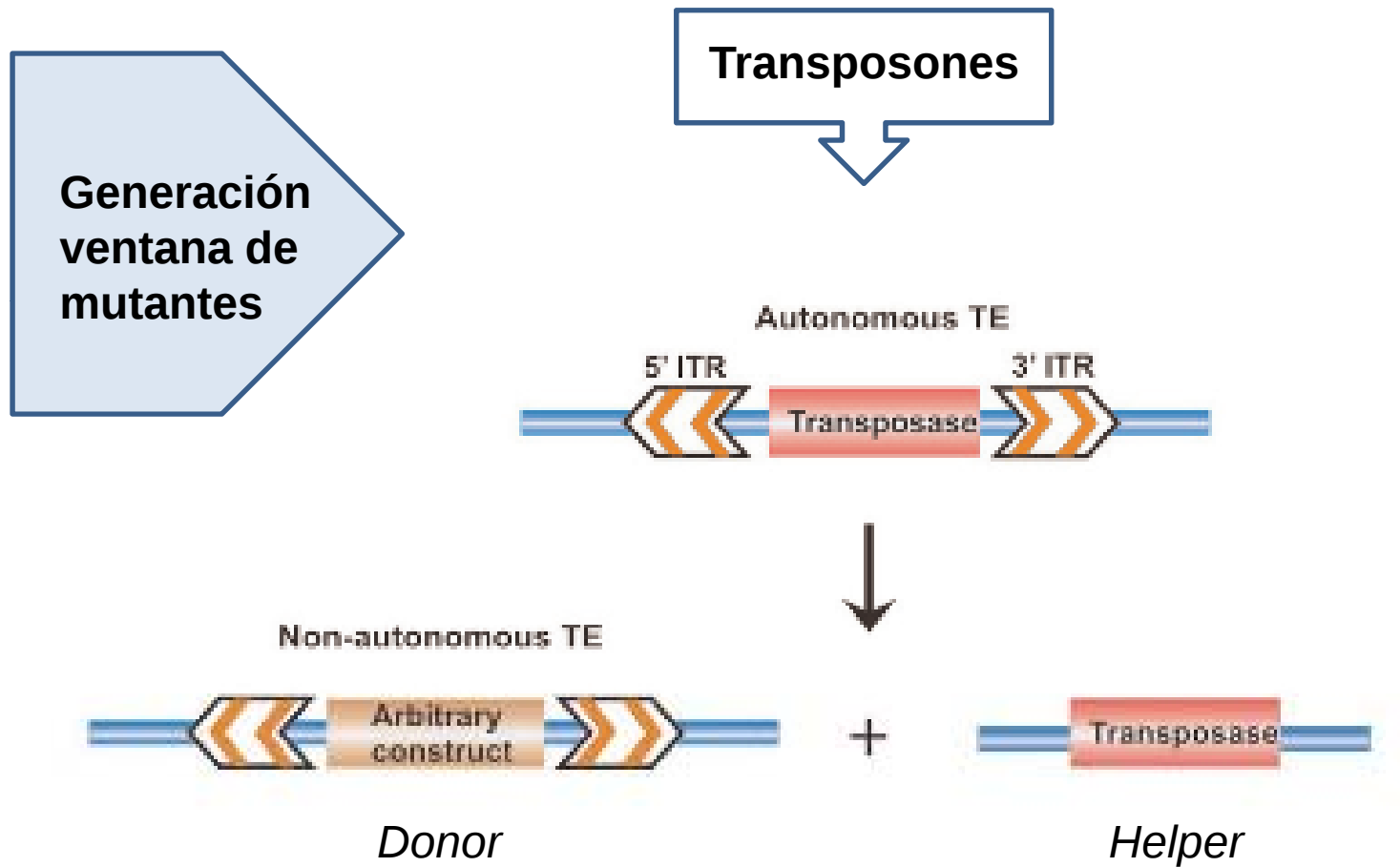
Transposones

Generación
ventana de
mutantes



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar: uso de transposones

The most frequently used transposable element systems in metazoan models and some of their main characteristics

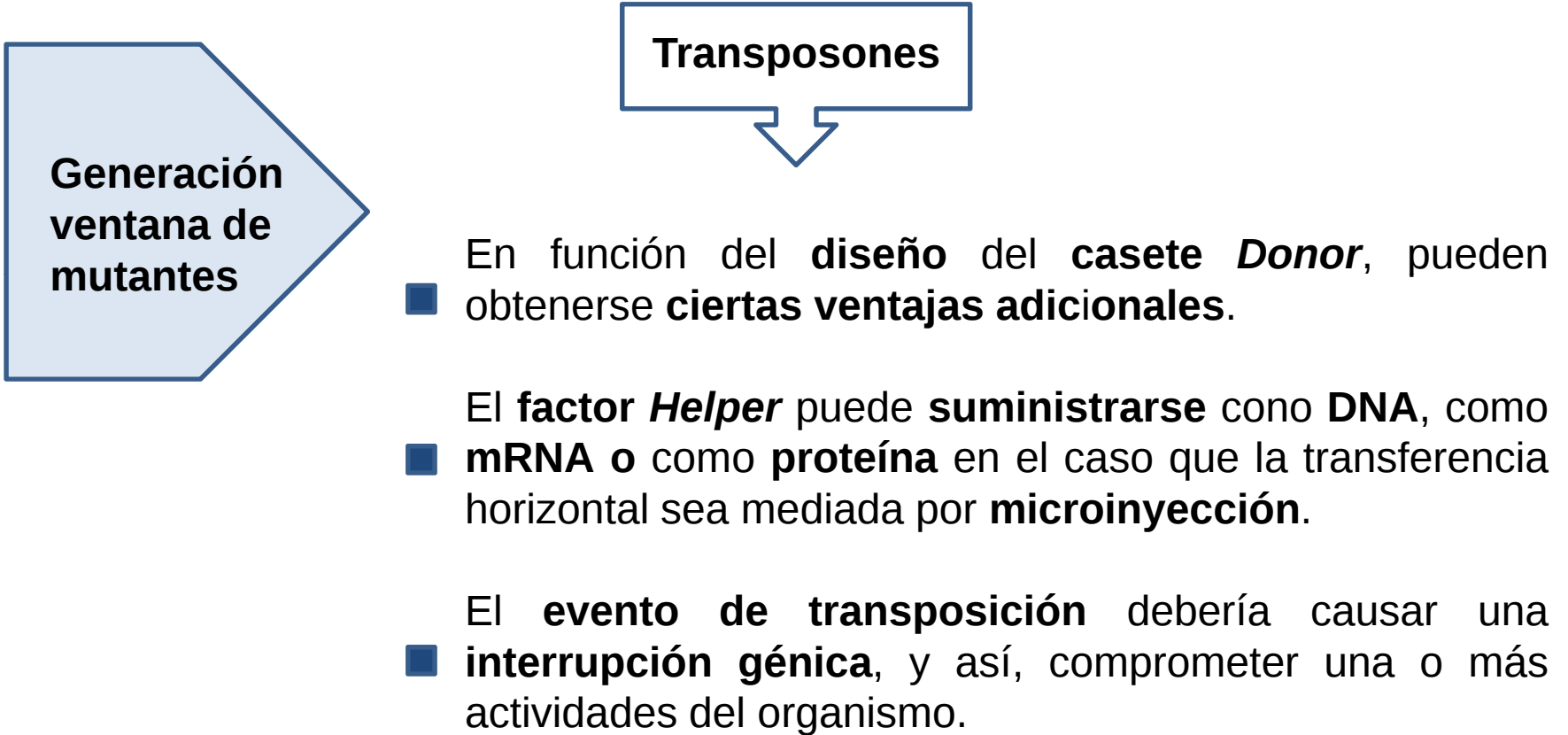
Transposon name	Transposon family	Tolerated cargo size	Target site sequence	Chromatic integration pattern
<i>Minos</i> (<i>Drosophila hydei</i>) [112]	<i>TcI</i>	Possibly similar to other <i>TcI</i> / <i>mariner</i> transposons	TA [113]	No preference for genes. Gene hits dominantly target introns [114]
<i>Mos1</i> (<i>Drosophila mauritiana</i>) [115]	<i>Mariner</i>	Sensitive to increased cargo size [116]	TA [115]	Possibly similar to other <i>TcI</i> / <i>mariner</i> transposons
<i>P</i> element (<i>Drosophila melanogaster</i>) [44,45]	<i>P</i>	Usually the cargo size is not limiting utility (10 to 20 kb routinely handled)	Heterogenic [117]	Bias for 5' regulatory sequences [61,62]
<i>piggyBac</i> (<i>Trichoplusia ni</i> cell line TN-368) [118]	<i>piggyBac</i>	Efficiency drops above 9.1 kb in pronucleus injected mice [68]	TTAA [119]	High preference for transcription units, (but the pattern is distinct from the <i>P</i> element pattern) [11,62,68]
<i>Sleeping Beauty</i> (salmonid fish) [67]	<i>TcI</i>	Increased cargo size exponentially decreasing the efficiency in cultured cells [120]	TA [67]	Slight preference for genes. Gene hits dominantly target introns [12,121]
<i>TcI</i> (<i>Caenorhabditis elegans</i>) [29]	<i>TcI</i>	Increased cargo size exponentially decreasing the efficiency in cultured cells [122]	TA [123]	Mild preference for introns in <i>C. elegans</i> [124]
<i>Tc3</i> (<i>C. elegans</i>) [125]	<i>TcI</i>	Possibly similar to <i>TcI</i>	TA [123]	Mild preference for introns in <i>C. elegans</i> [124]
<i>Tol2</i> (<i>Oryzias latipes</i> [medaka fish]) [126]	<i>hAT</i>	11.7 kb did not reduce transgenesis rates in zebrafish [127]; >10 kb transposons jump efficiently in human cells [98]	Heterogenic [72]	May prefer the 5' regions of genes [128]

kb, kilobases.

Mátés et al, 2007. Technology transfer from worms and flies to vertebrates: transposition-based genome manipulations and their future Perspectives. *Genome Biology* 2007, 8(Suppl 1):S1 (doi:10.1186/gb-2007-8-S1-S1)

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar



Generación
ventana de
mutantes

Transposones

- En función del **diseño** del **casete *Donor***, pueden obtenerse **ciertas ventajas adicionales**.

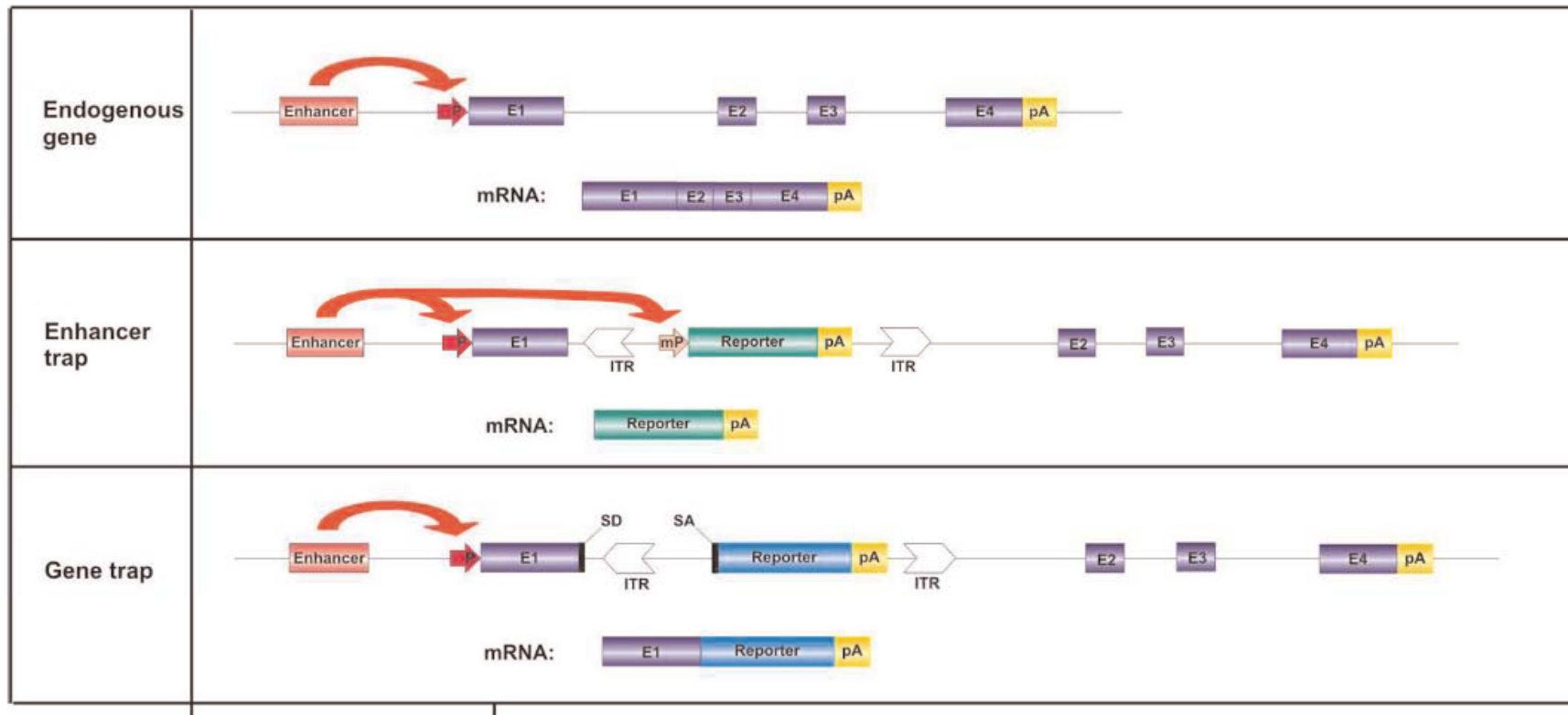
- El **factor *Helper*** puede **suministrarse** como **DNA**, como **mRNA** o como **proteína** en el caso que la transferencia horizontal sea mediada por **microinyección**.

- El **evento de transposición** debería causar una **interrupción génica**, y así, comprometer una o más actividades del organismo.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar: uso de transposones

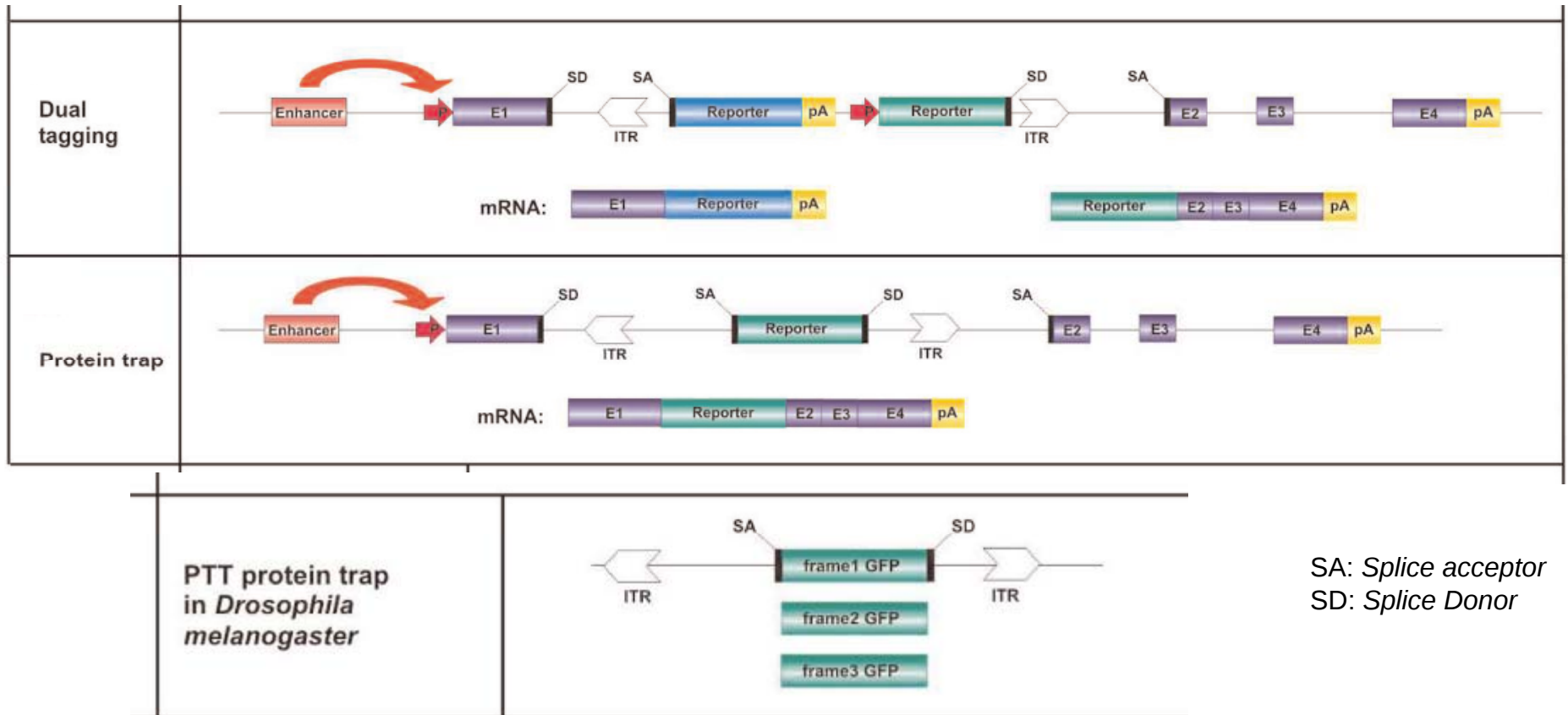
Ventajas en función del diseño del casete



Mutagénesis de genomas

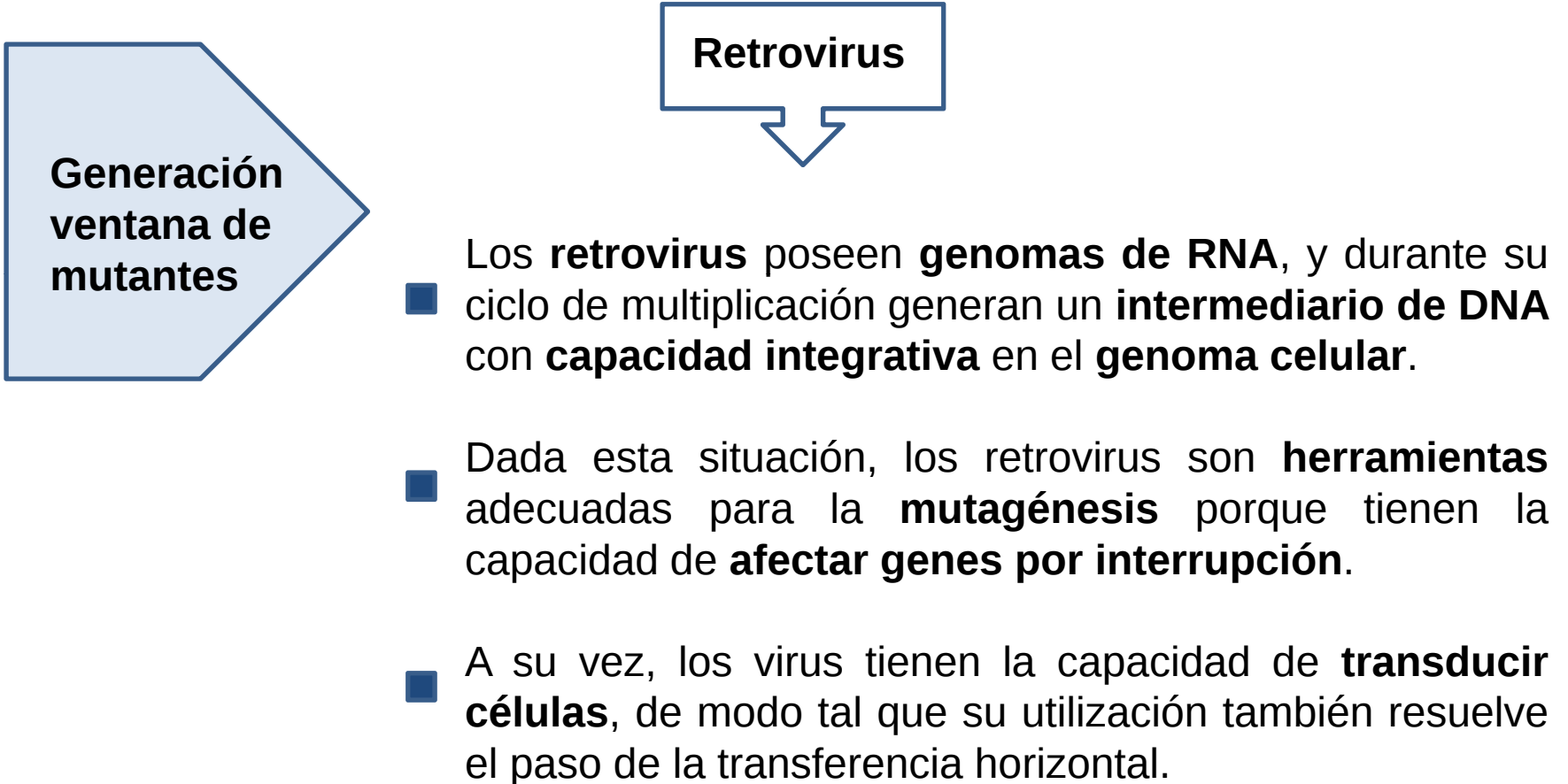
Aproximaciones al azar: uso de transposones

Ventajas en función del diseño del casete



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar



Generación
ventana de
mutantes

Retrovirus

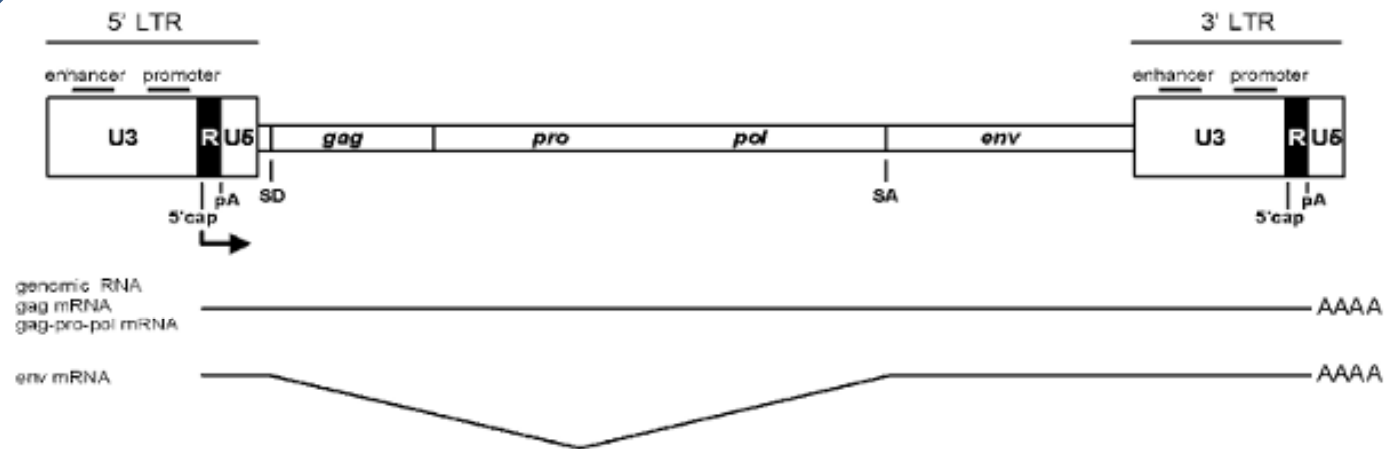
- Los **retrovirus** poseen **genomas de RNA**, y durante su ciclo de multiplicación generan un **intermediario de DNA** con **capacidad integrativa** en el **genoma celular**.
- Dada esta situación, los retrovirus son **herramientas** adecuadas para la **mutagénesis** porque tienen la capacidad de **afectar genes por interrupción**.
- A su vez, los virus tienen la capacidad de **transducir células**, de modo tal que su utilización también resuelve el paso de la transferencia horizontal.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar

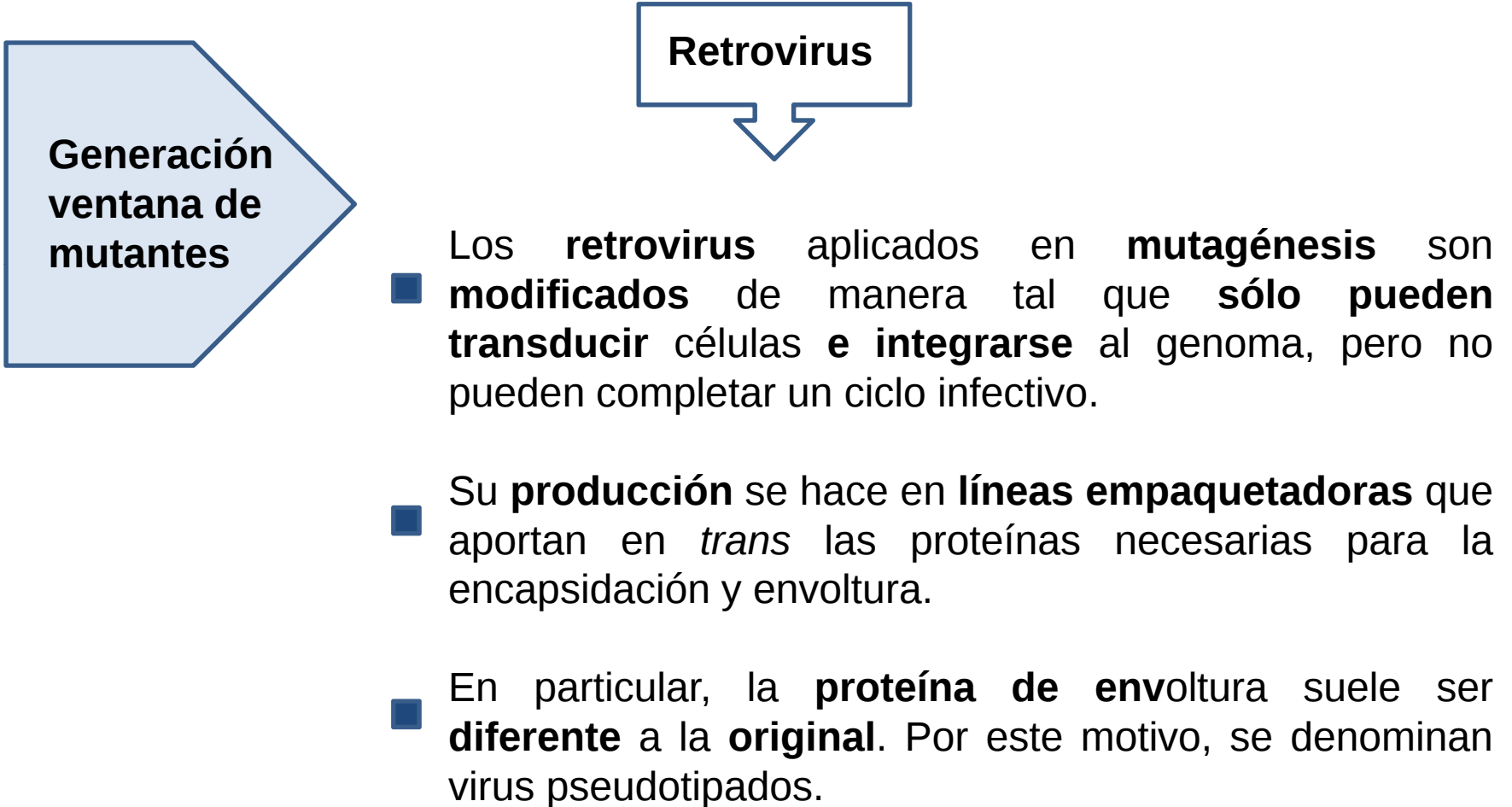
Generación
ventana de
mutantes

Retrovirus



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar



Generación
ventana de
mutantes

Retrovirus

- Los **retrovirus** aplicados en **mutagénesis** son **modificados** de manera tal que **sólo pueden transducir** células **e integrarse** al genoma, pero no pueden completar un ciclo infeccioso.
- Su **producción** se hace en **líneas empaquetadoras** que aportan en *trans* las proteínas necesarias para la encapsidación y envoltura.
- En particular, la **proteína de envoltura** suele ser **diferente** a la **original**. Por este motivo, se denominan virus pseudotipados.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar

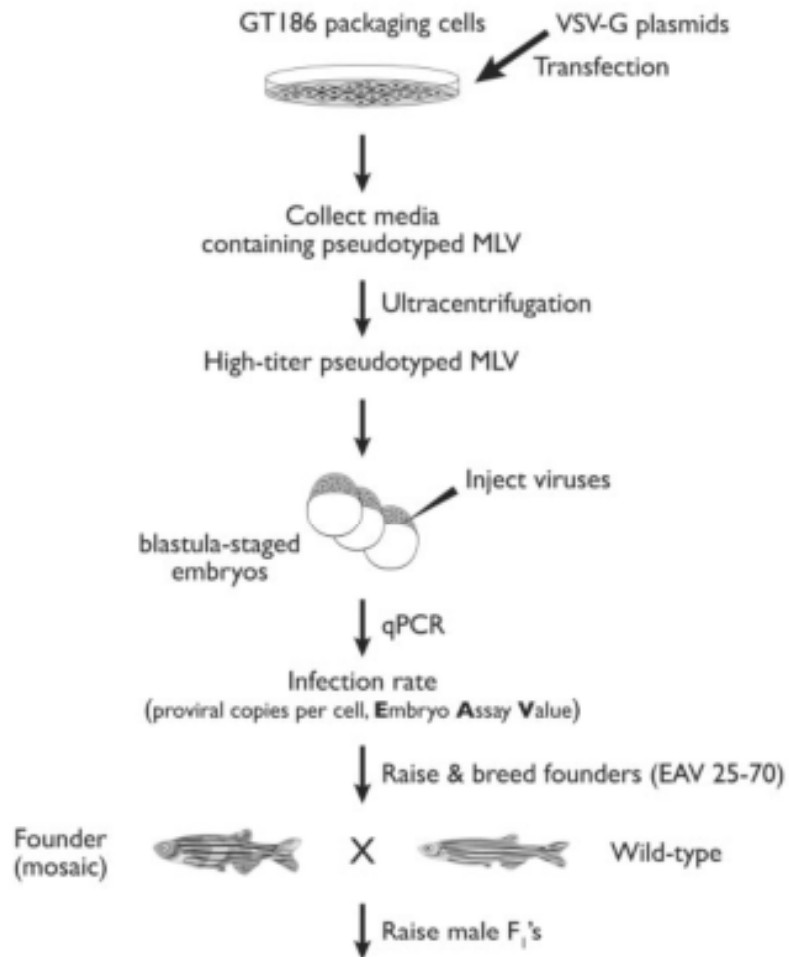


Retrovirus

- Uno de los **retrovirus** más utilizados es **MLV** (*Moloney murine leukemia virus*), pseudotipado con la glicoproteína del VSV (Virus de la estomatitis vesicular).
- En general, el **casete de integración** se coloca en un **plásmido**, y luego de su **transfección** en una **línea celular adecuada** que permite su transcripción y encapsidación, se obtienen **partículas pseudovirales**.
- Estas **partículas** se **inyectan en blástulas** y a partir de allí, se obtienen las líneas mutantes.

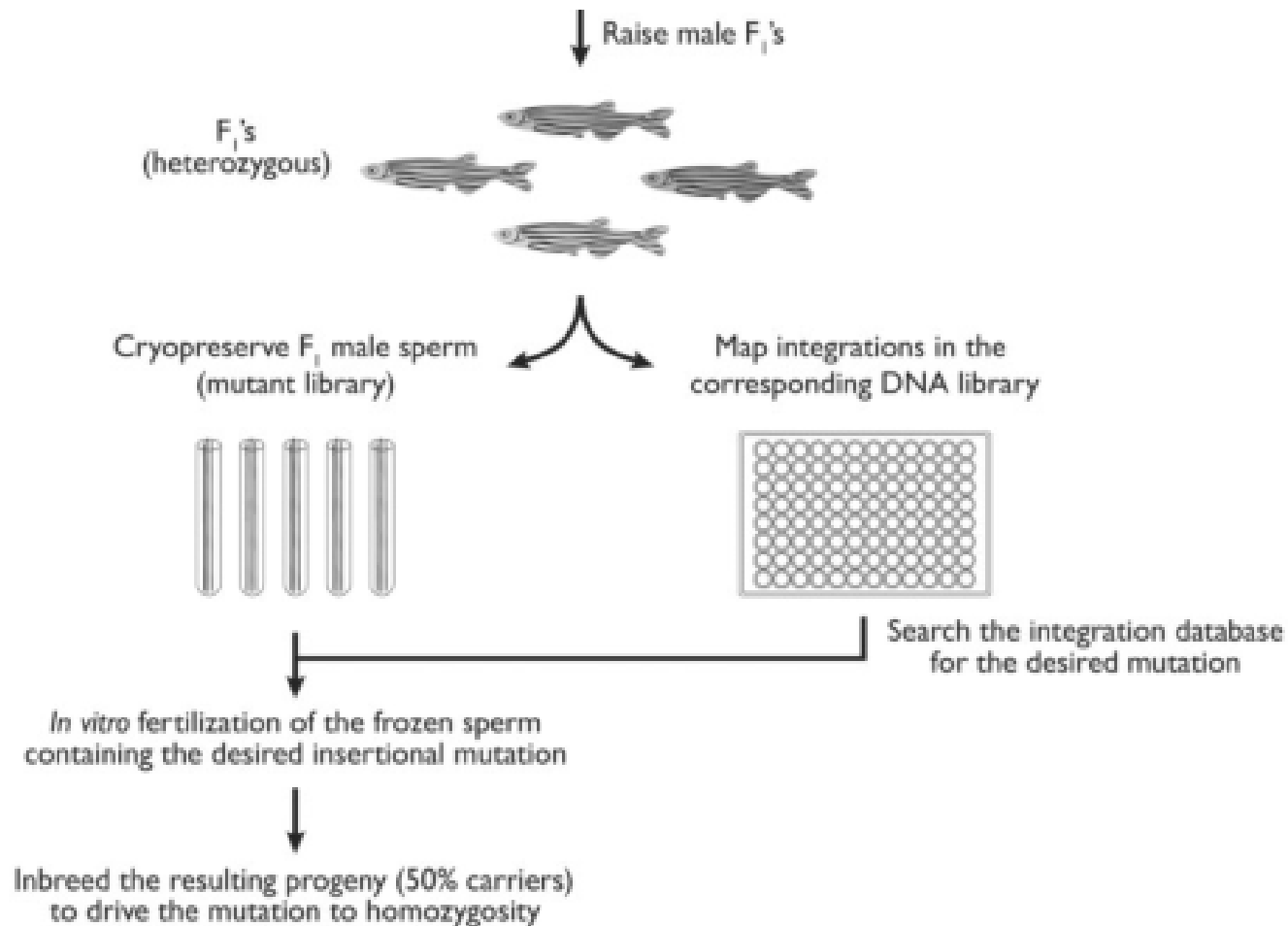
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar: retrovirus



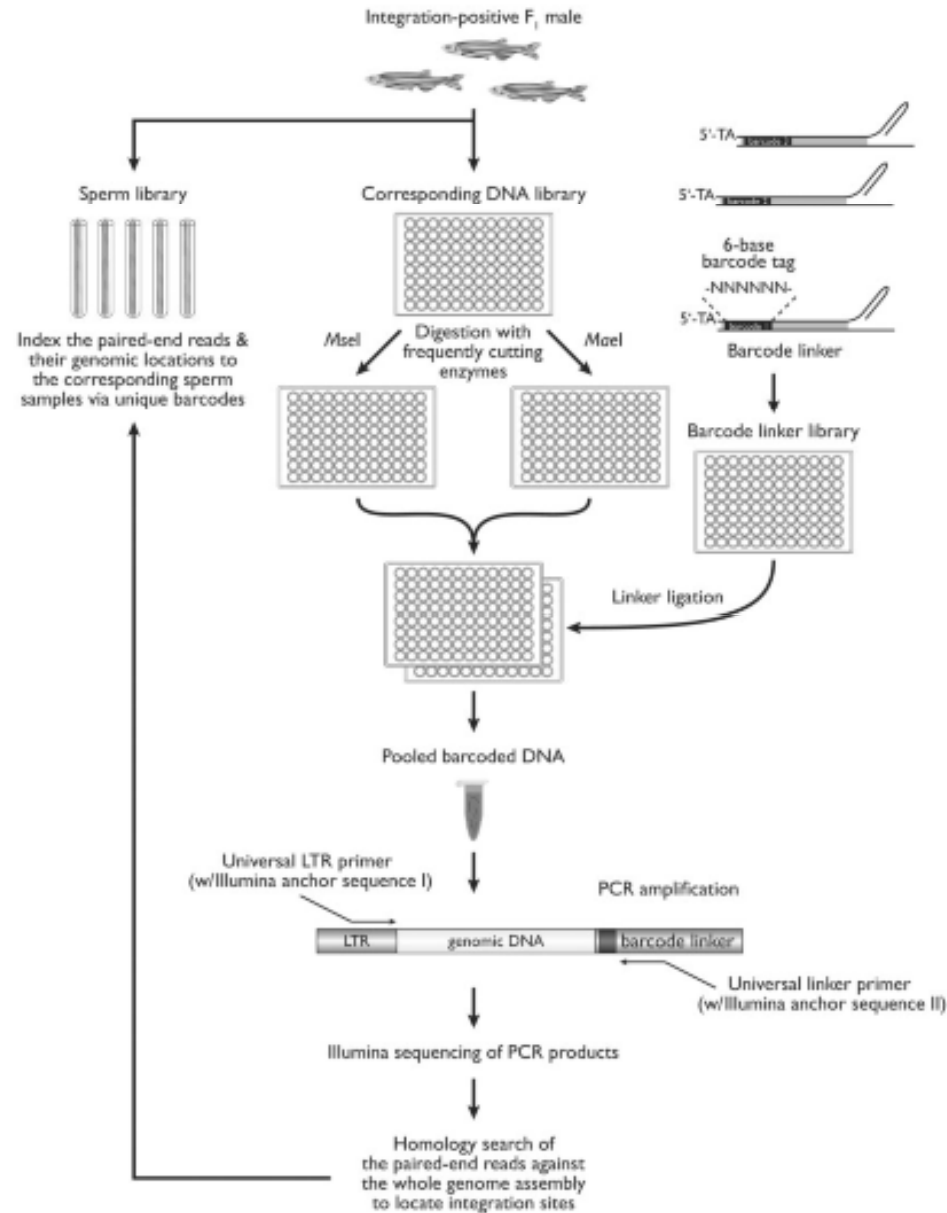
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar: retrovirus



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar: retrovirus



Jao et al, 2008. Using retroviruses as a mutagenesis tool to explore the zebrafish genome. BRIEFINGS IN FUNCTIONAL GENOMICS AND PROTEOMICS. VOL 7. NO 427^ 443

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar: retrovirus



Retrovirus que expresa YFP



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar

Flujo de trabajo

Selección Fenotipo negativo

- Luego de la **generación** de los **mutantes**, y de los **cruzamientos pertinentes** para generar los **organismos homocigotas**, se procede a **caracterizar** los **individuos** en función de los **fenotipos** que presentan.

Identifica- ción de secuencia afectada

- El **posicionamiento** de la **mutación** luego se realiza de acuerdo al método utilizado para la mutación.

- Si se realizó una mutagénesis con ENU, se debe posicionar mediante **mapeo de ligación**. En tanto, si se usaron **transposones** o **retrovirus**, el procedimiento usual es la **PCR invertida**.