

Ingeniería Genética II

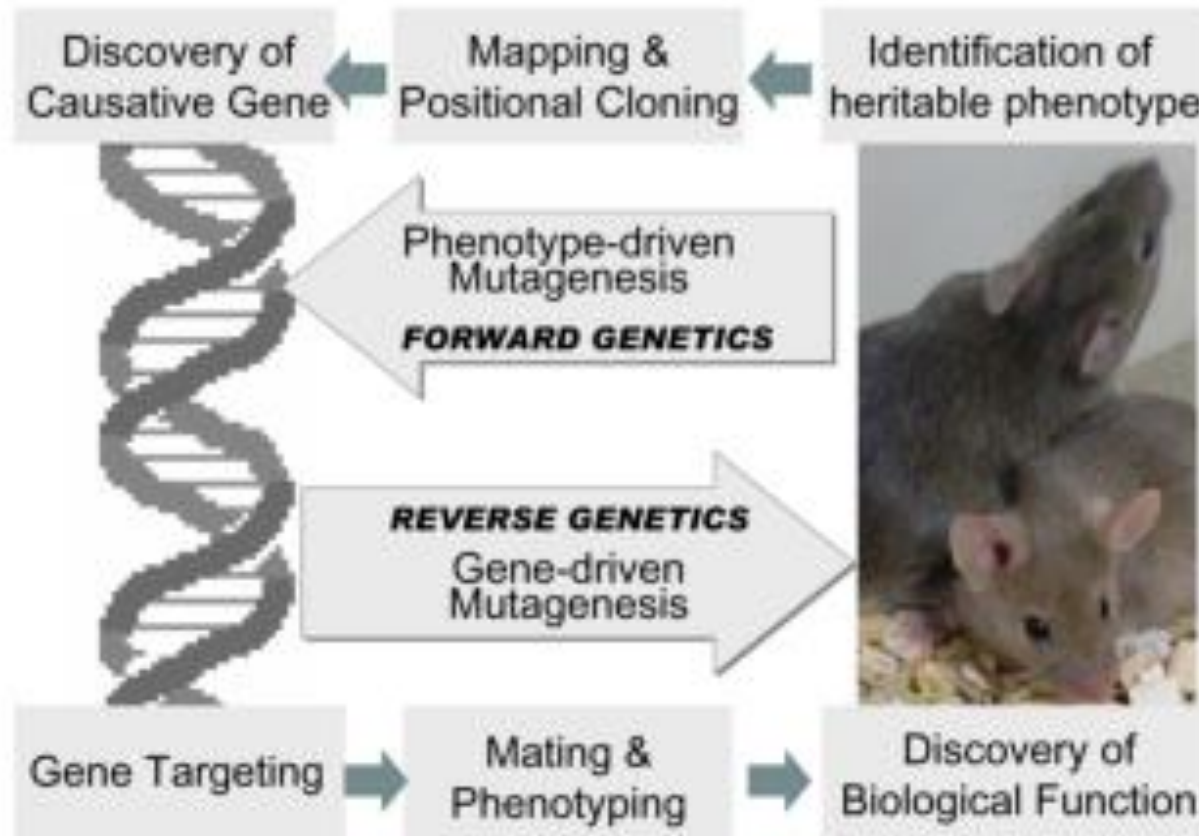
Unidad XI

Edición 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 modificaciones
se pueden hacer?***

Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**

Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**

La casa es azul. Se encuentra
ubicada en York. Es de madera.

Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**

La casa es azul. Se encuentra ubicada en York. Es de madera.



La casa es azul **y es vieja**. Se encuentra ubicada en York. Es de madera.

Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**

La casa es azul. Se encuentra ubicada en York. Es de madera.



La casa es azul **y es vieja**. Se encuentra ubicada en York. Es de madera.



La **cosa** es azul **y es vieja**. Se encuentra ubicada en York. Es de madera.

Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**

La casa es azul. Se encuentra ubicada en York. Es de madera.



La casa es azul **y es vieja**. Se encuentra ubicada en York. Es de madera.



La **cosa** es azul **y es vieja**. Se encuentra ubicada en **Nueva York**. Es de madera.



La **cosa** es azul **y es vieja**. Se encuentra ubicada en York. Es de madera.

Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**

La casa es azul. Se encuentra ubicada en York. Es de madera.



La casa es azul **y es vieja**. Se encuentra ubicada en York. Es de madera.



La **cosa** es azul **y es vieja**. Se encuentra ubicada en **Nueva York**. Es de madera.



La **cosa** es azul **y es vieja**. Se encuentra ubicada en York. Es de madera.



La **cosa** es azul **y es vieja**. Se encuentra ubicada en **Nueva York**.

Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**

La casa es azul. Se encuentra ubicada en York. Es de madera.



La **cosa** es azul **y es vieja**. Se encuentra ubicada en **Nueva York**.

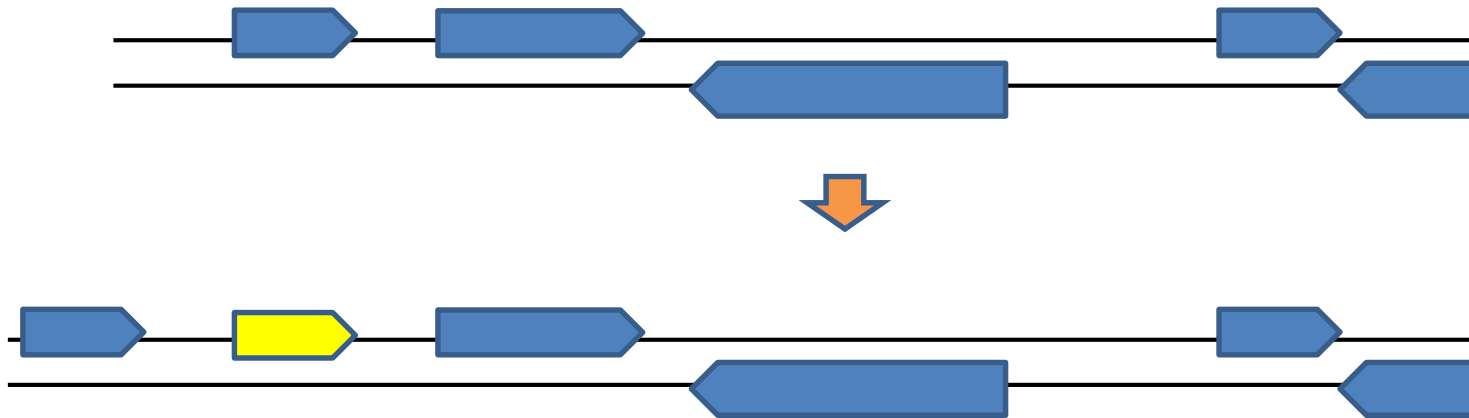
Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**



Edición de genomas

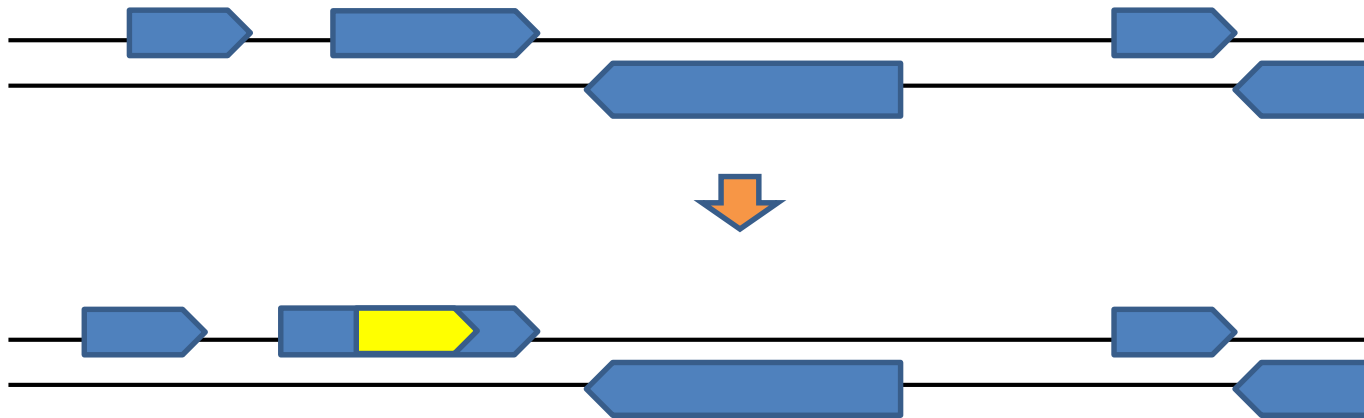
Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**



Knock-in (transgénico o cisgénico)

Edición de genomas

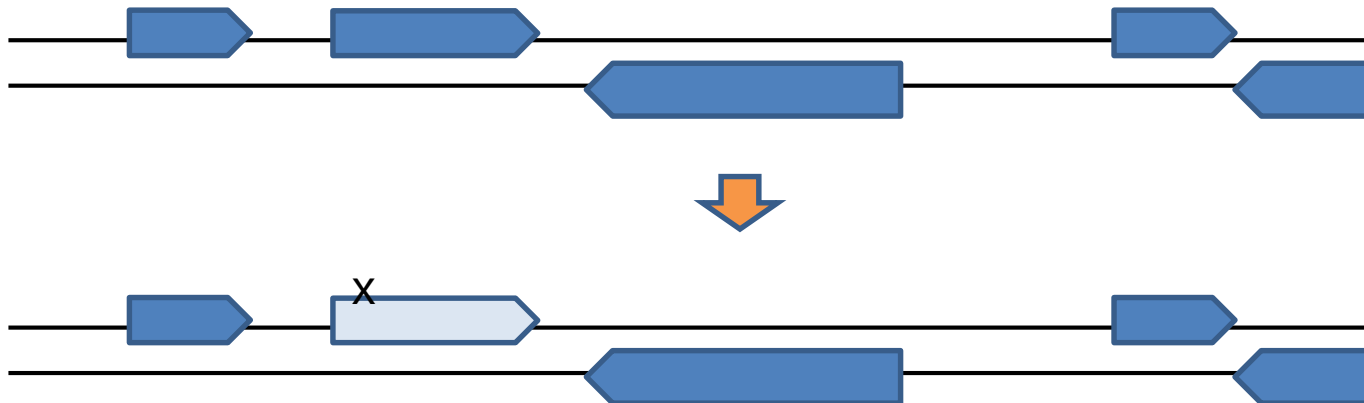
Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**



Knock-out (por interrupción)

Edición de genomas

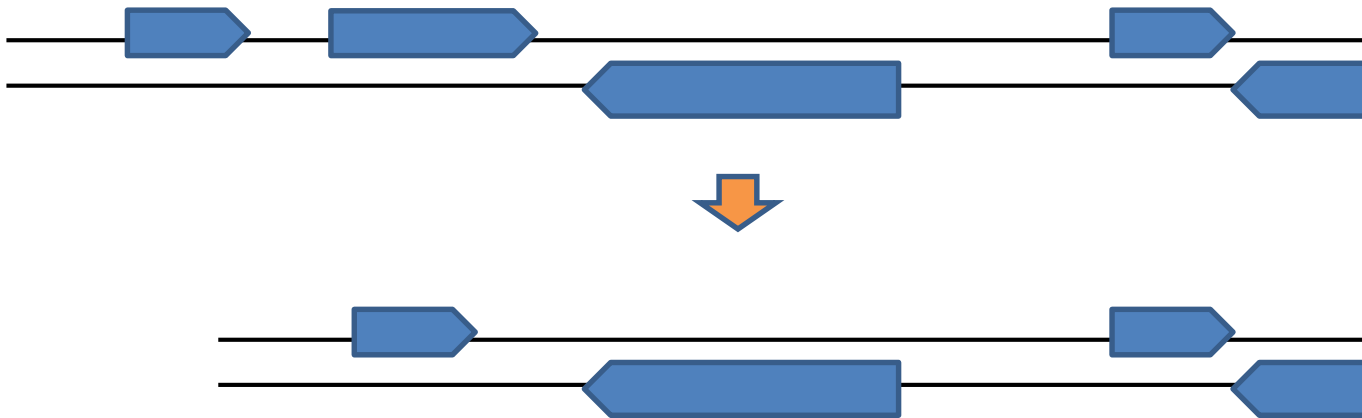
Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**



Knock-out (por afectación sintáctica)

Edición de genomas

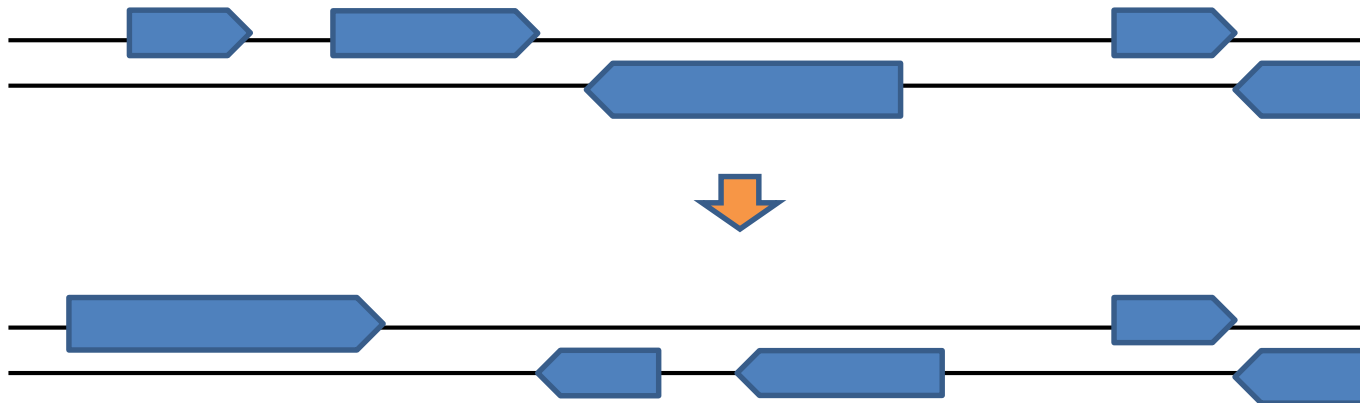
Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**



Knock-out (por delección)

Edición de genomas

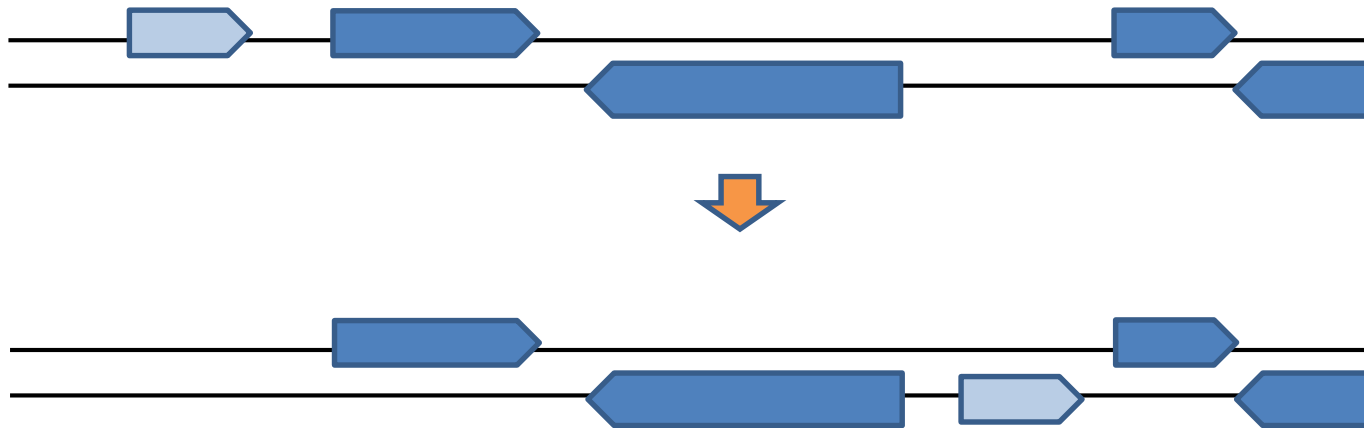
Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**



Cambios estructurales sin ganancia o pérdida de DNA (inversión)

Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un **TEXTO**



Cambios estructurales sin ganancia o pérdida de DNA (traslocación)

Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un
Programa Informático

GENOMA  **Código Fuente**

Un **GENOMA** es una colección de instrucciones (**código fuente**) que definirán las morfo-estructuras de tendrá la biomasa que lo porta, y el conjunto de capacidades y funciones que expresará.

Este **programa** será modulado por **factores ambientales** (INPUTS), a partir de lo cual se generarán las **respuestas biológicas** (OUTPUTS)

Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un
Programa Informático

GENOMA  **Código Fuente**

Así como existe la **Ingeniería de Software**, la **Ingeniería Genética** es la disciplina que **podrá intervenir** en el **código fuente** de los organismos (**GENOMAS**) para cambiar las respuestas biológicas.

Los **GENOMAS naturales** son **Códigos Fuente** programados por procesos de evolución, y en general, pueden considerarse como **Programas modulares** (pueden deconstruirse en subprogramas, o circuitos genéticos).

Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un
Programa Informático

Un **Programa informático modular** puede ser intervenido, desde la *Ingeniería de Software*, en **procesos** denominados:

- **Refactorización** (*reestructuración que altera la estructura interna sin cambiar el comportamiento externo*)
- **Depuración** (*identificación y corrección de errores*)
- **Agregado de nuevos módulos** (*adición de nuevos subprogramas y por ende, de nuevas posibilidades de respuestas*)

Edición de genomas

Un **GENOMA** puede ser considerado como un
Programa Informático

Un **GENOMA** puede ser intervenido, desde la **Ingeniería Genética**, en procesos similares a los de la **Ingeniería de Software**:

- **Refactorización** *(reestructuración que altera la estructura interna sin cambiar el comportamiento externo, como traslocaciones e inversiones; también, eliminación de moviloma parásito)*
- **Depuración** *(identificación y corrección de errores genéticos)*
- **Agregado de nuevos módulos** *(adición de nuevos circuitos genéticos para aportar nuevas posibilidades de morfo-estructuras y/o funciones/capacidades biológicas)*

***¿Para qué se pueden
utilizar las
modificaciones
genómicas sobre materia
viva?***

Edición de genomas

Algunas aplicaciones

- *Para mejorar “la aptitud biológica” de una especie.*
- *Para empeorar “la aptitud biológica” de una especie.*
- *Para producir bioinsumos (biofábricas).*
- *Para estudiar la función génica.*
- *Para hacer correcciones terapéuticas.*

Edición de genomas

Algunas aplicaciones

- *Para mejorar “la aptitud biológica” de una especie.*
- *Para empeorar “la aptitud biológica” de una especie.*
- *Para producir bioinsumos (biofábricas).*
- *Para estudiar la función génica.*
- *Para hacer correcciones terapéuticas.*

Edición de genomas

Algunas aplicaciones: mejorar aptitud



- *Resistencia a herbicidas*
- *Resistencia a virus*
- *Resistencia a insectos fitófagos*
- *Tolerancia al estrés hídrico*
- *Tolerancia a la insolación excesiva*
- *Mejor producción de granos/frutos/hojas*
- *Mejor valor nutricional*
- *Mayor durabilidad de frutos*
- *Mejor sabor, color, textura*

Edición de genomas

Algunas aplicaciones: mejorar aptitud



- *Mejor producción de leche*
- *Leche con más nutrientes y menos conflictos digestivos*
- *Mejor producción de carne*
- *Ganado sin cuernos*
- *Mejor seda*



Edición de genomas

Algunas aplicaciones

- *Para mejorar “la aptitud biológica” de una especie.*
- *Para empeorar “la aptitud biológica” de una especie.*
- *Para producir bioinsumos (biofábricas).*
- *Para estudiar la función génica.*
- *Para hacer correcciones terapéuticas.*

Edición de genomas

Algunas aplicaciones: empeorar aptitud



- *Conflicto sexual*
- *Pérdida de fertilidad*
- *Cambio de hábitos*
- *Afectación en el desarrollo*

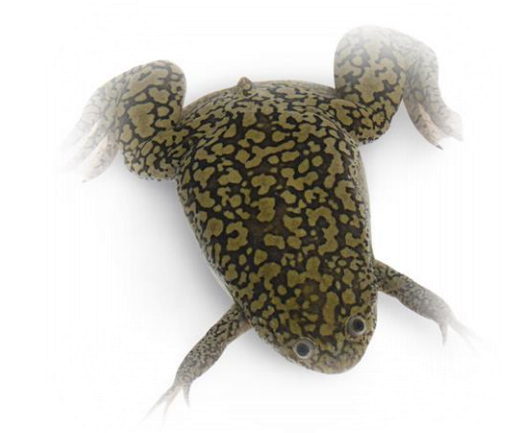


Edición de genomas

Algunas aplicaciones: empeorar aptitud



- *Afectación del genoma de organismos modelo para “mimetizar” patologías humanas*



Edición de genomas

Algunas aplicaciones

- *Para mejorar “la aptitud biológica” de una especie.*
- *Para empeorar “la aptitud biológica” de una especie.*
- *Para **producir bioinsumos** (biofábricas).*
- *Para estudiar la función génica.*
- *Para hacer correcciones terapéuticas.*

Edición de genomas

Algunas aplicaciones: producir



- *Producción de metabolitos útiles (alcoholes y otros biocombustibles, bioplásticos, etc,)*
- *Producción de proteínas terapéuticas*
- *Producción de vacunas*
- *Producción de enzimas para la industria y servicios*



Edición de genomas

Algunas aplicaciones

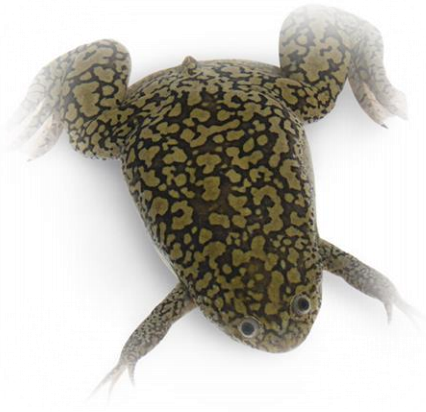
- *Para mejorar “la aptitud biológica” de una especie.*
- *Para empeorar “la aptitud biológica” de una especie.*
- *Para producir bioinsumos (biofábricas).*
- *Para **estudiar la función génica.***
- *Para hacer correcciones terapéuticas.*

Edición de genomas

Algunas aplicaciones: estudios básicos



- *Afectación del genoma de organismos modelo para establecer asociaciones del tipo GENOTIPO-FENOTIPO*



Edición de genomas

Algunas aplicaciones

- *Para mejorar “la aptitud biológica” de una especie.*
- *Para empeorar “la aptitud biológica” de una especie.*
- *Para producir bioinsumos (biofábricas).*
- *Para estudiar la función génica.*
- ***Para hacer correcciones terapéuticas.***

Edición de genomas

Algunas aplicaciones: terapia

- *Cambiar el genoma de células humanas adultas para corregir una patología.*
- *Cambiar el genoma de cigotos humanos para evitar el desarrollo de patologías*



Edición de genomas

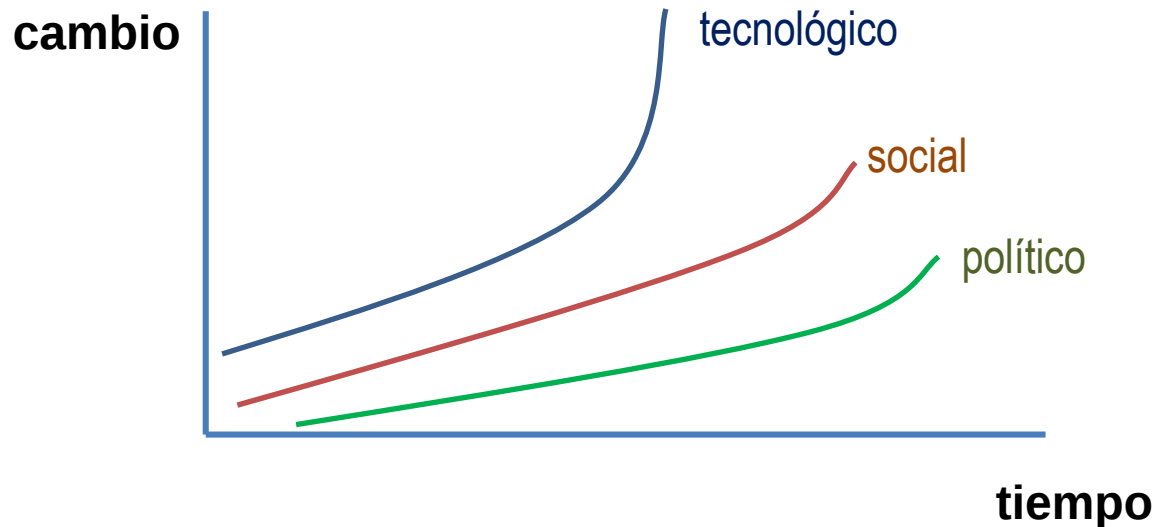
Algunas aplicaciones

Todas las aplicaciones anteriores se encuentran estrictamente reguladas por los estados, existiendo agencias regulatorias específicas

Edición de genomas

Algunas aplicaciones

Todas las aplicaciones anteriores se encuentran estrictamente reguladas por los estados, existiendo agencias regulatorias específicas



***¿En cuáles fenómenos
naturales se basan los
procesos de edición
genómica?***

Edición de genomas

Procesos naturales

- En la **naturaleza**, los **replicones genómicos** suelen padecer **injurias** de diversos tipos, que estimulan mecanismos de reparación.
- Entre estas injurias destaca la introducción de **Double Strand Breaks (DSB)** en el DNA.
- Entre los principales **factores** asociados a la **producción** de **DSB** se encuentran:
 - *los **ROS** (Reactive Oxygen Species)*
 - *la acción de **Topoisomerasas del tipo II***
 - *la **radiación ionizante** del cosmos*
 - *los **procesos de deshidratación***

Edición de genomas

Procesos naturales

Respuestas biológicas ante **DSBs**

NHEJ

(non-homologous end joining)

Actividad DNA ligasa

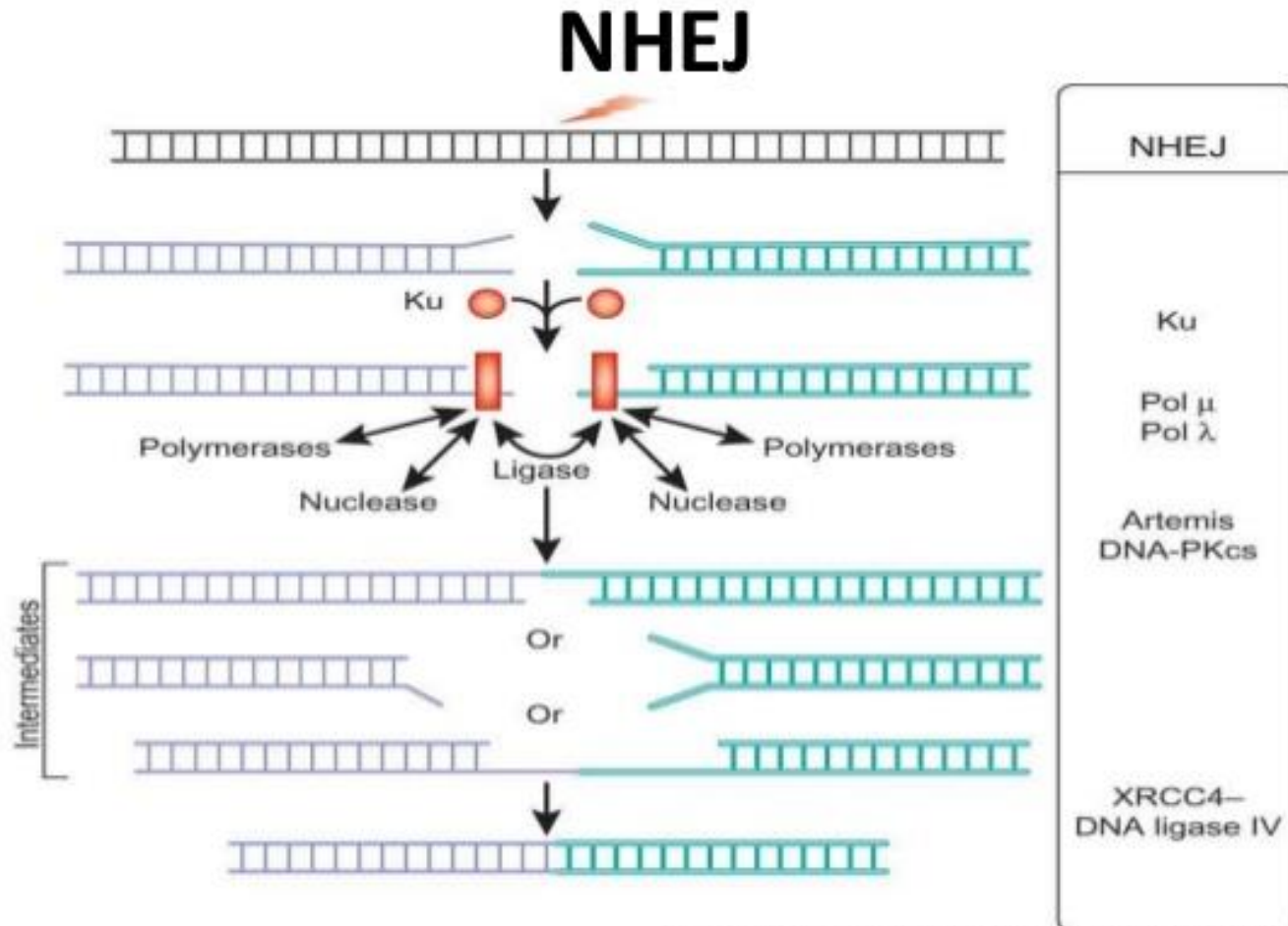
HR

(homologous recombination)

Síntesis dependiente de
invasión de cadena
SDSA (*synthesis-dependent strand-
annealing*)

Edición de genomas

Procesos naturales



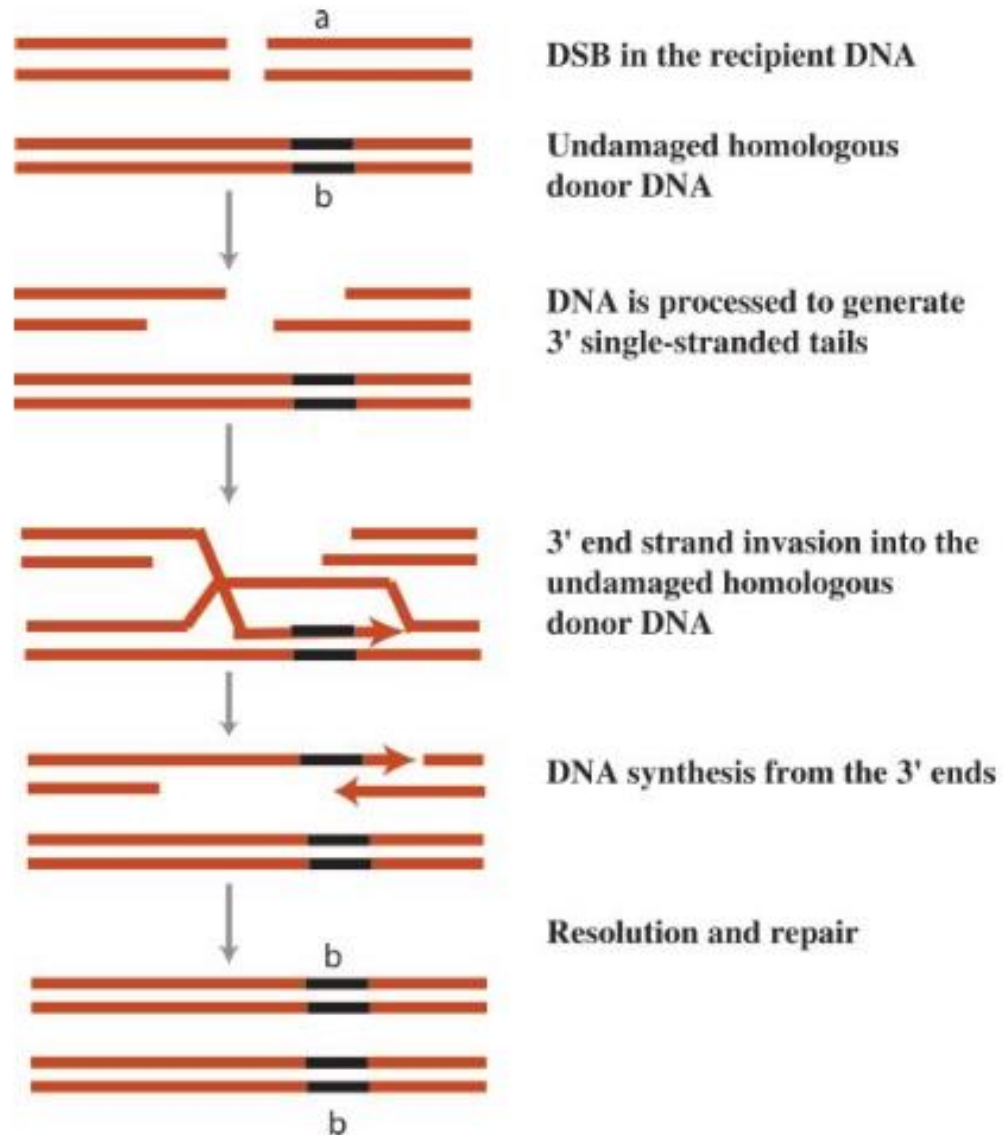
NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations

•Michael R Lieber *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 393–395 (2010)

Edición de genomas

Procesos naturales

SDSA



Edición de genomas

Procesos naturales

- En la **naturaleza**, los **replicones genómicos** suelen también padecer **cambios** por **intervención del moviloma**.
- Por ejemplo, muchos **ácidos nucleicos virales** y algunos **plásmidos** tienen la **capacidad** de **insertarse** en los **replicones genómicos** de los **organismos**.
- Por otro lado, los **transposones**, ya sea por mecanismos de propagación o movilización, logran **cambiar** las **secuencias genómicas**.
- En todos estos **procesos naturales** intervienen **maquinarias** proteicas del tipo **integrasa**, que catalizan **procesos de recombinación** de secuencias del tipo **sitio específico**.

***¿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 las **actividades de reparación del DNA endógenas** de las células.
- Para ello, se han **desarrollado** diversas **aproximaciones** para **estimular DSBs** de manera **locus específica**:

- **Nucleasas Zinc Finger**

- **TALEN**

- **CRISPR/Cas9**

Mutagénesis de genomas

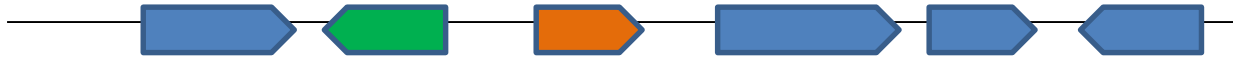
Aproximaciones dirigidas

- En general, desde el inicio de este campo tecnológico se emplea a la **Recombinación Homóloga** como el mejor procedimiento para **insertar nuevas secuencias** en un **genoma**, en un **sitio específico**.
- 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 si no se cuenta con un **DSB** previo en el **locus** involucrado (a veces, 1 en 1.000.000). **Es por esto que se han desarrollado Nucleasas de secuencia específica**.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga sin DSB**

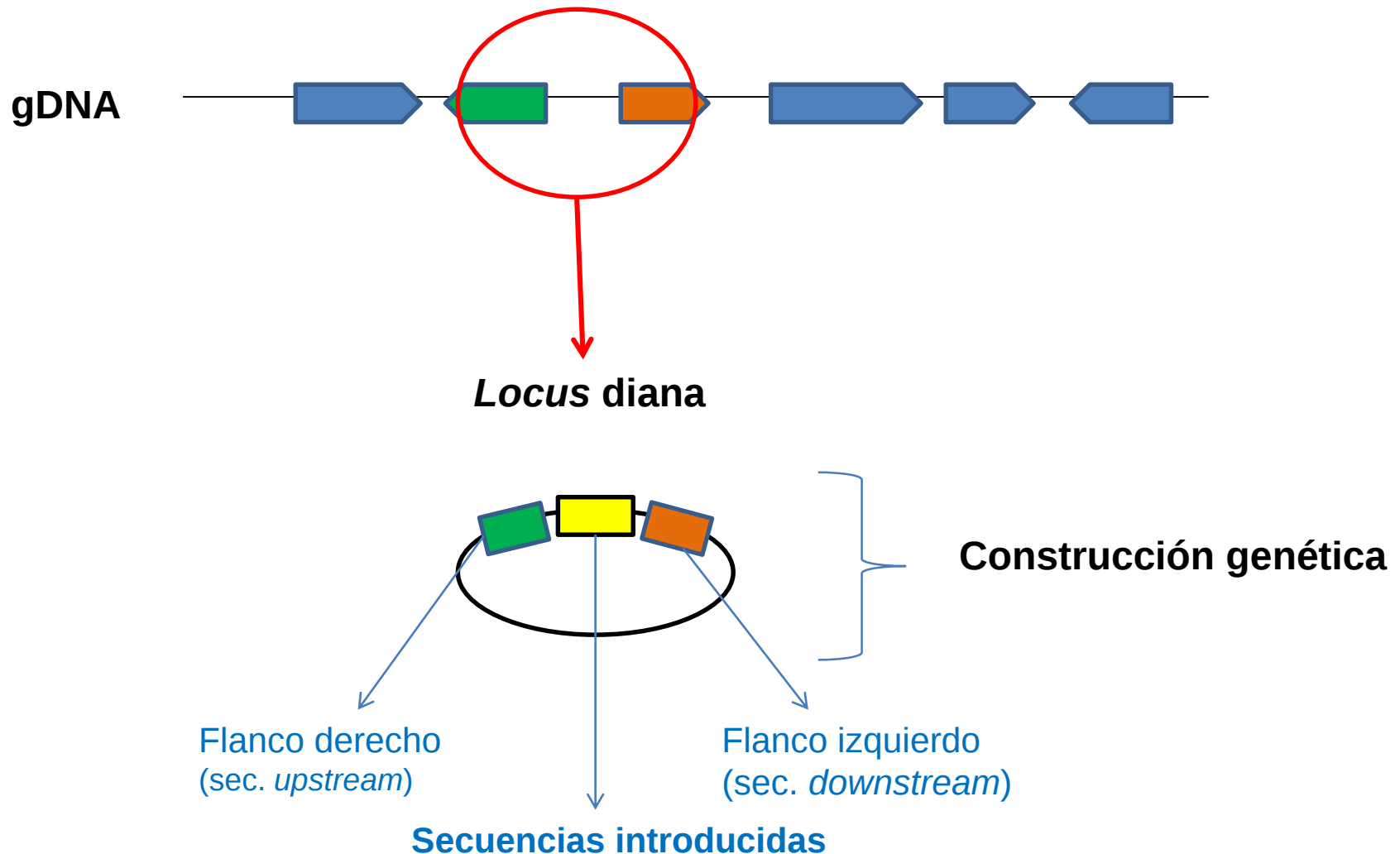
gDNA



Objetivo 1: introducir secuencias en el genoma

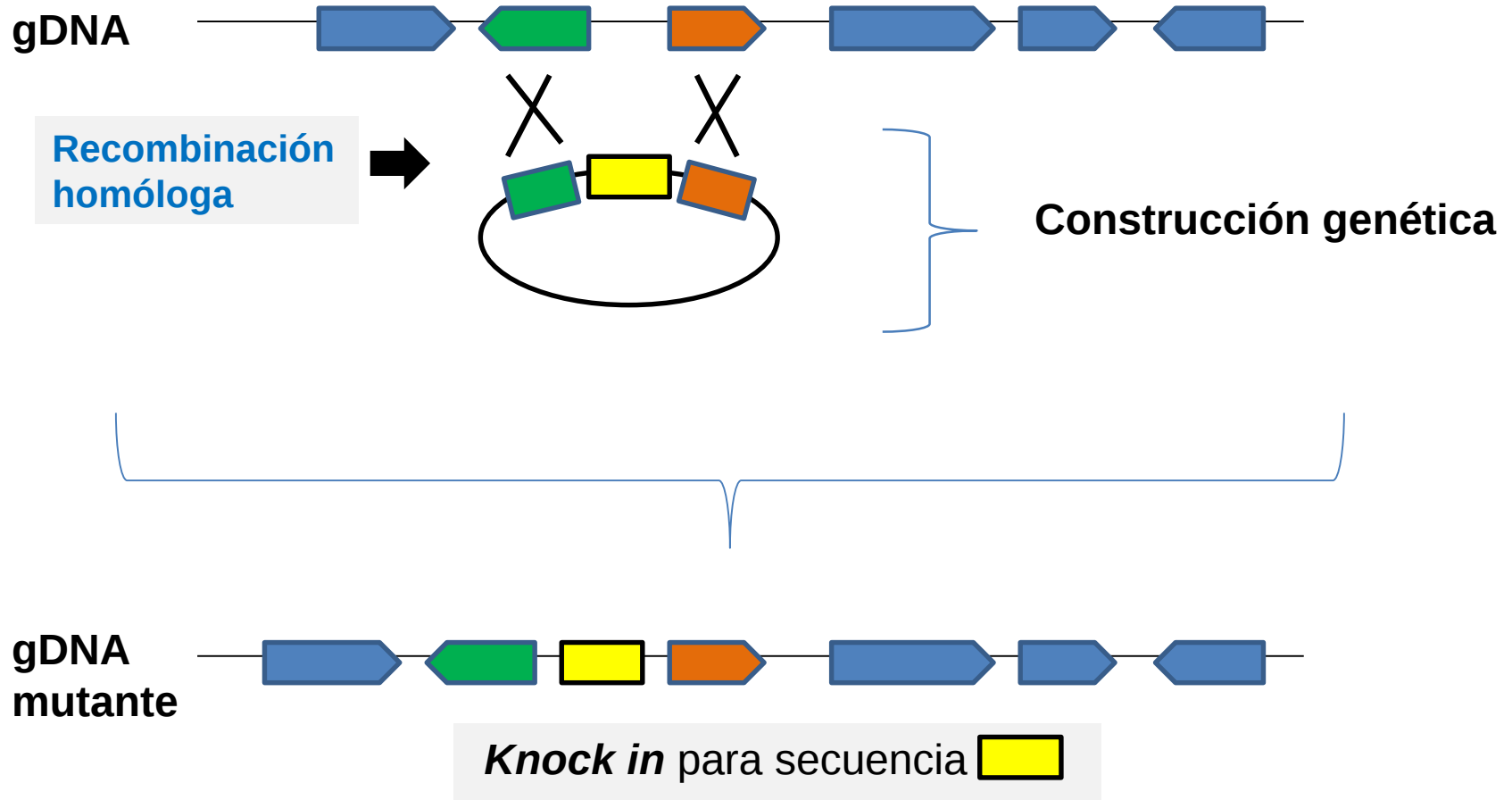
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga sin DSB**



Mutagénesis de genomas

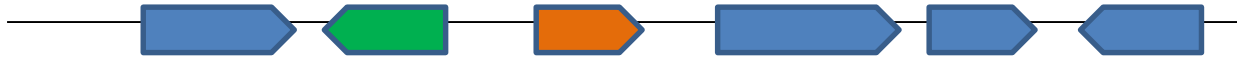
Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga sin DSB**



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga sin DSB**

gDNA

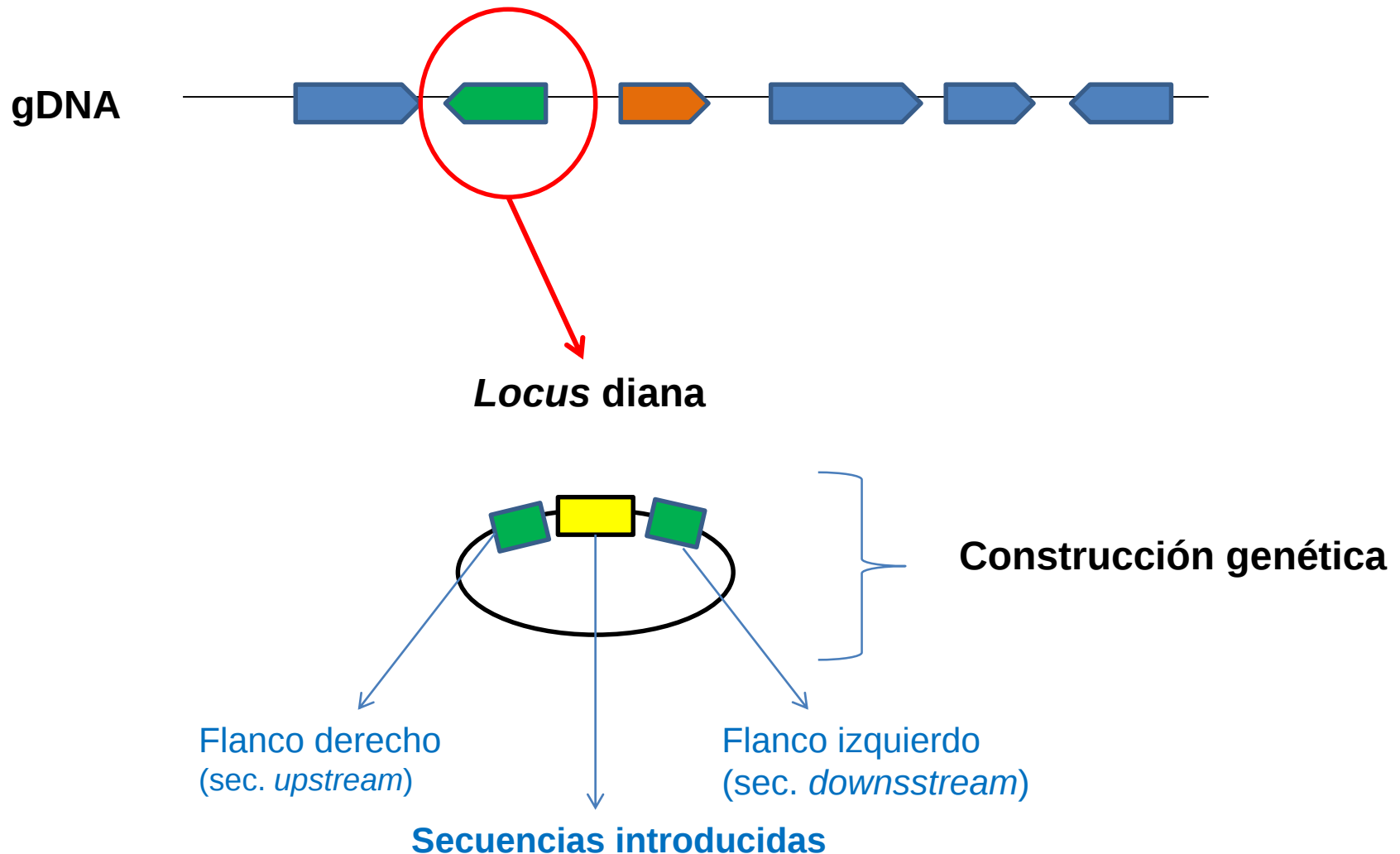


Objetivo 2: Afectar el gen



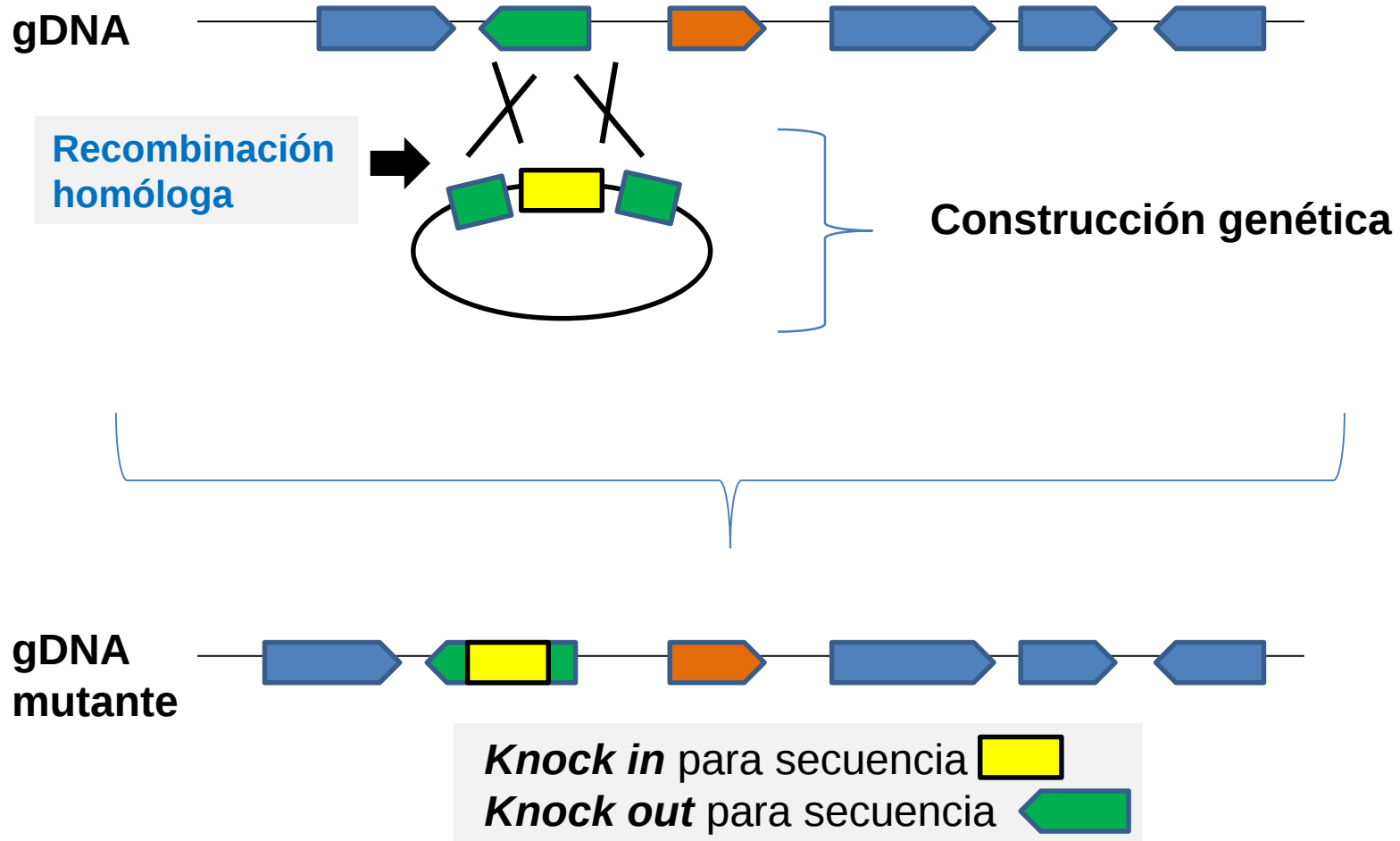
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga sin DSB**



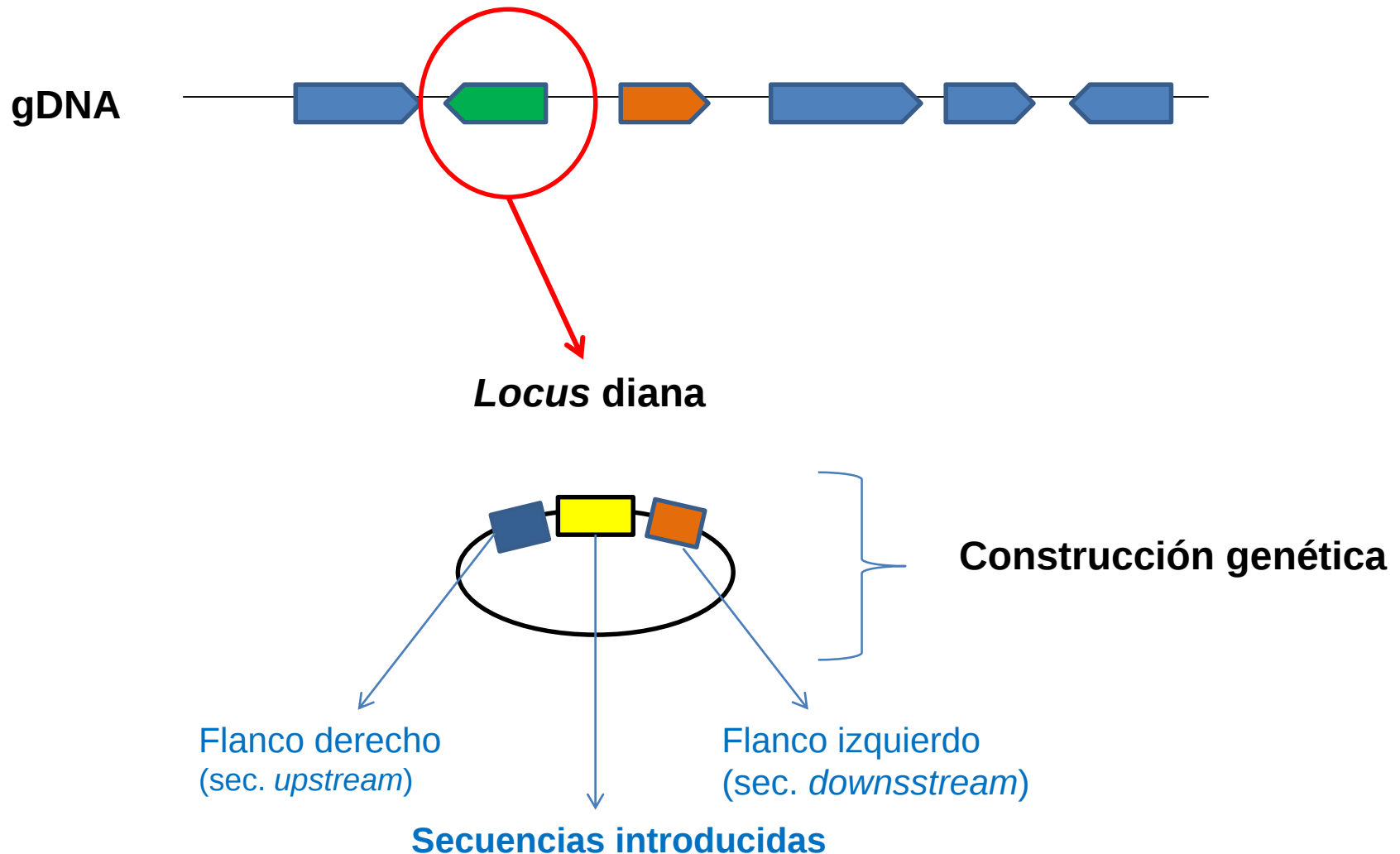
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga sin DSB**



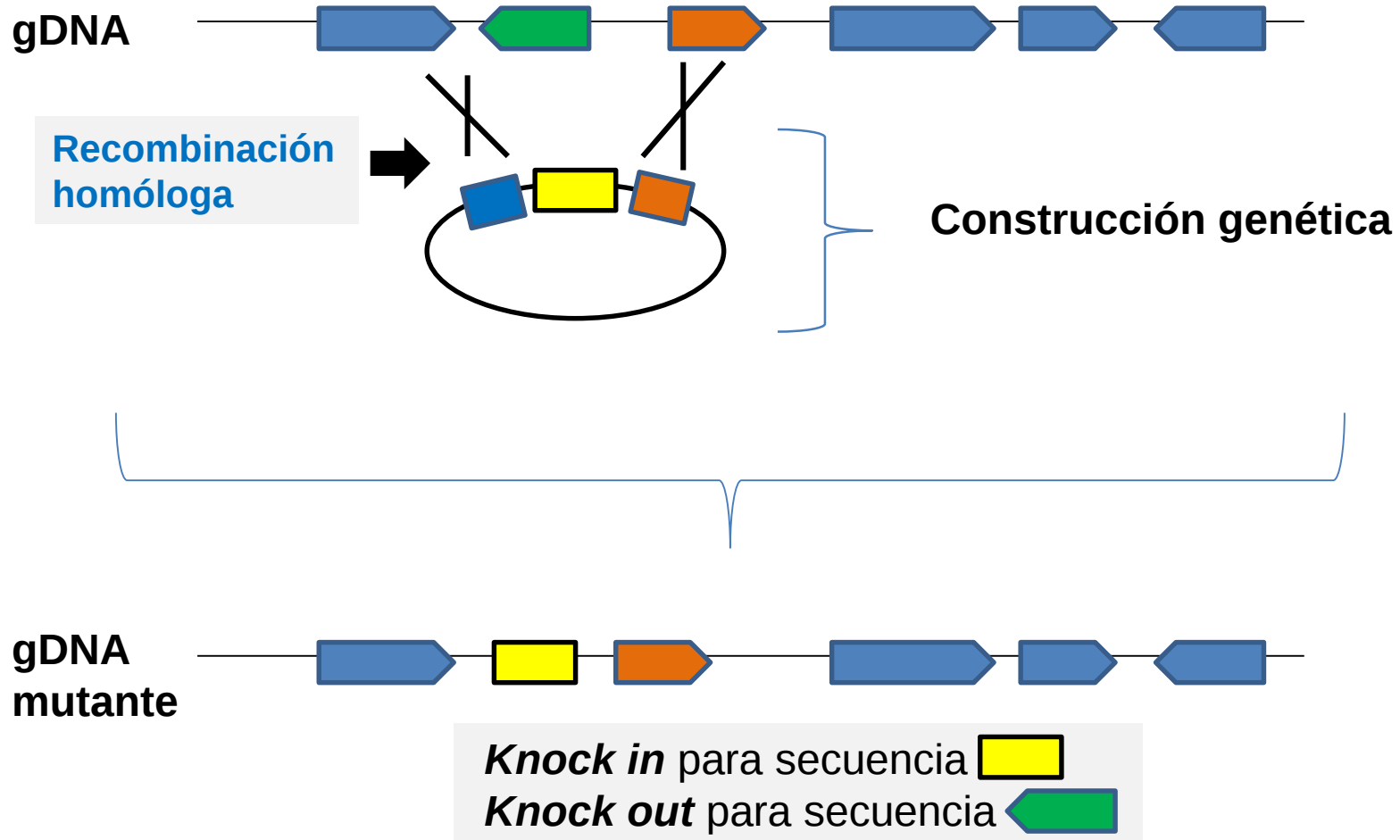
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga sin DSB**



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Recombinación homóloga sin DSB**



***¿Cuáles son los
procedimientos para realizar
una mutagénesis genómica
dirigida, estimulando con un
DSB?***

Nucleasas Zinc Finger

Mutagénesis de genomas

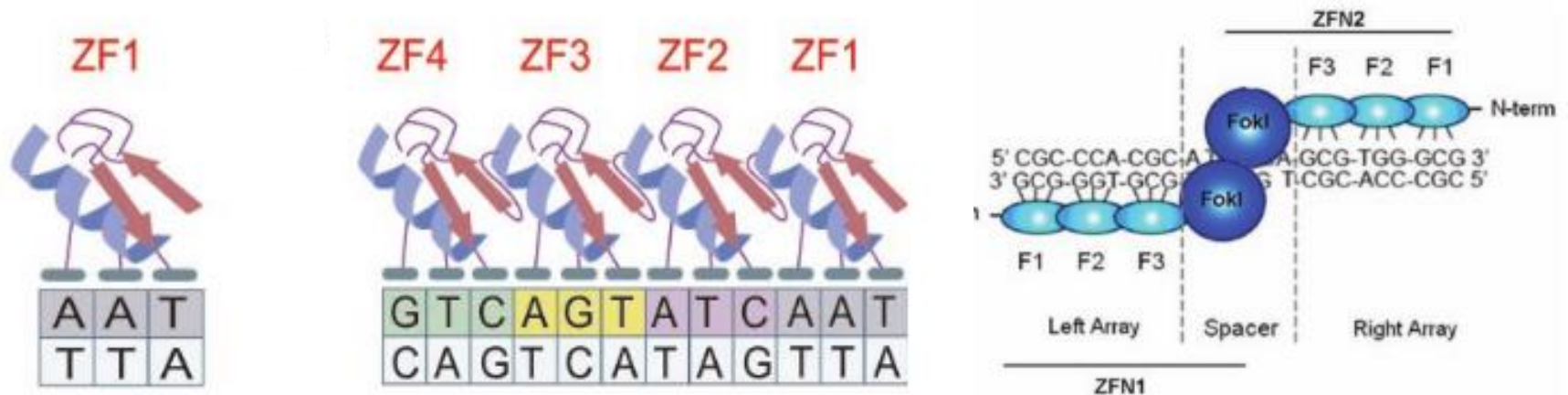
Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**

- 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***.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**

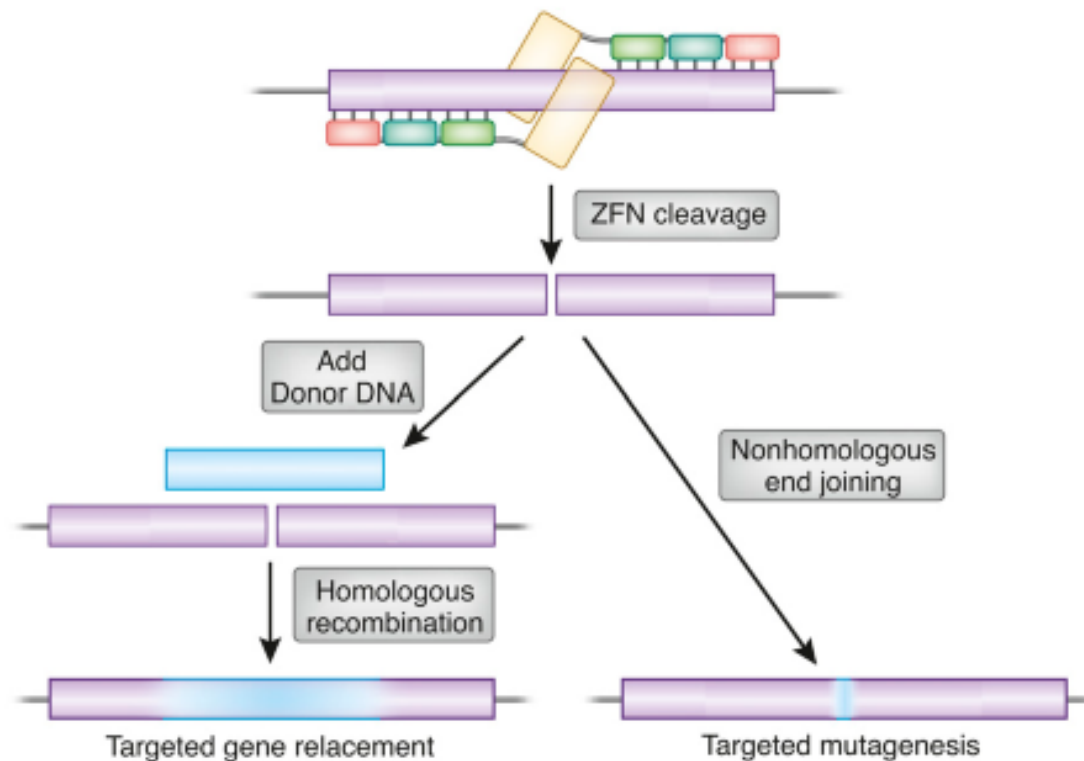
Las **nucleasas Zinc Finger** son proteínas generadas *ad hoc* con **motivos de unión específica** a una secuencia y con otro motivo con actividad **endonucleasa**



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**

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



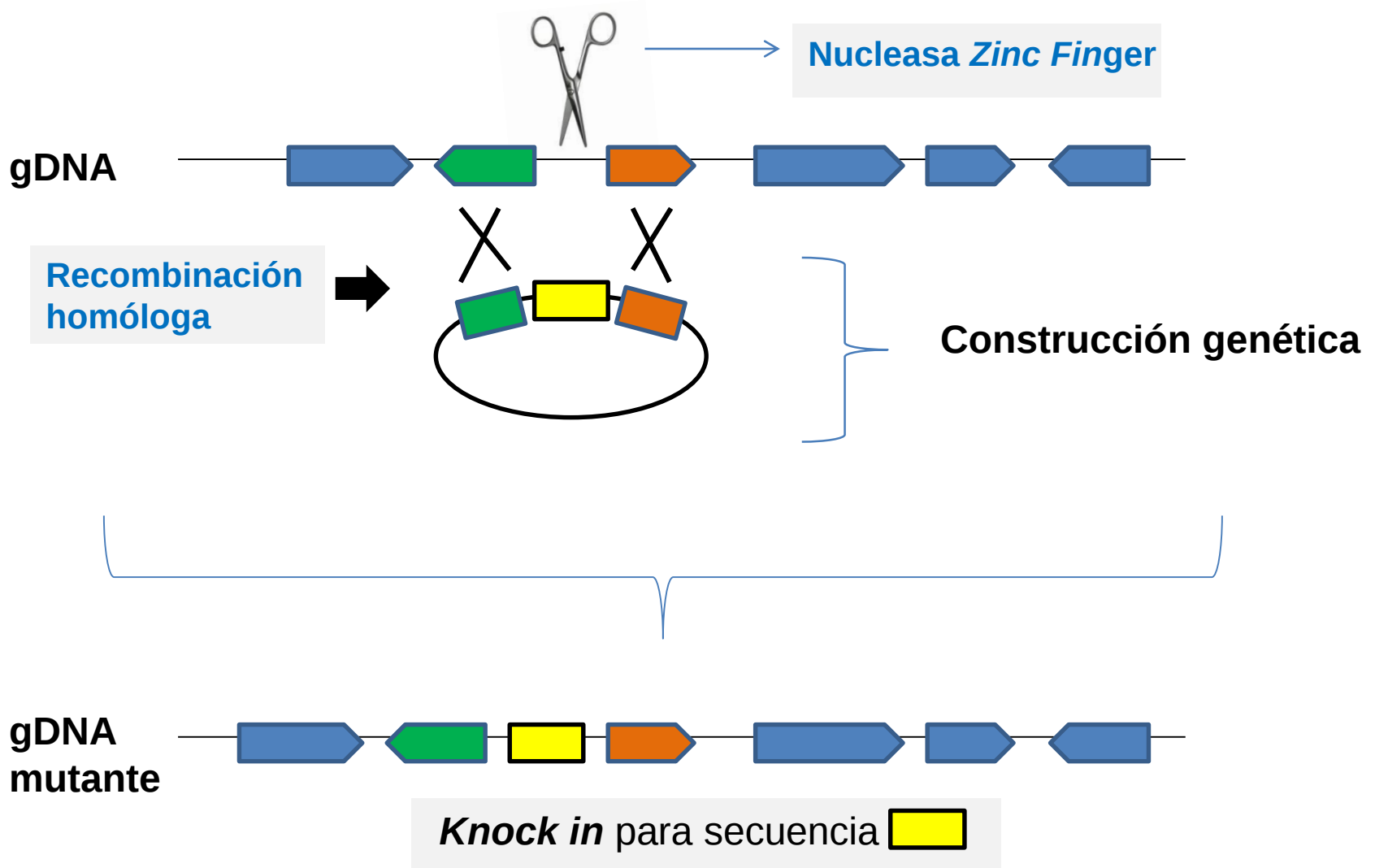
Mutagénesis de genomas

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**.

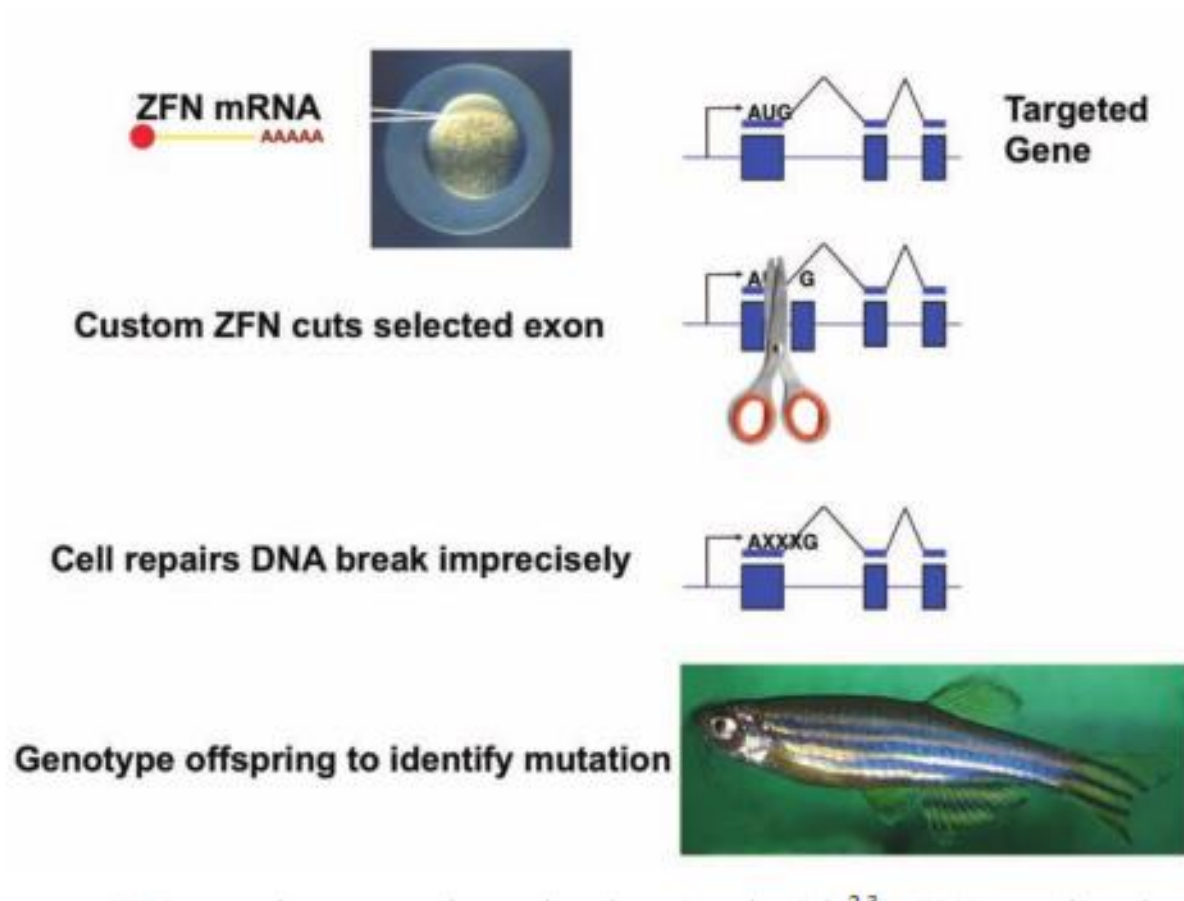
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**



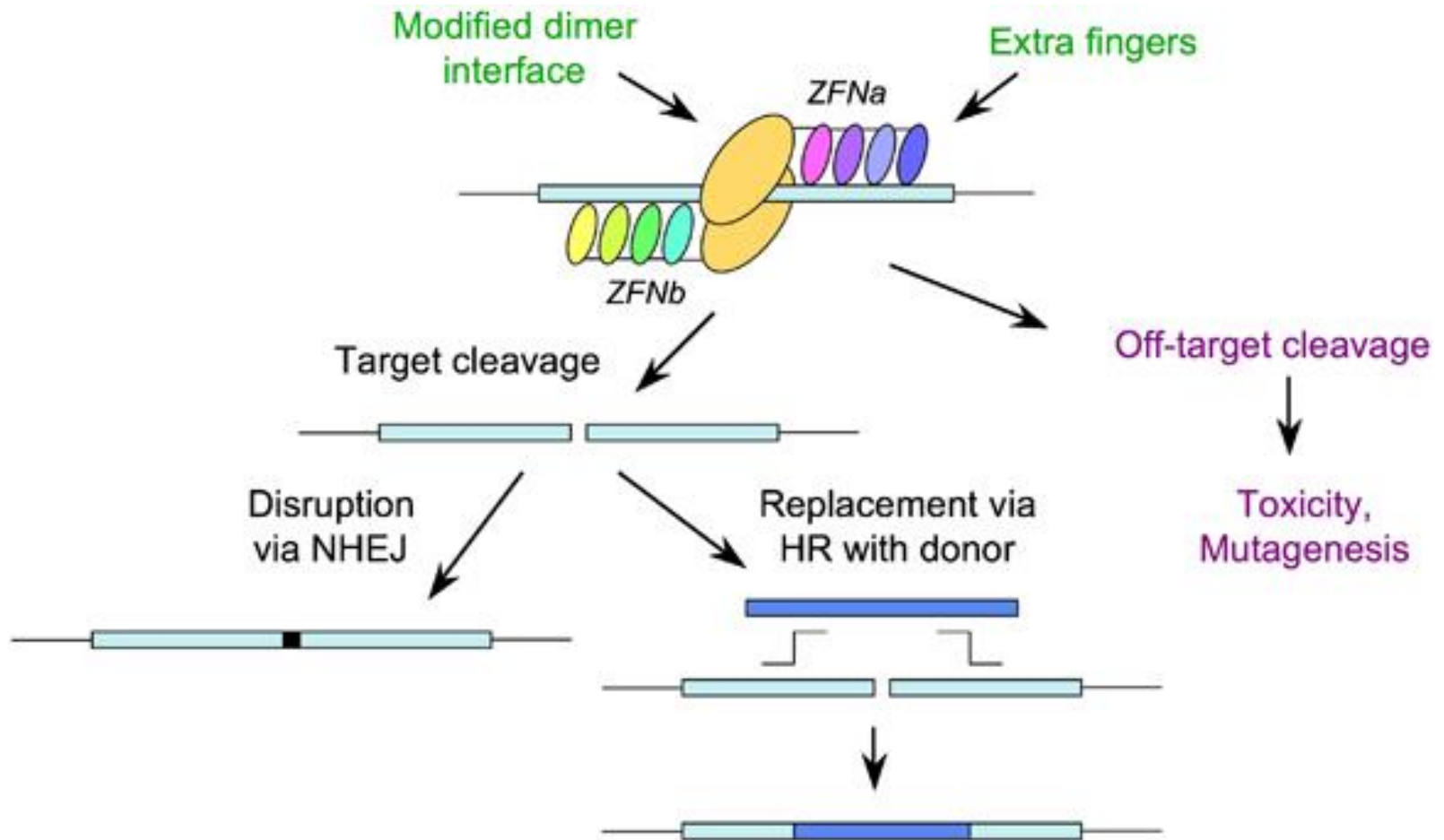
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **Nucleasas Zinc Finger**



***¿Cuáles son los
procedimientos para realizar
una mutagénesis genómica
dirigida, estimulando con un
DSB?***

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.

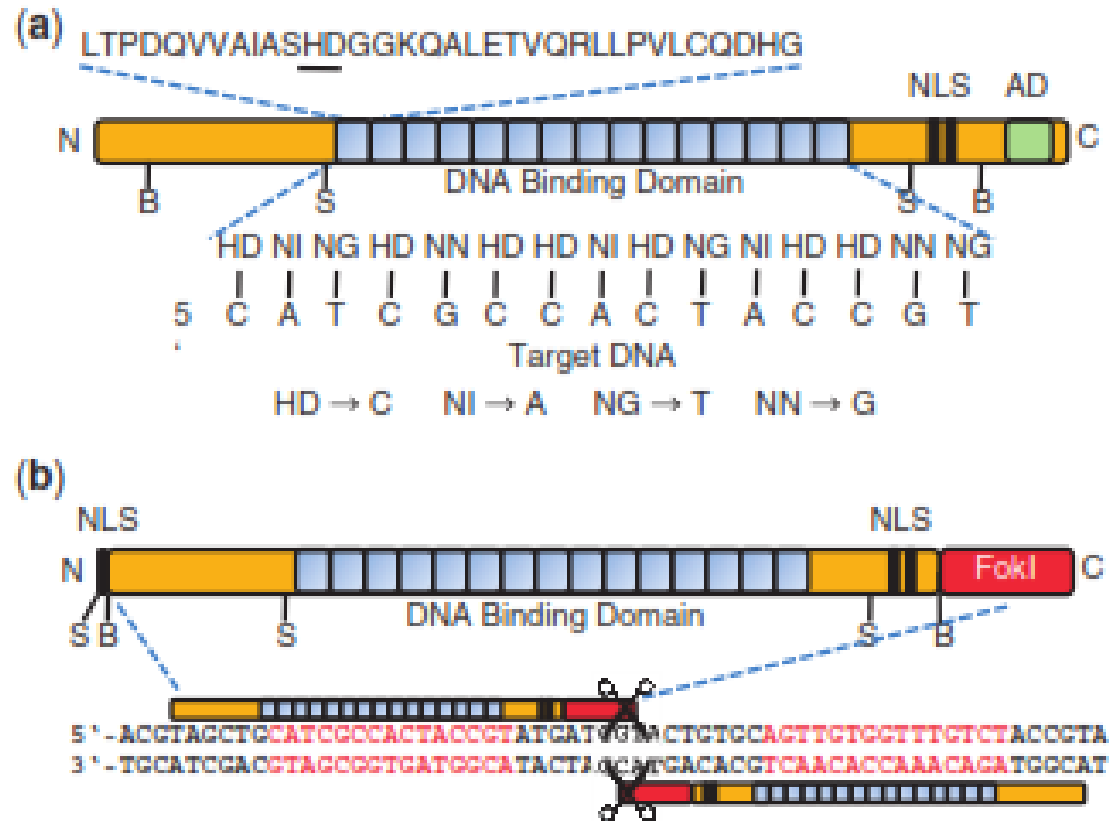
Mutagénesis de genomas

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.

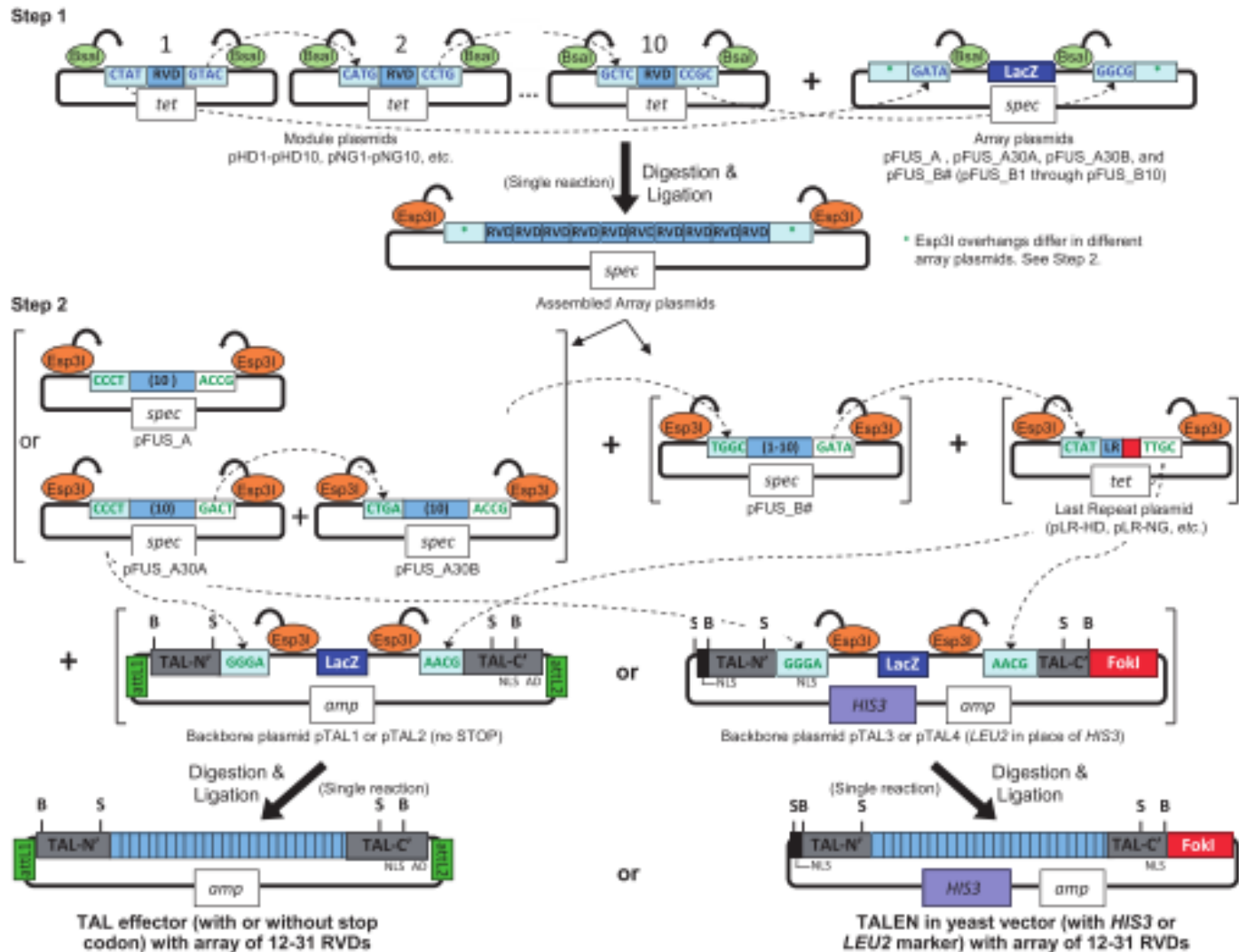
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **TALEN**



Mutagénesis de genomas

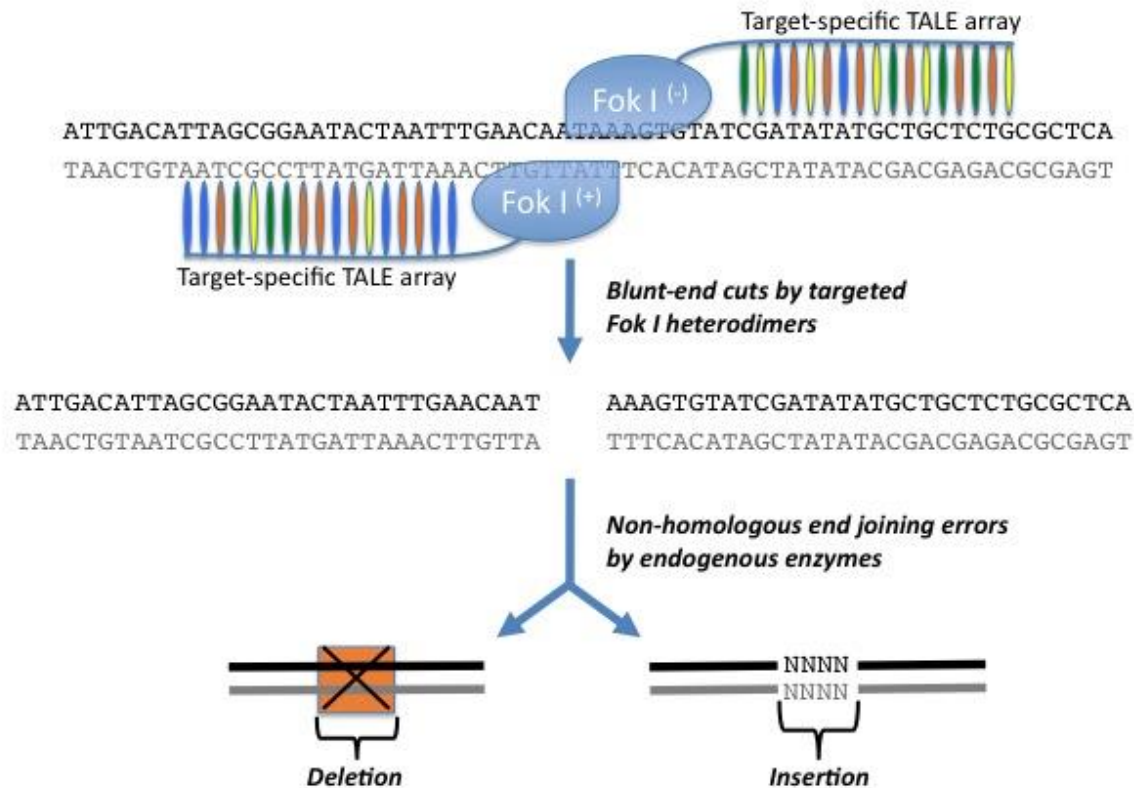
Aproximaciones dirigidas: **TALEN**



Sistema Golden Gate para generar proteínas TALEN

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: TALEN



***¿Cuáles son los
procedimientos para realizar
una mutagénesis genómica
dirigida, estimulando con un
DSB?***

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.

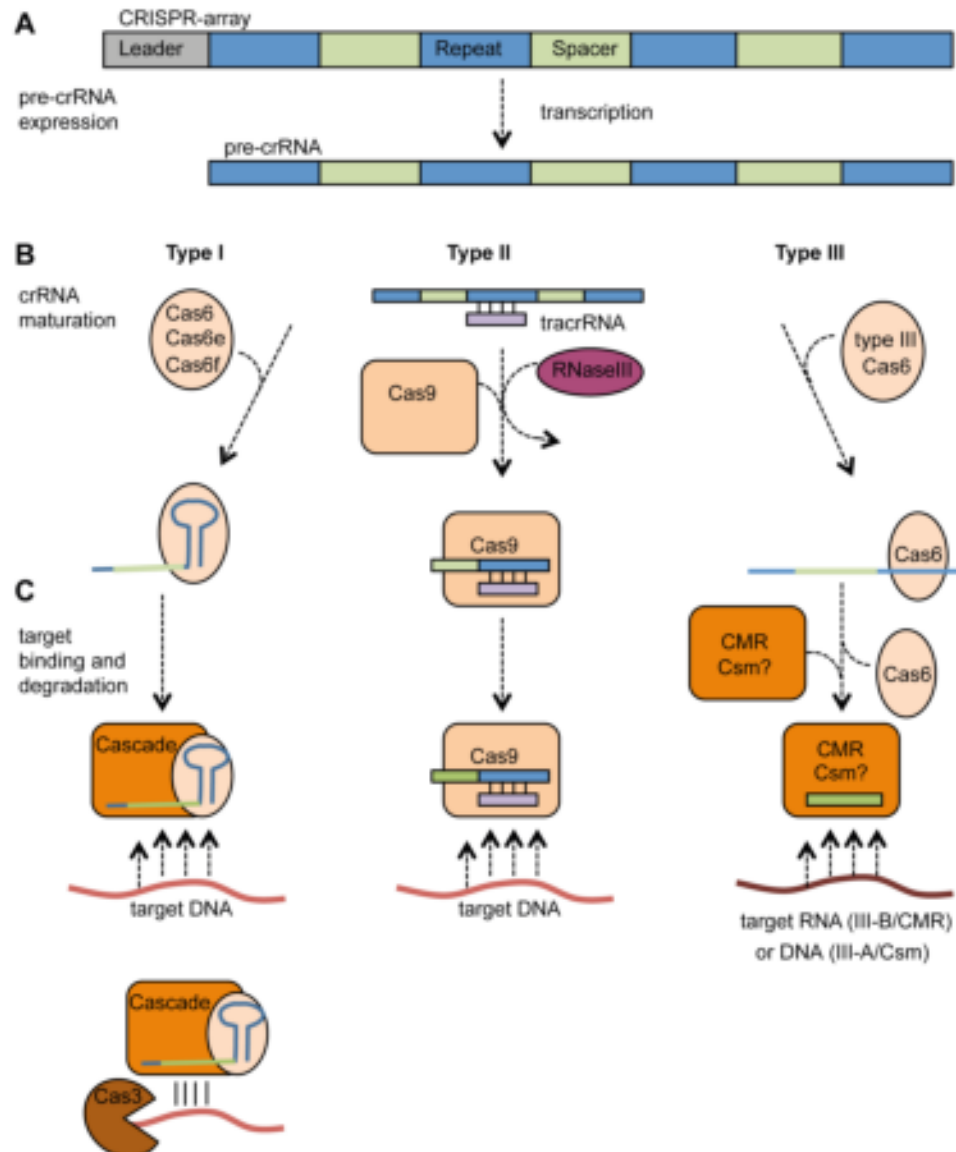
Mutagénesis de genomas

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

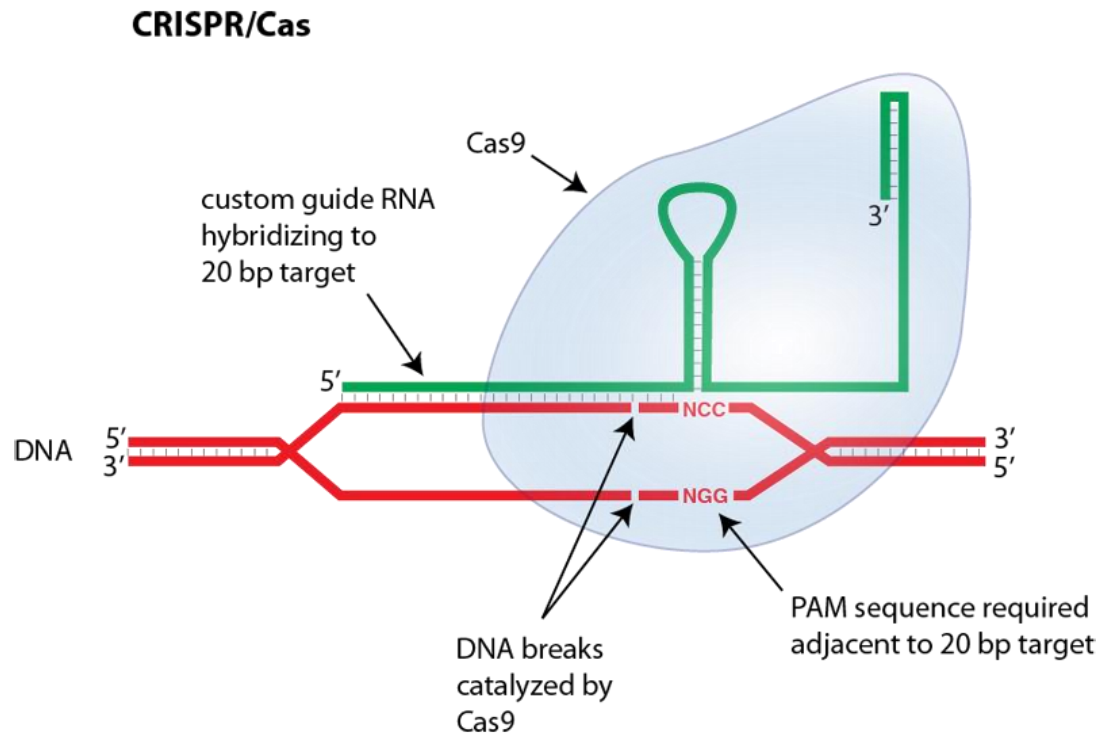
Aproximaciones dirigidas: CRISPR/Cas9



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: CRISPR/Cas9

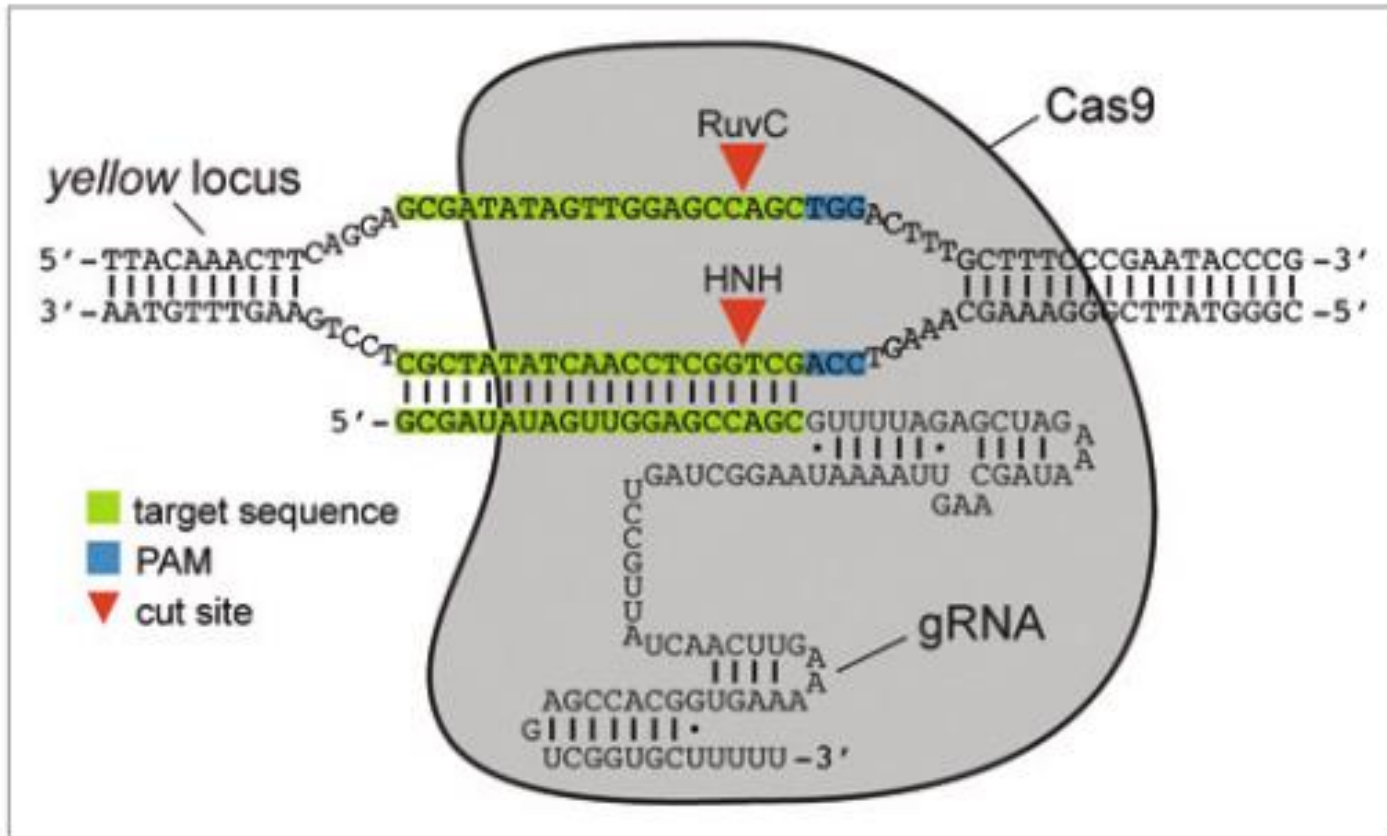
- El sistema **CRISPR/Cas9** requiere del **diseño del gRNA** conteniendo unos **20 nt** propios del **DNA diana**, los cuales tienen que estar **upstream** a un trinucleótido **NGG** (secuencia PAM).
- La **proteína Cas9** presenta **dos dominios nucleasa** (HNH y RuvC-like) que se encargarán de hidrolizar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



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: CRISPR/Cas9

Ejemplo de una aplicación...



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **CRISPR/Cas9**

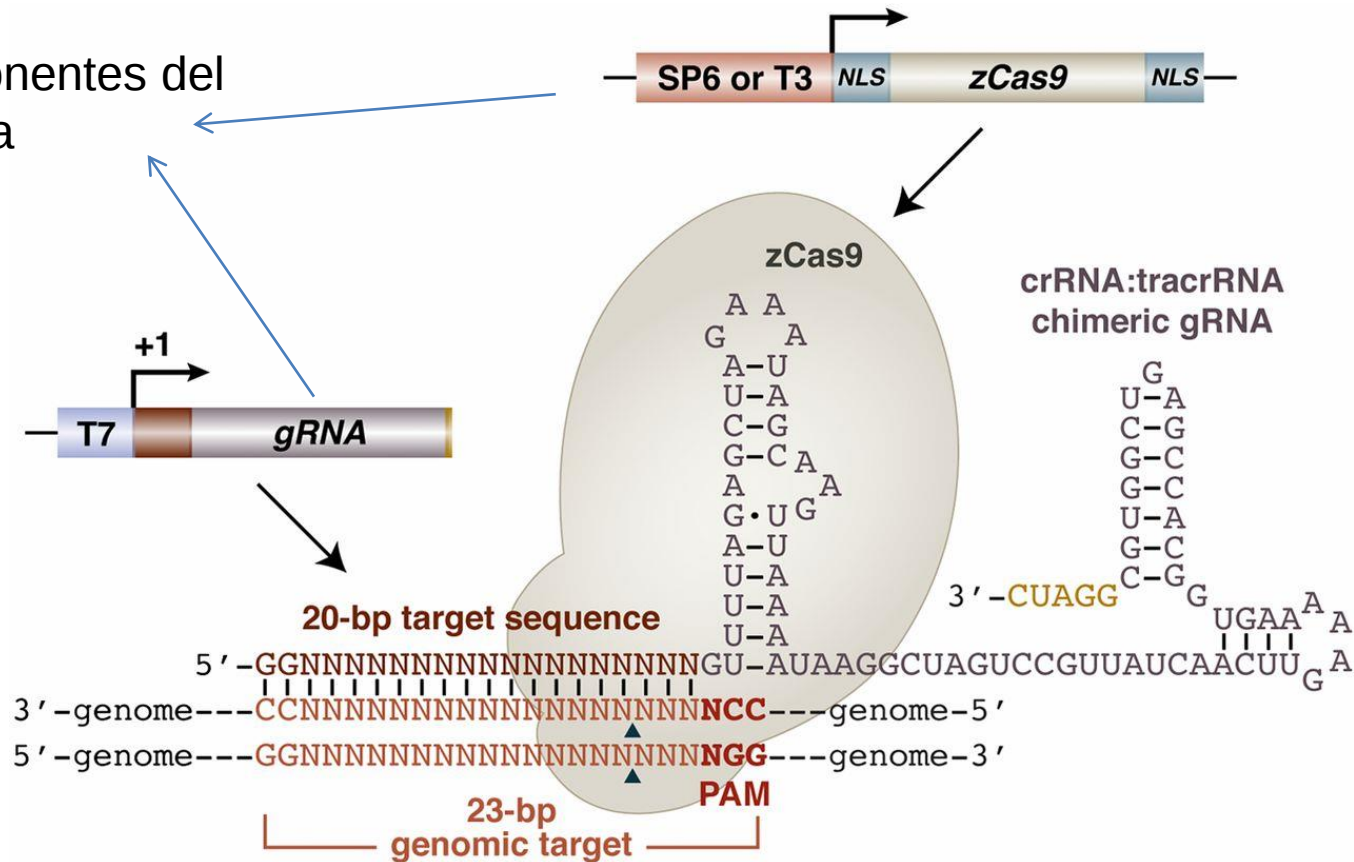
- Existen **software** que colaboran en el **diseño de los gRNA** (por ejemplo, <http://www.e-crisp.org/E-CRISP/index.html>)



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: **CRISPR/Cas9**

Componentes del sistema



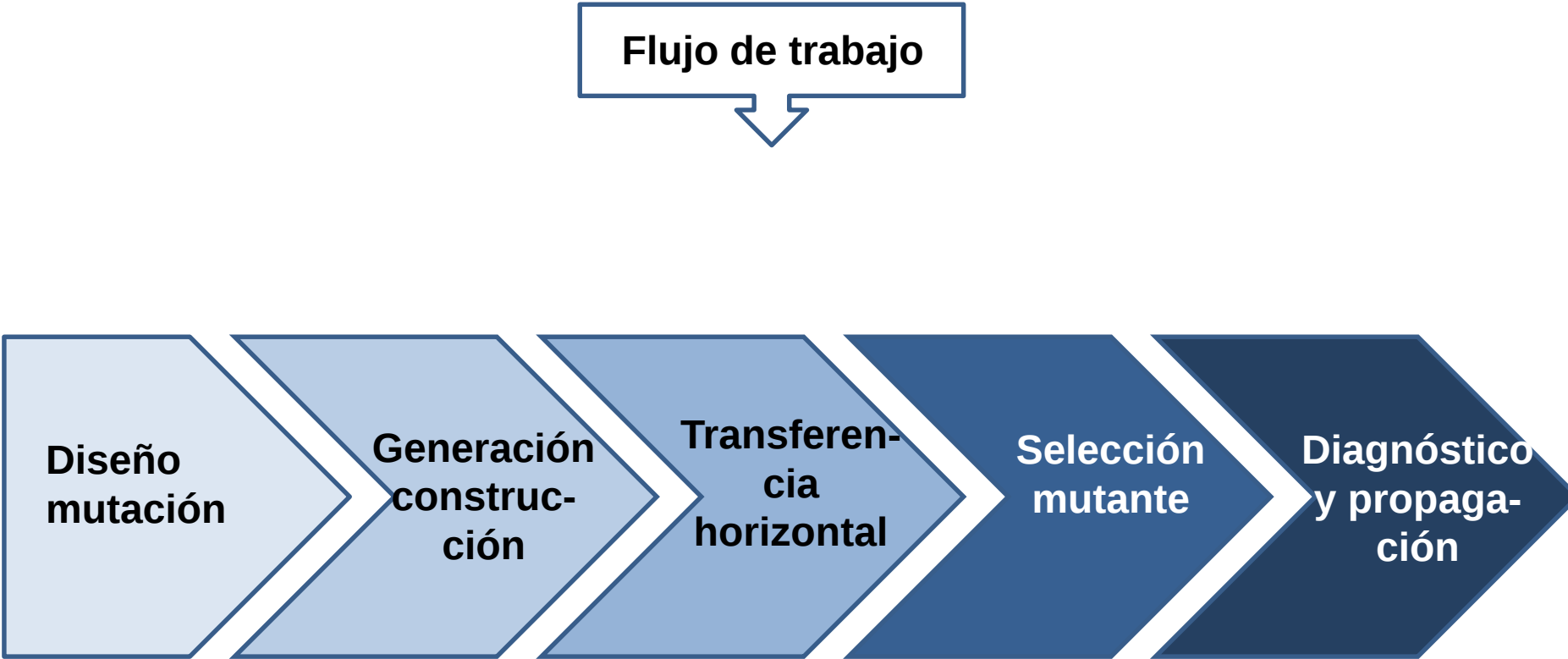
El sistema **CRIPR/Cas9** es hasta el momento el **más simple y eficiente método** para estimular **mutaciones NHEJ**, y/o para **incrementar la eficiencia** de procedimientos de incorporación de transgenes mediante **recombinación homóloga**.

***¿Cuál es el flujo de trabajo
para realizar una edición
genómica dirigida en un
organismo?***

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Flujo de trabajo



```
graph TD; A[Flujo de trabajo] --> B[Diseño mutación]; B --> C[Generación construcción]; C --> D[Transferencia horizontal]; D --> E[Selección mutante]; E --> F[Diagnóstico y propagación];
```

**Diseño
mutación**

**Generación
construc-
ción**

**Transferen-
cia
horizontal**

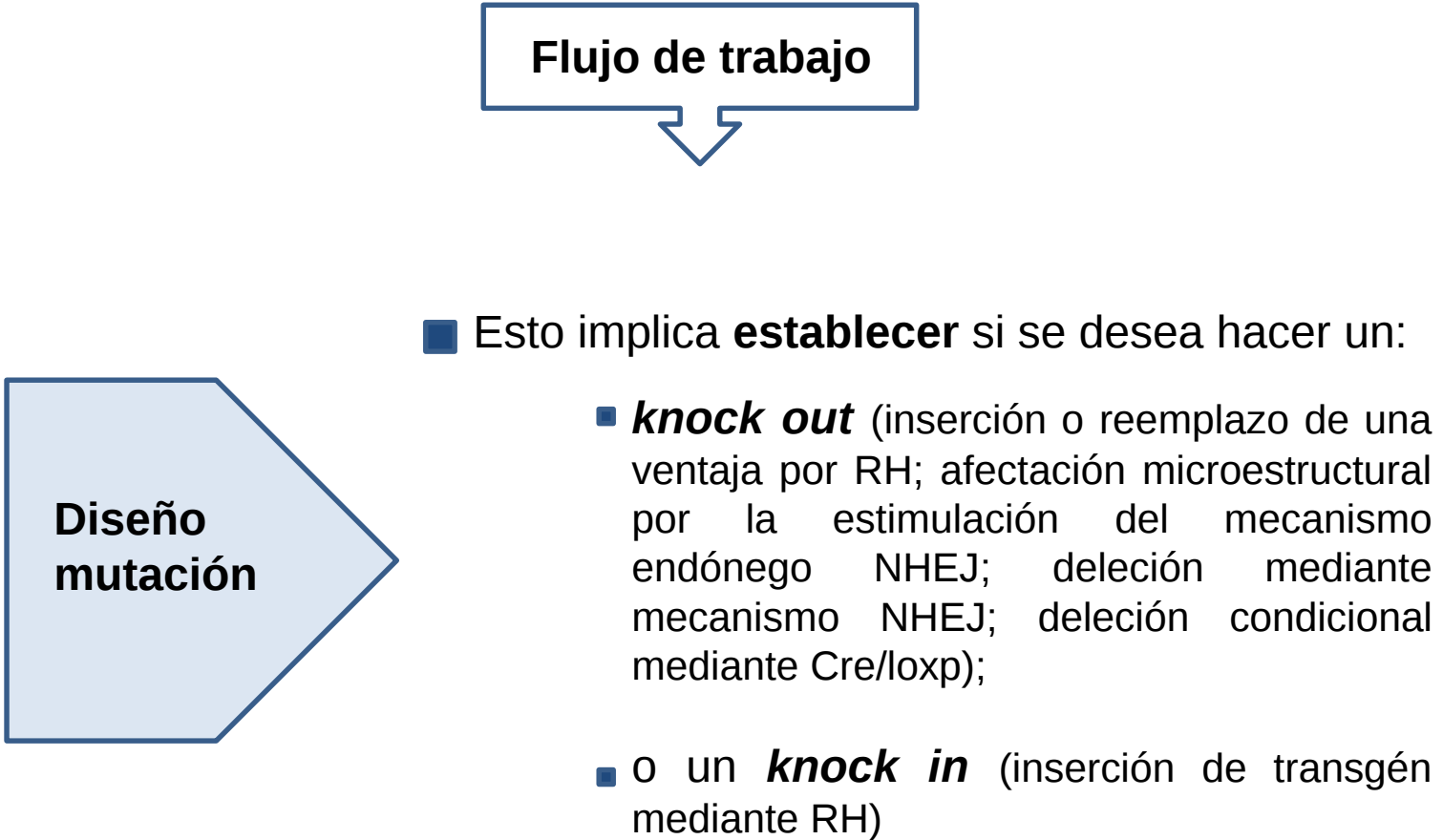
**Selección
mutante**

**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

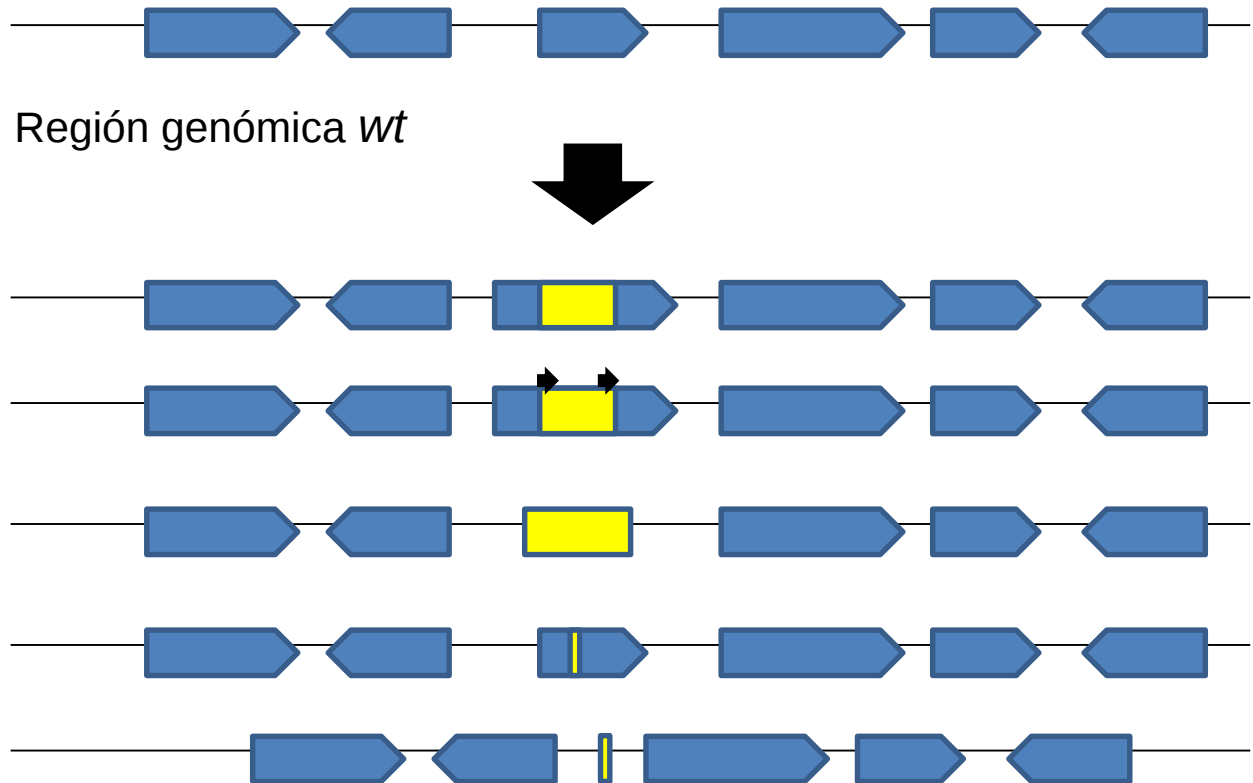


➡ *loxp*

 *ventaja*

Knock out

Región genómica *wt*



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

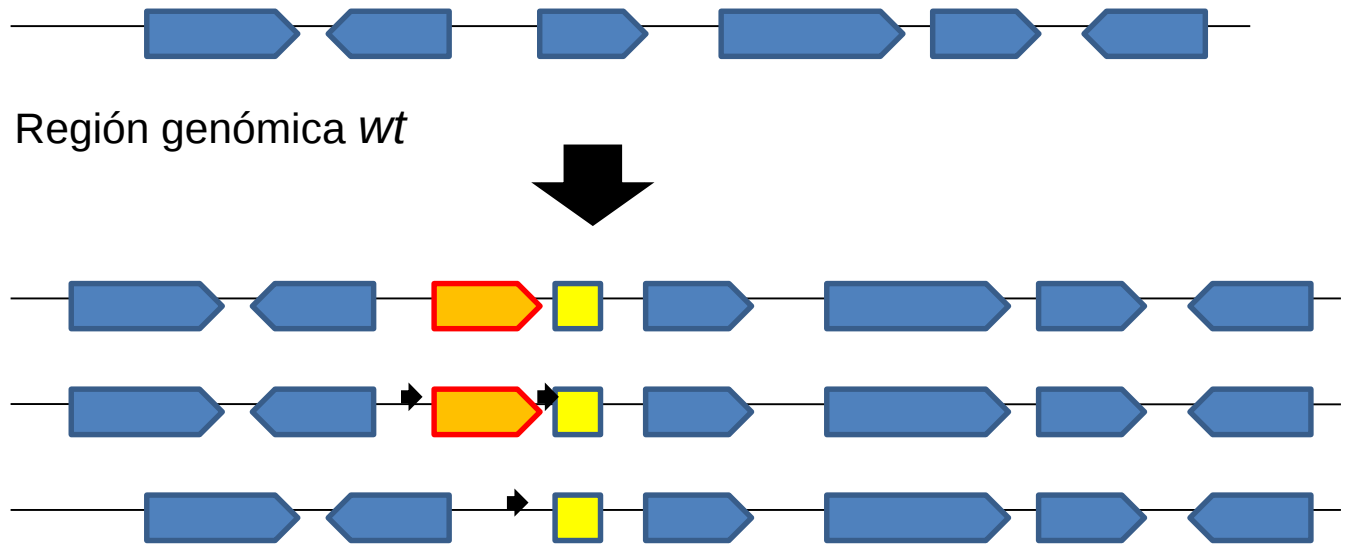


➡ *loxp*

 *ventaja*

 *transgen*

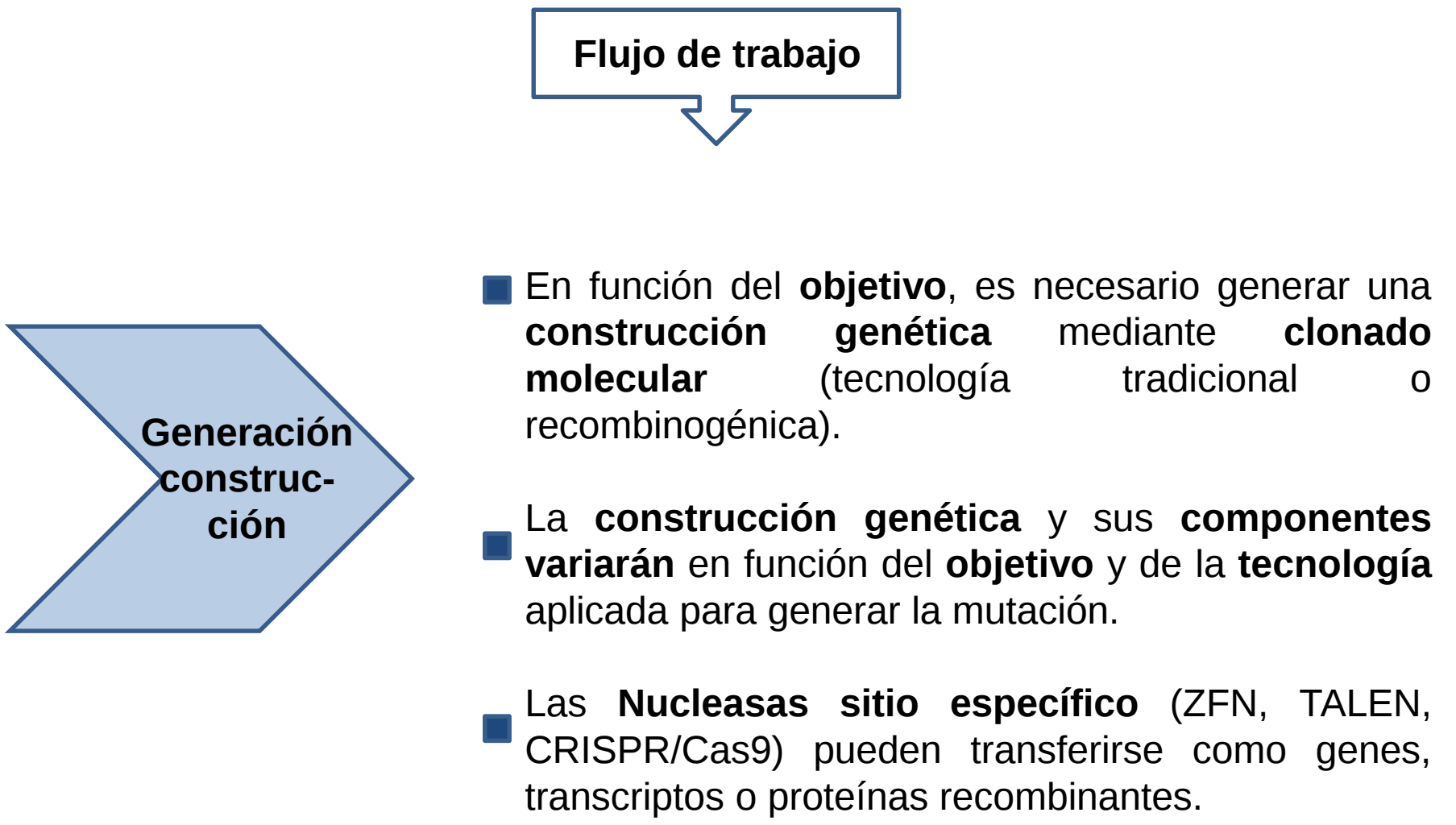
Knock in



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Flujo de trabajo

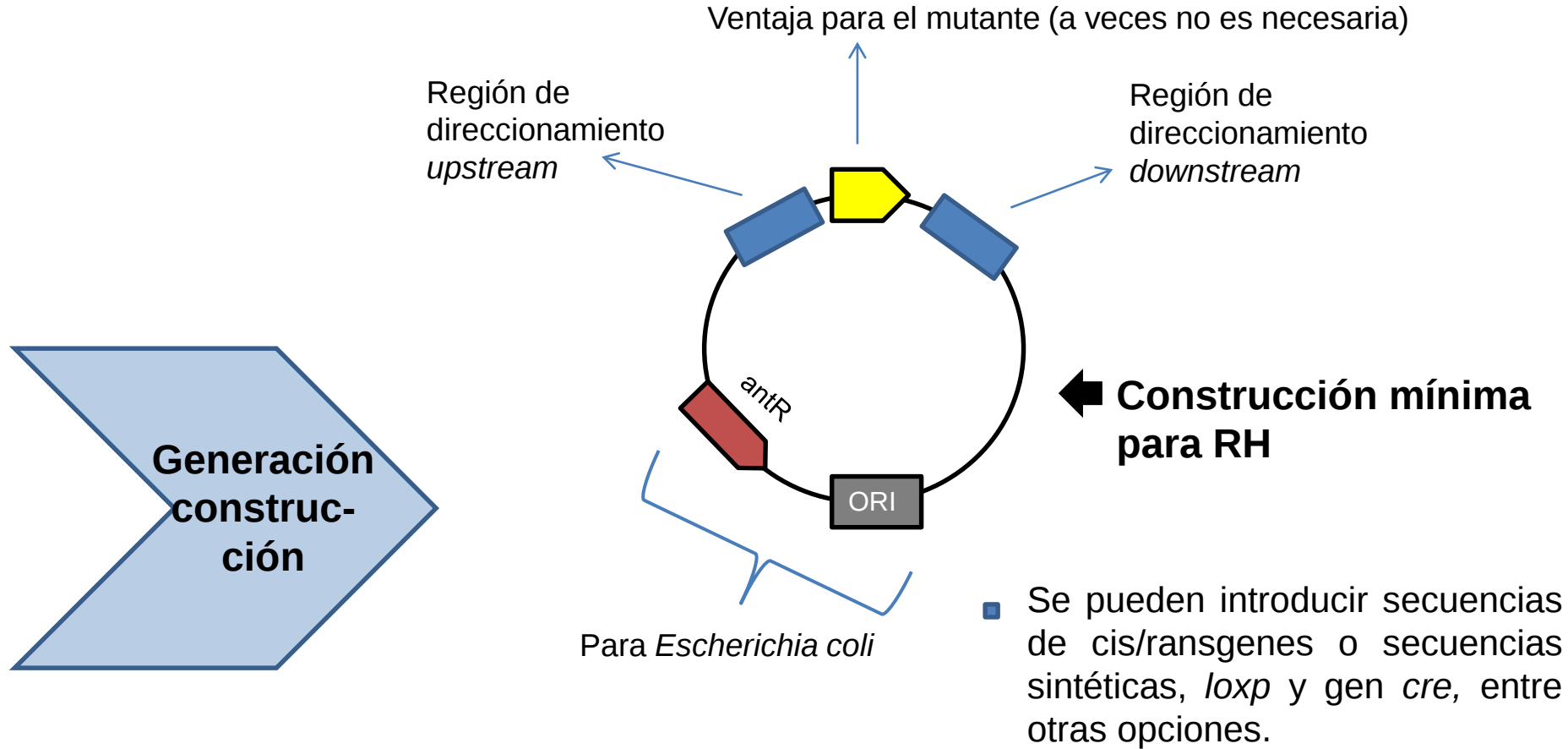


Generación
construc-
ción

- 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.
- Las **Nucleasas sitio específico** (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) pueden transferirse como genes, transcriptos o proteínas recombinantes.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

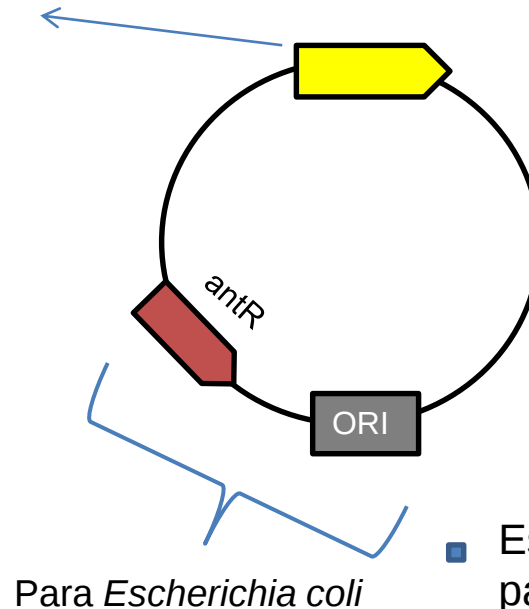


Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Gen/es construídos para la expresión de la/s nucleasa/s en el organismo a ser editado, o para generar un transcripto *in vitro*, o para generar la/s proteína/s recombinante/s

Generación
construcción



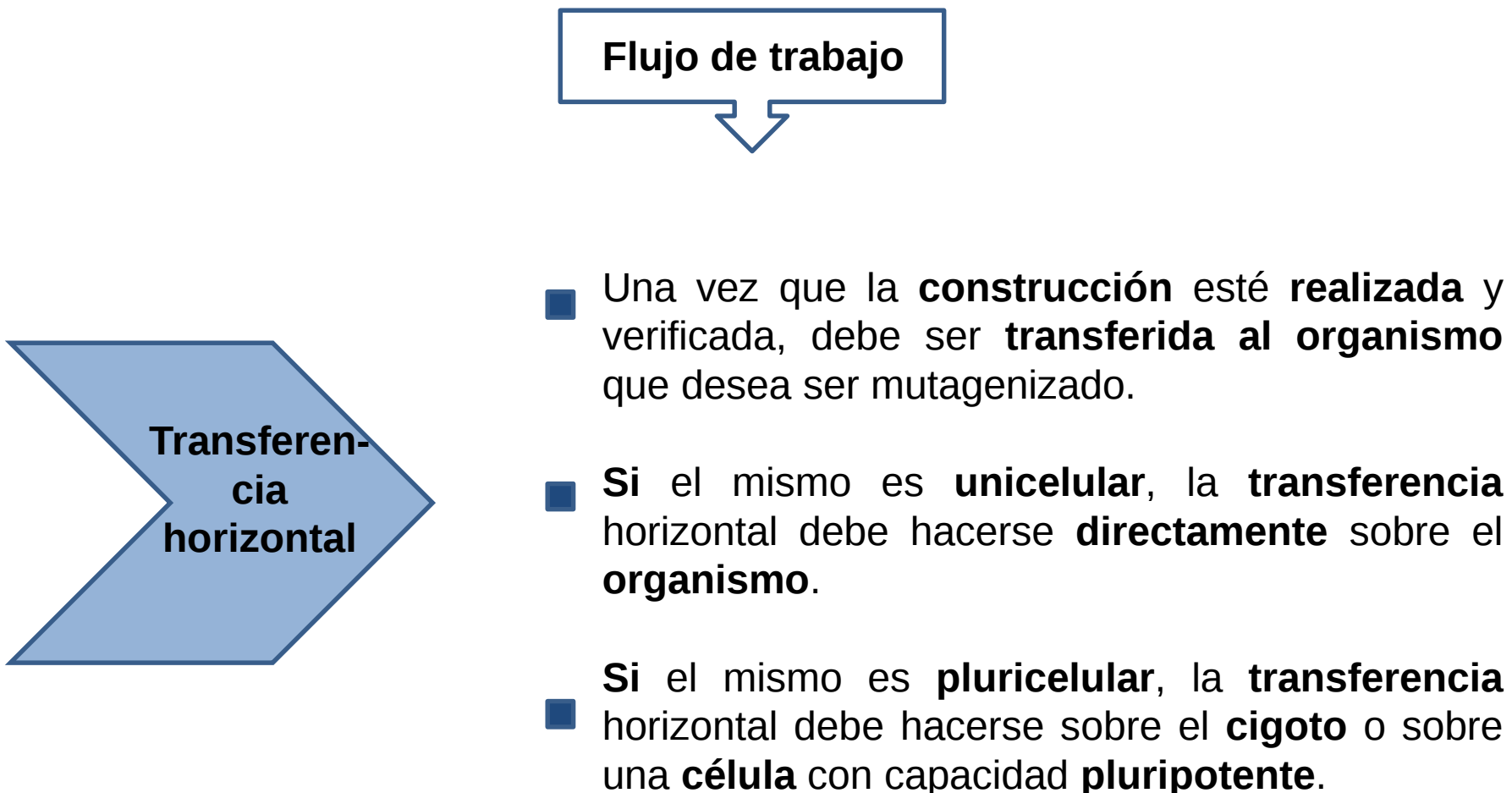
Construcción para
Nucleasas

- Esta construcción será necesaria para introducir un **DSB controlado** en el genoma a ser editado.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Flujo de trabajo

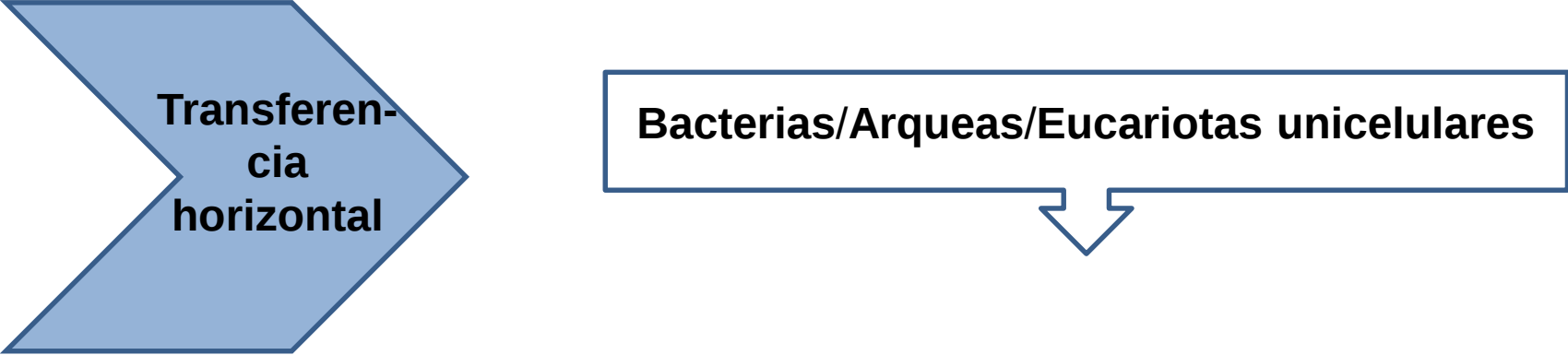


Transferencia
horizontal

- 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



Transferencia
horizontal

The diagram consists of a large blue arrow pointing right, labeled 'Transferencia horizontal'. This arrow points towards a rectangular box containing the text 'Bacterias/Arqueas/Eucariotas unicelulares'. A smaller blue arrow points downwards from the bottom center of this box.

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

Transfere-
ncia
horizontal

The diagram consists of a large blue arrow pointing to the right, containing the text 'Transfere-ncia horizontal'. To its right is a white rectangular box with a blue border containing the text 'Eucariotas pluricelulares'. A blue arrow points from the bottom of this box down towards the bulleted text below.

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

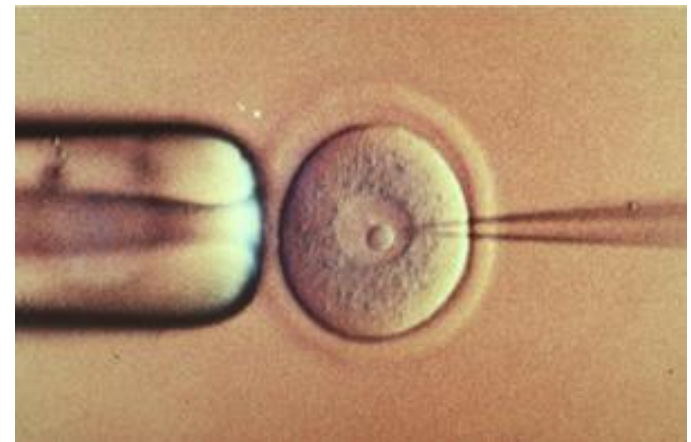
Transferen-
cia
horizontal



microinyector



microinyección



microinyección

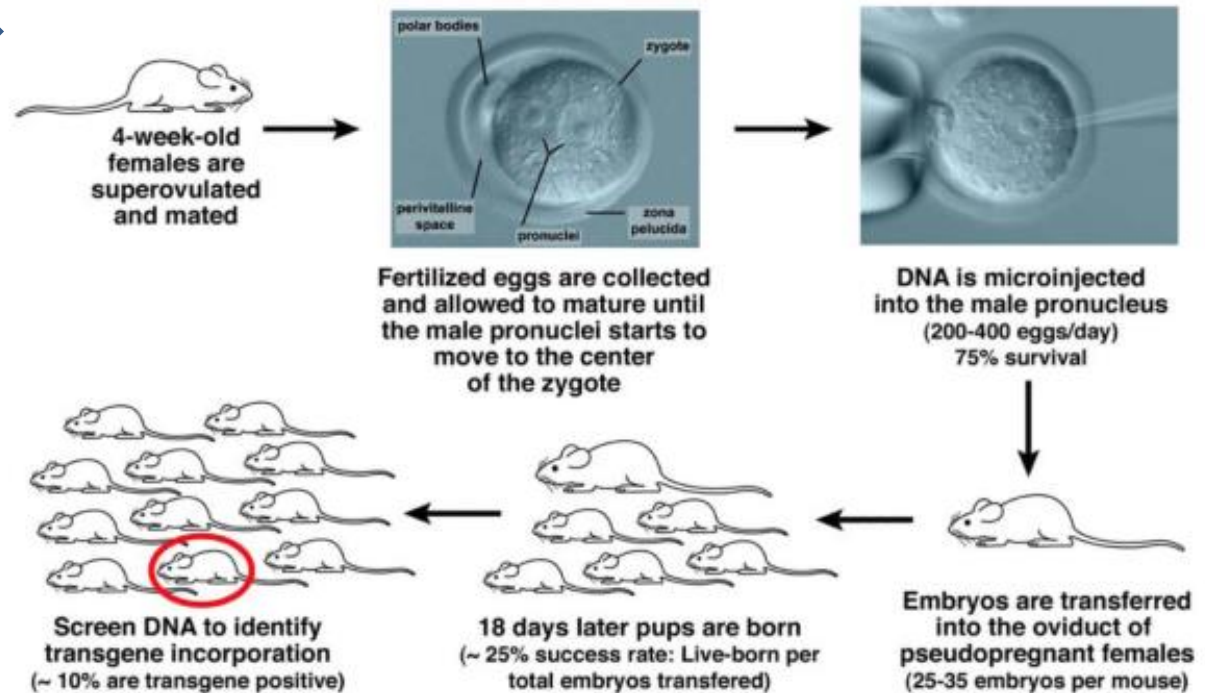
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

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

Transferencia horizontal

Selección mutante



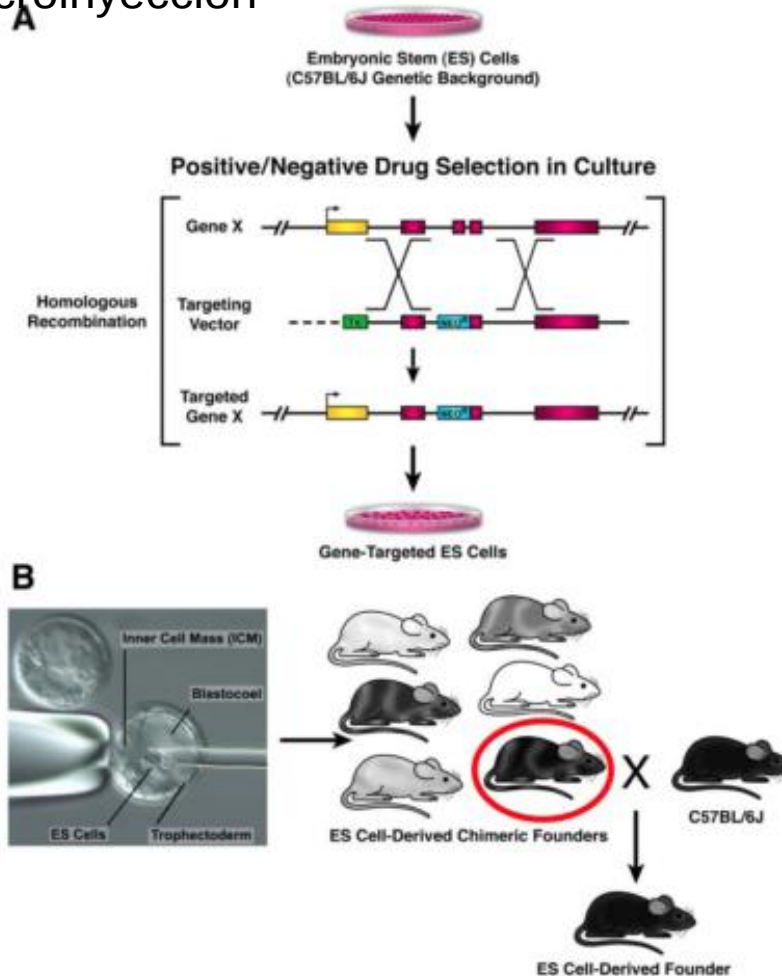
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Transferencia
horizontal

Selección
mutante

Ejemplo de modificación de células ES en cultivo y microinyección



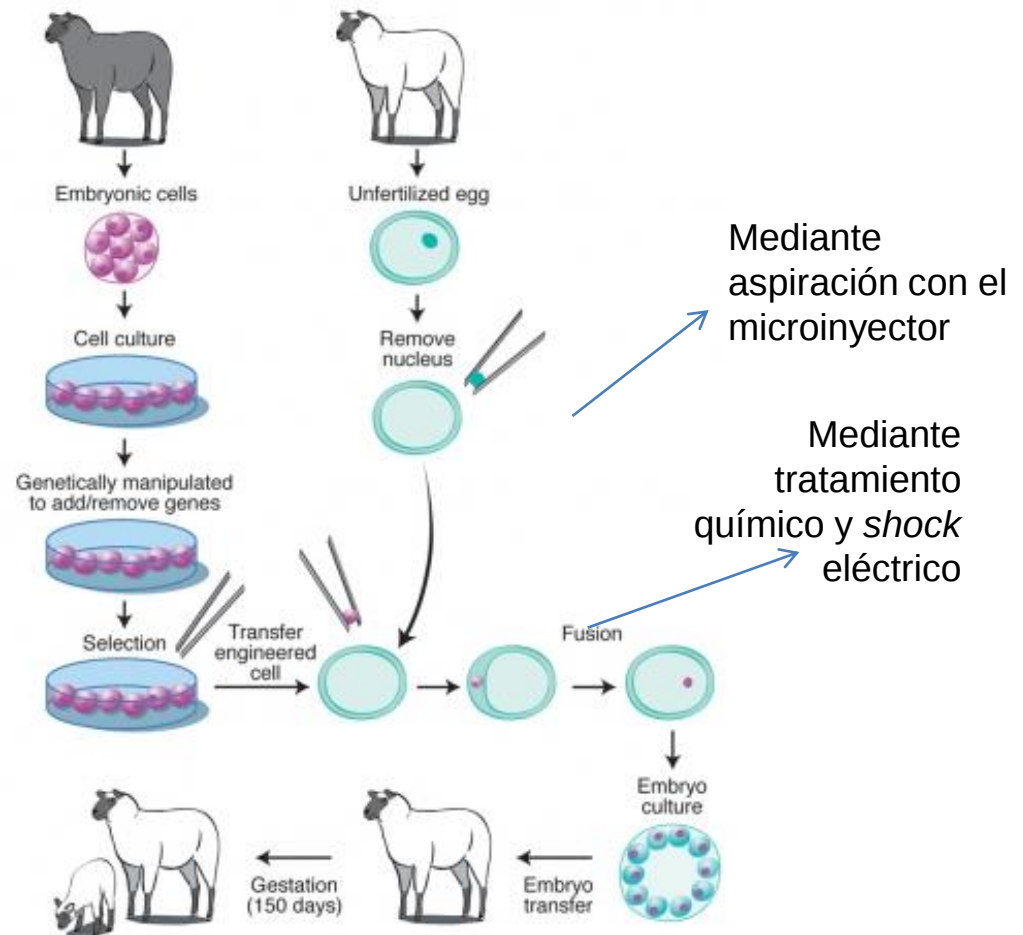
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Ejemplo de modificación de células en cultivo y clonación.

Transferencia
horizontal

Selección
mutante

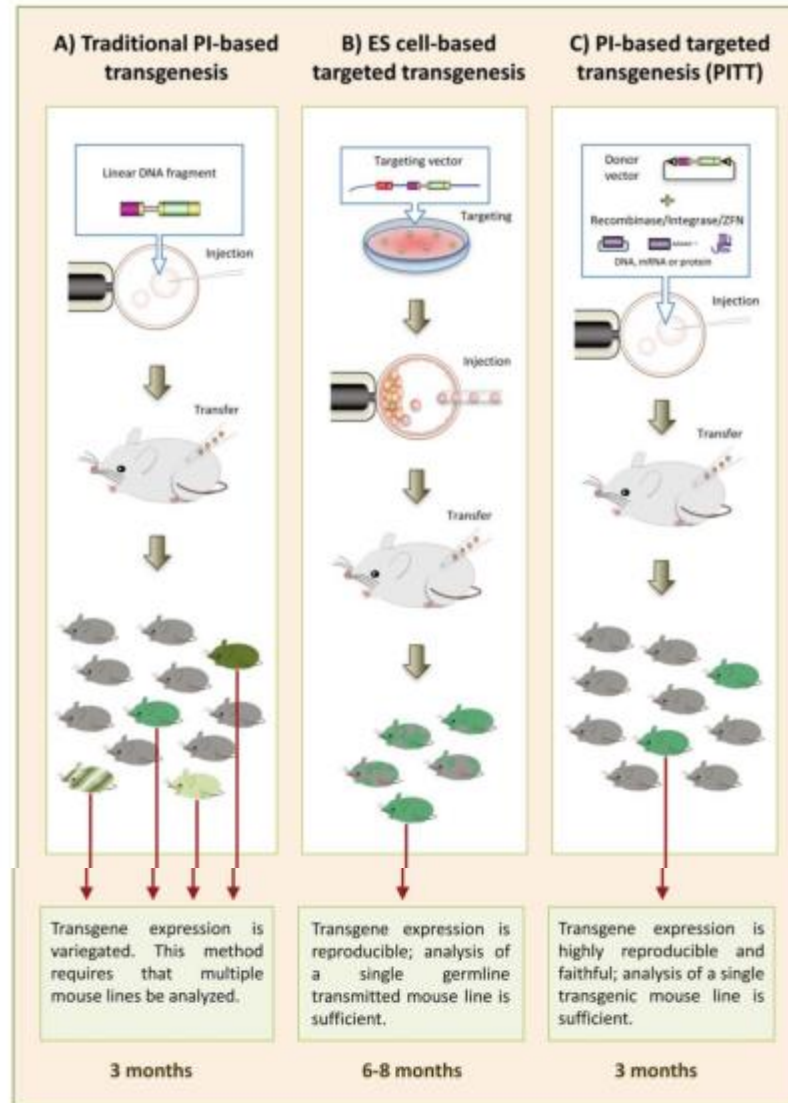


Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas

Transferencia
horizontal

Selección
mutante



Metodologías de
transferencia
para animales

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas



Selección
mutante

- Los **organismos mutantes** por **RH** (o **células modificadas**) se **seleccionan** en función de la **ventaja incorporada** (resistencia a antibióticos, proteínas indicadoras, resolución de auxotrofías), **y/o mediante procedimientos genéticos** que detecten las secuencias introducidas.
- En los casos de **mutaciones del tipo NHEJ**, los **procedimientos** de selección suelen ser sólo de **índole genética**.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas



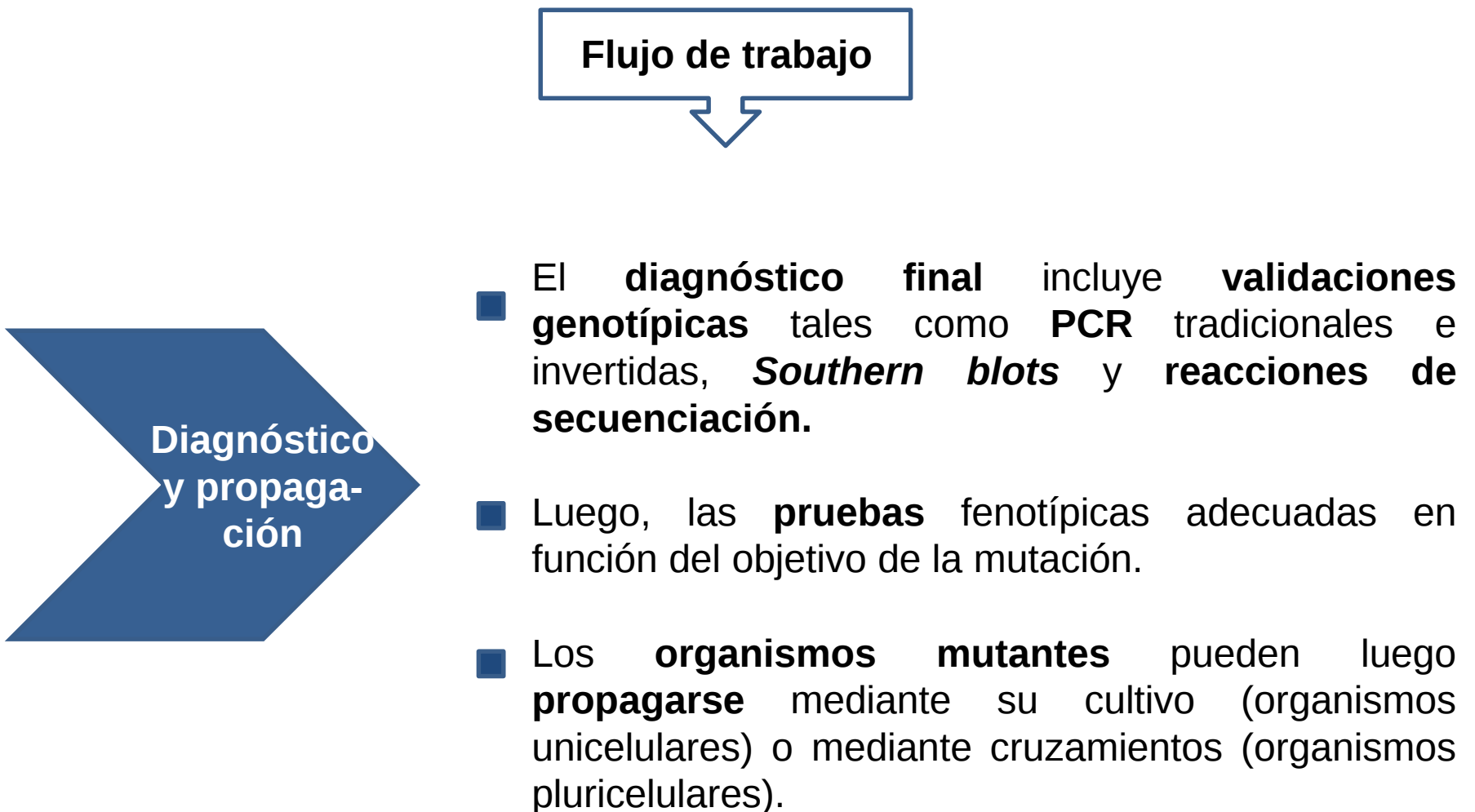
Selección
mutante

- 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** puede 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

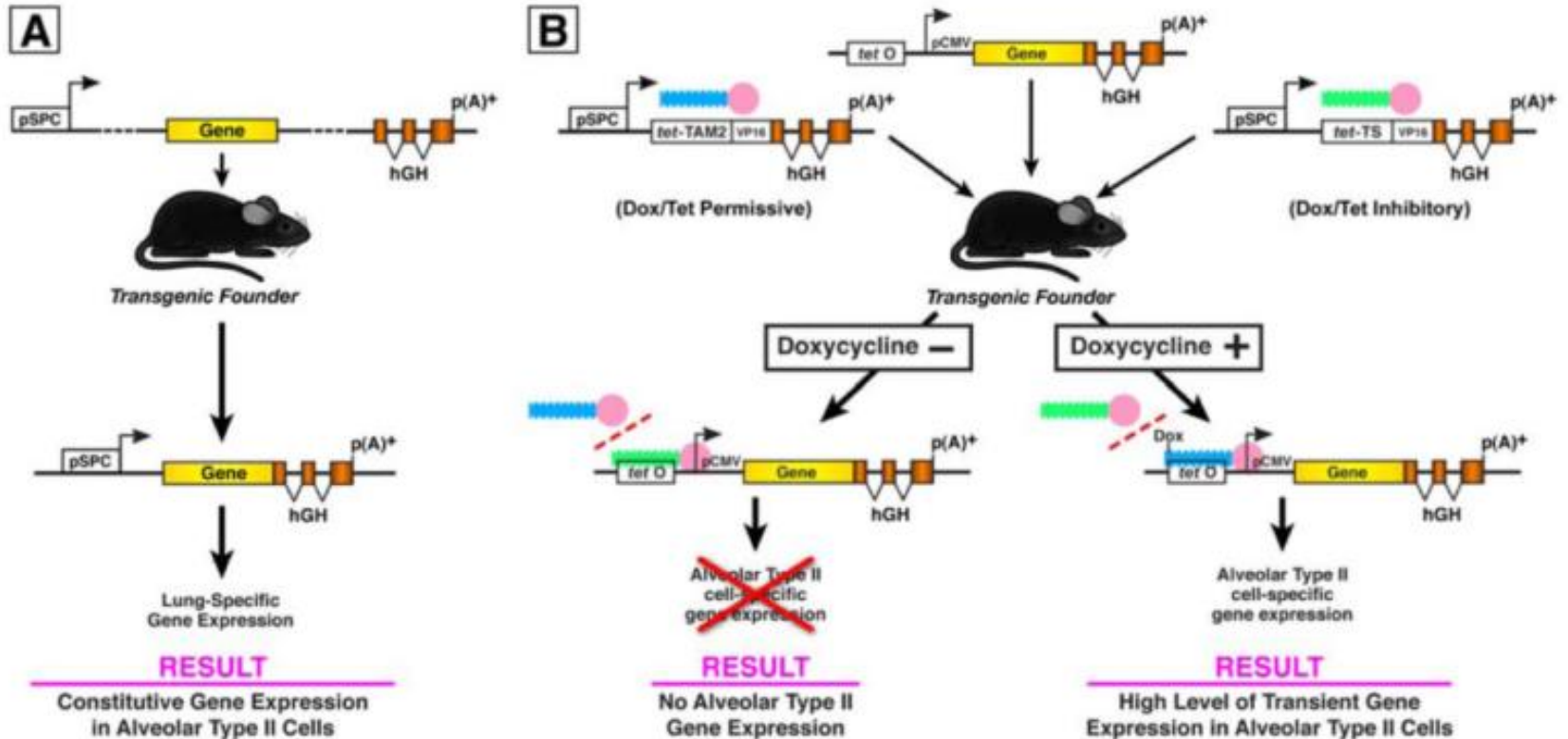


Diagnóstico
y propaga-
ción

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

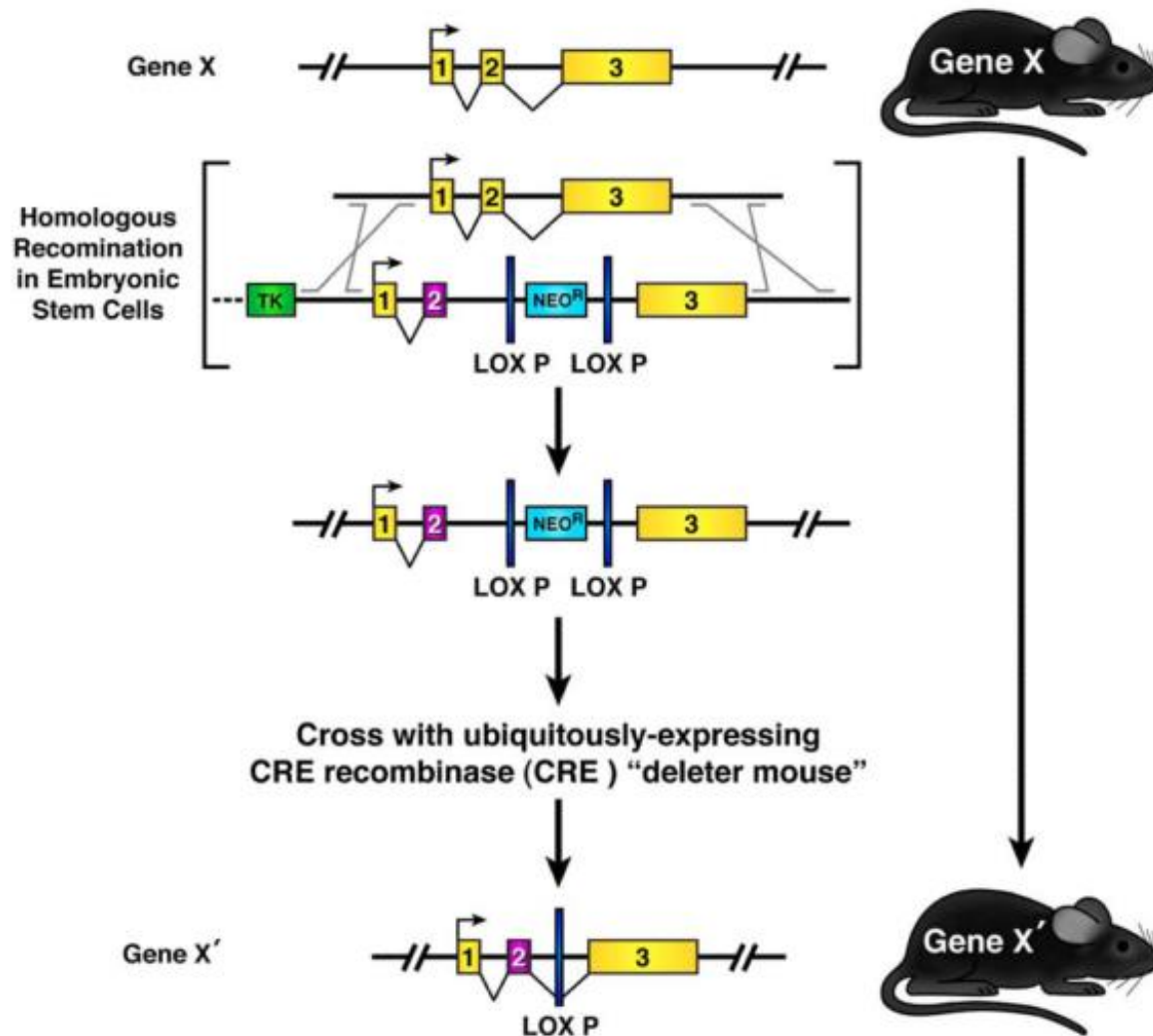
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: ejemplos en ratón



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones dirigidas: ejemplos en ratón



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

Mutagénesis de genomas

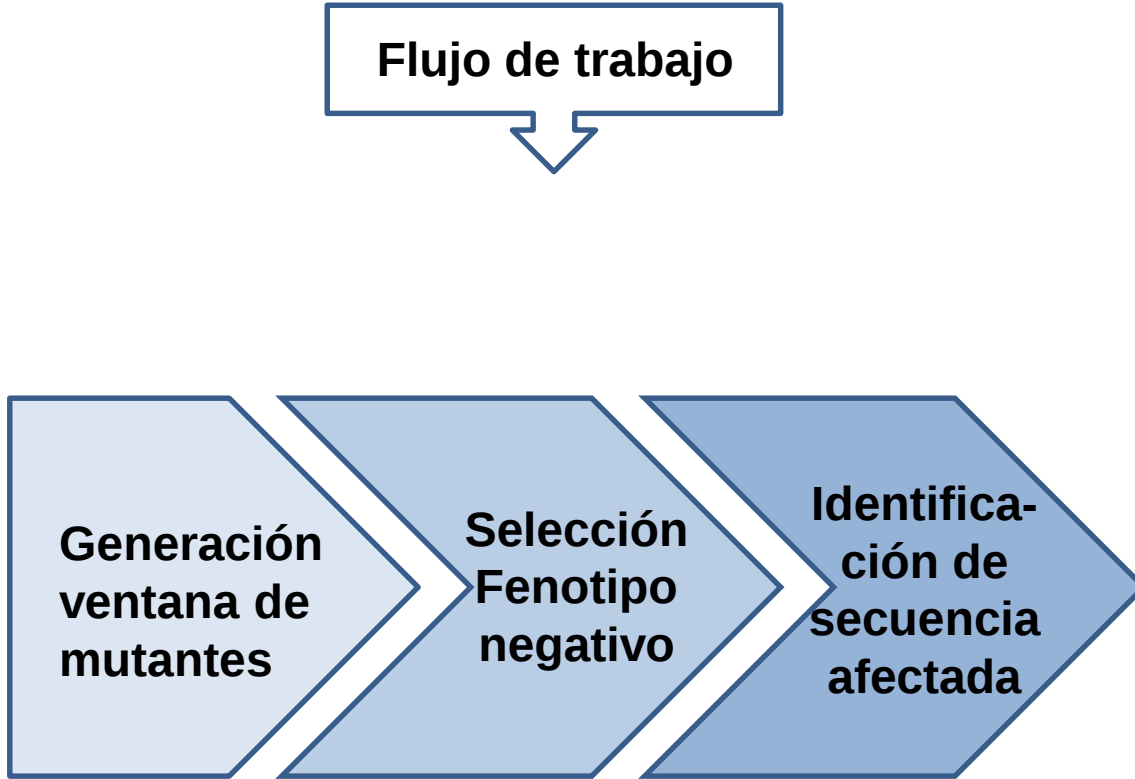
Aproximaciones al azar

- 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.
- En estos casos, **suelen emplearse procedimientos** que incluyen **injurias no controladas al DNA**, y **componentes del moviloma** (por ejemplo: transposones, retrovirus)

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar

Flujo de trabajo



```
graph TD; A[Flujo de trabajo] --> B[Generación ventana de mutantes]; B --> C[Selección Fenotipo negativo]; C --> D[Identificación de secuencia afectada]
```

**Generación
ventana de
mutantes**

**Selección
Fenotipo
negativo**

**Identifica-
ción de
secuencia
afectada**

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar



**Generación
ventana de
mutantes**

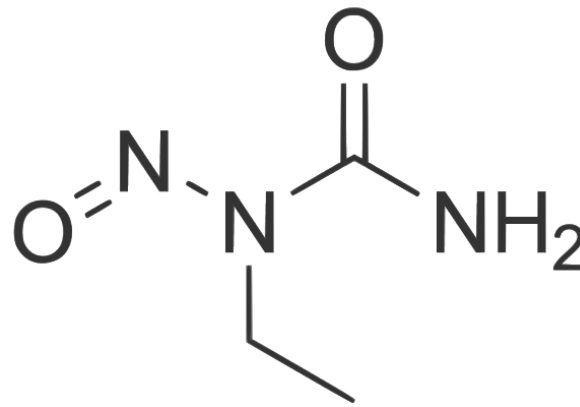
- Los **procedimientos** más utilizados para generar **ventanas de mutantes** son:
 - *Tratamiento con ENU*
 - *Utilización de transposones*
 - *Utilización de retrovirus*

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar

Tratamiento con ENU

Generación
ventana de
mutantes



N-etil-N-nitrosourea

- **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**.

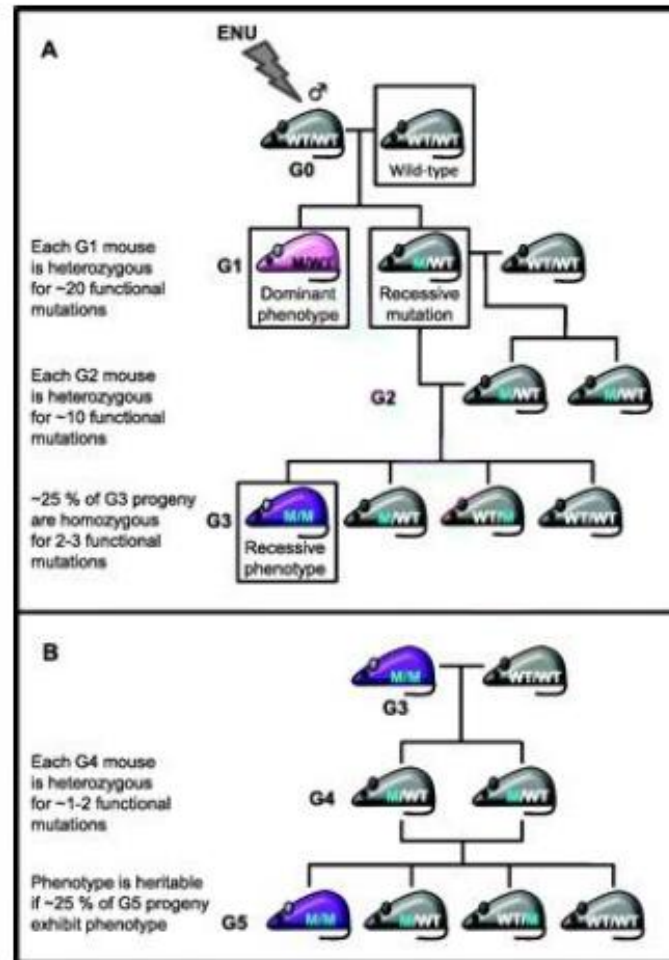
Mutagénesis de genomas

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

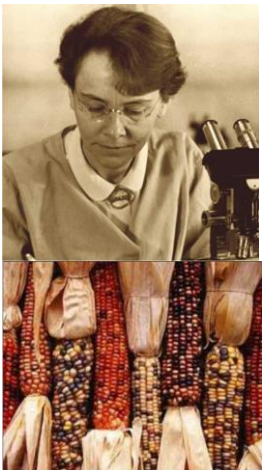
Generación
ventana de
mutantes

- 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**.

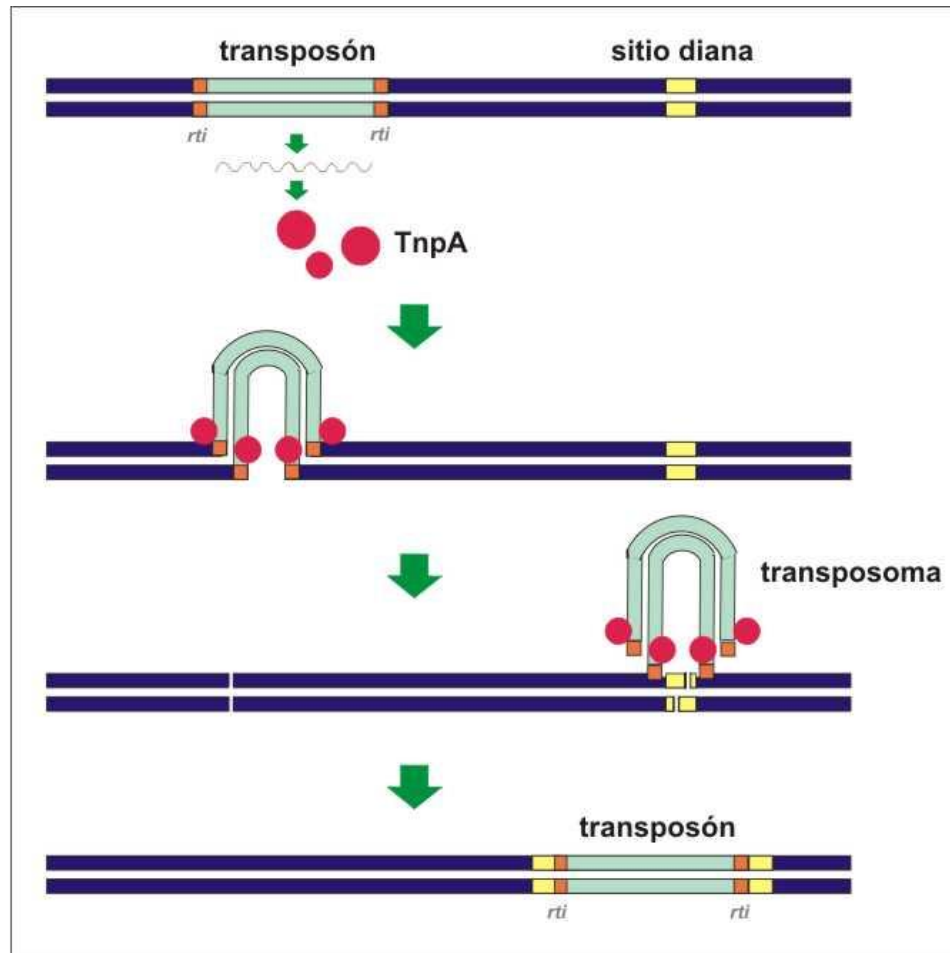


Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar

Transposones

Generación
ventana de
mutantes

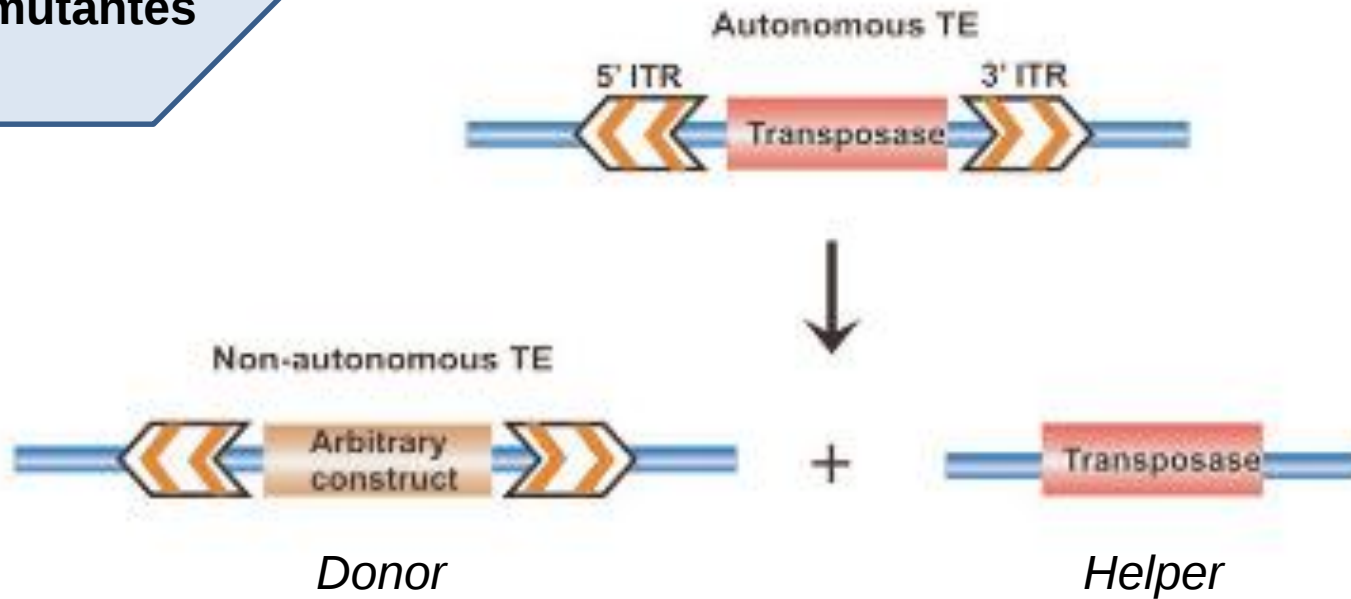


Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar

Transposones

Generación
ventana de
mutantes



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> /mariner 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> /mariner 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.

Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar

Transposones

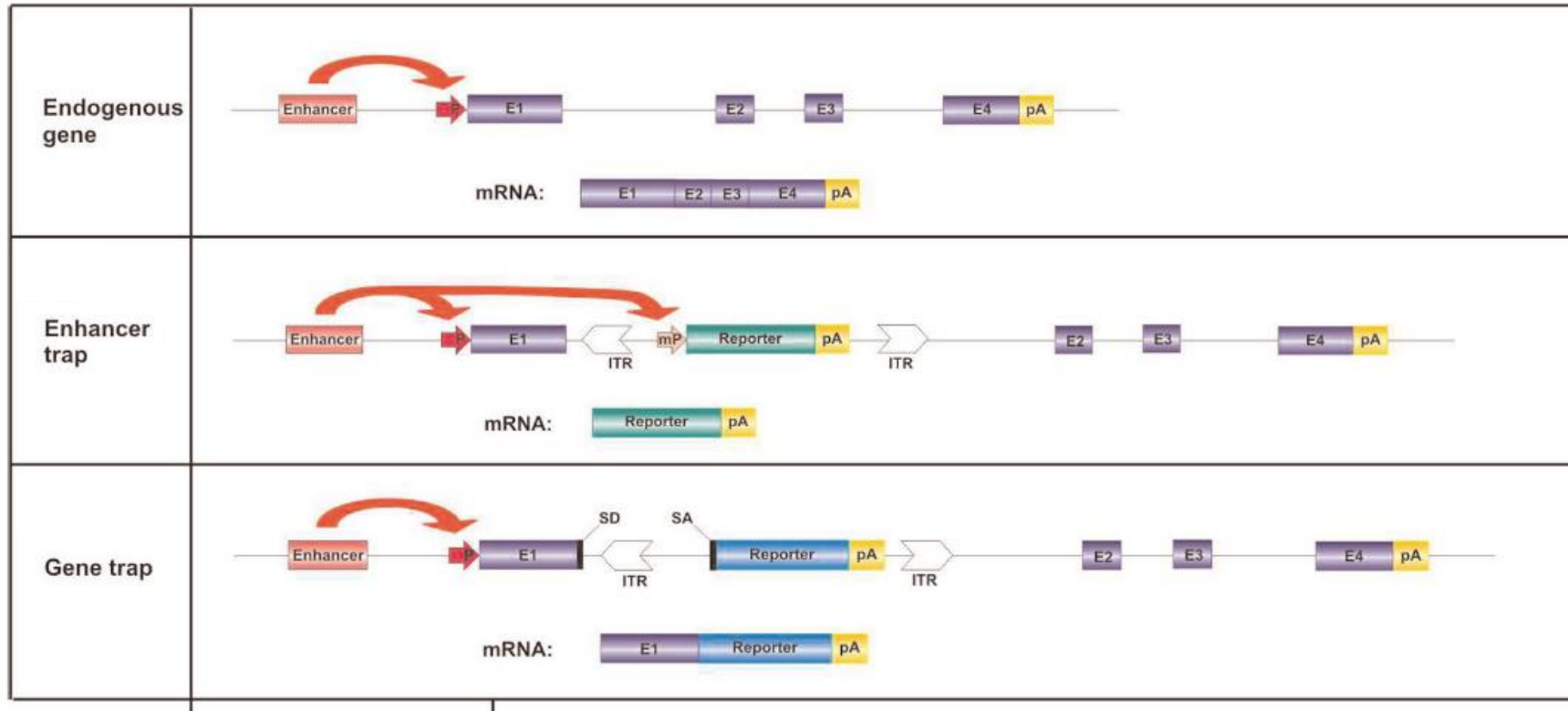
Generación
ventana de
mutantes

- 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

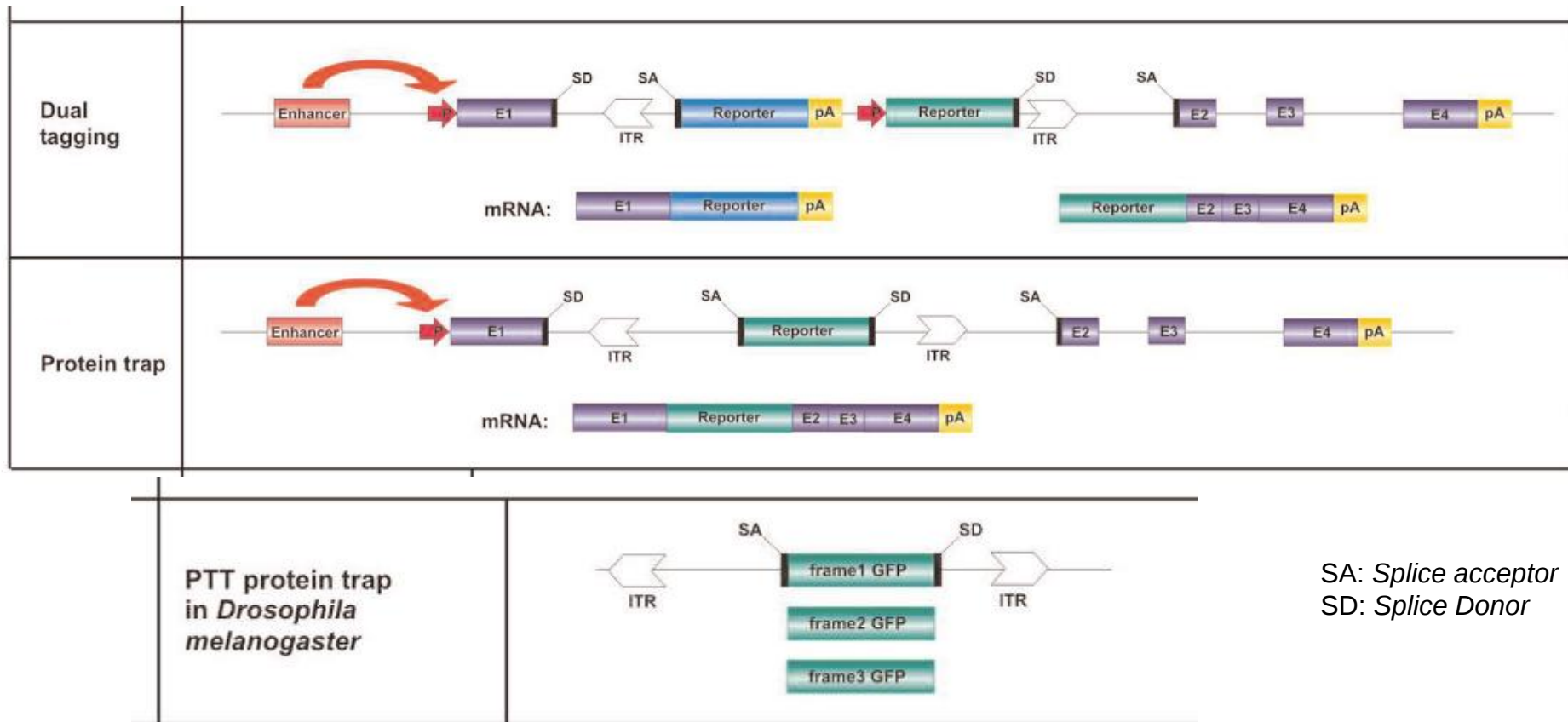
Ventajas en función del diseño del casete



Mutagénesis de genomas

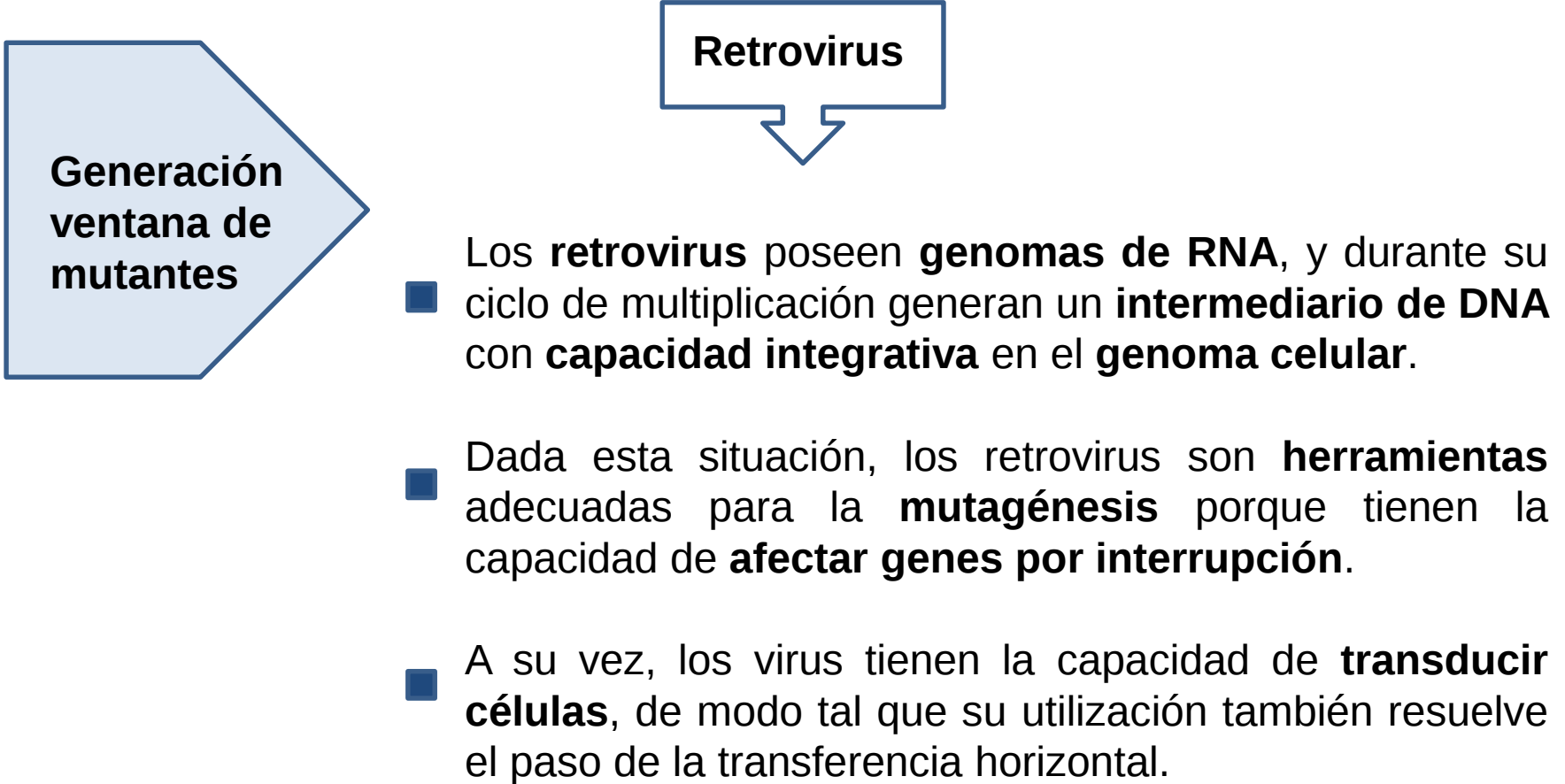
Aproximaciones al azar: uso de transposones

Ventajas en función del diseño del casete



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar



Generación
ventana de
mutantes

Retrovirus

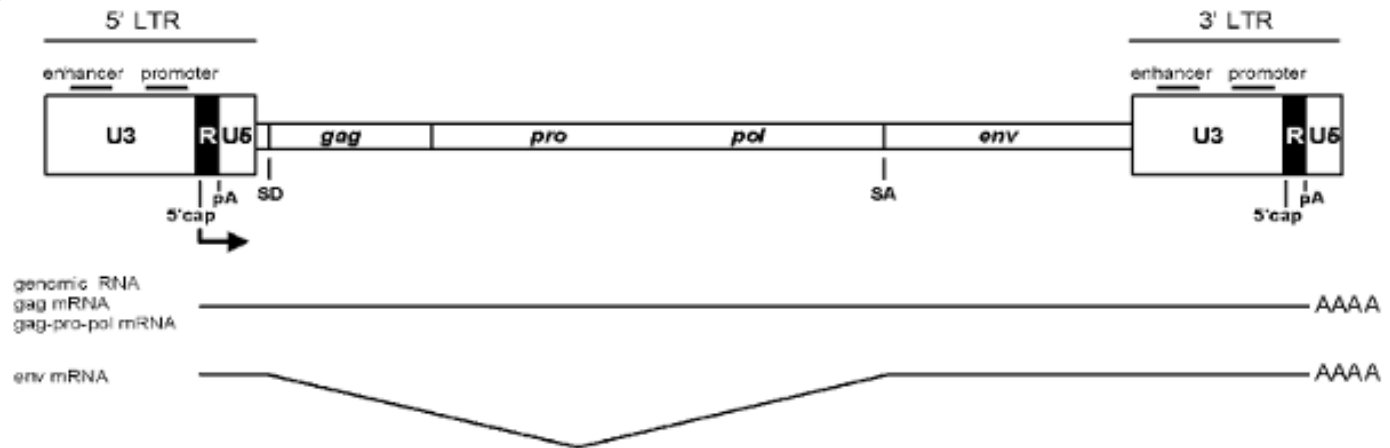
- Los **retrovirus** poseen **genomas de RNA**, y durante su ciclo de multiplicación generan un **intermediario de DNA** con **capacidad integrativa** en el **genoma celular**.
- Dada esta situación, los retrovirus son **herramientas** adecuadas para la **mutagénesis** porque tienen la capacidad de **afectar 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

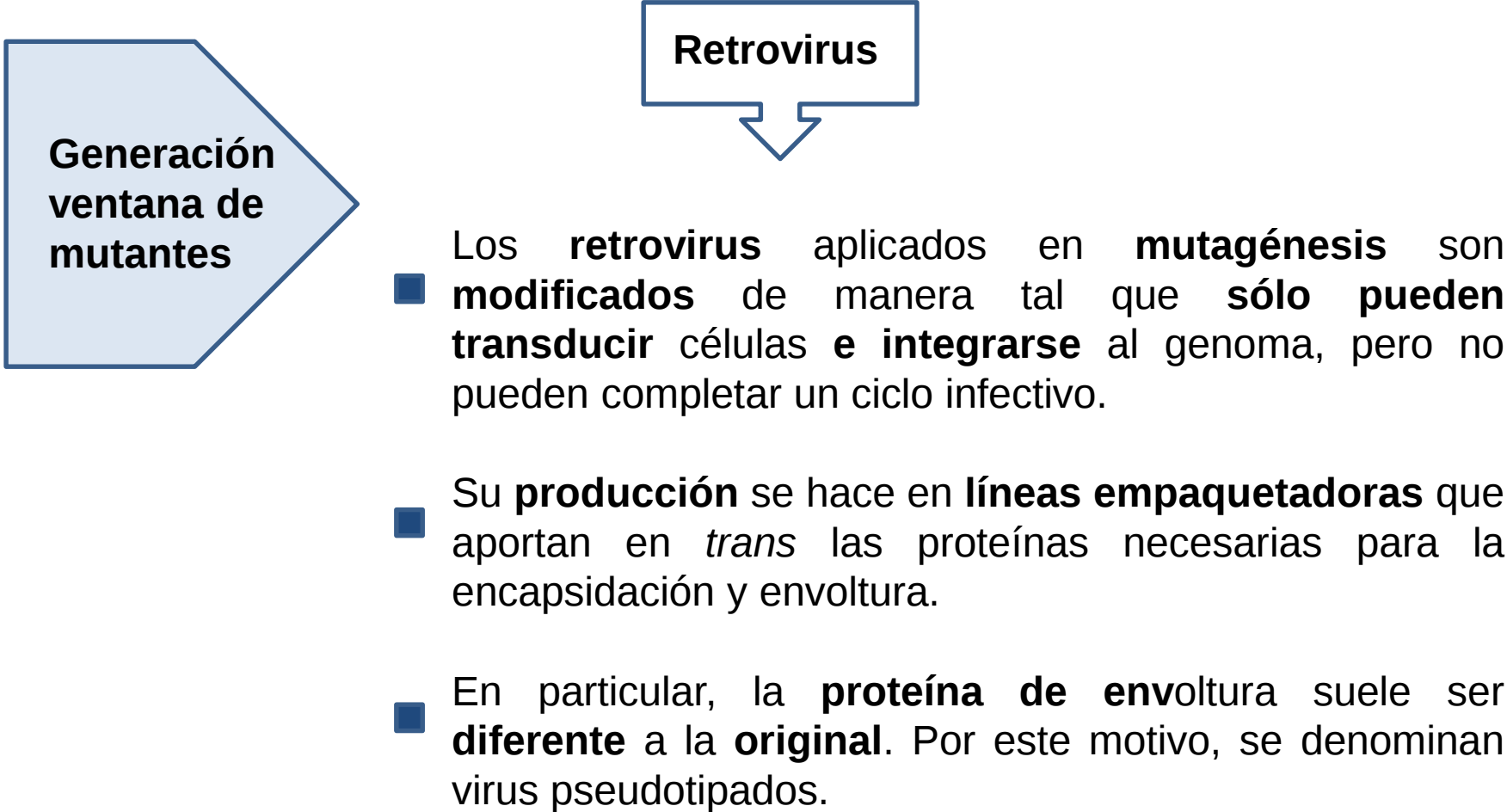
Retrovirus

Generación
ventana de
mutantes



Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar



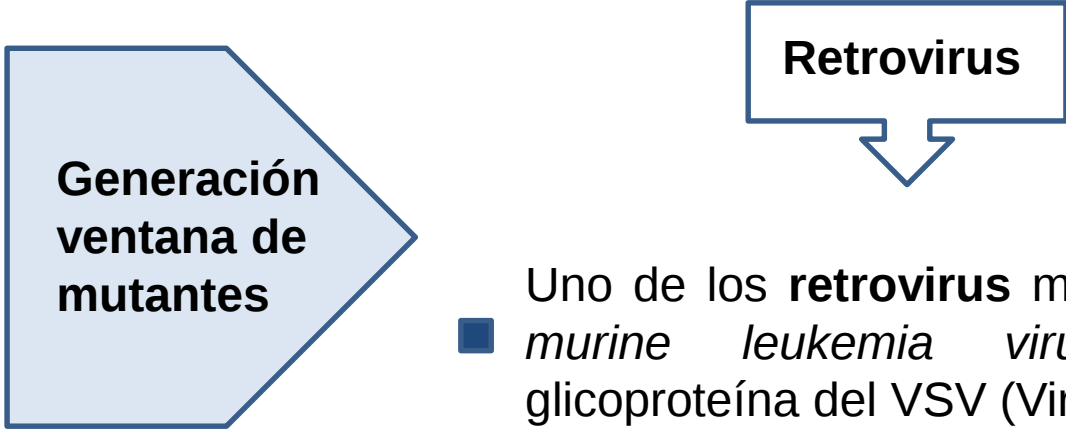
Generación
ventana de
mutantes

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 infectivo.
- 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



Generación
ventana de
mutantes

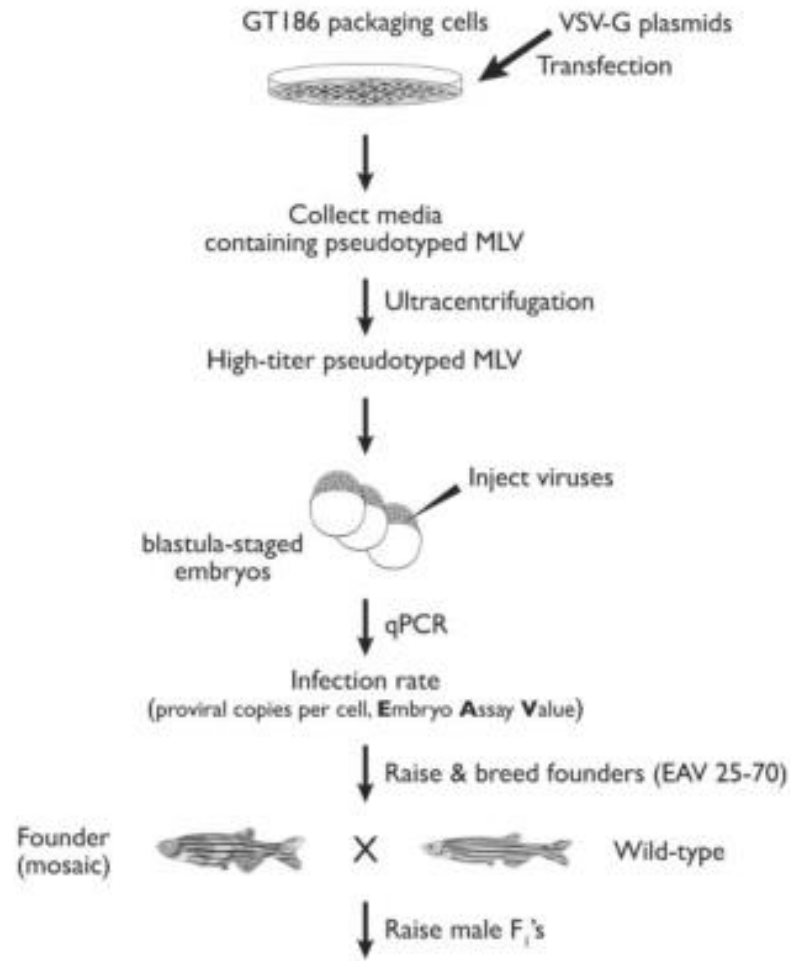
Retrovirus

- 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.

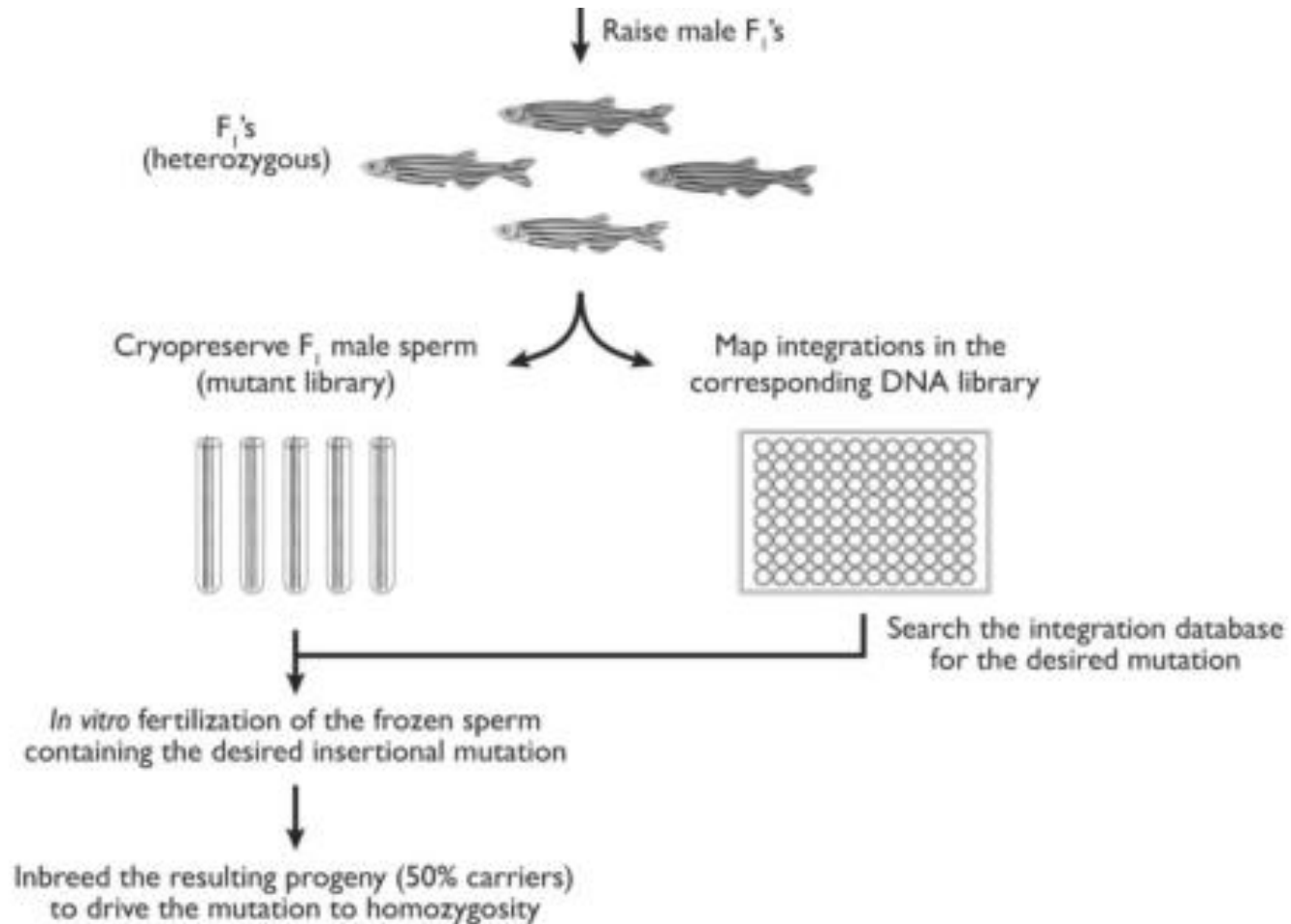
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar: retrovirus



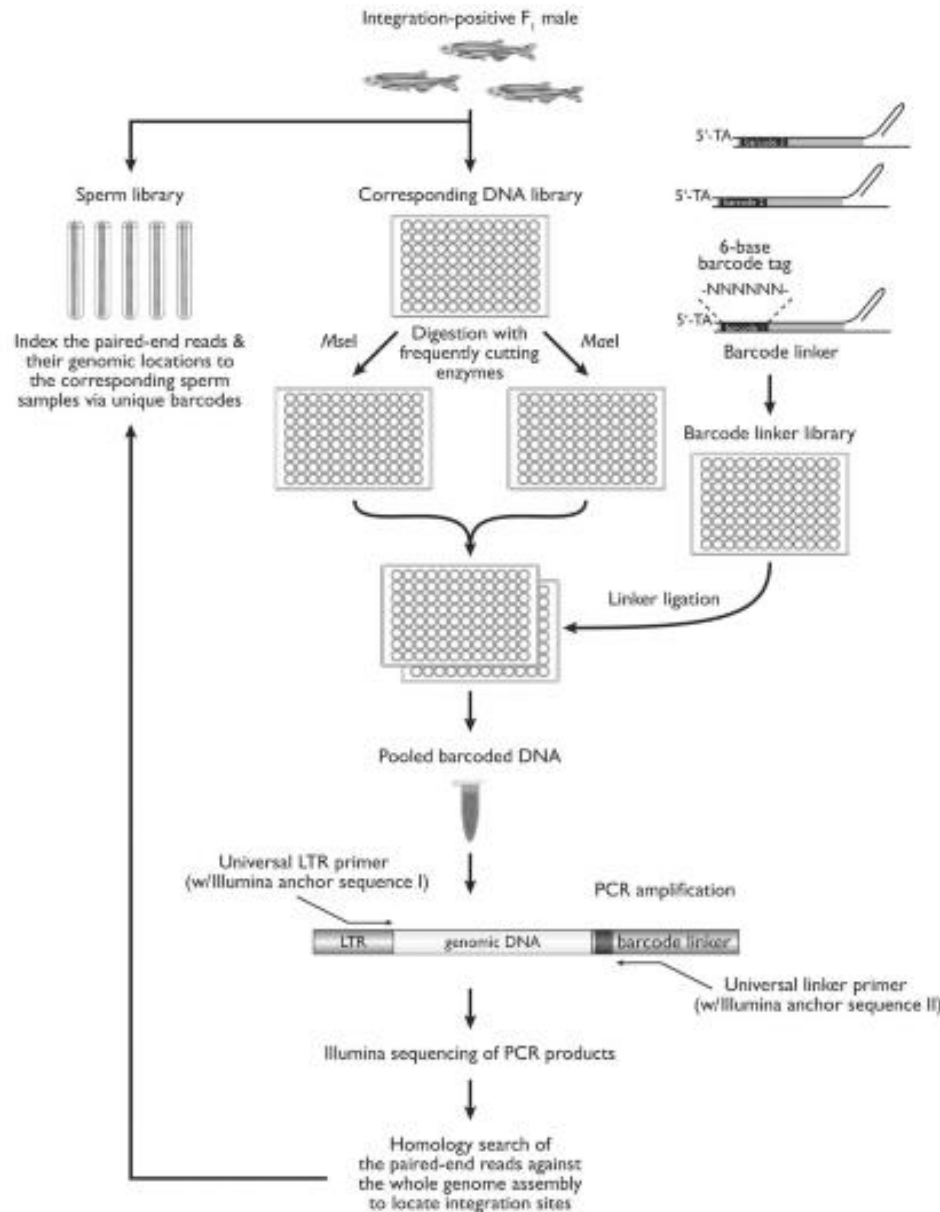
Mutagénesis de genomas

Aproximaciones al azar: retrovirus



Mutagénesis de genomas

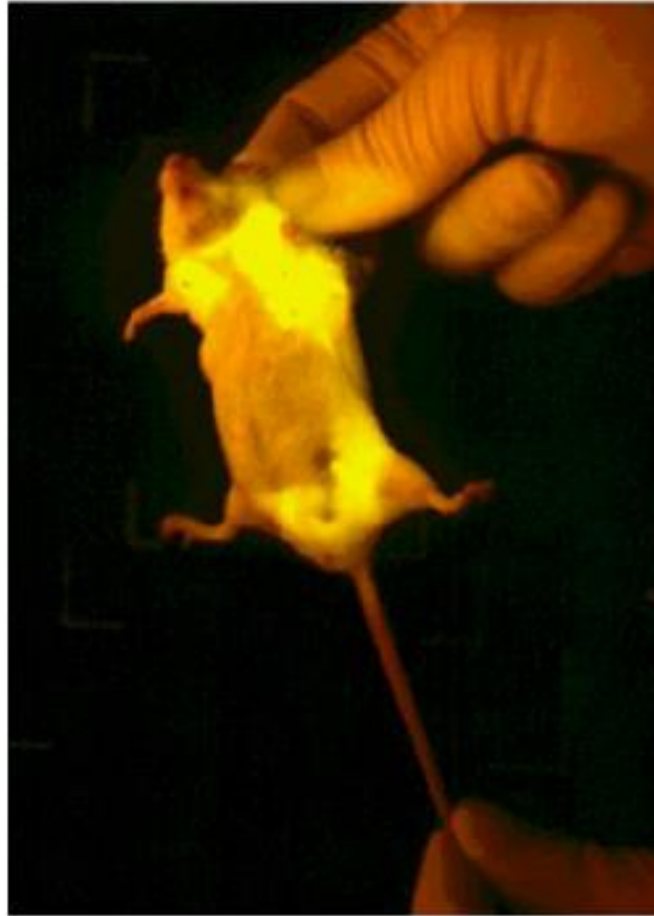
Aproximaciones al azar: retrovirus



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**.