



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

# EDICIÓN DE GENOMAS EMPLEANDO NUCLEASAS SITIO-DIRIGIDAS



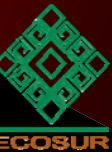
Dr Yuri Jorge Peña Ramírez  
Ecosur Campeche

## 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?



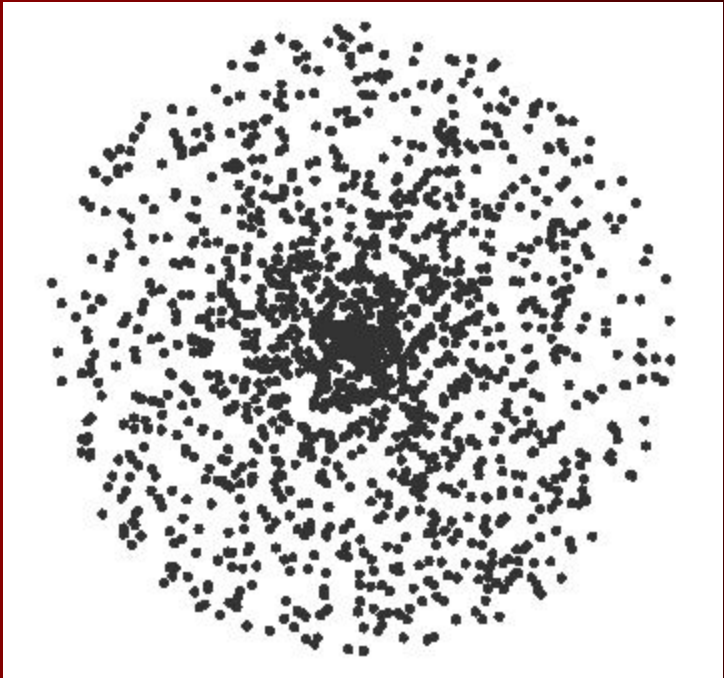
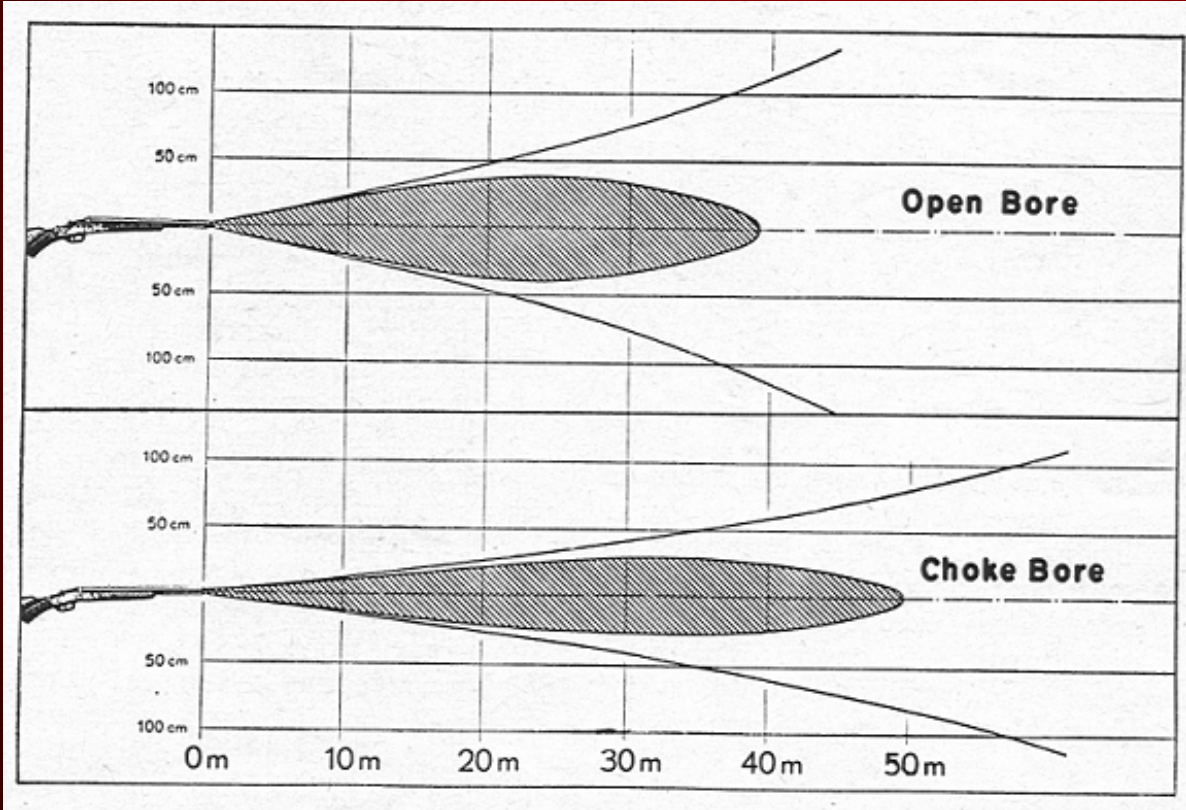
ECOSUR

# CAZANDO PATOS



ECOSUR

# CAZANDO PATOS

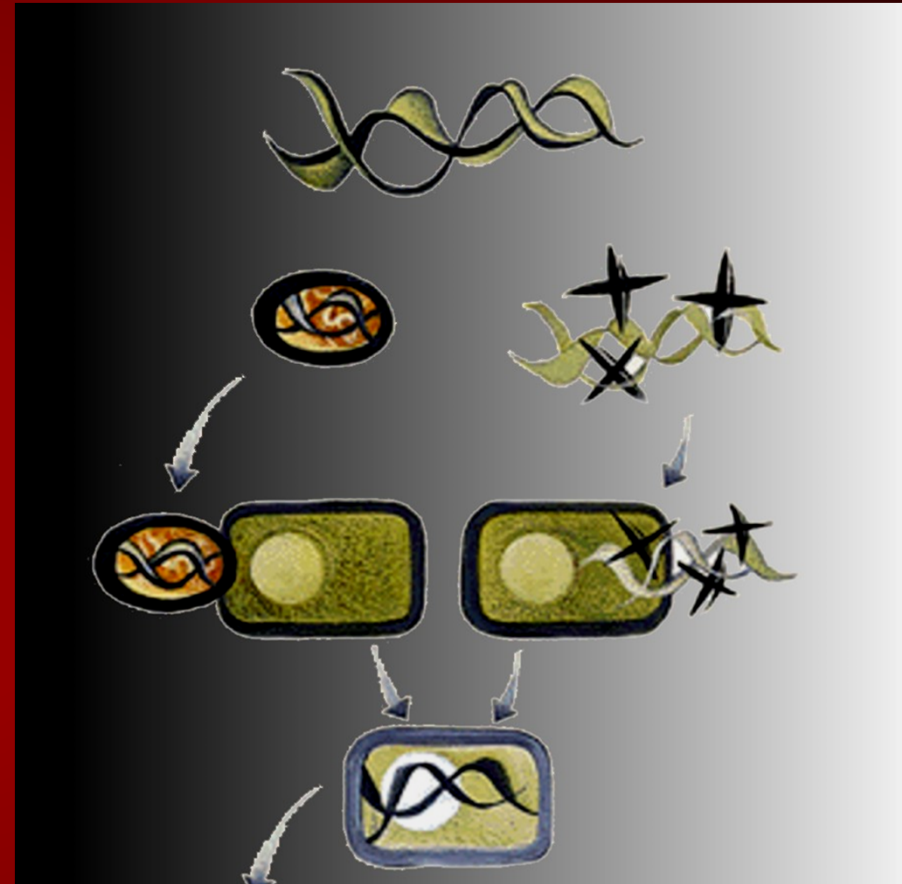




## CAZANDO UNA PLANTA GM

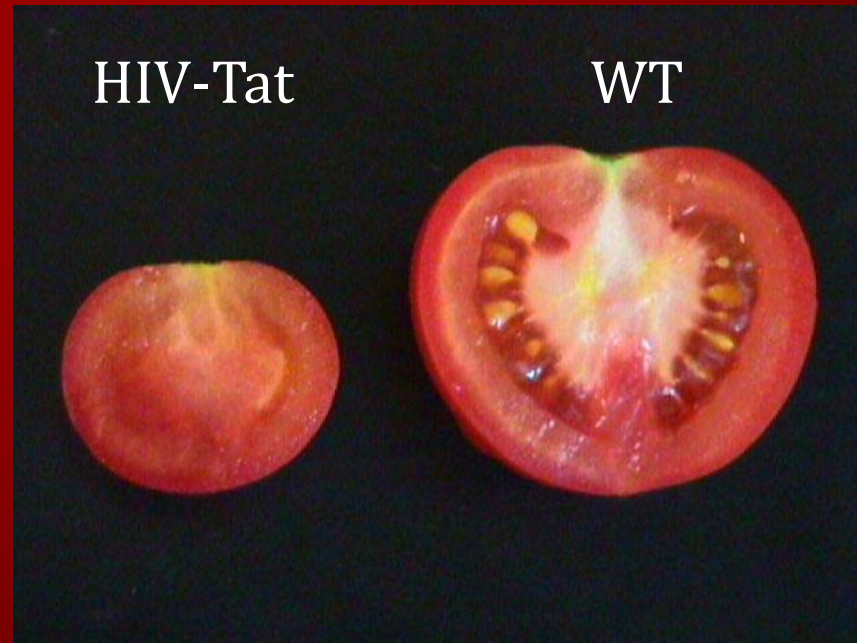
En los métodos tradicionales de generación de plantas GM (Agrobacterium y Biobalística), el sitio de inserción del transgén no puede ser controlado.

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



ECOSUR



# ¿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.

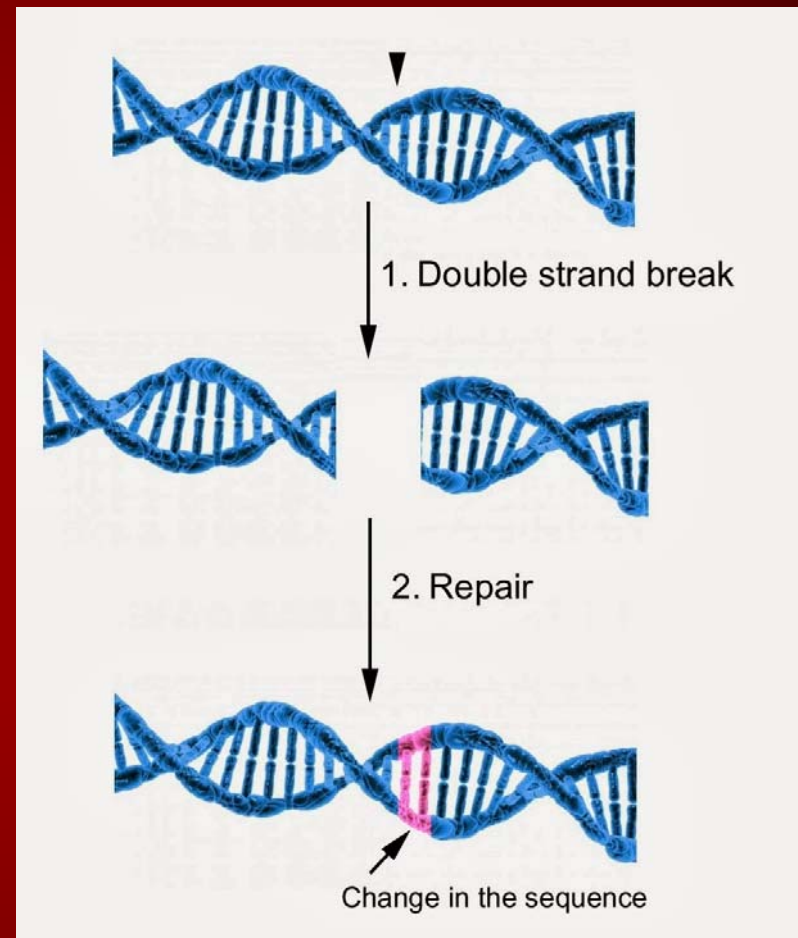
A diferencia de las técnicas previas, esta manipulación se dirige a **sitios específicos**.



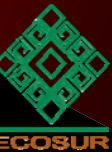
## EN GENERAL:

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



ECOSUR

# 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



ECOSUR

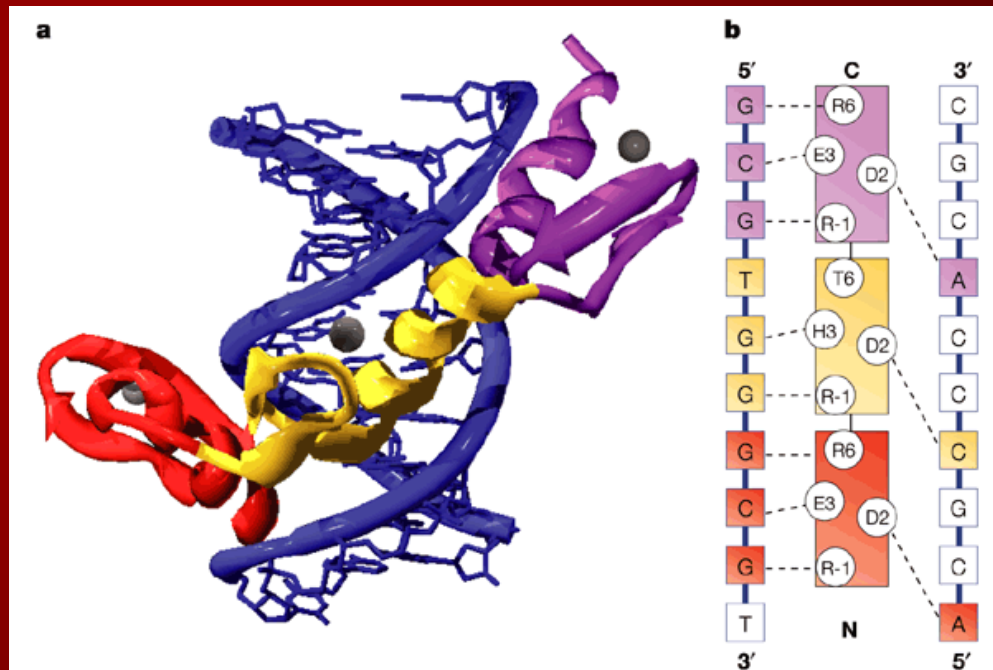


# ZFNS O ZN

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

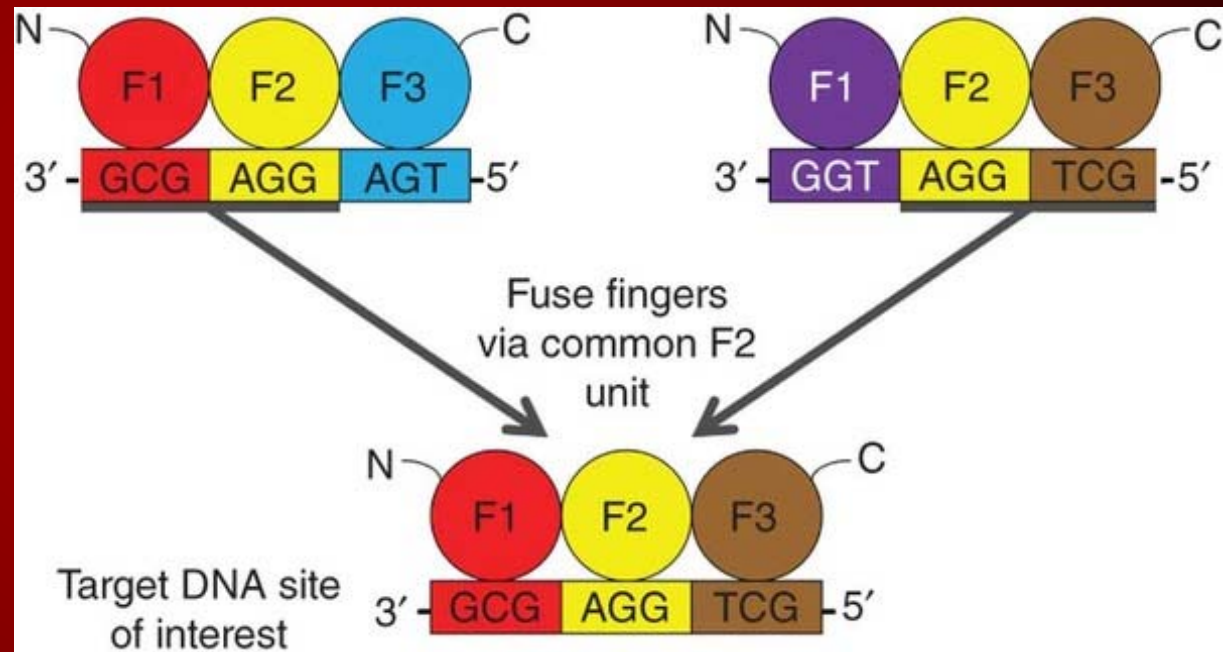


# ZFNS O ZN

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

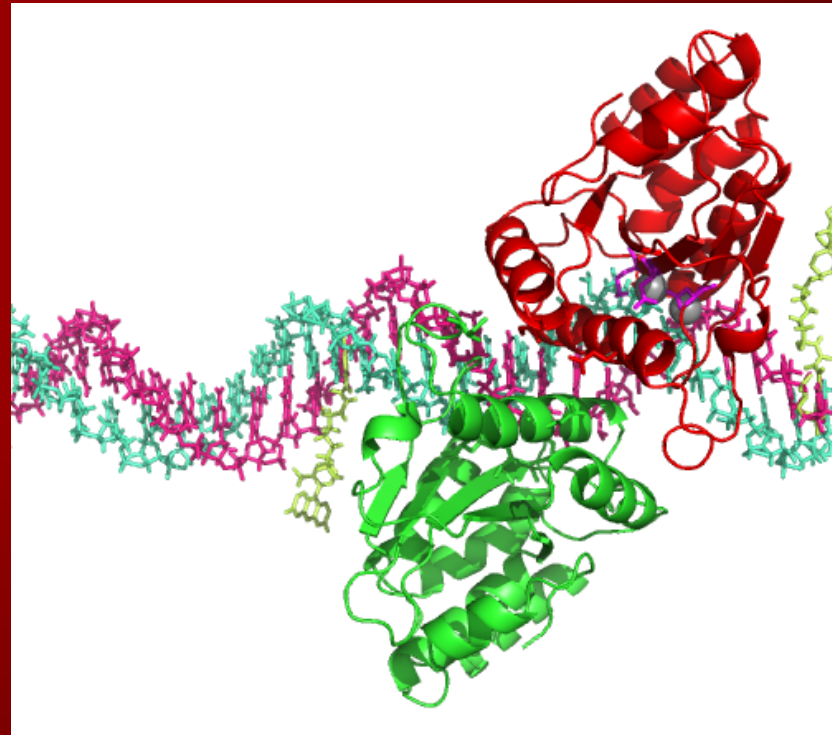


# ZFNS O ZN

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

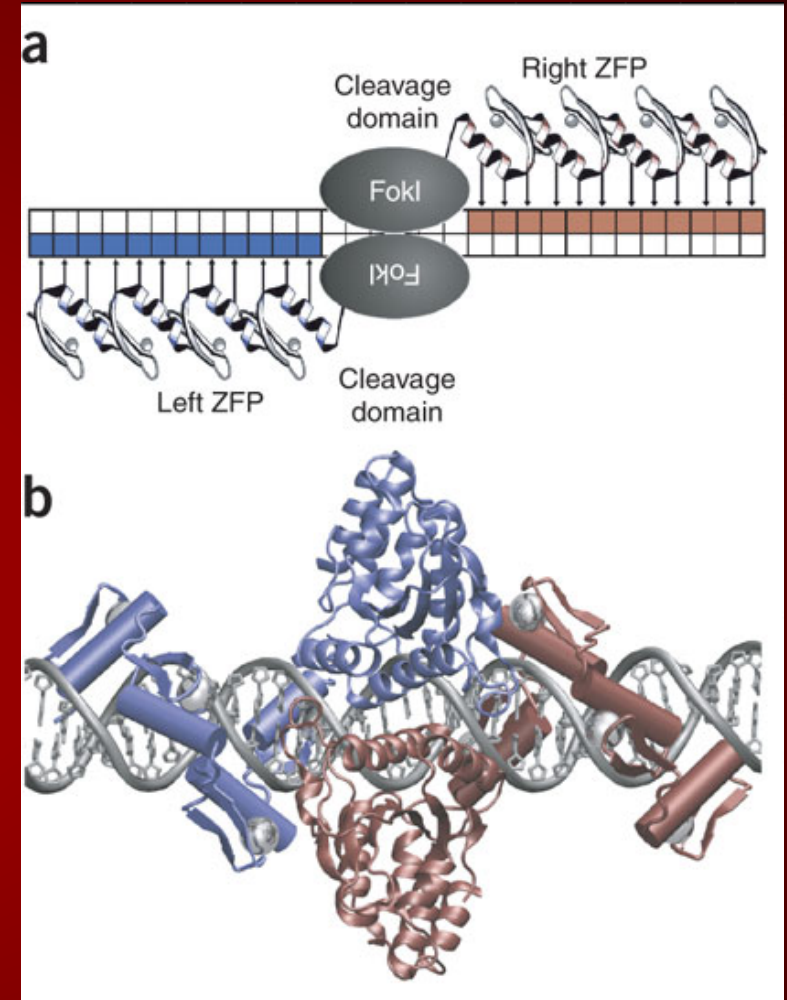
- 1) Los dedos de Zinc
- 2) La nucleasa FokI

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

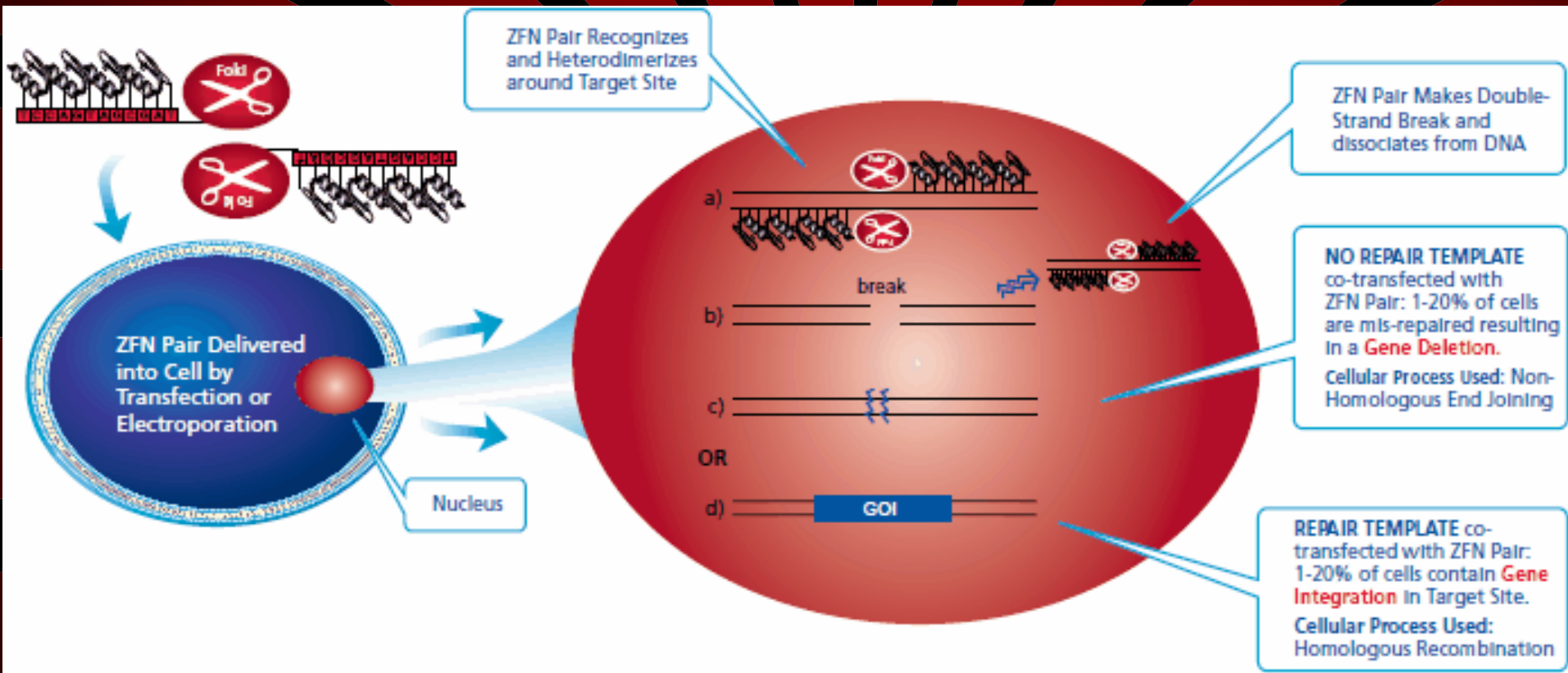


# ZFNs O ZN

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)



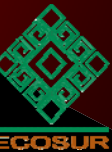
# ZFNs O ZN





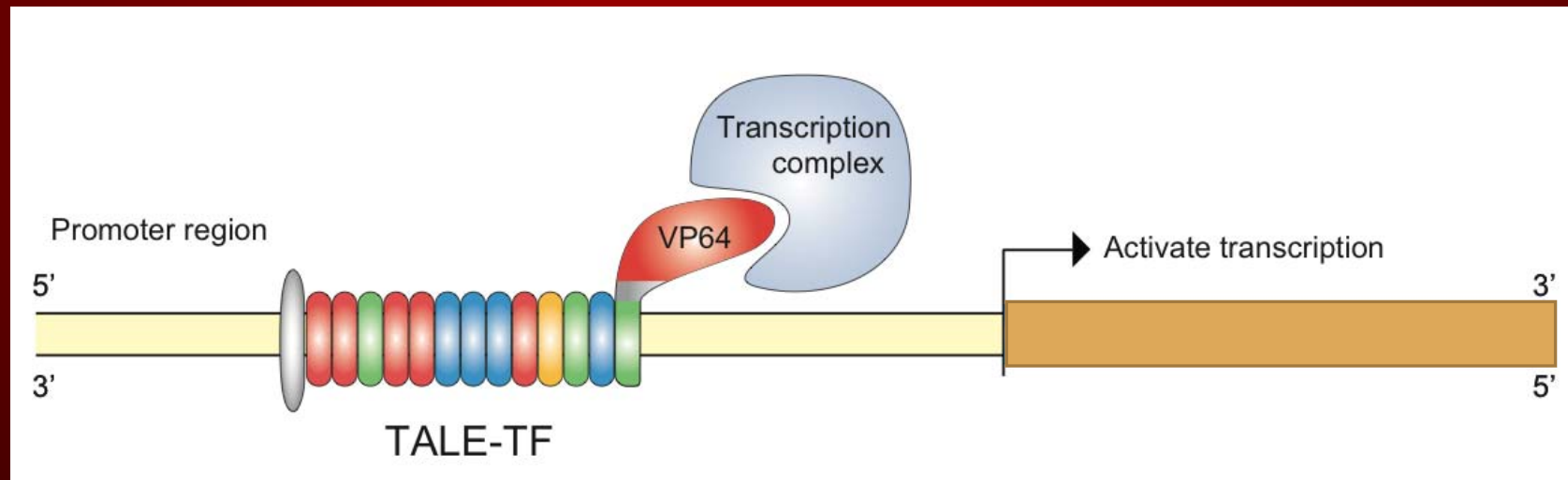
# TALENS

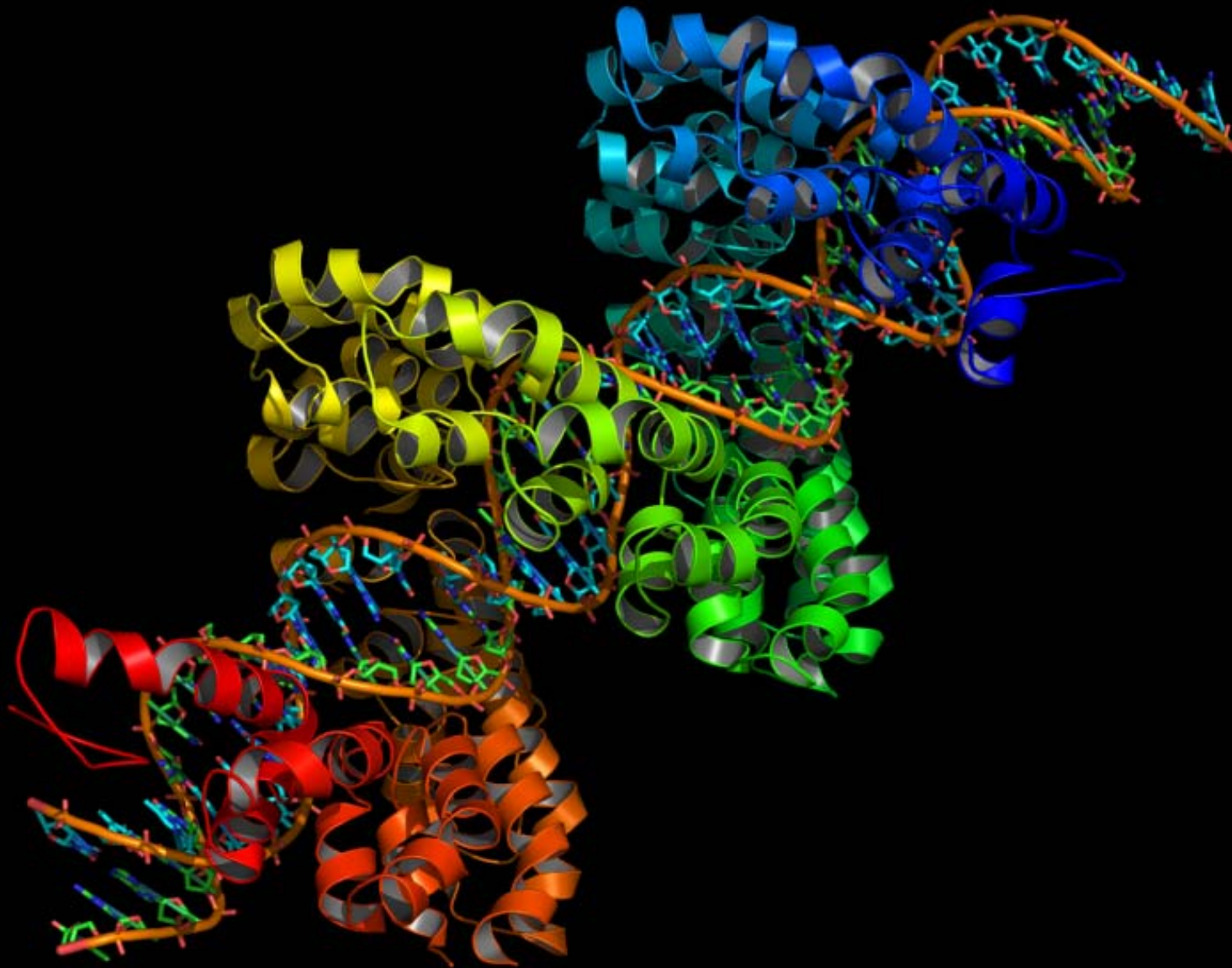
Transcription Activator Like Effector Nucleases



# TRANSCRIPTION ACTVATOR 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.



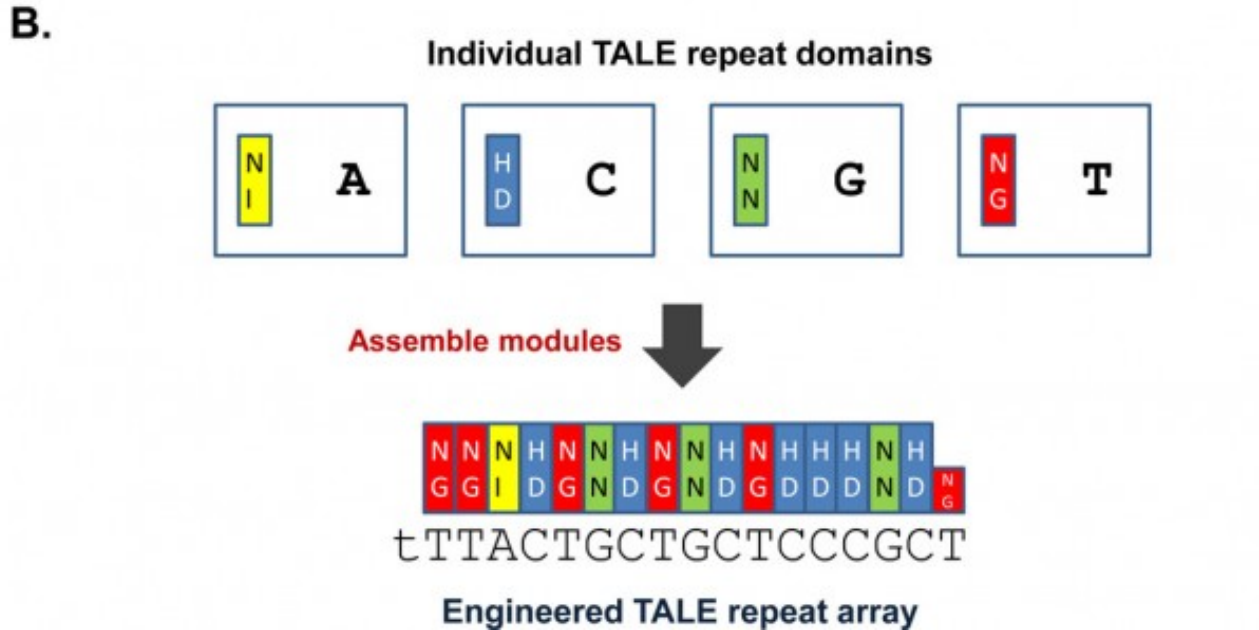


# INGENIERÍA DE TALEs

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

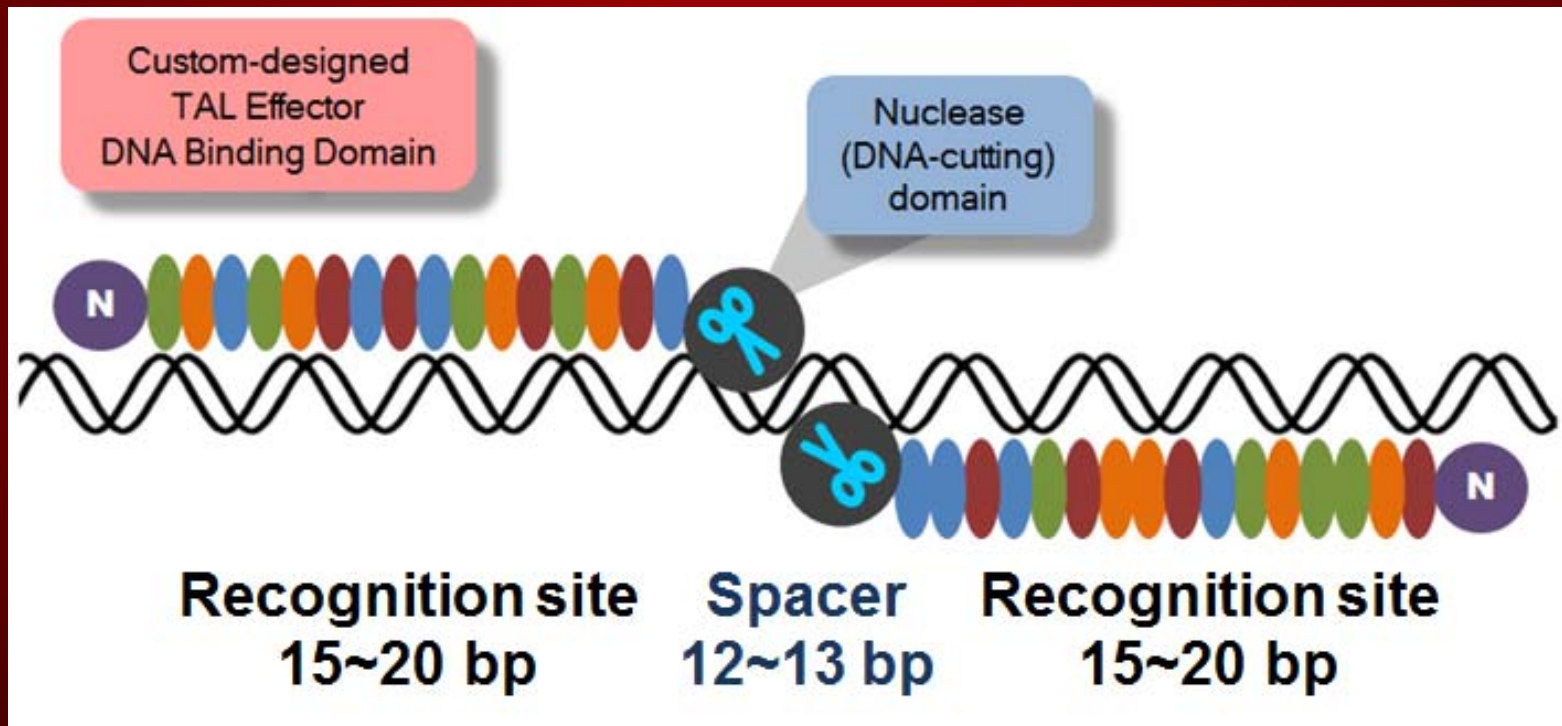
**THE TALE CODE**

Di-Amino acid	Nucleotide bound
NI	= A
NG	= T
HD	= C
NN	= G/A

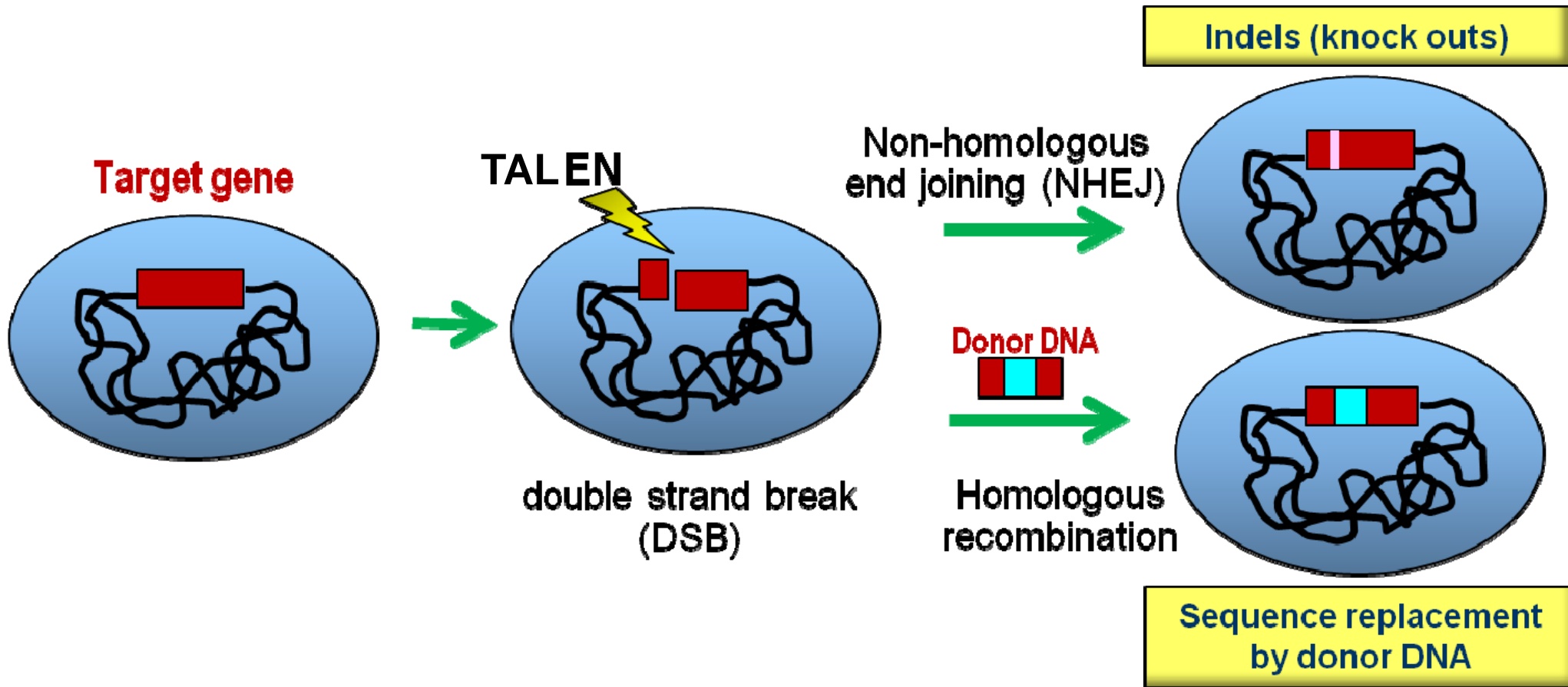


# INGENIERÍA DE TALEs

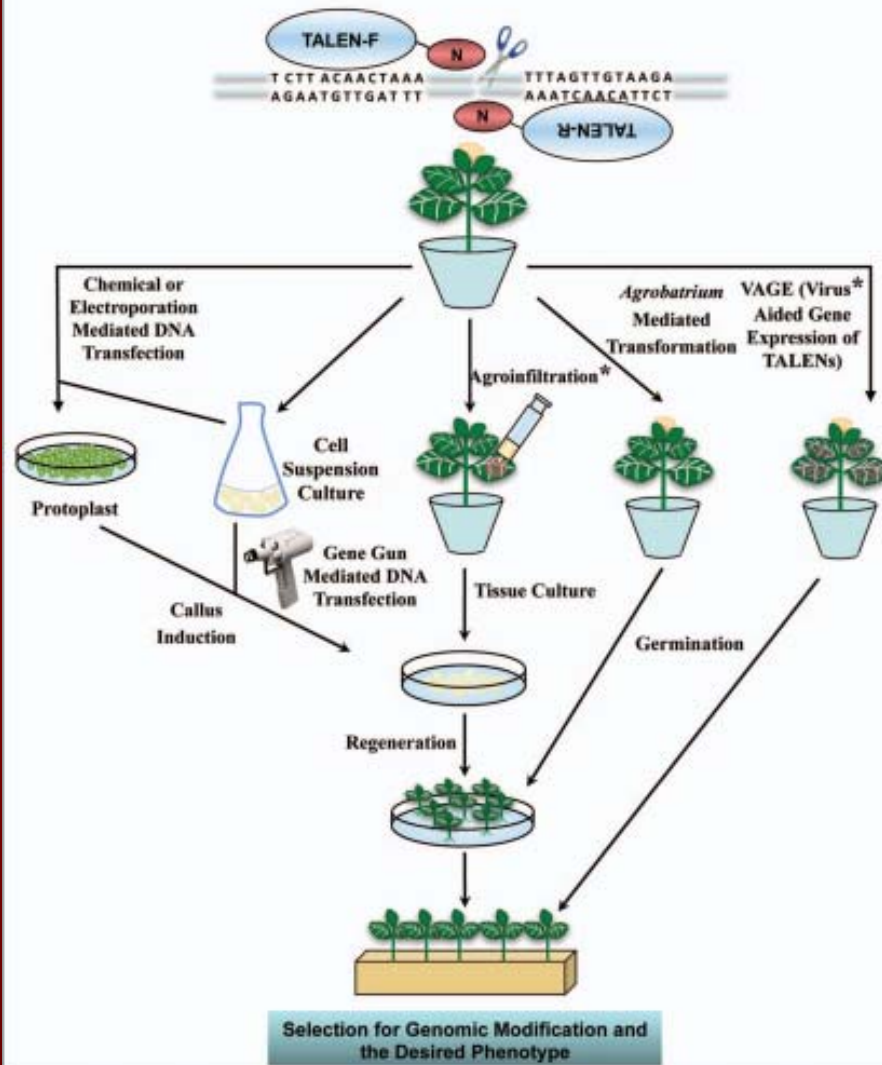
A la secuencia de TALEs personalizada se puede fusionar la nucleasa FokI para generar el dímero funcional de corte





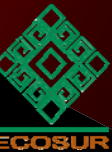


TALENs *in silico* Design, Synthesis and *in vitro* Assembly



# CRISPR / CAS9

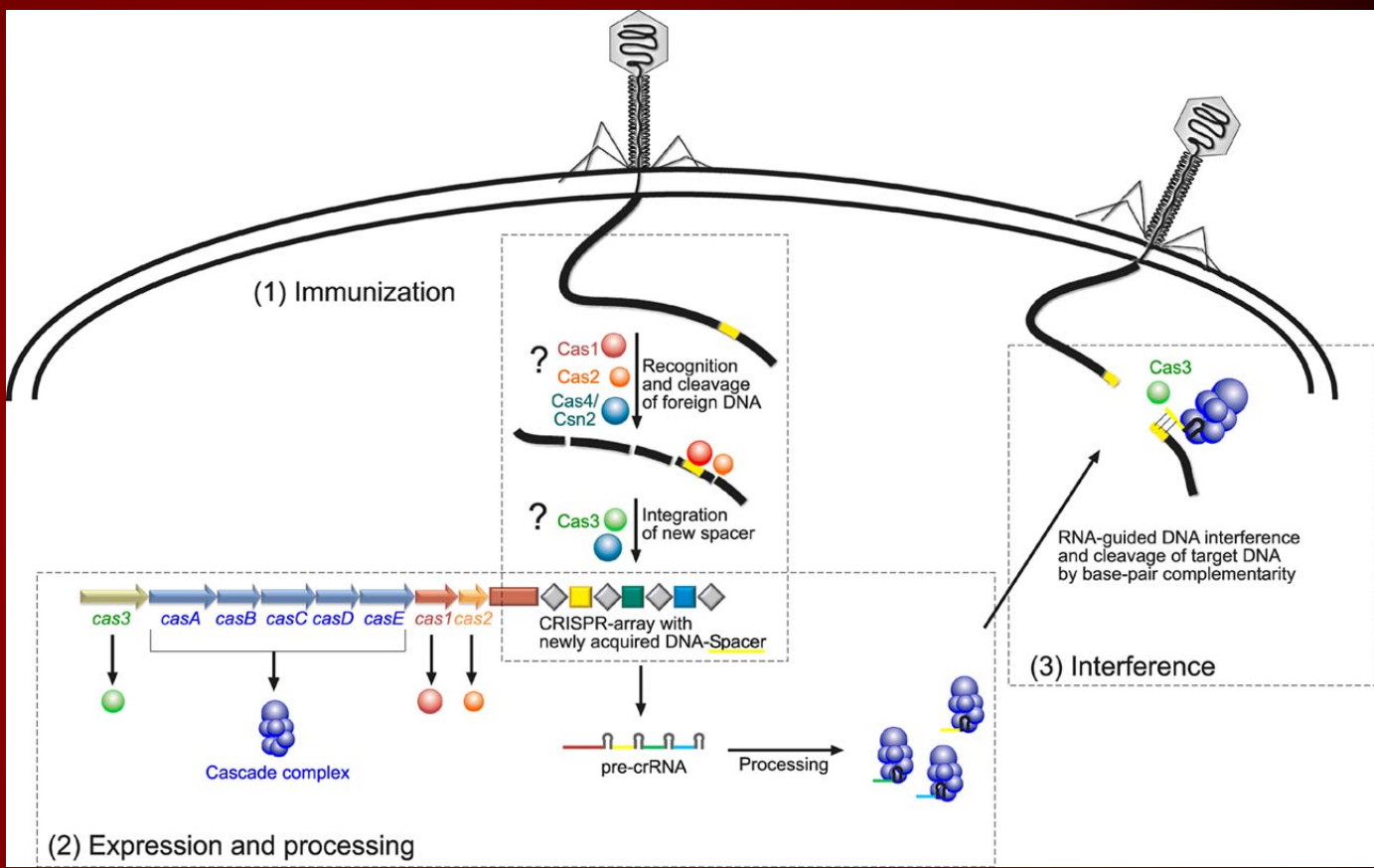
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats



# 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

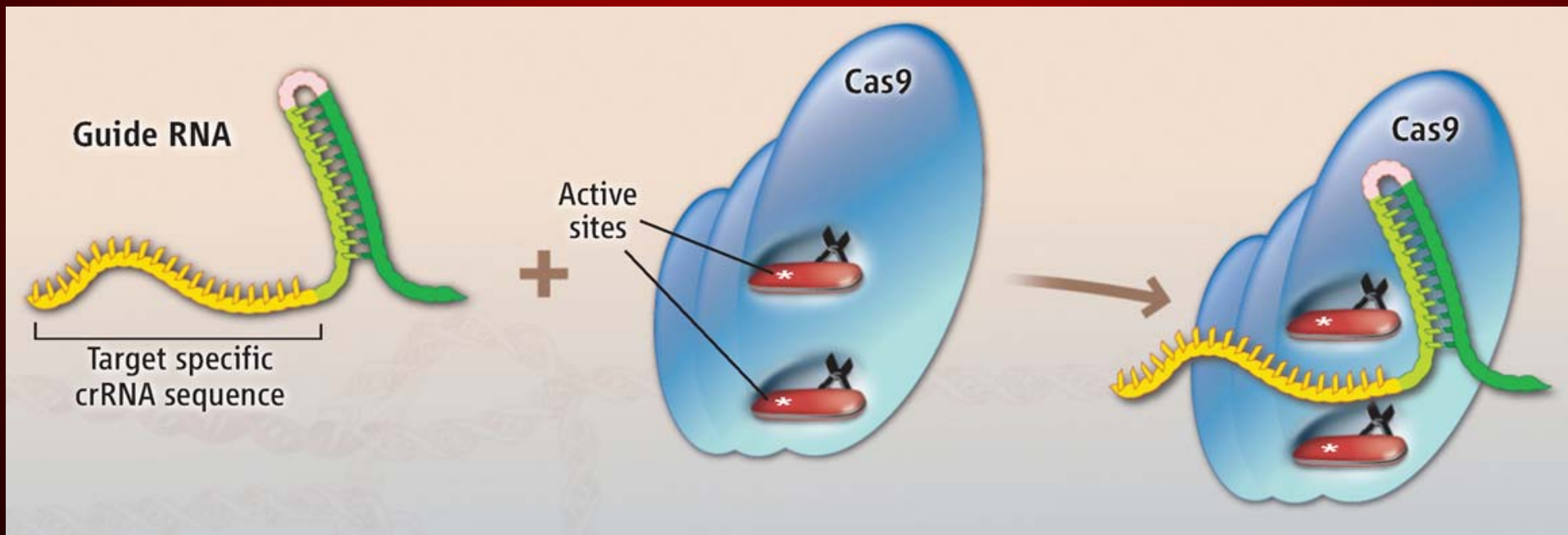


ECOSUR

# 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



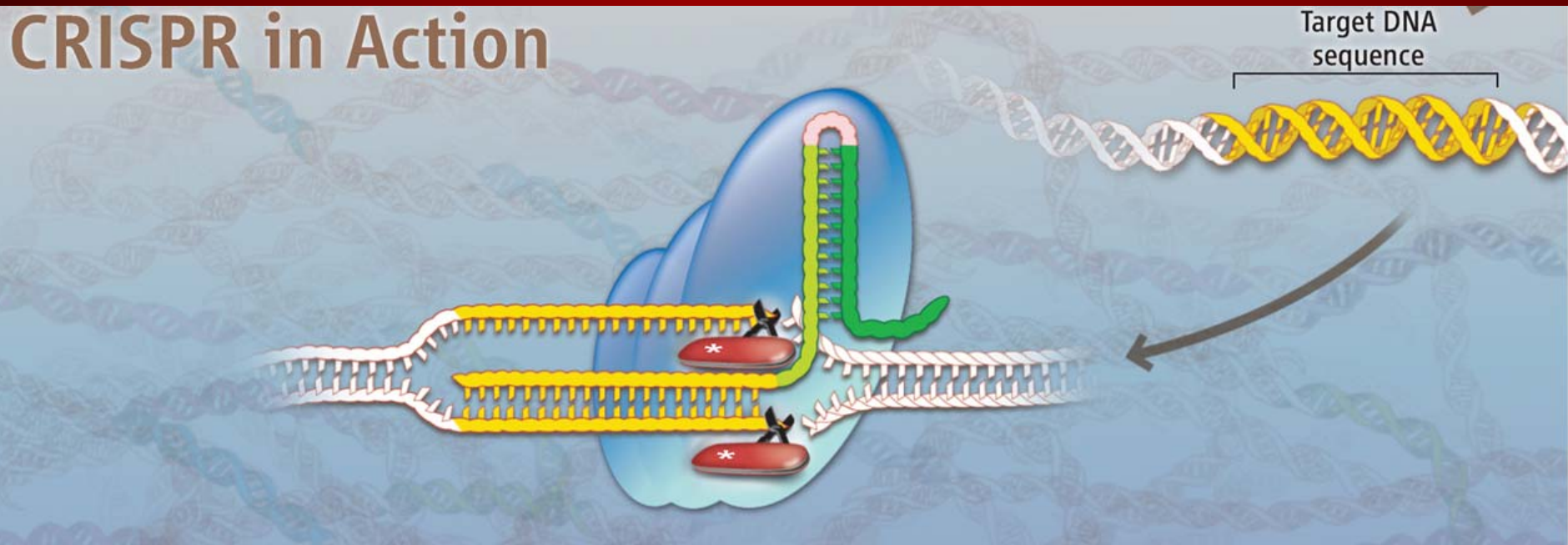


# ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA CRISPR / CAS9

El sistema CRISPR se compone de dos partes

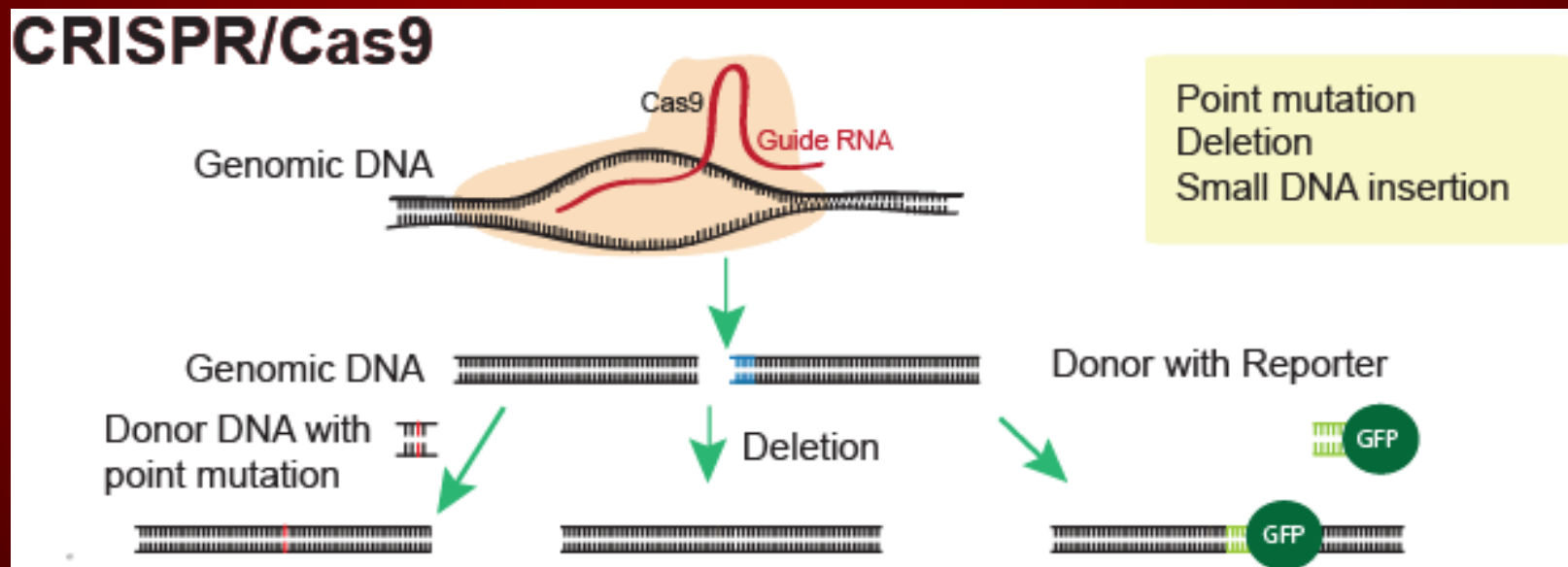
- 1) Un componente protéico CAS9 con actividad de nucleasa
- 2) Un RNA guía que brinda especificidad al sistema

## CRISPR in Action



# USO DE CRISPR / CAS9

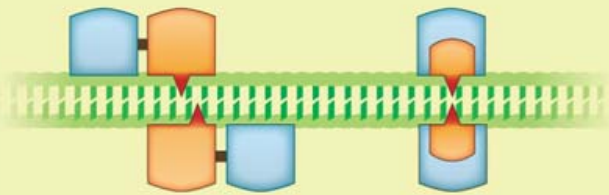
Al igual que en los sistemas anteriores la edición con CRISPR puede emplearse para generar mutaciones puntuales, deleciones o inserciones cortas



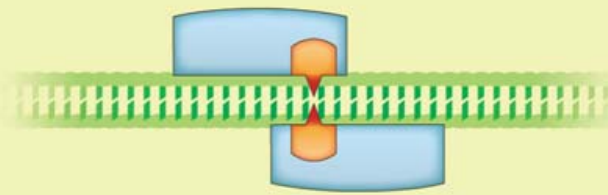
# EN RESUMEN

## NATURAL

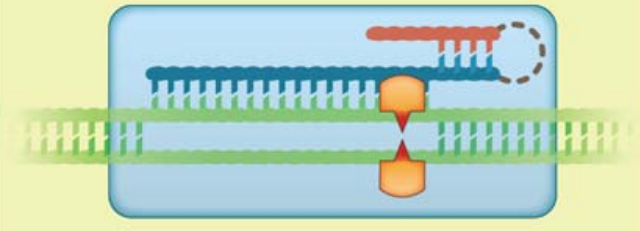
**A** Restriction nucleases



**B** Homing endonuclease

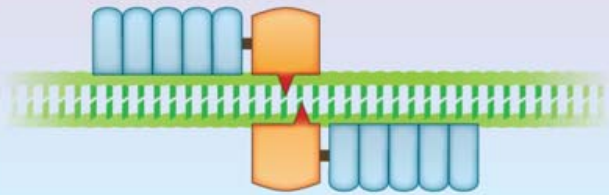


**C** CRISPR-associated nuclease

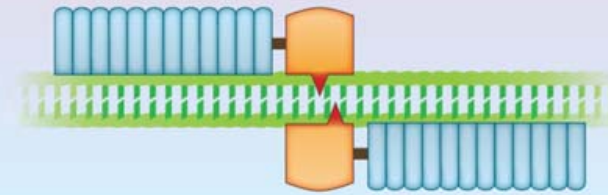


## SYNTHETIC

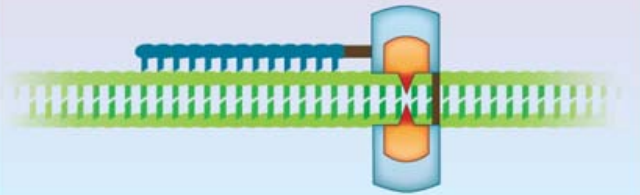
**D** Zinc finger nuclease



**E** TAL effector nuclease



**F** TFO nuclease





# OGMS EN DESARROLLO



ECOSUR

# 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 <sup>†</sup>	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

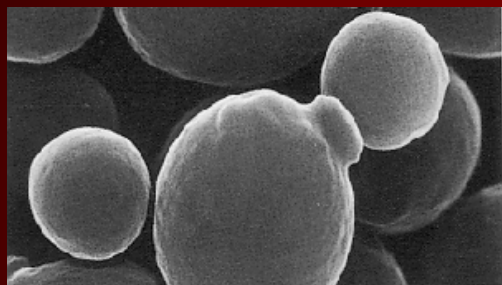




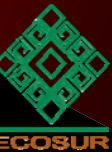
# ORGANISMOS EN DESARROLLO USANDO ZFN

Organism	Gene	ZFN development method*	Refs
<b>Gene correction</b>			
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 <sup>†</sup>	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
<b>Gene addition</b>			
K562 cells	<i>IL2RG</i>	Two-finger modules <sup>†</sup>	66
Human ES cells	<i>IL2RG, CCR5</i>	Two-finger modules <sup>†</sup>	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 <sup>†</sup>	75
Human tissue culture cells	<i>PPP1R12C</i> (AAVS1 locus)	Two-finger modules <sup>†</sup>	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



ECOSUR

# 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

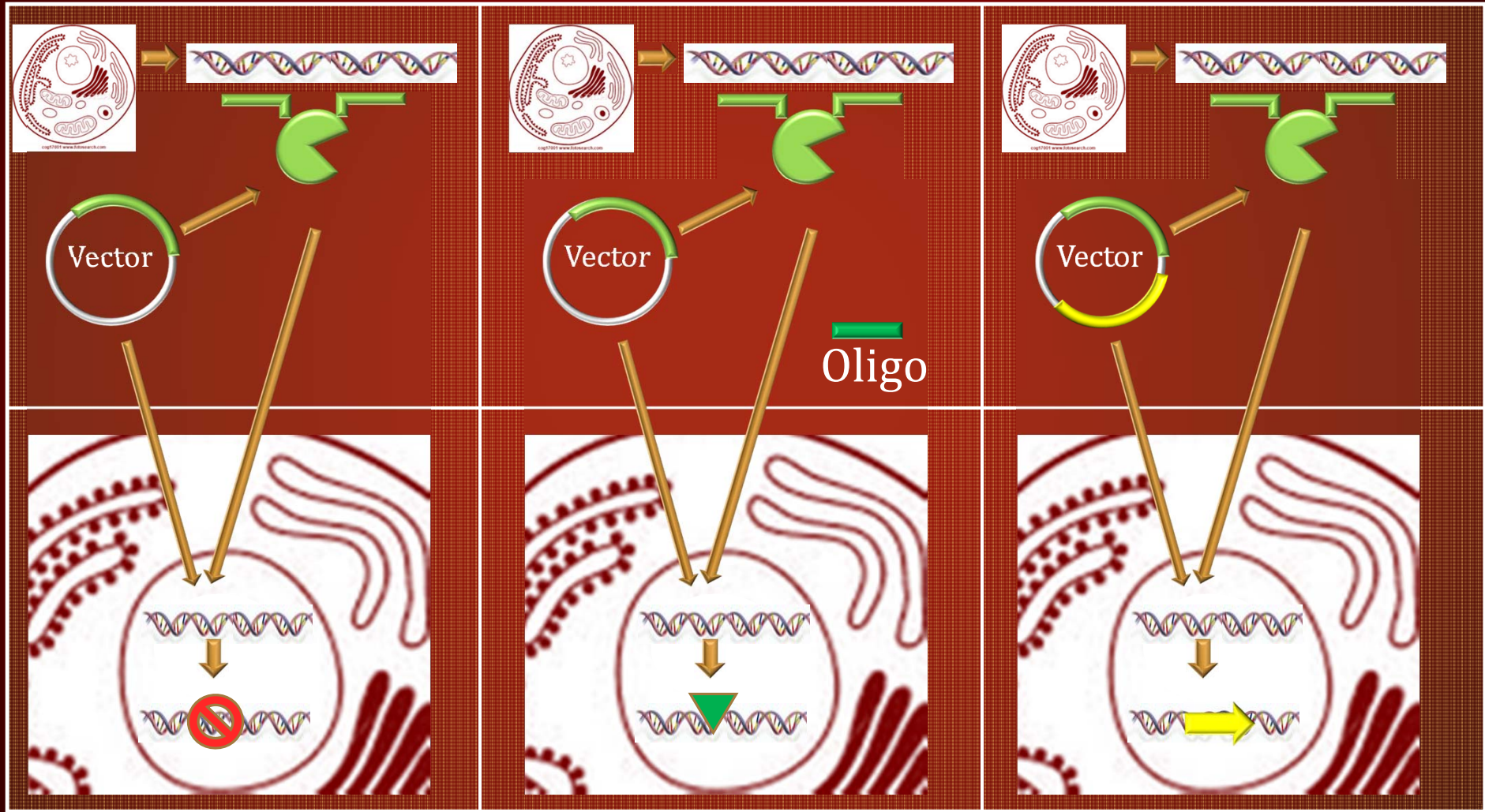


*In silico / in vitro*  
*In vivo*

### Modificación tipo 1

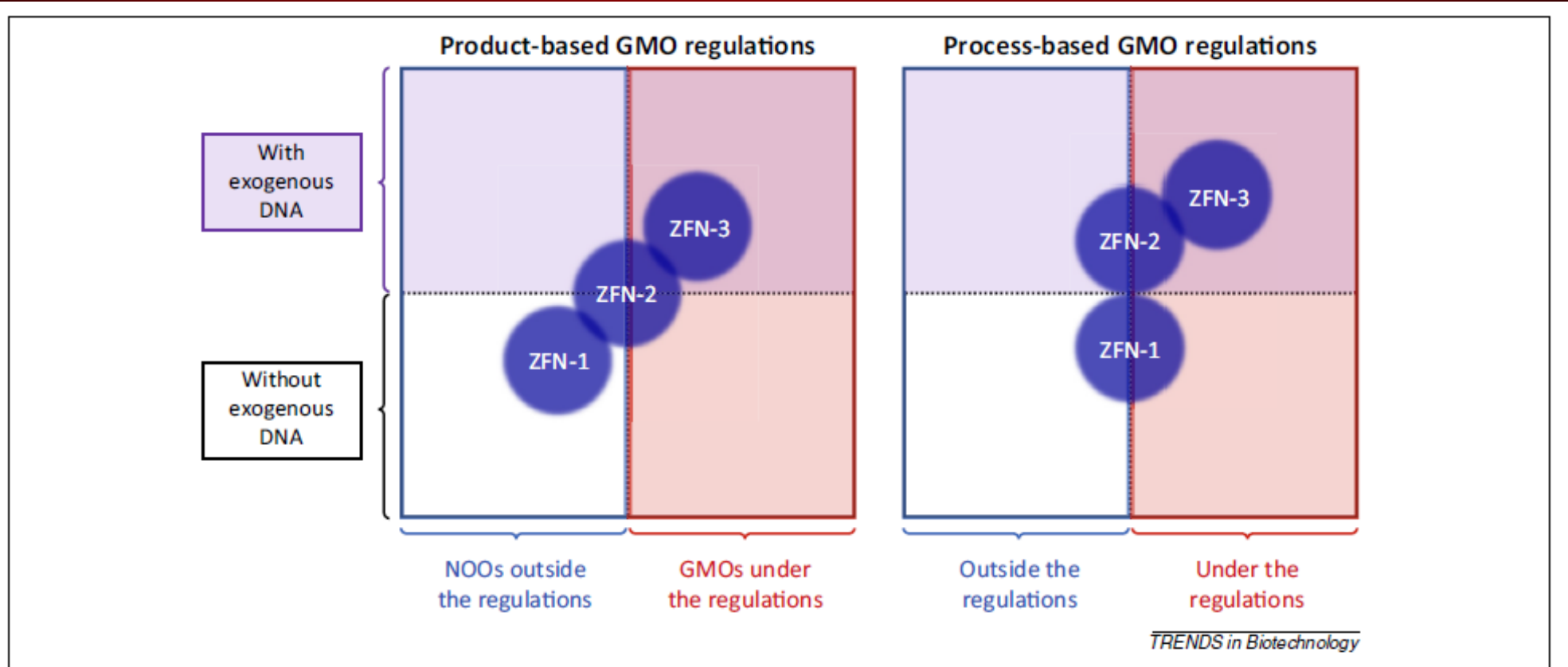
### Modificación tipo 2

### Modificación tipo 3



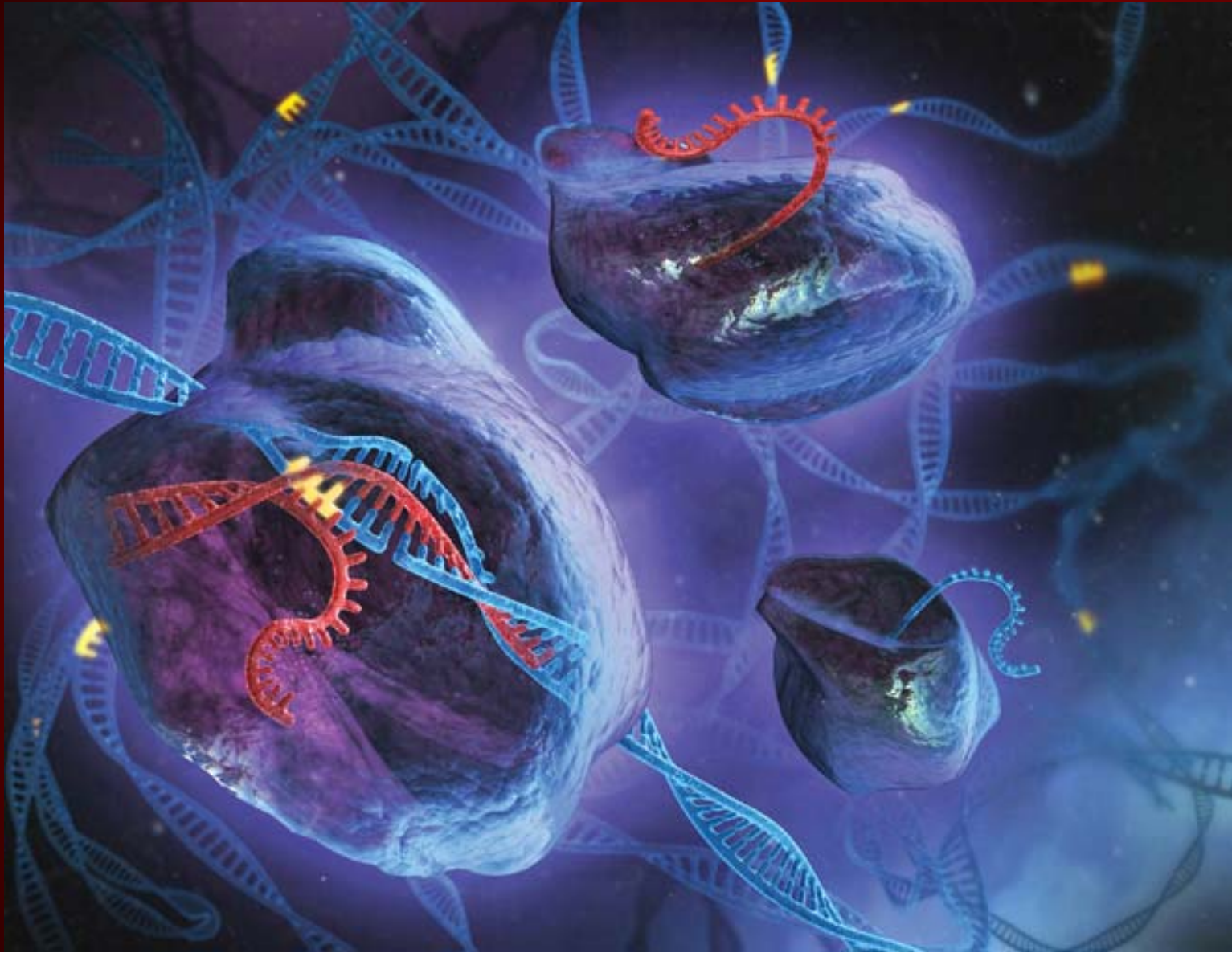


# UN PRIMER ACERCAMIENTO A LA REGULACIÓN



**Figure 1.** The presumed treatment of organisms modified with genome editing technology under genetically modified organism (GMO) regulations. The positions of zinc finger nuclease-1 (ZFN-1; site-specific random mutations involving one or a few base pairs without exogenous DNA), ZFN-2 (mutations and gene repair with short exogenous DNA), and ZFN-3 (transgenesis with long exogeneous DNA) (Box 1) are mapped in the product-based or the process-based regulations for GMOs or naturally occurring organisms (NOOs). In this analysis, the form of genome editing enzymes is presumed to be protein or RNA, not DNA.





ECOSUR



POR SU ATENCIÓN, MUCHAS GRACIAS!!!

Yuri Jorge Peña Ramírez

Contacto:

Correo electrónico: [ypena@ecosur.mx](mailto:ypena@ecosur.mx)

Teléfono: 981 1273720 ext 2306

Web personal [www.cultivo.com.mx](http://www.cultivo.com.mx)

Twitter: @Biotec\_Forestal