

Pasado, presente y futuro de la Edición Genómica

Aplicaciones de la Ingeniería Genética

Febrero de 2018

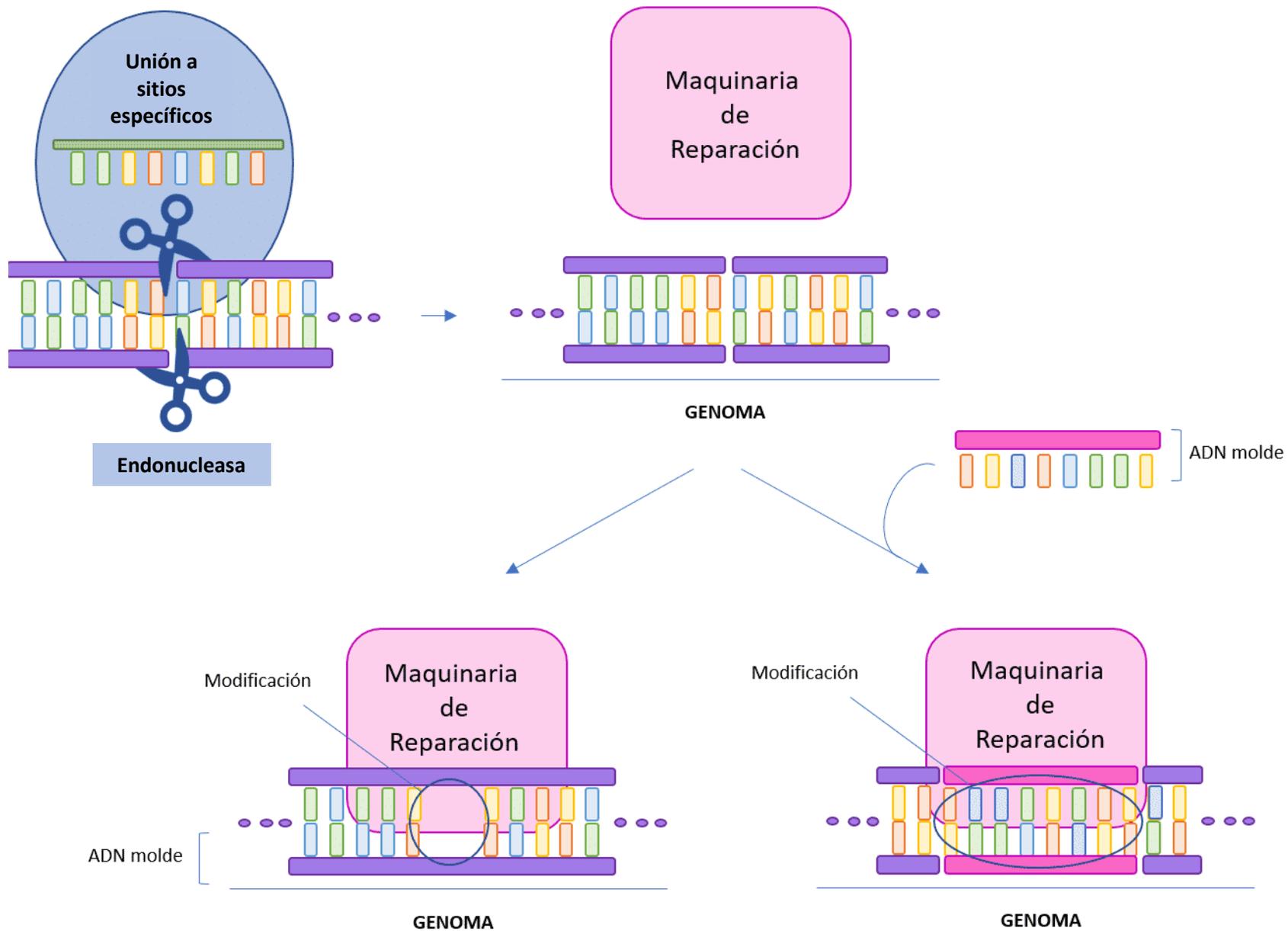
Máster en Genética y Evolución
(Especialidad Agroalimentaria)

Edición génica

Uso de un sistema enzimático para modificar el ADN directamente dentro de la célula.



La edición génica fue usada para desarrollar una canola tolerante a herbicida para ayudar a los agricultores a controlar las malezas.



Nucleasas de Dedos de Zinc, ZFNs (*Zinc finger nucleases*)



Dominio **Fok I** que produce **cortes** en la doble cadena de ADN

Dominio **ZFN** que reconoce sitios específicos de ADN a los que se une



Sitio de reconocimiento de 3 pb por cada dedo de zinc

TALEN: transcription activator-like effectors nucleases

nature | **methods**

2011

Method of the Year

**Genome Editing with
Engineered Nucleases**



PROTOCOL

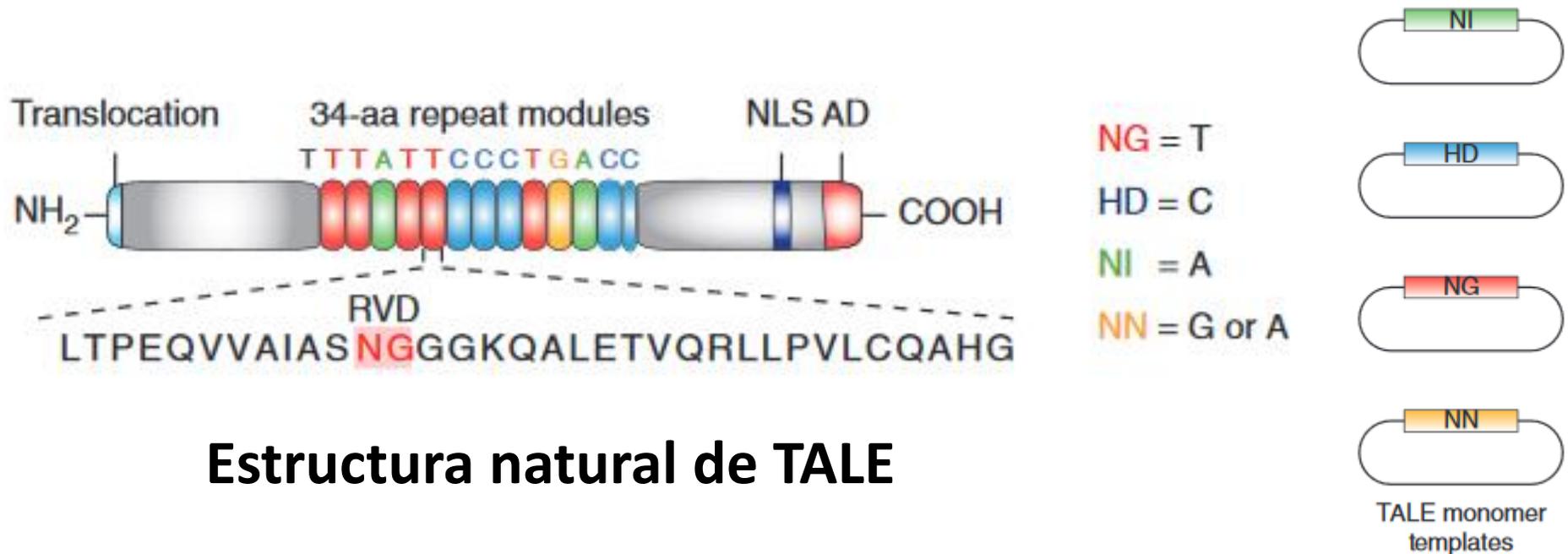
A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering

Neville E Sanjana^{1,2,4}, Le Cong¹⁻⁴, Yang Zhou^{1,2,4}, Margaret M Cunniff^{1,2}, Guoping Feng^{1,2} & Feng Zhang^{1,2}

¹Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA. ²Department of Brain and Cognitive Sciences, McGovern Institute for Brain Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA. ³Program in Biological and Biomedical Sciences, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ⁴These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to F.Z. (zhang_f@mit.edu).

TALEN: transcription activator-like effectors nucleases

- Descubrimiento asociado a *Xanthomonas*
- Factores de **unión específica a genes diana**, cuya expresión son capaces de regular. Esto facilita la infección bacteriana.

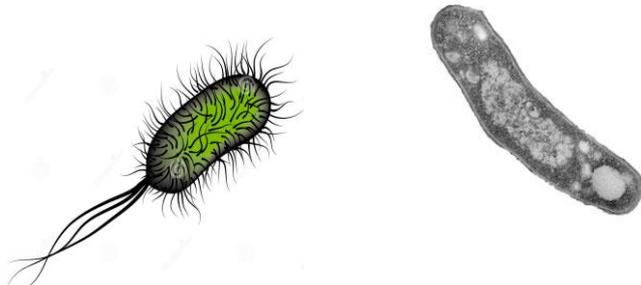


Estructura natural de TALE

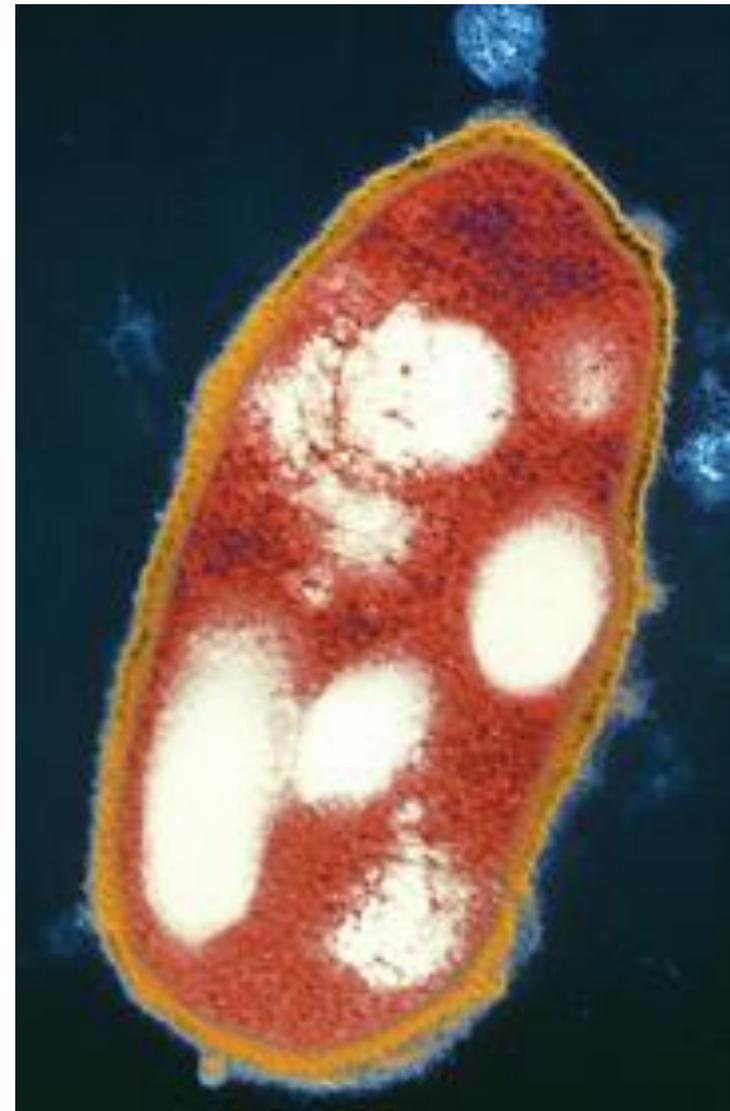
Código TALE

SRSR, “Short Regularly Spaced Repeats”.

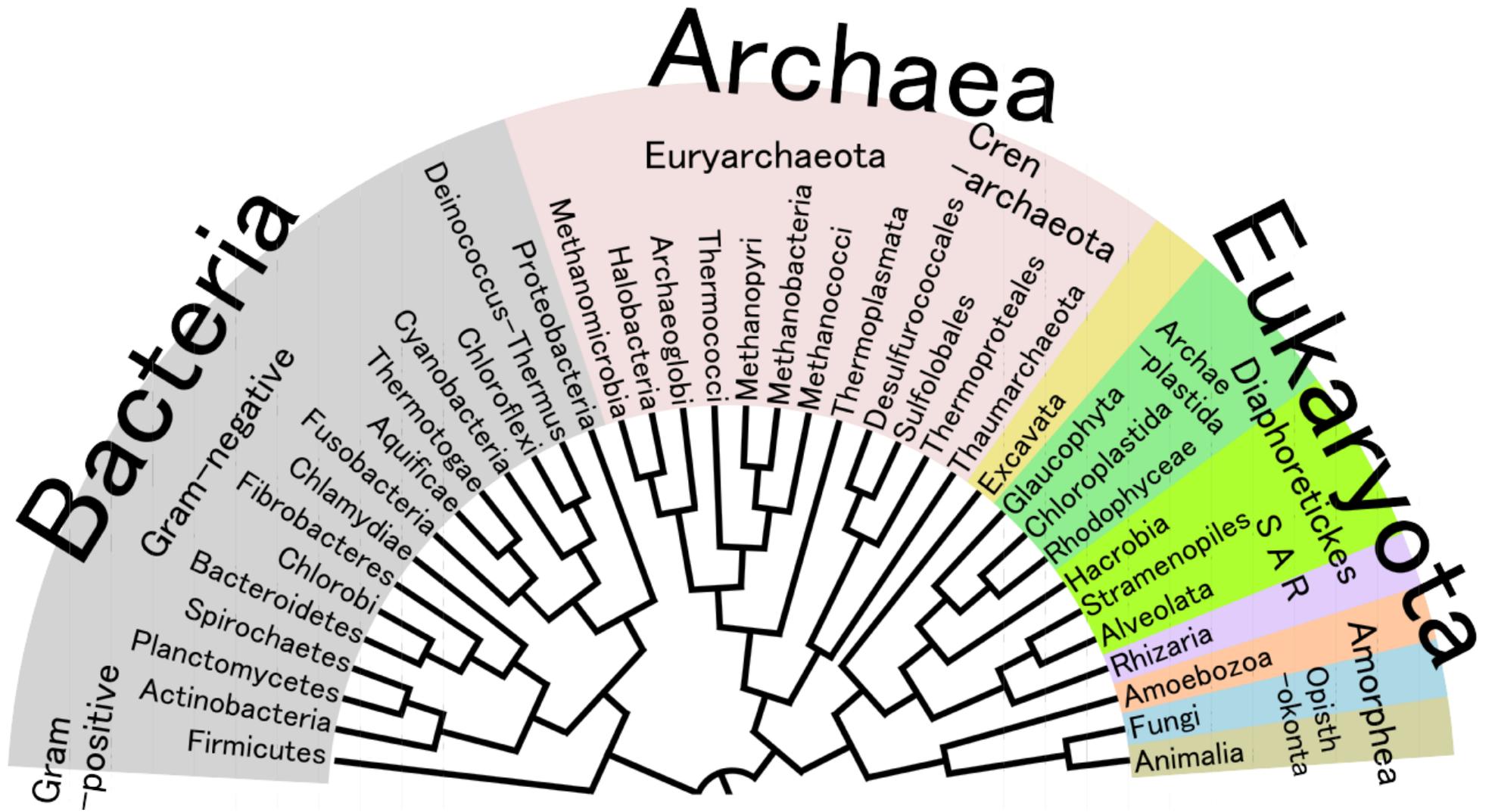
"Encontré unas secuencias repetidas en su genoma. Tenían que ser importantes para las células, porque muchas se morían cuando las manipulábamos [...] comprendí que debían cumplir una función importante para la célula"
(Mojica)



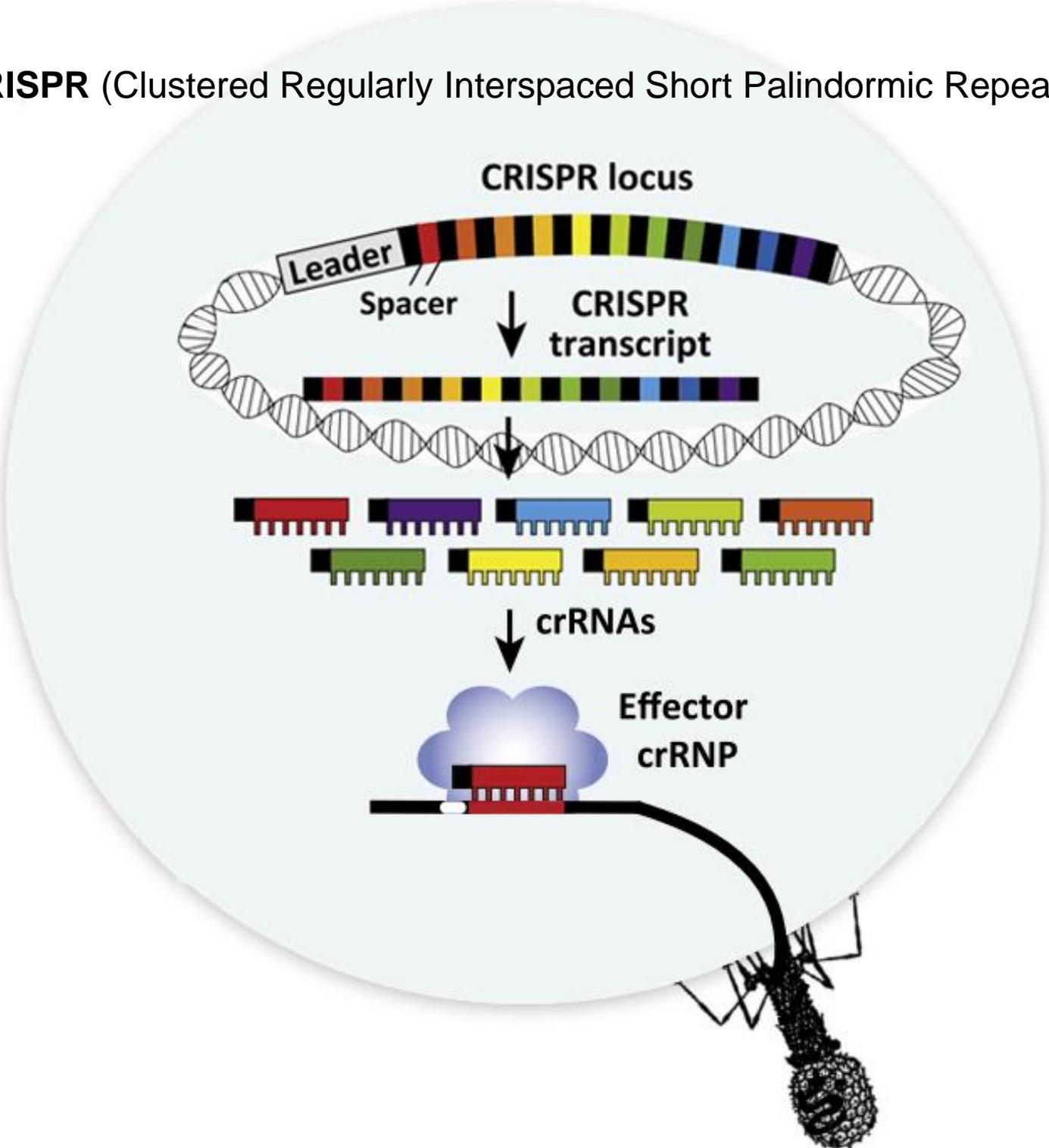
Posteriormente encontradas en *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis*



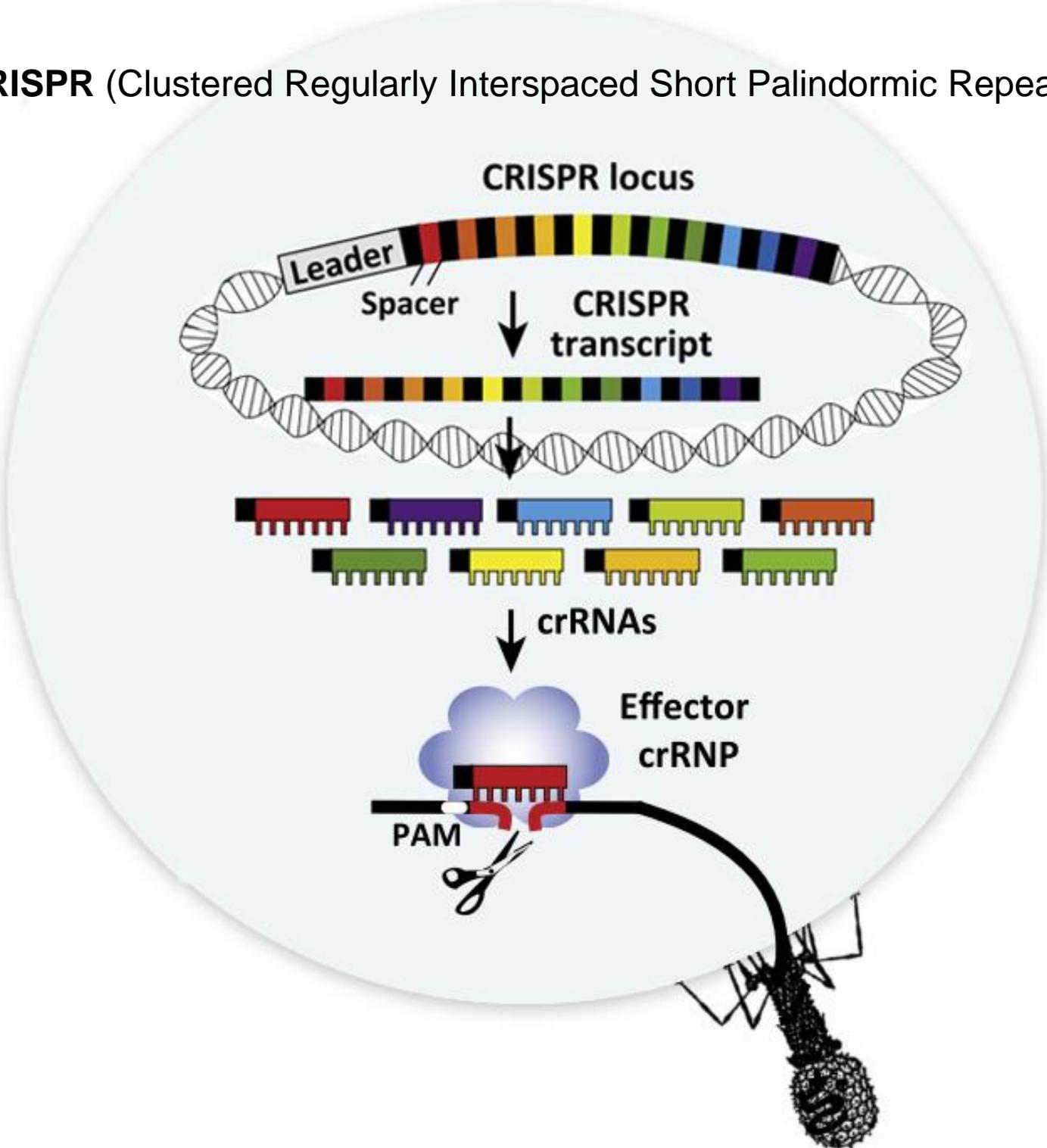
Arquea *Haloferax mediterranei*



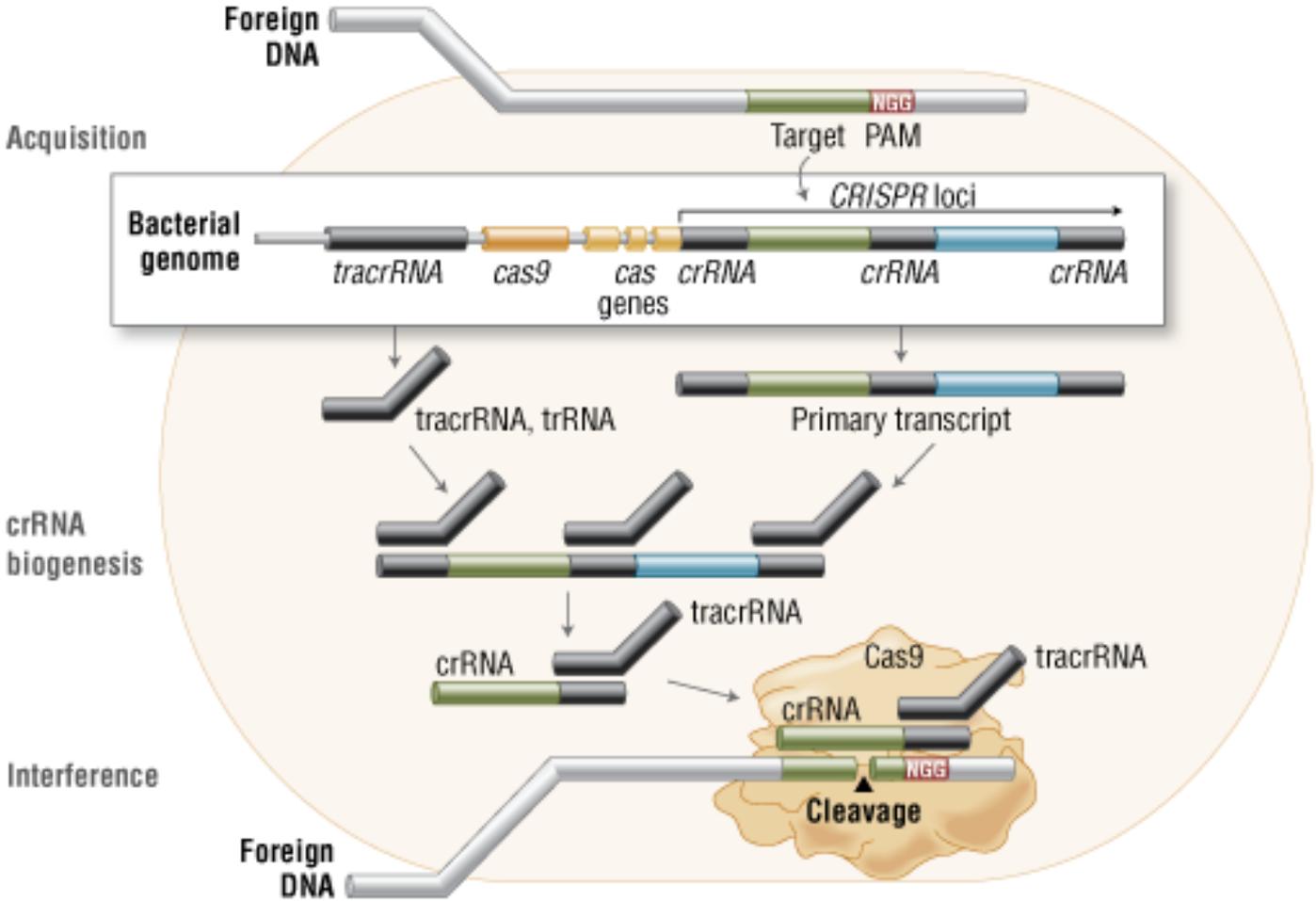
CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)



CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)



CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)



CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

sgRNA: (*single-guide RNA*) Consta de dos partes:

- Región variable, **crRNA:** (*CRISPR RNAs*) Región complementaria al gen target, normalmente de unos 20 nucleótidos.
- Región constante, **tracrRNA:** (*trans-activating crRNA*). Tiene una región complementaria a crRNA. Es la secuencia de unión a Cas9.

PAM: (*Protospacer adjacent motif*) motivo de 2-6 pb que se encuentra inmediatamente después del gen de interés. Su secuencia depende del tipo de bacteria de la que se aísle Cas9 (NGG para *S. pyogenes*). Cas9 provoca una rotura de doble cadena ~3 pb aguas arriba de PAM.

- **(2003)** Mojica (izquierda) descubre que CRISPR es un sistema inmunitario con el que las bacterias se protegen de las infecciones víricas.



- **(2012)** Charpentier y Doudna (derecha) identifican los elementos mínimos de CRISPR con los que se puede cortar el ADN, abriéndose así la puerta a la **edición de genomas** (el llamado “*corta y pega genético*”).

CRISPR en Ingeniería Genética

Journal List > RNA Biol > v.10(5); 2013 May 1 > PMC3737341



RNA Biol. 2013 May 1; 10(5): 841–851.

PMCID: PMC3737341

Published online 2013 Mar 27. doi: [10.4161/rna.24203](https://doi.org/10.4161/rna.24203)

crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*

Tautvydas Karvelis,^{1,†} Giedrius Gasiunas,^{1,†} Algirdas Miksys,¹ Rodolphe Barrangou,² Philippe Horvath,³ and Virginijus Siksnys^{1,*}

[Author information](#) ▶ [Article notes](#) ▶ [Copyright and License information](#) ▶

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

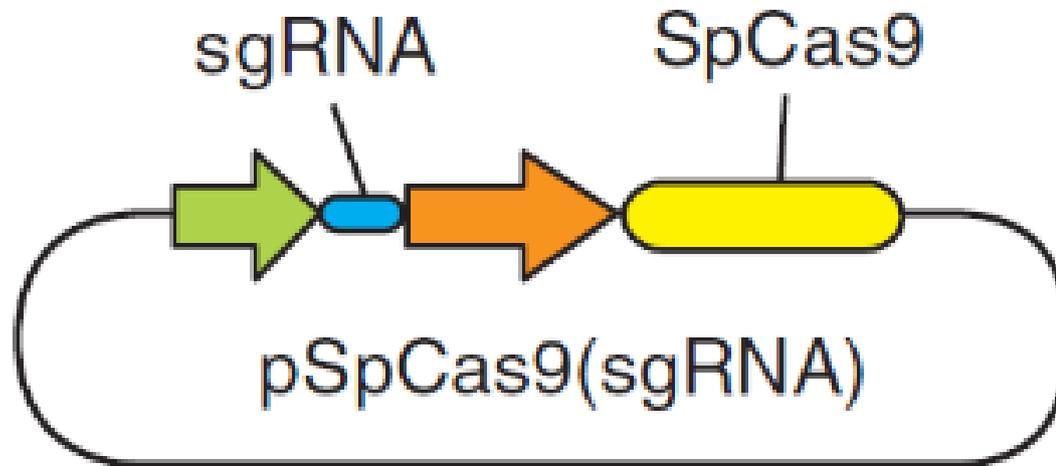
Abstract

Go to:

The Cas9-crRNA complex of the *Streptococcus thermophilus* DGCC7710 CRISPR3-Cas system functions as an RNA-guided endonuclease with crRNA-directed target sequence recognition and protein-mediated DNA cleavage. We show here that an additional RNA molecule, tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA), co-purifies with the Cas9 protein isolated from the heterologous *E. coli* strain carrying the *S. thermophilus* DGCC7710 CRISPR3-Cas system. We provide experimental evidence that tracrRNA is required for Cas9-mediated DNA interference both in vitro and in vivo. We show that Cas9 specifically promotes duplex formation between the precursor crRNA (pre-crRNA) transcript and tracrRNA, in vitro. Furthermore, the housekeeping RNase III contributes to primary pre-crRNA-tracrRNA duplex cleavage for mature crRNA biogenesis. RNase III, however, is not required in the processing of a short pre-crRNA transcribed from a minimal CRISPR array containing a single spacer. Finally, we show that an in vitro-assembled ternary Cas9-crRNA-tracrRNA complex cleaves DNA. This study further specifies the molecular basis for crRNA-based re-programming of Cas9 to specifically cleave any target DNA sequence for precise genome surgery. The processes for crRNA maturation and effector complex assembly established here will contribute to the further development of the Cas9 re-programmable system for genome editing applications.

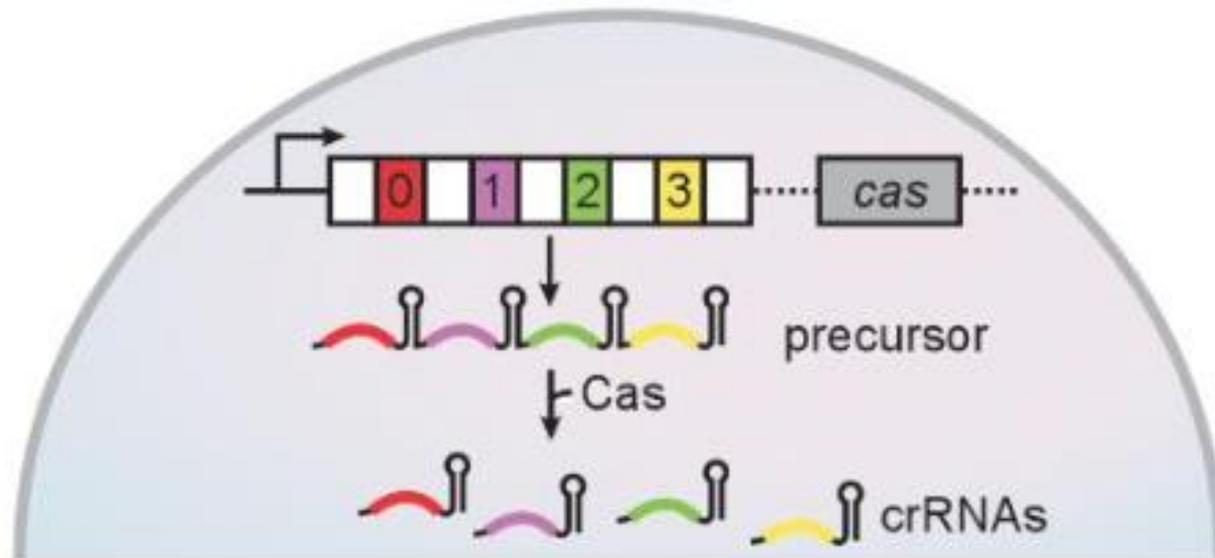
Keywords: CRISPR, DNA silencing, Type II CRISPR-Cas systems

CRISPR en Ingeniería Genética



Especificidad y customización

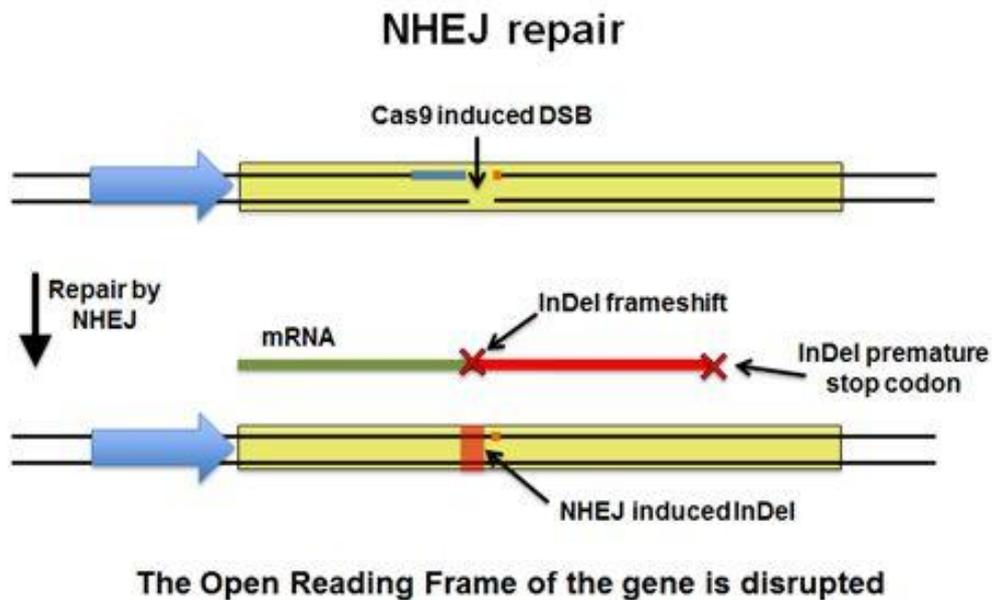
CRISPR en Ingeniería Genética



Edición simultánea de varios genes

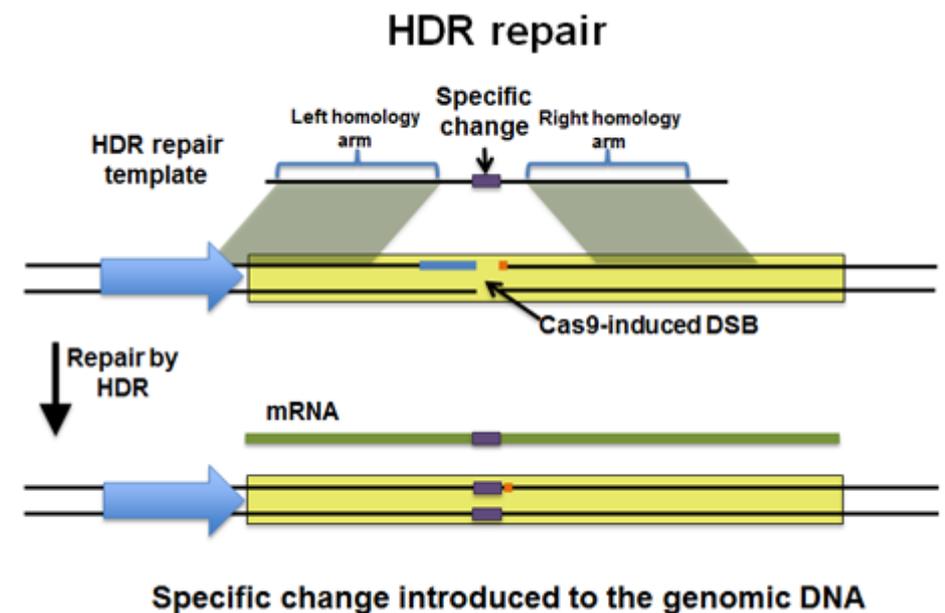
Inserciones/deleciones (Knock outs)

NHEJ: (Non-homologous end joining)
Recombinación No Homóloga. Los extremos de las dobles roturas se ligan sin la intervención de un ADN molde.

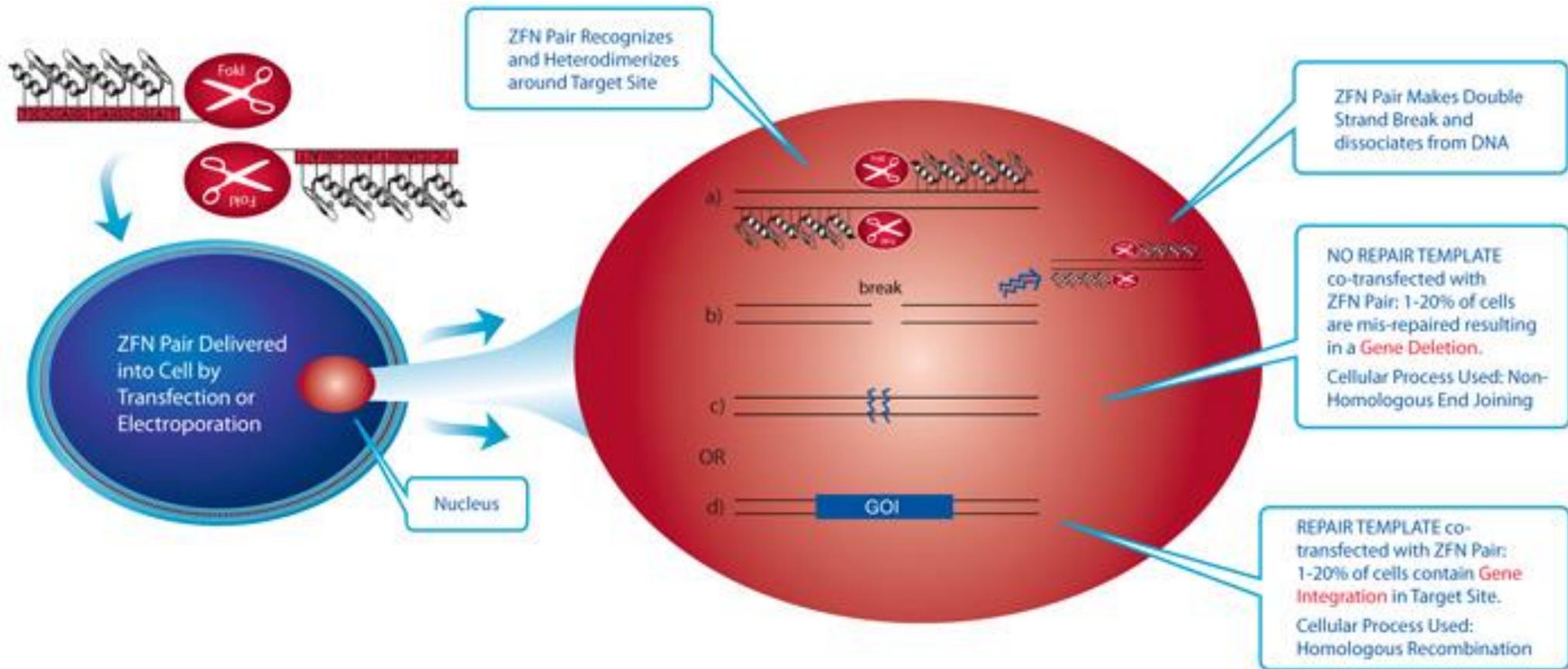


Cambios Precisos en el ADN

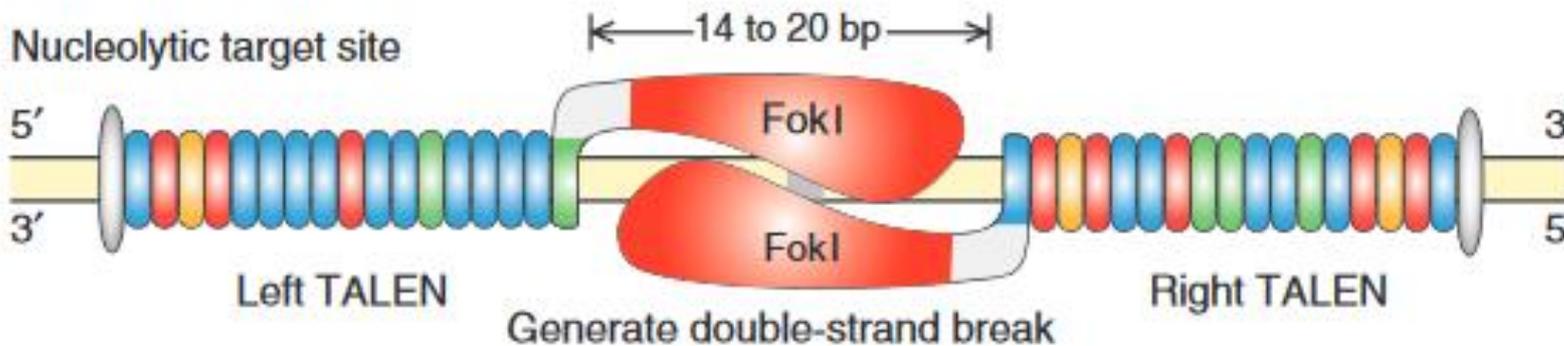
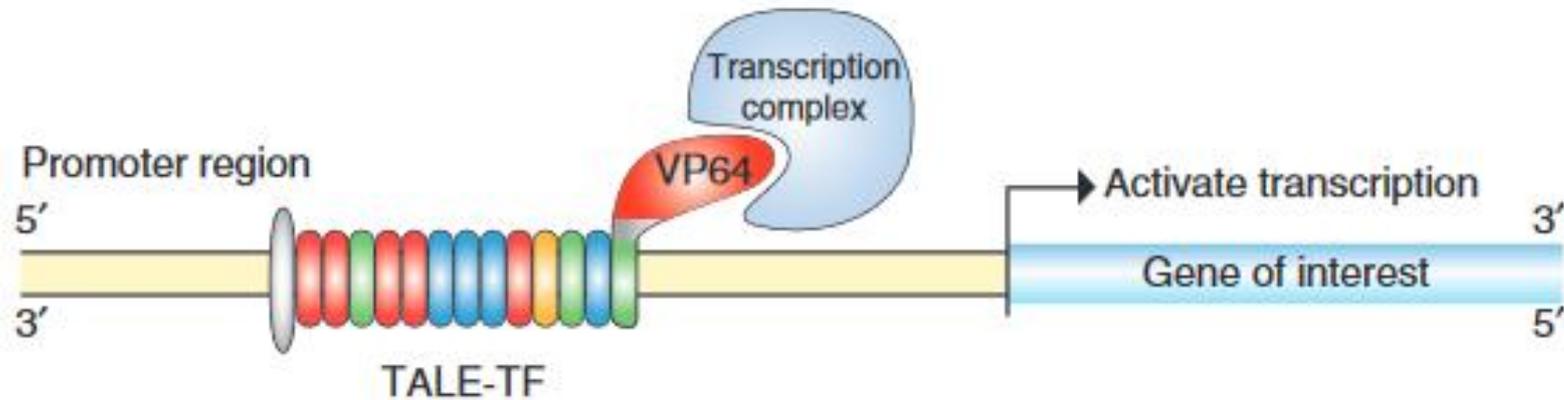
HDR: (*Homology Directed Repair*) o
Recombinación Homóloga. Las dobles roturas se reparan utilizando un ADN homólogo como molde.



Delección de genes o edición genómica



Modulación de la transcripción o edición genómica



Tipos de “delivery”

- Vector viral
- Liposomas
- Agrobacterium
- ADN desnudo

Electroporadores de última generación



https://www.youtube.com/watch?v=ko_MKurxRO8



<http://www.lonza.com/genome-editing>

Características principales de los nuevos sistema de edición génica

	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
Nuclease	Fok1	Fok1	Cas9
DNA binding molecule	ZF Protein	TALE protein	GuideRNA (gRNA)
Type	Fusion protein → High effort to modify for new targeting site	Fusion protein → High effort to modify for new targeting site	Protein + RNA → Easy to modify → Multiple targeting possible
Binding sites	2 sites (15 or 18 bp each) → High specificity → Low risk for off-target effects	2 sites (\geq 13 bp each) → High specificity → Low risk for off-target effects	1 site (18-20 bp + 3bp PAM) → Lower specificity → Higher risk for off-target effects

Especies	Modificaciones ADN	Nucleasas	Targets	Referencias
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Mutación (SDN-1)	TALEN	OsBRI1, OsDEP1	Chen et al., <i>Methods</i> . 69:2-8, 2014
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Gen OsSWEET14	Li et al., <i>Nat. Biotechnol.</i> 30, 390–392, 2012
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Genes OsDEP1, OsBADH2, OsCKX2, OsSD1	Shan et al., <i>Mol. Plant</i> 6, 1365–1368, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Os MPK5	Xie & Yang, <i>Mol. Plant</i> 6, 1975–1983, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsCAO1, OsLAZY1	Miao et al., <i>Cell Res.</i> 23, 1233–1236, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Familia de genes OsCDK	Endo et al. <i>in Rice</i> . 1, 1–7, 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsSWEET11/14	Jiang et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 41, e188–e188, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsPDS, OsBADH2, Os02g23823, OsMPK2	Shan et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> 31, 686–688, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsROC5, OsSPP, OsYSA	Feng et al. <i>Cell Res.</i> 23, 1229–1232, 2013
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsPDS, PMS3, EPSPS, DERF1, SH1, MYB5, MYB1, ROC5, SPP, YSA	Zhang et al. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 1–11., 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Genes OsSWEET11/13/1a/1b	Zhou et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 42, 10903–10914, 2014.
	Gran deleción (SDN-1)	CRISPR/Cas	Clusters de genes relacionados con diterpenos de labdano. On Chr 2, 4, 6	Zhou et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 42, 10903–10914, 2014
	Sustitución de genes (SDN-2)	ZFN	Gen IPK1	Shukla et al. <i>Nature</i> 459, 437–441, 2009
	Sustitución de genes (SDN-2)	CRISPR/Cas	Gen PDS	Shan et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> 31, 686–688, 2013

Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	Mutación (SDN-1)	Meganucleasa (I-SceI)	Transgén	Yang et al., 2009
	Mutación (SDN-1)	Meganucleasa (I-CreI*)	Secuencia intergénica (adyacente al promotor del gen <i>liguleless 1</i>)	Gao et al. <i>Plant J.</i> 61, 176–187, 2010
	Mutación (SDN-1)	Meganucleasa (I-CreI*)	Gen ZmMS26	Djukanovic et al. <i>Plant J.</i> 76, 888–899, 2010
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Genes ZmPDS, ZmIPK1A, ZmIPK, Zm MRP4	Liang et al. <i>J. Genet. Genomics</i> 41, 63–68, 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Gen ZmIPK	Liang et al. <i>J. Genet. Genomics</i> 41, 63–68, 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Gen ZmHKT1	Xing et al., 2014
	Inserción gen (SDN-3)	ZFN	TLPs (inserción de tolerancia a los herbicidas AAD1 y genes PAT).	Ainley et al. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 11, 1126–1134, 2013
Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L.)	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Transgén (DsRED2)	Jiang et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 41, e188–e188, 2013
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Mutación (SDN-1)	TALEN	Gen TaMLO	Wang et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> 1–6, 2014
	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Gen TaMLO	Shan et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> 31, 686–688, 2013

Cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	Mutación (SDN-1)	TALEN	Gen PAPHy_a	Wendt et al. <i>Plant Mol. Biol.</i> 83, 279–285, 2013
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Transgén	Gurushidze et al. <i>PLoS One</i> 9, 1–9, 2014
<i>Brachypodium distachyon</i> L.	Mutación (SDN-1)	TALEN	Genes BdABA1, CKX2, SMC6, SPL, SBP, COI1, RHT, HTA1	Shan et al. <i>Mol. Plant</i> 6, 1365–1368, 2013
Haba de soja (<i>Glycine max</i> L.)	Mutación (SDN-1)	ZFN	Genes GmDCL1a/b, DCL4a/b, RDR6a, HEN1a, transgén	Curtin et al. <i>Plant Physiol.</i> 156, 466–473, 2011
	Mutación (SDN-1)	TALEN	Genes GmFAD2-1A/B	Haun et al. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 1–7., 2014
Algodón (<i>Gossypium</i> sp.)	Inserción gen (SDN-3)	Meganucleasa (I-CreI*)	Secuencia intergénica, junto a un locus Bt pre-existente (inserción de hppd, epsps)	D'Halluin & Ruiters, <i>Int. J. Dev. Biol.</i> 57, 621–627, 2013
Colza (<i>Brassica napus</i> L.)	Regulación de expresión génica	Activador viral ZF-VP16	Gen BnKasII	Gupta et al. <i>Plant Biotechnol. J.</i> 10, 783–791, 2012
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	Reemplazo gen (SDN-2)	ZFN	Genes NtSuRA/B (inserción de alelos mutados confiriendo tolerancia a herbicida)	Townsend et al. <i>Nature</i> 459, 442–445, 2009
	Reemplazo gen (SDN-2)	TALEN	Genes NtSuRA/B (inserción de alelos mutados confiriendo tolerancia a herbicida)	Zhang et al. <i>Plant Physiol.</i> 161, 20–27, 2013
Petunia (<i>Petunia hybrida</i> Hook.)	Mutación (SDN-1)	ZFN	Transgén	Marton et al. <i>Plant Physiol.</i> 154, 1079–1087, 2010
Manzana (<i>Malus x domestica</i> Borkh.)	Mutación (SDN-1)	ZFN	Transgén	Peer et al., 2014
Higuera (<i>Ficus carica</i> L.)	Mutación (SDN-1)	ZFN	Transgén	Peer et al. <i>Planta.</i> 241:941-51, 2015
Naranja dulce (<i>Citrus sinensis</i> L.)	Mutación (SDN-1)	CRISPR/Cas	Gen CsPDS	Jia et al. <i>PLoS One</i> 9, e93806, 2014