

GENÓMICA SINTÉTICA Y EDICIÓN GENÓMICA. CIENCIA Y ÉTICA

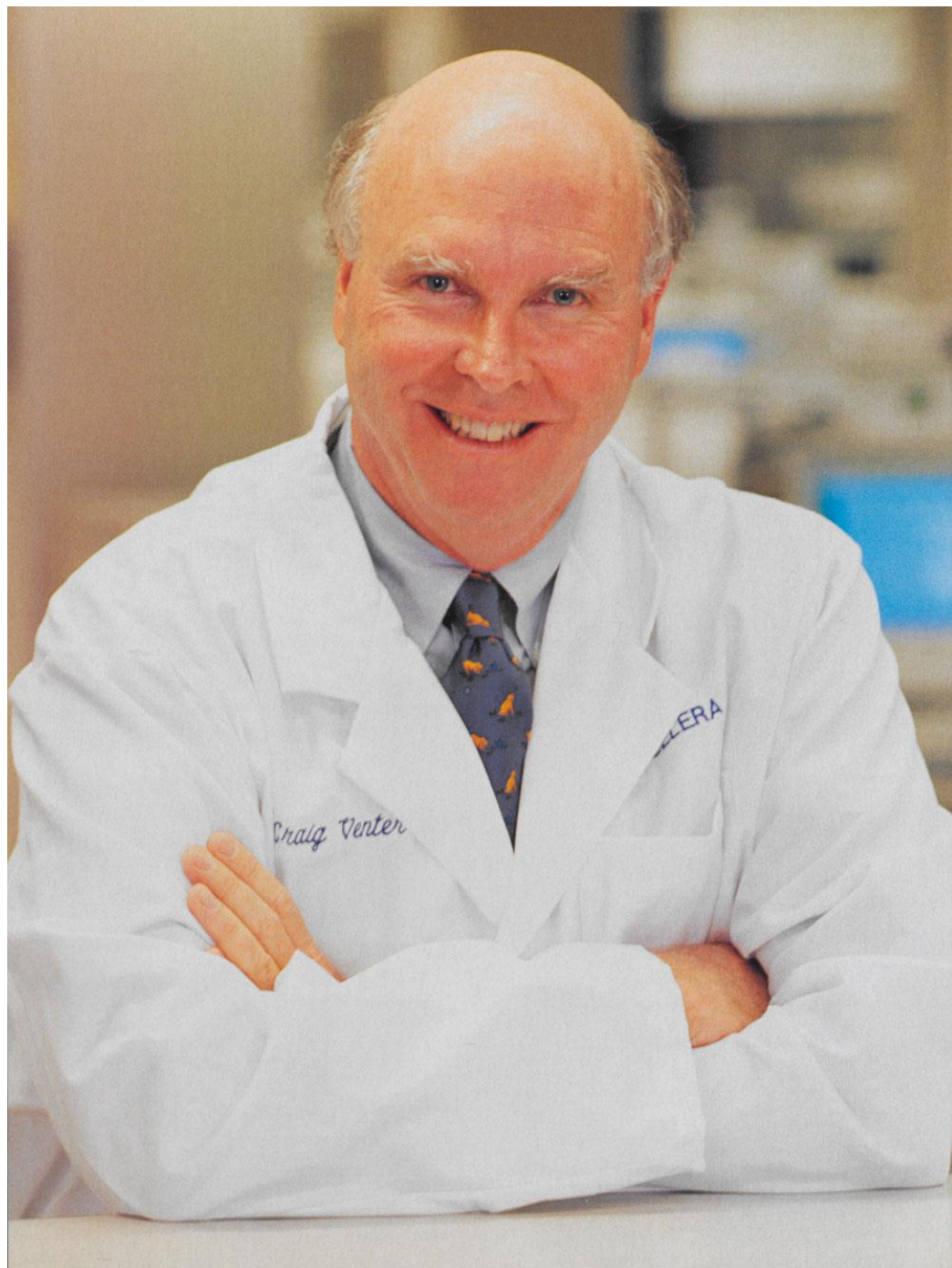
Juan-Ramón Lacadena
Colegio Libre de Eméritos
22 noviembre 2016

GENÓMICA SINTÉTICA

(“Seréis como dioses” Gn 3,5)

¿Qué es la Genómica sintética?

Síntesis artificial de genomas con la intención de producir nuevas formas de vida





Hamilton O. Smith (Premio Nobel, 1978)

GENÓMICA

BACTERIAS (PRIMEROS GENOMAS SECUENCIADOS)

Haemophilus influenzae: 1.830.137 pb (Venter et al., 1995)

Mycoplasma genitalium: 580.070 pb (Venter et al., 1995)

Methanococcus jannaschii: 1.660.000 pb (Venter et al., 1996)

Helicobacter pylori: 1.667.867 pb (Venter et al., 1997)

Escherichia coli: 4.639.221 pb (Blattner et al., 1997)

Bacillus subtilis: 4.214.810 pb (Kunst et al., 1997)

Treponema pallidum: 1.138.006 pb (Venter et al., 1998)

etc.

GENÓMICA SINTÉTICA

(“Seréis como dioses” Gn 3,5)

- **1999, J. Craig Venter y col.:**
Juego esencial mínimo de genes y genoma mínimo en *Mycoplasma genitalium* 580 kpb (de 480 genes más de 130 son prescindibles, mutagénesis global mediante transposones)
- **2006-2007, Venter (Synthetic Genomics Inc.): Patente USPO,** “juego mínimo de genes que codifican para proteínas que proporcionan la información requerida para la replicación de un organismo vivo libre en un medio de cultivo bacteriano enriquecido”

GENÓMICA SINTÉTICA

(“Seréis como dioses” Gn 3,5)

- **2007, Venter y col.: Trasplante de genomas**, cambiar una especie en otra (*Mycoplasma capricolum* → *M. mycoides*)
- **2008, Venter (J. Craig Venter Institute): Síntesis química** de un **genoma bacteriano** completo (*Mycoplasma genitalium*, 582.979 pb) (*Mycoplasma laboratorium*)
- **2010, Venter y col.: Síntesis del genoma *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 (1,08 Mpb)**. Ensamblaje de casetes de 1.080 pb con extremos solapantes de 80 pb; intermedios de 10 kb y de 100 kb). Transferencia a *M. capricolum* → *M. mycoides* capaces de autoreplicación: **célula sintética**

GENÓMICA SINTÉTICA

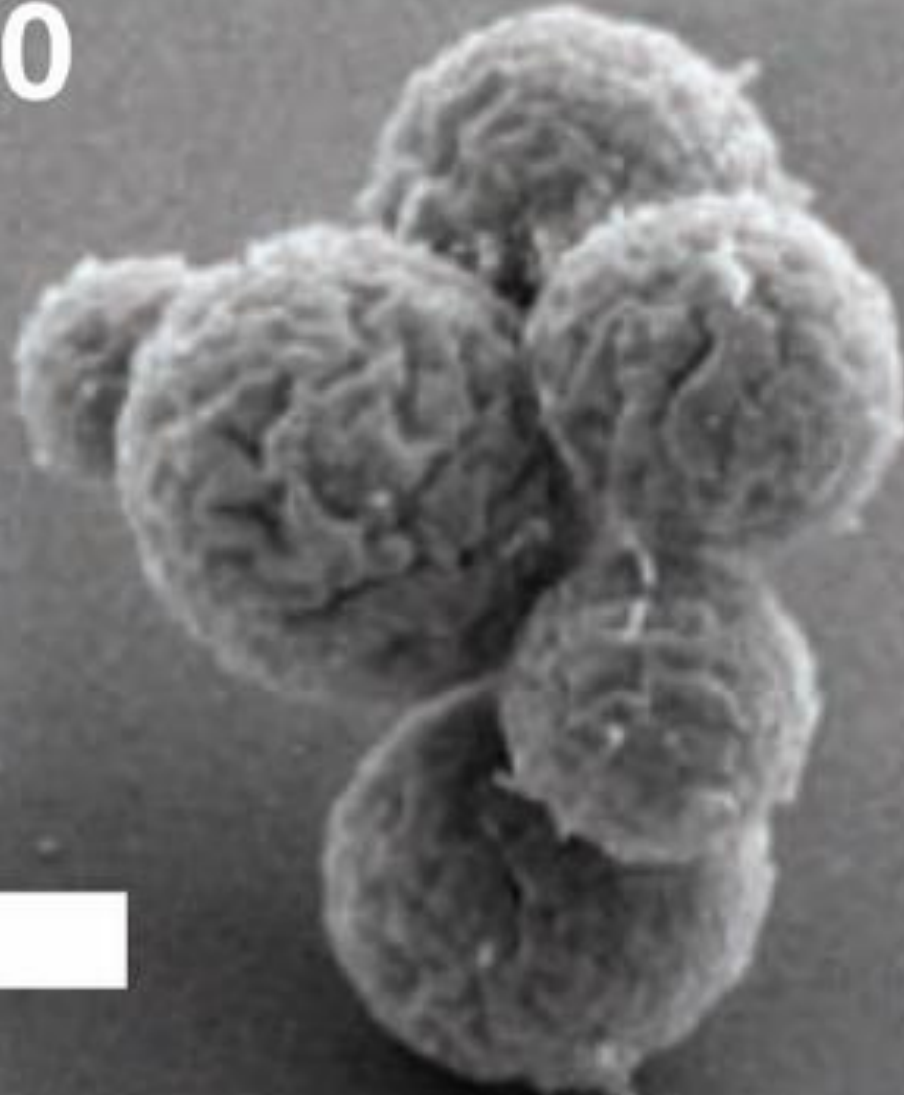
(“Seréis como dioses” Gn 3,5)

- **2016, Venter y col.:** Minimizan el genoma de JCVI-syn 1.0 (1,079 Mpb), sintetizando químicamente un genoma de 531 kpb que contiene 473 genes (JCVI-syn3.0). Es el genoma más pequeño que el de cualquier célula capaz de replicarse autónomamente que existe en la naturaleza. Diseño y síntesis de fragmentos solapantes de 1,4 kpb que se agrupan en casetes de 7 kpb y se ensamblan formando fragmentos de una longitud 1/8 del genoma total. El ensamblaje de los 8 fragmentos da lugar al genoma final.
Hutchison, C.A.;...; Venter J.C. 2016. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*, 351 (25 marzo 2016).
- **Aplicaciones biotecnológicas:** Hacia “el **primer organismo de los mil millones de dólares**” (Venter): biocarburantes (hidrógeno, etanol), capturar CO₂, tóxicos...

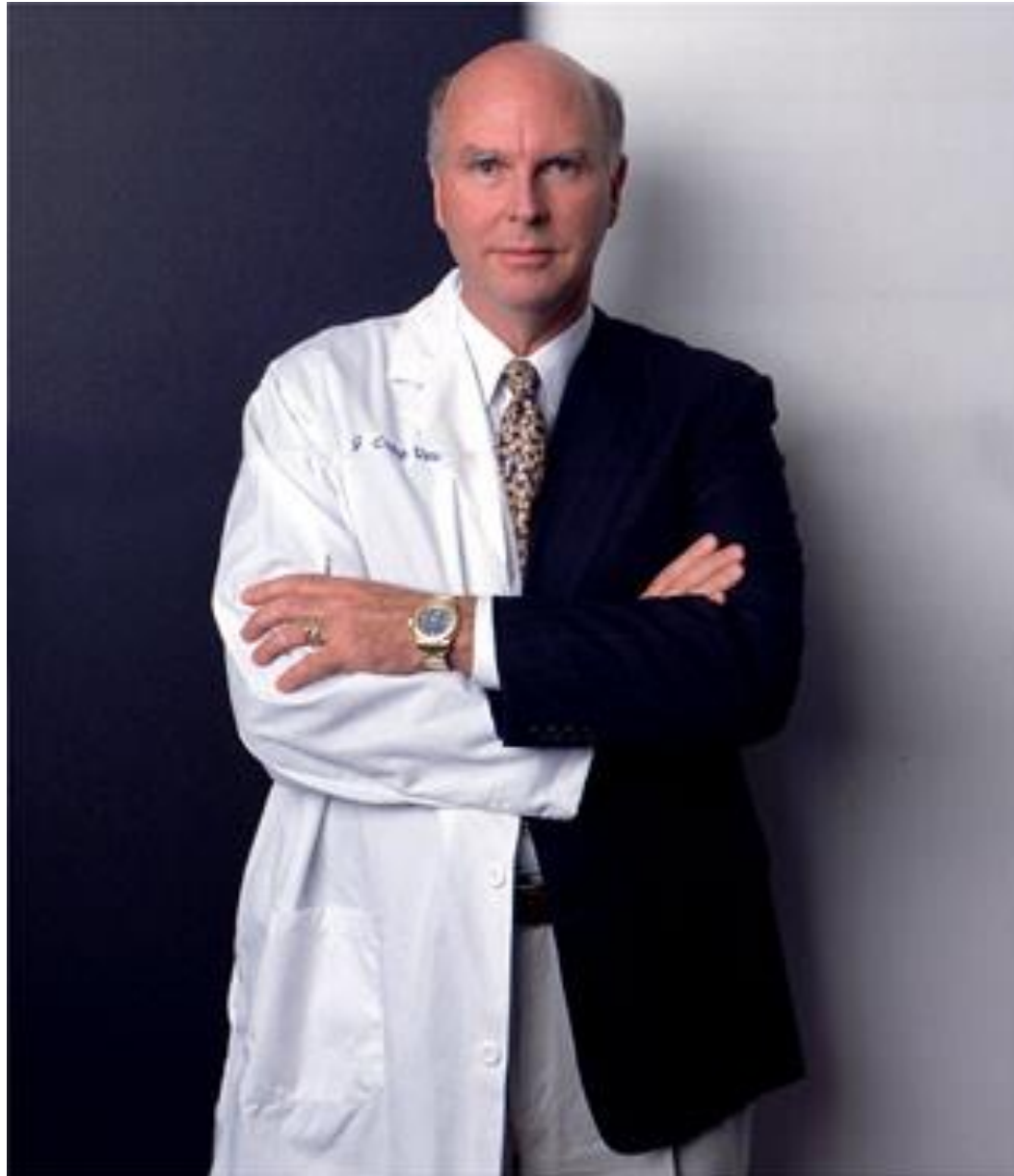
GENÓMICA SINTÉTICA

(“Seréis como dioses” Gn 3,5)

Syn3.0



J. CRAIG VENTER: CIENTÍFICO-EMPRESARIO



J. CRAIG VENTER

- **National Institutes of Health (NIH) (1984)**
- **The Institute for Genomic Research (TIGR)(1992)**
- **Celera Genomics (1998)**
- **Synthetic Genomics Inc. (2005)**
- **J. Craig Venter Science Foundation(JCVSF)**
- **JVSCF-Join Technology Center**
- **Institute for Biological Energy Alternatives (IBEA)**
- **J. Craig Venter Institute (2006)**
- **Human Longevity Inc. (2014)**

JOHN CRAIG VENTER

Awards and nominations

Medalla Nacional de Ciencia de los Estados Unidos (2008)





EDICIÓN GENÓMICA

EDICIÓN GENÓMICA

REGLA DE ORO DE LA INVESTIGACIÓN: CONSEJOS PARA LLEGAR A SER PREMIO NOBEL

- Plantear una *pregunta* importante
- Tratar de contestarla en un *material biológico* idóneo
- Utilizar una *técnica* metodológica o instrumental adecuada

EDICIÓN GENÓMICA

TÉCNICAS GENÉTICAS Y PREMIOS NOBEL

Endonucleasas de restricción (W. Arber, H.O. Smith y D. Nathans, 1978)

Secuenciación del ADN (W. Gilbert y F. Sanger, 1980)

Moléculas de ADN recombinante (P. Berg, 1980)

Anticuerpos monoclonales (G.J.F. Köhler y C. Milstein, 1984)

PCR, reacción en cadena de la polimerasa (K.B. Mullis, 1993)

Tecnología *knock-out* (M.R. Capecchi, M.J. Evans y O. Smithies, 2007)

Proteína fluorescente verde, GFP: (O. Shimomura, M. Chalfie y R.Y. Tsien, 2008)

Edición genómica: técnica CRISPR-Cas9 (J. A. Doudna y E. Charpentier, ¿futuro Premio Nobel con alguien más?)

EDICIÓN GENÓMICA

¿QUÉ ES LA EDICIÓN GENÓMICA?

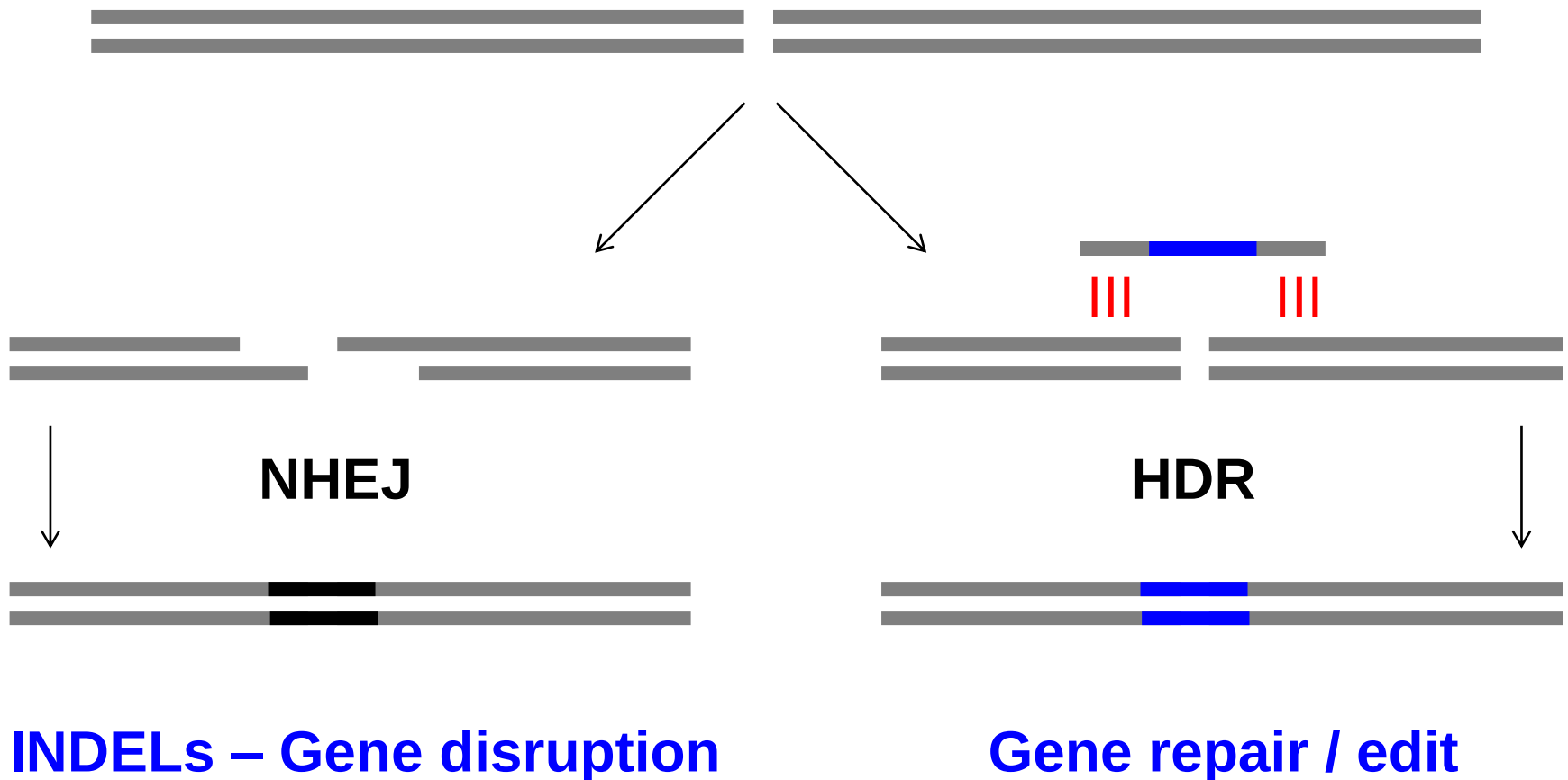
Por **edición genómica** se entiende un tipo de ingeniería genética en la que el ADN es insertado, eliminado o reemplazado en el genoma de un organismo utilizando enzimas del tipo nucleasas (denominadas “**tijeras moleculares**”).

La edición genómica se denomina coloquialmente como la técnica de “**corta y pega**”.

EDICIÓN GENÓMICA

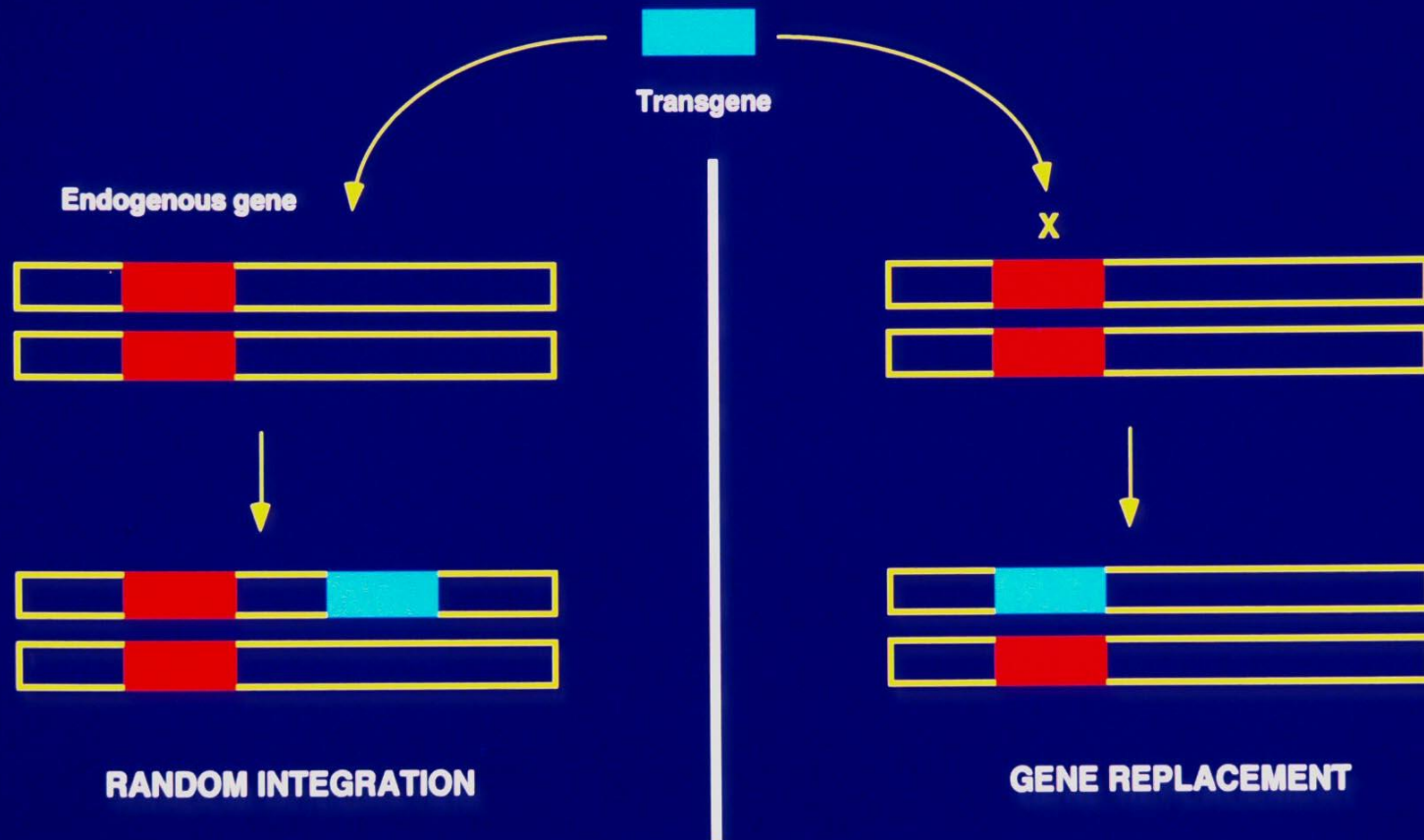
Las nucleasas producen **roturas de doble cadena (*DSB*)** en lugares precisos del genoma y las dobles roturas del ADN pueden ser reparadas por mecanismos de unión de extremos no homólogos (*NHEJ*) o mediante reparación dirigida por homología (*HDR*), dando lugar a mutaciones controladas (**edición**).

Genomic Editing Tools: 2 pathways to fix the Double Strand Break (DSB)

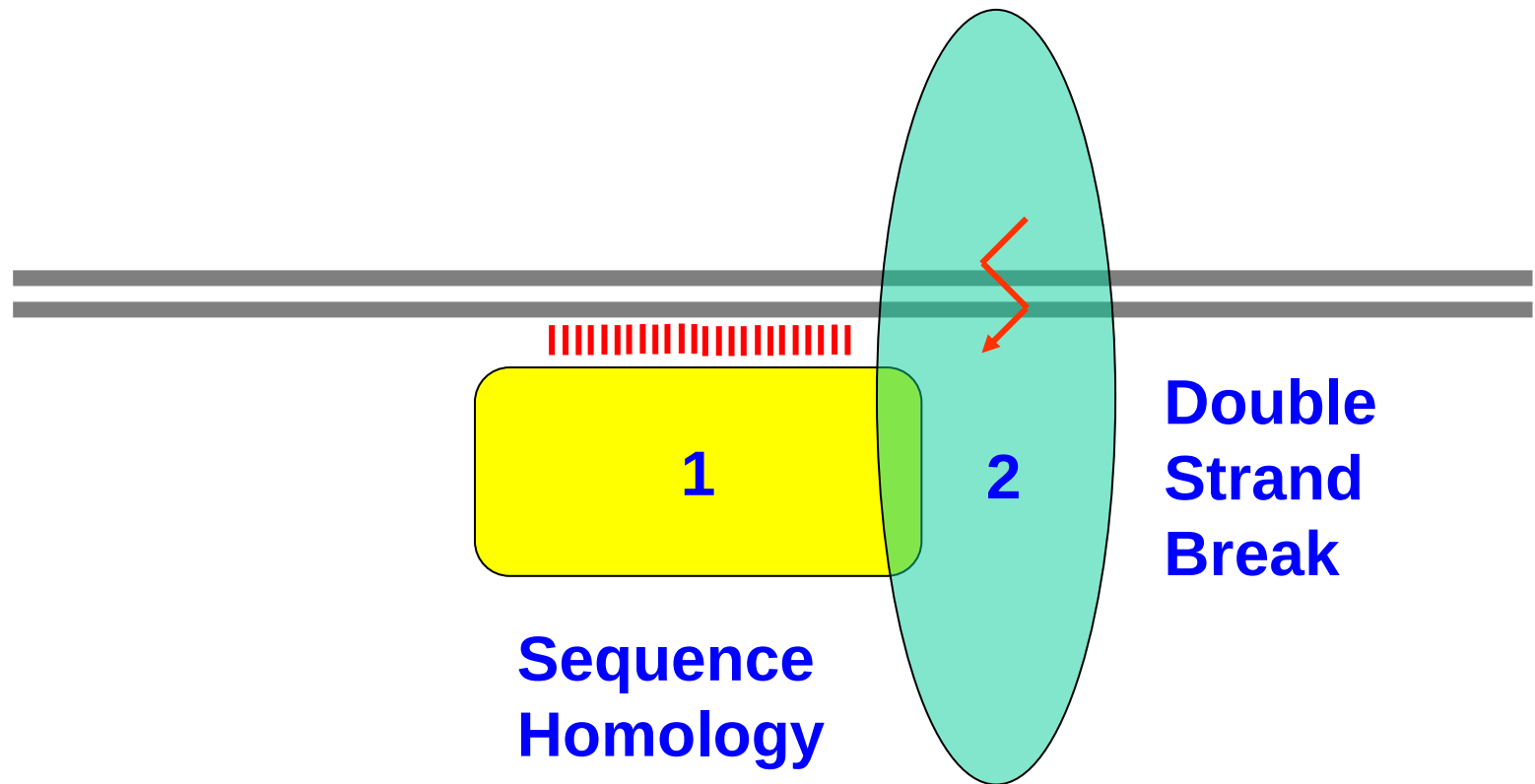


EDICIÓN GENÓMICA

RANDOM INTEGRATION VERSUS HOMOLOGUS RECOMBINATION IN TRANSGENIC MICE



Genomic Editing Tools: 2 elements



Genomic Editing Tools: 3 flavours

Type	Sequence Homology	Double Strand Break
Zinc-Finger Nuclease (ZFN)	PROTEIN 1 Zinc finger (3 AA) → 3 bp	PROTEIN FokI
TALEN	PROTEIN 2 AA → 1 bp	PROTEIN FokI
CRISPR-Cas9	RNA 1 ribonucleotide → 1 bp	PROTEIN Cas9

The Watson&Crick base pairing champions CRISPRs

EDICIÓN GENÓMICA

TERMINOLOGÍA

CRISPR-Cas

CRISPR: acrónimo de **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats
(repeticiones palindrómicas cortas
interespaciadas regularmente agrupadas)
(Francisco Juan Martínez Mojica, 2000)

Cas: **C**RISPR **a**ssociated

EDICIÓN GENÓMICA

CRISPR-Cas9

La revista *Science* consideró la aplicación de la técnica CRISPR para la edición genómica como el descubrimiento más importante del año 2015

EDICIÓN GENÓMICA

La democratización del tiro al blanco (diana) génico (Dana Carroll)

- Zinc finger nucleasas, 30.000 €
- TALEN, 3-4 meses, 10.000 €
- CRISPR-Cas9, 2-3 semanas, 20-30 €

1993



Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *Pst*I sites

F. J. M. Mojica, G. Juez and F. Rodríguez-Valera*
Departamento de Genética Molecular y Microbiología,
Apartado 374, Universidad de Alicante, 03080 Alicante,
Spain.

Summary

Two genomic sequences from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, where we had found *Pst*I restriction-pattern modifications depending on the salinity of the growth medium, have been studied. A markedly salt-dependent differential expression has been detected in the nearby regions. Two of the open reading frames characterized correspond to two of the differentially expressed transcripts. In both cases the *Pst*I sites were included in purine-pyrimidine alternancies suggestive of Z-DNA structures and located in non-coding regions with frequent repetitive motifs. A long alternating adenine-thymine tract also appears in the upstream regions of one of these open reading frames. A possible role of local DNA configuration in osmoregulation in this organism is discussed.

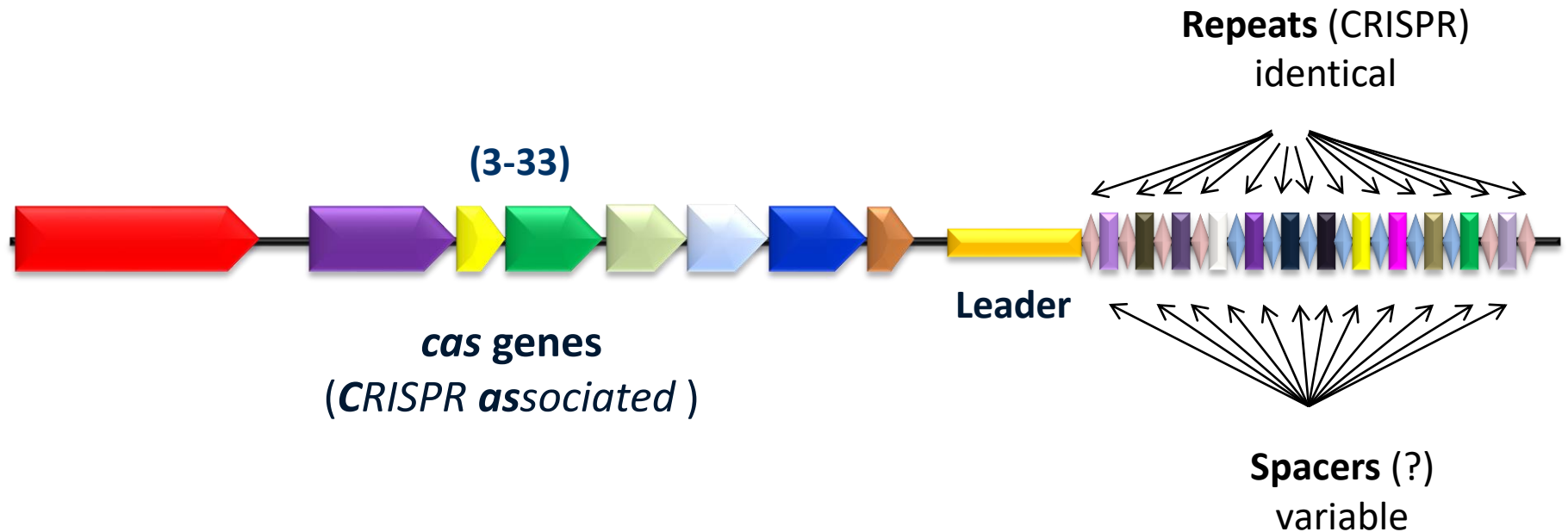
involved in the high-affinity K⁺ transport, whose regulation is effected at transcriptional level and is being extensively studied (Csonka, 1989; May *et al.*, 1989; Mizuno and Mizushima, 1990; Sugiura *et al.*, 1992). A role for the topology of DNA and intracellular K⁺ concentrations in osmoregulation has been suggested (Sutherland *et al.*, 1986; Higgins *et al.*, 1987; 1988; Graeme-Cook *et al.*, 1989; Ramirez and Villarejo, 1991). In the case of halobacteria there is little evidence of the effect of salinity on gene expression. To our knowledge, the only reference to the subject concerns a markedly different expression of the *mc-vac* gene encoding the major gas vesicles protein of *Haloferax mediterranei* at different salinities (Englert *et al.*, 1990).

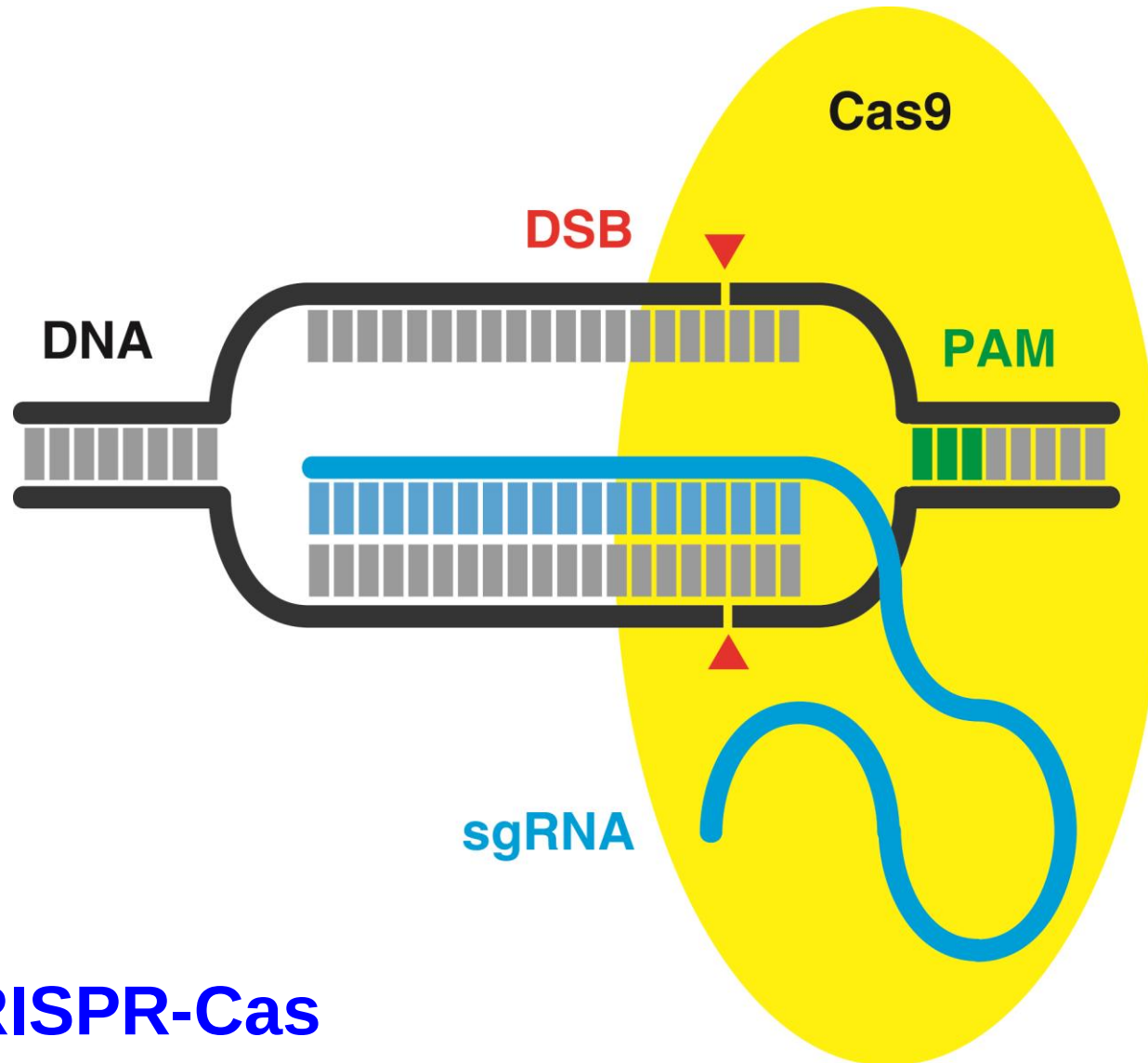
We previously described the existence of certain *Pst*I sites in the *H. mediterranei* genome which appeared to be more susceptible to cleavage, or less, depending on the salt concentration at which the cells were grown (Juez *et al.*, 1990). At least 5% of the clones from a genomic library of the organism used as probes revealed restriction-pattern modifications which appeared to be consistently associated with the salinity of the growth medium. To clarify whether this phenomenon could have any biological significance implicated in the adaptation of the

Francis J.M. Mojica
University of Alicante
Spain

CRISPR arrays also discovered by Mojica et al. (1993) Molecular Microbiology, in *archeas*

The CRISPR-Cas system in prokaryotes





**The CRISPR-Cas
system**

The CRISPR-Cas System: targeting nucleases to specific DNA sequences

a binary system: Cas9 protein and sgRNA

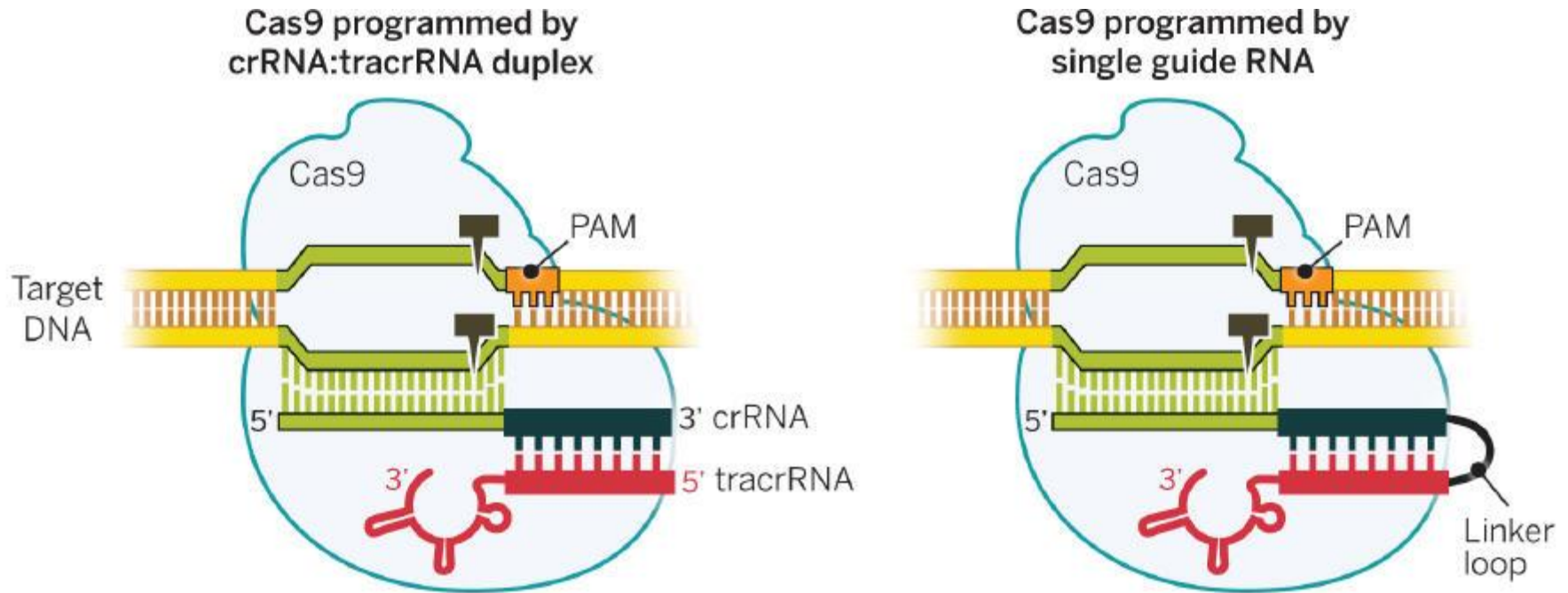
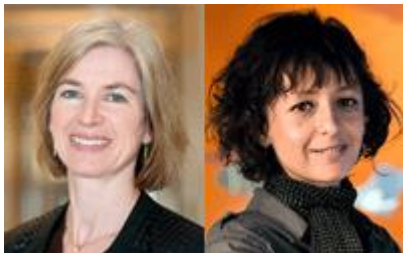


Fig. 3. Evolution and structure of Cas9. The structure of *S. pyogenes* Cas9 in the unliganded and RNA-DNA-bound forms [from (77, 81)].



Jennifer Doudna
Emmanuelle Charpentier

Jinek et al. (2012) *Science*
Doudna & Charpentier (2014) *Science*

The CRISPR-Cas pioneers



Francisco Mojica
University of Alicante, Spain



Rodolphe Barrangou
North Carolina State Univ, Raleigh, USA



Philippe Horvath
DuPont Nutrition and Health, France



Luciano Marraffini
The Rockefeller Univ, New York, USA



John van der Oost
Wageningen University, The Netherlands



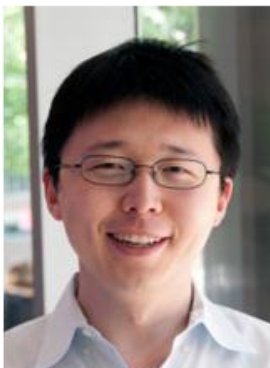
Emmanuelle Charpentier
MPI for Infect. Biol., Berlin, Germany



Jennifer Doudna
Univ California Berkeley, CA, USA



Virginijus Siksnys
Vilnius University, Lithuania



Feng Zhang
BROAD-MIT, Cambridge, MA, USA



George Church
Harvard Med School, Boston, MA, USA



Rudolf Jaenisch
Whitehead Inst, Cambridge, MA, USA



J. Keith Joung
Mass Gen Hosp, Charlestown, MA, USA

EDICIÓN GENÓMICA

LOS 12 HÉROES DE CRISPR

Lander, E.S. 2016. The Heroes of CRISPR. *Cell*, 164:18-28
(14 Jan 2016)

Por orden de aparición en escena:

- Descubrimiento de CRISPR: Francisco Javier Martínez **Mojica** (1993)
- CRISPR es un sistema inmune adaptativo: F.J.M. **Mojica** (2005), Gilles Vergnaud (2005), Alexander Bolotin (2005)
- Evidencia experimental de que CRISPR confiere inmunidad adaptativa y utiliza una nucleasa: Philippe Horvath (2007)
- Programando CRISPR: John van der Oost (2008)
- Dianas CRISPR en el ADN: Luciano Marrafini (2008)

EDICIÓN GENÓMICA

LOS 12 HÉROES DE CRISPR

- Cas9 es guiada por crRNAs y crea dobles roturas en el ADN: Sylvain Moineau (2008)
- Reconstituyendo CRISPR en un organismo distante: Virginijus Siksnys (2011)
- Estudiando CRISPR in vitro: V. Siksnys (2012), Emmanuelle **Charpentier** (2012), Jennifer A. **Doudna** (2012)
- Edición genómica en células de mamíferos: Feng **Zhang** (2012), George Church (2013)
- Fase de expansión de CRISPR: miles de laboratorios en todo el mundo

EDICIÓN GENÓMICA

- **Patentes** derivadas de CRISPR-Cas9

Requisitos: invención, novedosa, aplicación práctica . Disputa entre Berkeley y MIT.

- Creación de **compañías biotecnológicas** para desarrollar las aplicaciones de la técnica CRISPR en Medicina como Editas Medicine en EEUU (J.A. Doudna) y CRISPR Therapeutics en Suiza (E. Charpentier).

Comparar la situación con los anticuerpos monoclonales descubiertos por César Milstein y Goeorge J.F. Köhler (Premios Nobel 1984).

EDICIÓN GENÓMICA

EDICIÓN GENÓMICA EN EMBRIONES HUMANOS

Liang, P.; Xu, Y.; Zhang, X.; Ding, C.; Huang, R.; Zhang, Z.; Lv, J.; Xie, X.; Chen, Y.; Li, Y.; Sun, Y.; Bai, Y.; Songyang, Z.; Ma, W.; Zhou, C.; Huang, J. 2015. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 6(5):363-372

Edición del gen de la beta-globina. La eficacia de la rotura del gen es alta, pero la eficiencia de la reparación mediante recombinación homóloga es baja y los embriones editados resultan mosaicos. También se producen con cierta frecuencia roturas fuera de la diana.

EDICIÓN GENÓMICA

EDICIÓN GENÓMICA EN EMBRIONES HUMANOS

- El 1 de febrero de 2016, la Human Fertilization and Embryology Authority (HFEA) del Reino Unido autorizó a la investigadora Kathy Niakan del Instituto Francis Crick de Londres, la edición genética de embriones humanos mediante la técnica CRISPR-Cas9 con fines de investigación (no reproductivos)
- ¿Cuándo y dónde nacerá un niño CRISPR?

EDICIÓN GENÓMICA

TERAPIA GÉNICA

Transgénesis:

“Transmisión horizontal” de la información genética

Terapia génica:

Administración deliberada de material genético en un paciente humano con la intención de corregir un defecto genético específico.

Técnica terapéutica mediante la cual se inserta un gen funcional en las células de un paciente humano para corregir un defecto genético o para dotar a las células de una nueva función.

EDICIÓN GENÓMICA

TERAPIA GÉNICA

Tipos: TG somática, TG germinal

Técnicas: *ex vivo*, *in vivo*, *in situ*

Métodos :

Inserción génica: se introduce en las células una nueva versión normal del gen defectuoso sin modificar éste

Sustitución génica: el gen defectuoso es sustituido por su versión normal mediante recombinación homóloga o **edición genómica**

Modificación génica: el gen defectuoso es normalizado por mutagénesis dirigida o por **edición genómica**

EDICIÓN GENÓMICA

Declaración Universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos (1997)

Artículo 24 invita al Comité Internacional de Bioética de la UNESCO *“a la identificación de prácticas que pueden ir en contra de la dignidad humana, como las **intervenciones en la línea germinal**”*, en clara alusión a la TG germinal.

Convenio relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina (Convenio Europeo de Bioética) de 1997

Artículo 13: *“no podrá realizarse intervención alguna sobre el genoma humano si no es con fines preventivos, diagnósticos o terapéuticos y a condición de que **no** tenga por objetivo **modificar el genoma de la descendencia**”*. Por tanto, queda prohibida la TG germinal.

EDICIÓN GENÓMICA

Directiva 98/44/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a la protección jurídica de las invenciones biotecnológicas aprobada el 6 de julio de 1998, se consideran no patentables los *“procedimientos de **modificación de la identidad genética germinal del ser humano**”* (Art. 6.2.b) por considerar su explotación *“contraria al orden público o a la moralidad”* (Art. 6.1).

Directiva 98/44/CE es incorporada al Derecho español por la Ley 10/2002, de 29 de abril, por la que modifica la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes,

Art. 5 : *“no podrán ser objeto de Patente: 1. Las invenciones cuya explotación comercial sea contraria al orden público o las buenas costumbres. En particular... b) Los procedimientos de **modificación de la identidad genética germinal del ser humano**”, lo cual incluye a la TG germinal.*

Lo mantiene la **Ley 24/2015, de 24 de julio, de Patentes** que entrará en vigor el 1 de abril de 2017

CRISPR-Cas9 and *in vivo* somatic gene therapy

Science

REPORTS

Cite as: M. Tabeibordbar *et al.*, *Science* 10.1126/science.aad5177 (2015).

In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells

Mohammadsharif Tabeibordbar,^{1,2*} Kexian Zhu,^{1,3*} Jason K. W. Cheng,¹ Wei Leong Chew,^{2,4} Jeffrey J. Widrick,⁵ Winston X. Yan,^{6,7} Claire Maesner,¹ Elizabeth Y. Wu,^{1,†} Ru Xiao,⁸ F. Ann Ran,^{6,7} Le Cong,^{6,7} Feng Zhang,^{6,7} Luk H. Vandenberghe,⁸ George M. Church,⁴ Amy J. Wagers^{1,‡}

Science

REPORTS

Cite as: C. E. Nelson *et al.*, *Science* 10.1126/science.aad5143 (2015).

In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy

Christopher E. Nelson,^{1,2} Chady H. Hakim,³ David G. Ousterout,^{1,2} Pratiksha I. Thakore,^{1,2} Eirik A. Moreb,^{1,2} Ruth M. Castellanos Rivera,⁴ Sarina Madhavan,^{1,2} Xiufang Pan,³ F. Ann Ran,^{5,6} Winston X. Yan,^{5,7,8} Aravind Asokan,⁴ Feng Zhang,^{5,9,10,11} Dongsheng Duan,^{3,12} Charles A. Gersbach^{1,2,13*}

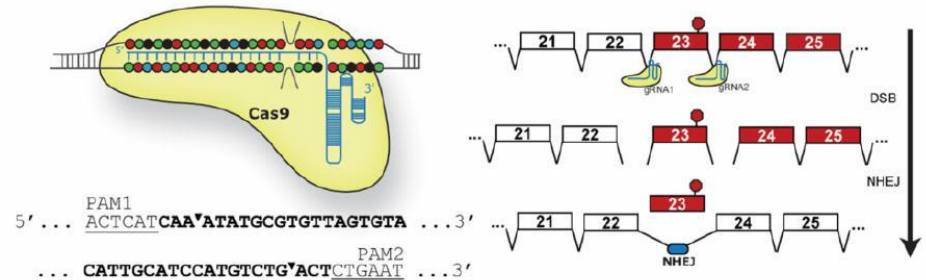
Science

REPORTS

Cite as: C. Long *et al.*, *Science* 10.1126/science.aad5725 (2015).

Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy

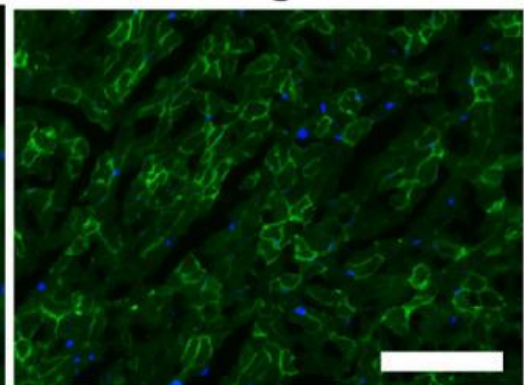
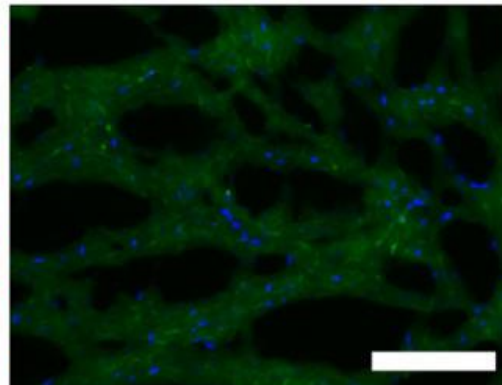
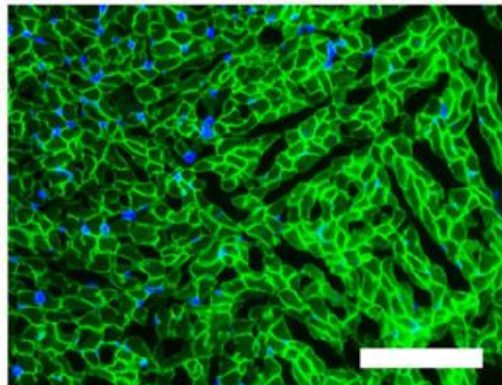
Chengzu Long,^{1,2,3*} Leonela Amoasii,^{1,2,3*} Alex A. Mireault,^{1,2,3} John R. McAnally,^{1,2,3} Hui Li,^{1,2,3} Efrain Sanchez-Ortiz,^{1,2,3} Samadrita Bhattacharyya,^{1,2,3} John M. Shelton,⁴ Rhonda Bassel-Duby,^{1,2,3} Eric N. Olson^{1,2,3,†}



WT

mdx

Cas9/gRNA

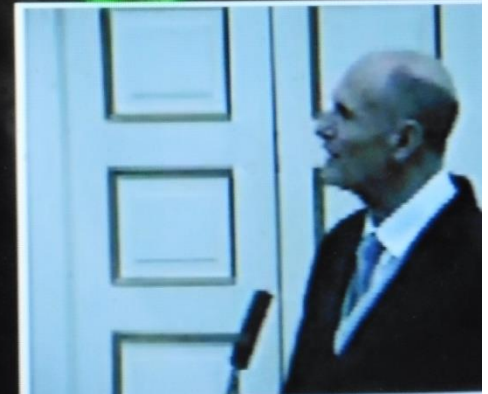
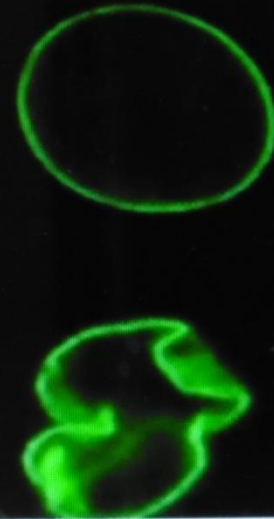


EDICIÓN GENÓMICA PROGERIA

Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS)

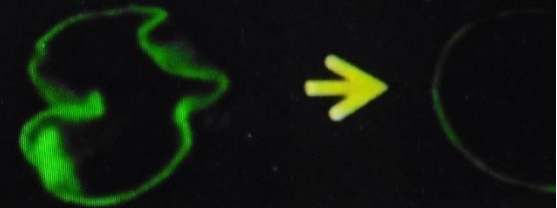


HGPS patients die of premature atherosclerosis around age 10.



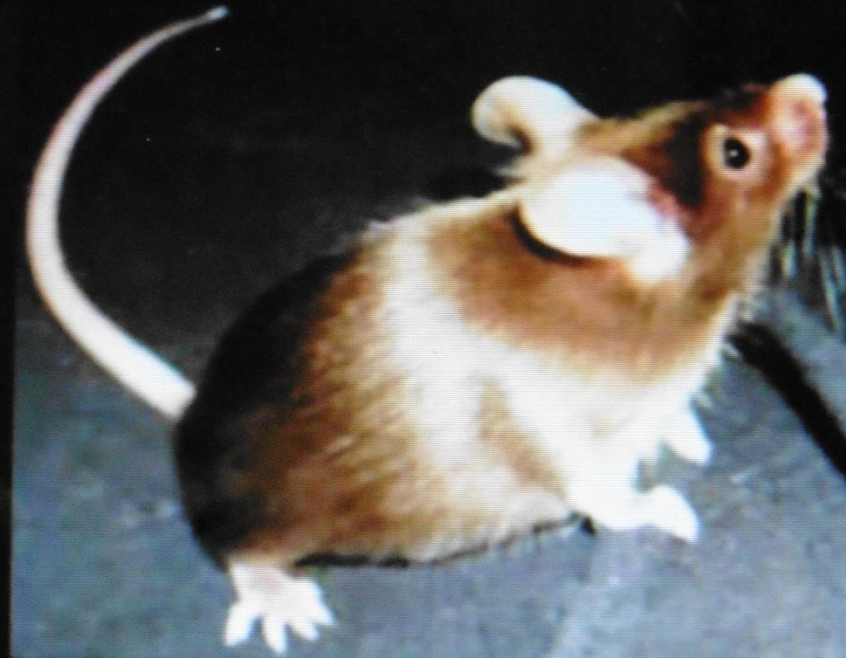
EDICIÓN GENÓMICA PROGERIA

Gene Editing of Aging



EDICIÓN GENÓMICA PROGERIA

Gene Editing of Aging



EDICIÓN GENÓMICA RETINITIS PIGMENTARIA



XENOTRANSPLANTE

NO HAY PROBLEMAS DE ESCASEZ ÓRGANOS
DISPONIBLES EN CUALQUIER MOMENTO

RECHAZO HIPERAGUDO

ANIMALES TRANSGÉNICOS

RECHAZO AGUDO

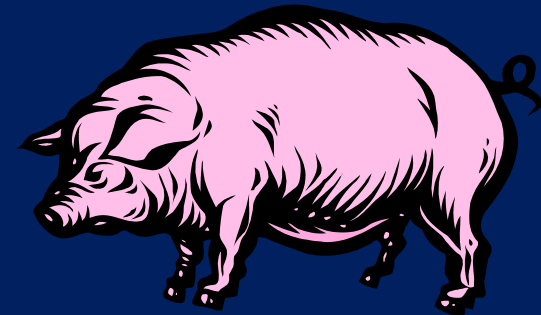
CERDO

- *Escaso número de enfermedades graves humanas de origen porcino*
- *Crianza fácil*
- *Órganos de tamaño y fisiología comparables a los humanos*
- *No está en peligro de extinción*
- *Peligro de transmisión de enfermedades de origen viral*

TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

INMUNOAISLAMIENTO

TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES
AL HOMBRE

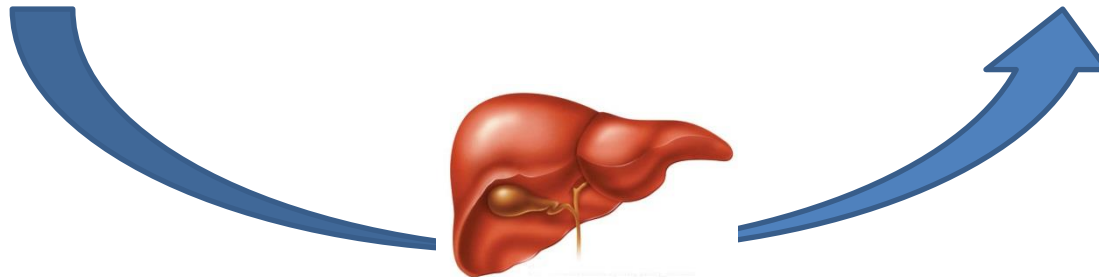


CRISPR-Cas and animal biotechnology

Xenotransplantation

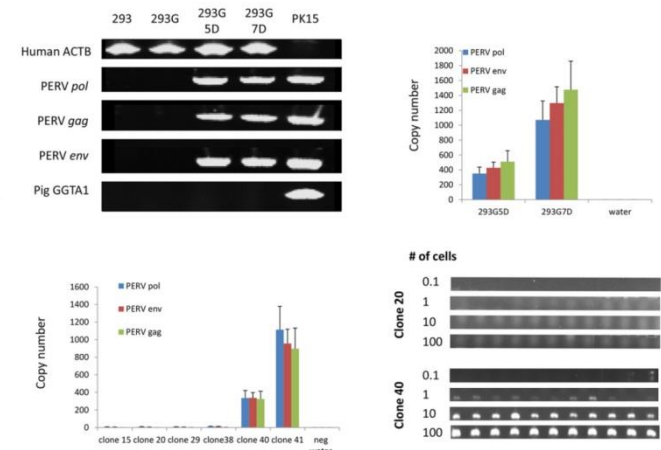
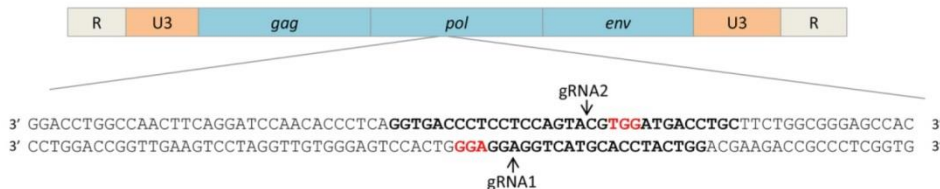
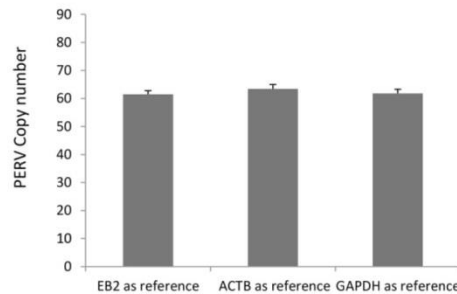
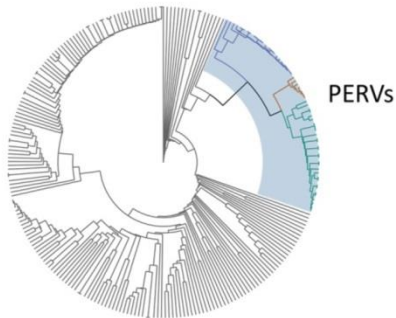


PERV



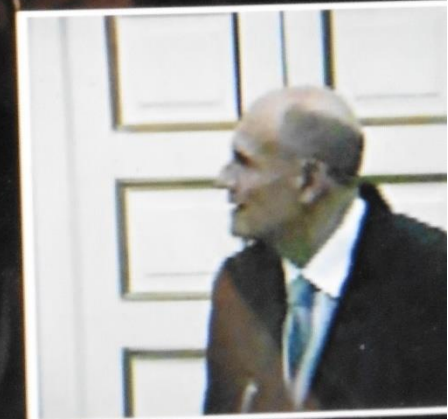
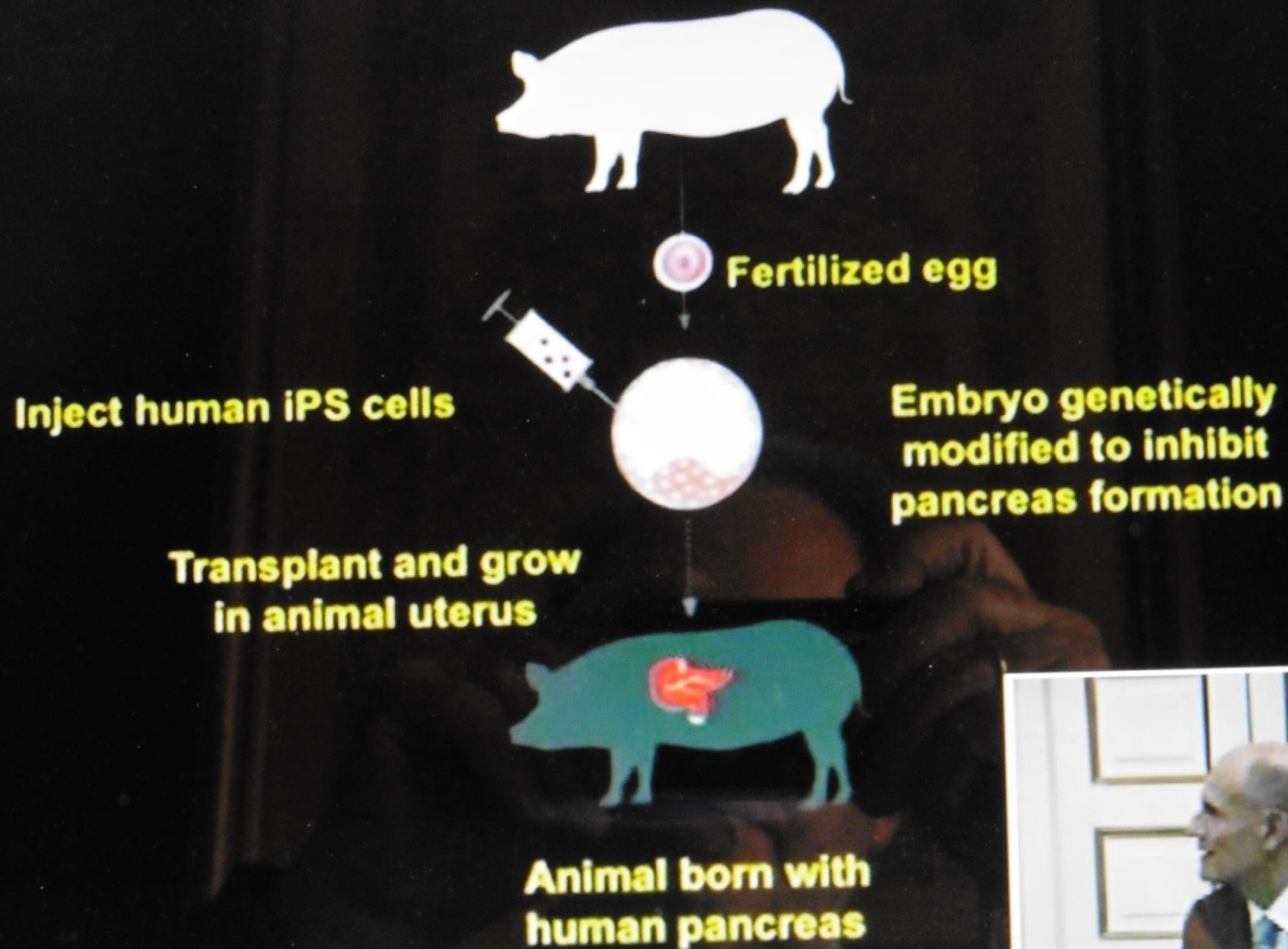
Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)

Luhan Yang,^{1,2,3*} Marc Güell,^{1,2,3†} Dong Niu,^{1,4†} Haydy George,^{1†} Emal Leshia,¹ Dennis Grishin,¹ John Aach,¹ Ellen Shrock,¹ Weihong Xu,⁶ Jürgen Poci,¹ Rebeca Cortazio,¹ Robert A Wilkinson,⁵ Jay A. Fishman,⁵ George Church^{1,2,3*}



Inactivation of 62x PERV integrated in the pig genome

QUIMERAS HUMANAS INTERESPECÍFICAS



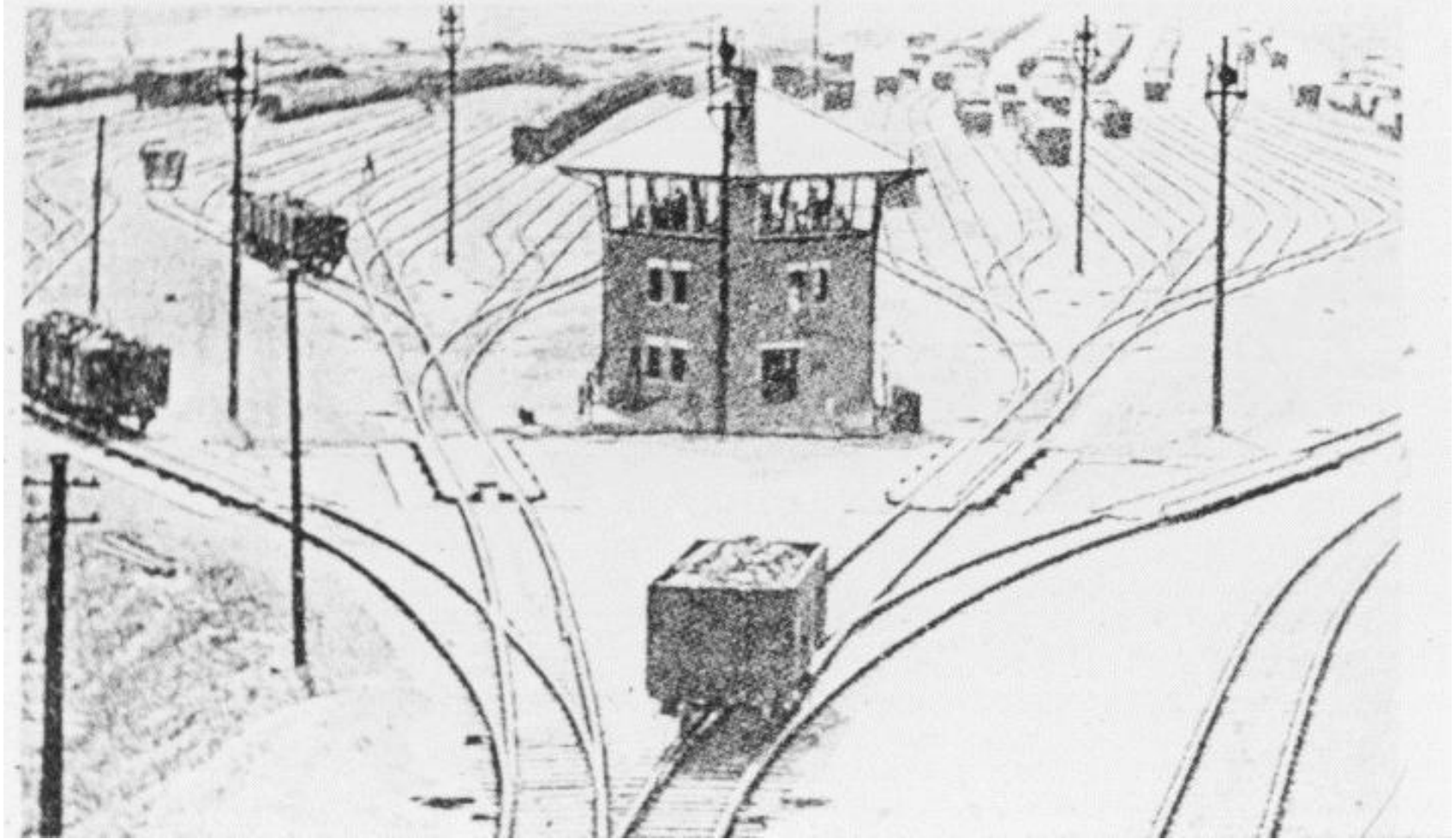
CONCEPTO GENÉTICO DE DESARROLLO

Componentes del desarrollo

- Crecimiento o proliferación celular
- **Diferenciación celular (citodiferenciación)**
- Histogénesis como agregación de células diferenciadas
- Organogénesis como asociación de tejidos
- Morfogénesis
- Comportamiento

FIGURE 29

Photograph of a railroad switching yard presented by Joseph Needham (1936) to illustrate the hypothesis of his friend and collaborator, C. H. Waddington. The tracks represent different developmental pathways that a boxcar could follow. The binary branches can be readily observed.





REPROGRAMACIÓN NUCLEAR

CRONOLOGÍA DE LA REPROGRAMACIÓN NUCLEAR

- **Clonación en anfibios por transferencia de núcleos (1950 - 1965)**
- **Transferencia nuclear de células somáticas en mamíferos (oveja Dolly, 1997)**
- **Células troncales embrionarias (ES, *embryo stem*) en mamíferos (ratón, 1981; humano, 1998)**
- **Células troncales adultas (AS, *adult stem*) (1999, 2000, 2001, 2002)**
- **Células troncales pluripotentes inducidas (iPS, *induced pluripotent stem*) (2007, 2008, 2009)**
- **Reprogramación directa (2008, 2010, 2014)**

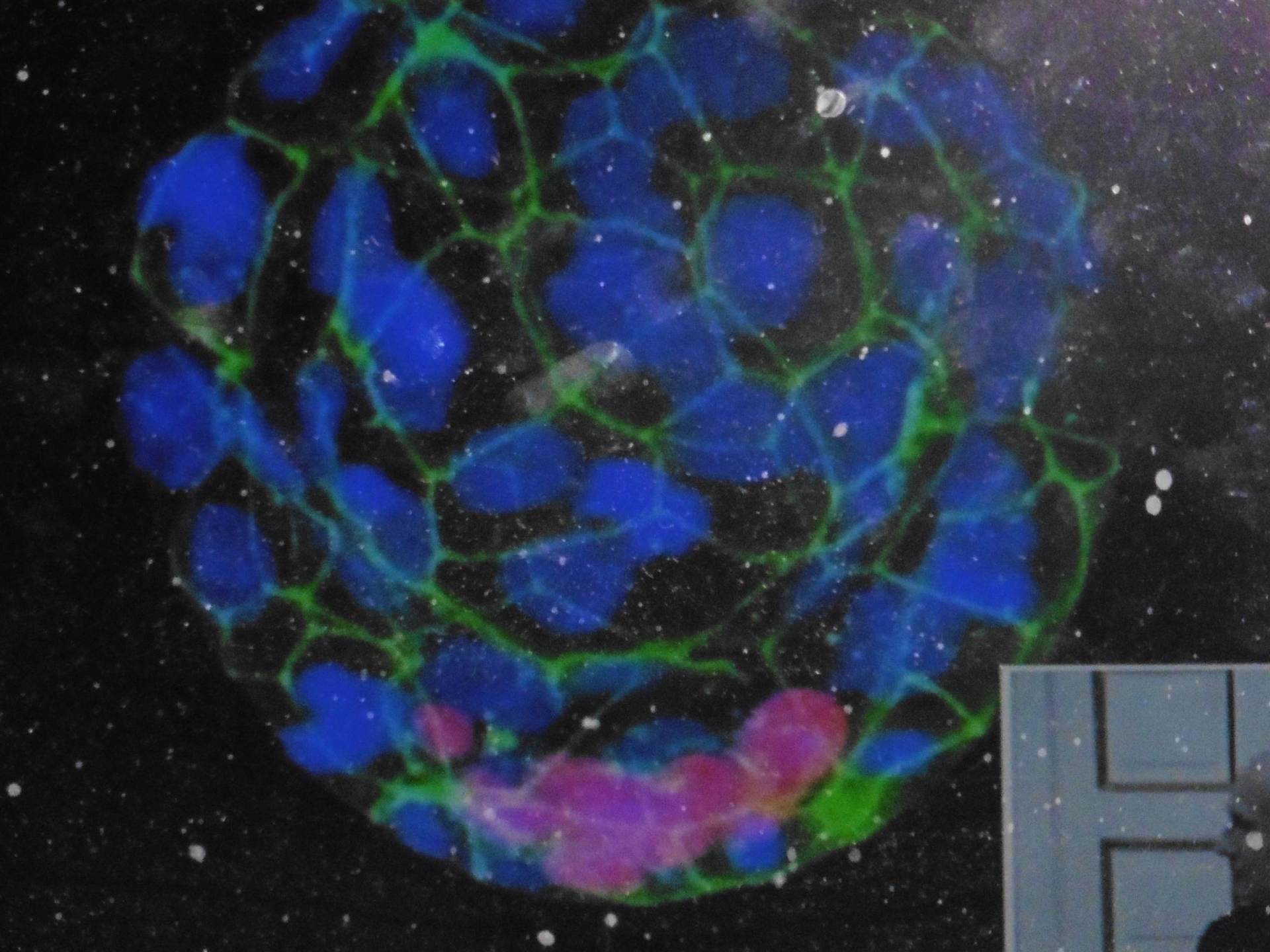
Sir John B. Gurdon (*1933)
Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2012



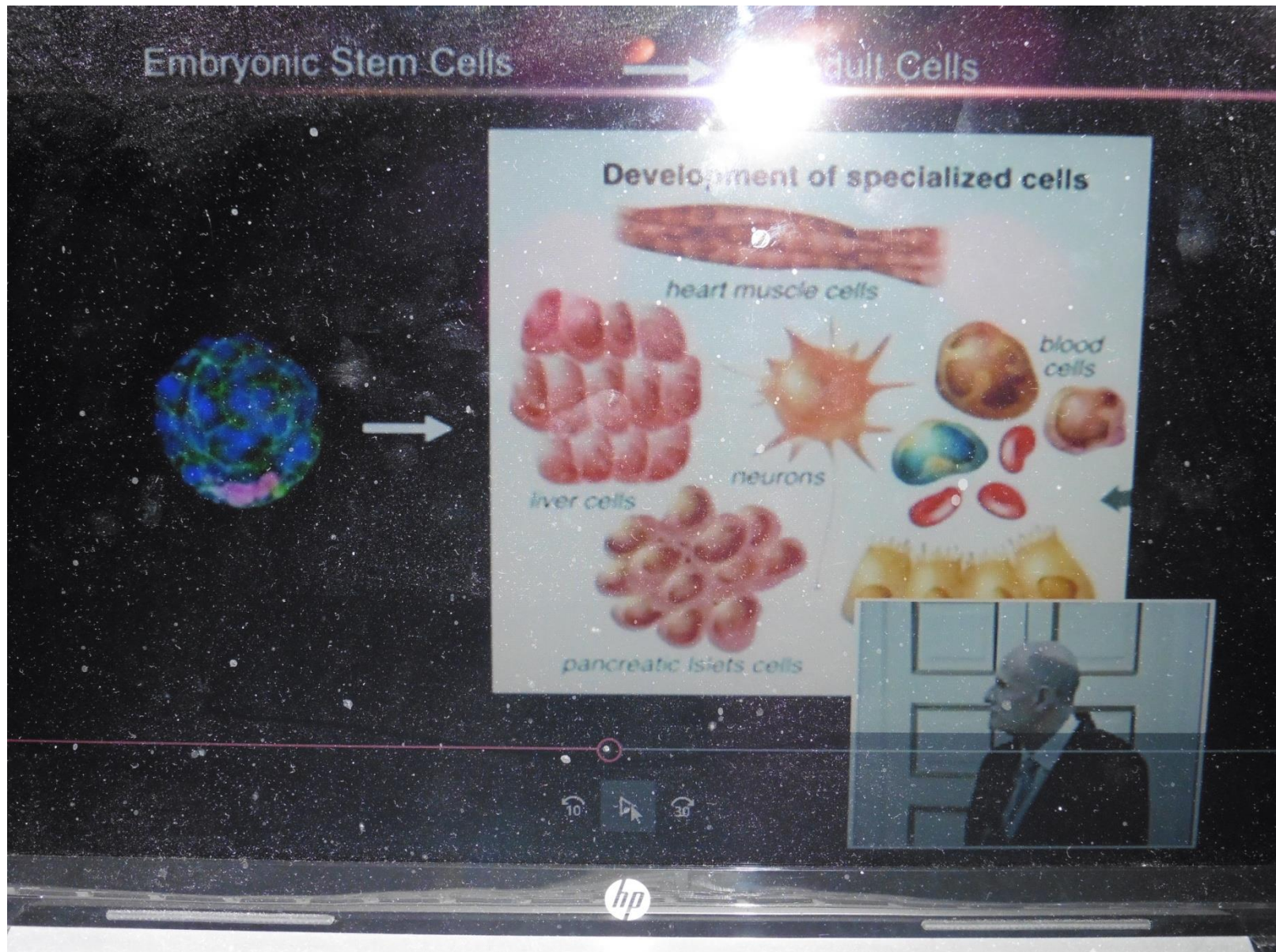
CÉLULAS TRONCALES Y MEDICINA REGENERATIVA

- Terapia celular y Medicina regenerativa: fines y medios
- Células troncales: terminología (*stammzellen*, *stem cells*, *células madre*)
- Células troncales: definición
- Totipotencia, pluripotencia, multipotencia
- Tipos: células troncales embrionarias (**ES y ES-SCNT**), células troncales adultas (**AS**), células troncales pluripotentes inducidas (**iPS**)
- Reprogramación directa





CÉLULAS TRONCALES



Dr. Shinya Yamanaka (*1962)
Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2012



Células troncales pluripotentes inducidas (iPS)

Células troncales pluripotentes inducidas (células iPS, *induced pluripotent stem*) en ratón:

Yamanaka

2006: Retrovirus, Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc

2008: Transfección repetida con dos plásmidos (Oct3/4, Sox-2, Klf4) y c-Myc

Jaenisch

2007: Ratifica trabajo de Yamanaka (2006)

2009: Un único vector policistrónico Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc

Schöler (2009): Basta la presencia de Oct4 (1FiPS)

Blasco (2009): Papel necesario de la telomerasa

Ding (2009): Transformación de células somáticas en células iPS sin introducir información genética (ADN), utilizando proteínas

Células troncales pluripotentes inducidas (iPS)

Células troncales pluripotentes inducidas (células iPS, *induced pluripotent stem*) en humano:

Yamanaka (2007): retrovirus, Oct3/4, Soc2, c-Myc, Klf4

Thomson (2007): Oct4, Sox2, Nanog, Lin28

Melton (2008): Oct4 y Sox2

Jaenisch (2009): Un único vector policistrónico Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc

Lowry (2008): Obtención de iPS a partir de fibroblastos de la dermis

Izpisúa Belmonte (2008): Queratinocito → célula nerviosa

Rossi (2010): Obtención de células iPS utilizando ARNm sintético (células RiPS). Posibilidad de dirigir la diferenciación al tipo de células deseado

Ecker, Thomson (2011): Diferencias entre los metilomas (perfiles de metilación) de las células iPS y las embrionarias

Izpisúa Belmonte (2012): iPS enfermedad de Parkinson

Células troncales pluripotentes inducidas (iPS)

Aplicaciones terapéuticas

Modelo experimental en ratón:

- Anemia falciforme HbS (Jaenisch, 2007)
- Hemofilia A (Ward y Ma, 2009)
- Diabetes (Ward y Ma, 2010)
- Lesiones en médula espinal (Yamanaka y Okano, 2010)
- Diabetes tipo 1 con hiPSC beta-like y sobre-expresión del gen ERR gamma (Yoshihara ... Evans, 2016)

Células troncales pluripotentes inducidas (iPS)

Aplicaciones terapéuticas en humanos:

- **Esclerosis lateral amiotrófica, ELA (Eggan, 2008);**
- **distrofia muscular y enfermedad de Huntington (Park., 2008 y The HD iPSC Consortium, 2012);**
- **atrofia muscular espinal, AME (Svendsen, 2009);**
- **síndrome de Rett (Marchetto, 2010);**
- **deficiencia en α 1- antitripsina (Rashid, 2010);**
- **ataxia espinocerebelar (Koch, 2011);**
- **progeria (Izpisúa Belmonte, 2011);**
- **esquizofrenia (Brennand, 2011);**
- **enfermedad de Parkinson (Izpisúa Belmonte, 2012);**
- **enfermedad de Alzheimer (Israel, 2012)**

Células troncales pluripotentes inducidas (iPS)

Aplicaciones terapéuticas

Diferenciación tridimensional de órganos humanos a partir de células iPS:

- **hígado, Takebe, 2013;**
- **cerebro normal y microcefalia, Knoblich, 2013;**
- **riñón normal y poliquístico, Izpisúa Belmonte, 2013.**

QUIMERAS

Organismos que contienen células, tejidos u órganos de diferente constitución genética (genotipo) procedentes de individuos distintos por fusión embrionaria o por transferencia de células, tejidos u órganos.

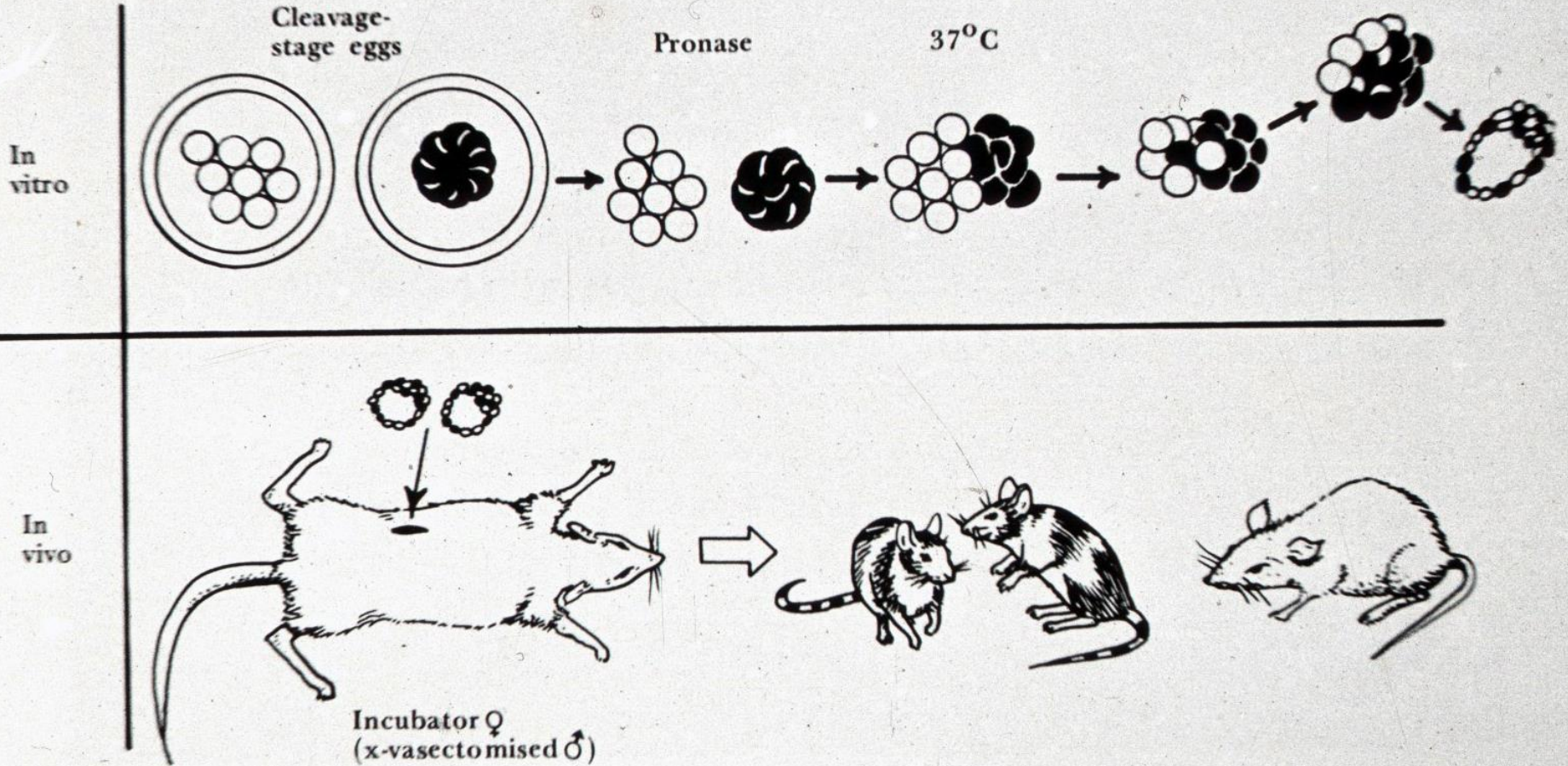
No confundir con los híbridos sexuales ni con los mosaicos genéticos producidos por mutación o recombinación somática.

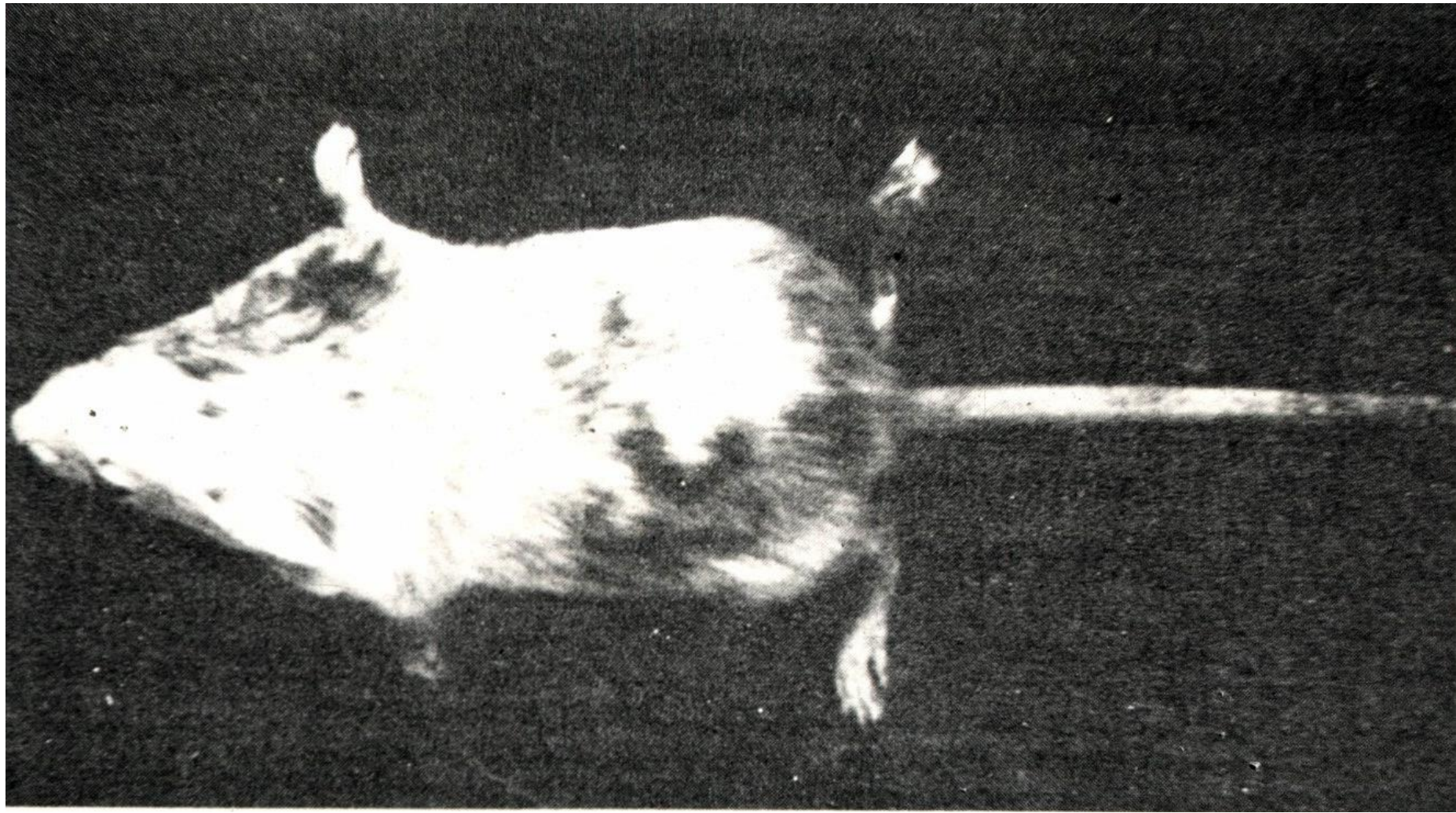
Las quimeras pueden ser intraespecíficas o interespecíficas.

QUIMERA



Allophenic mice from aggregated eggs

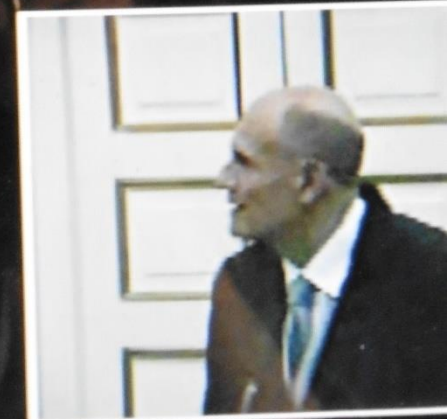
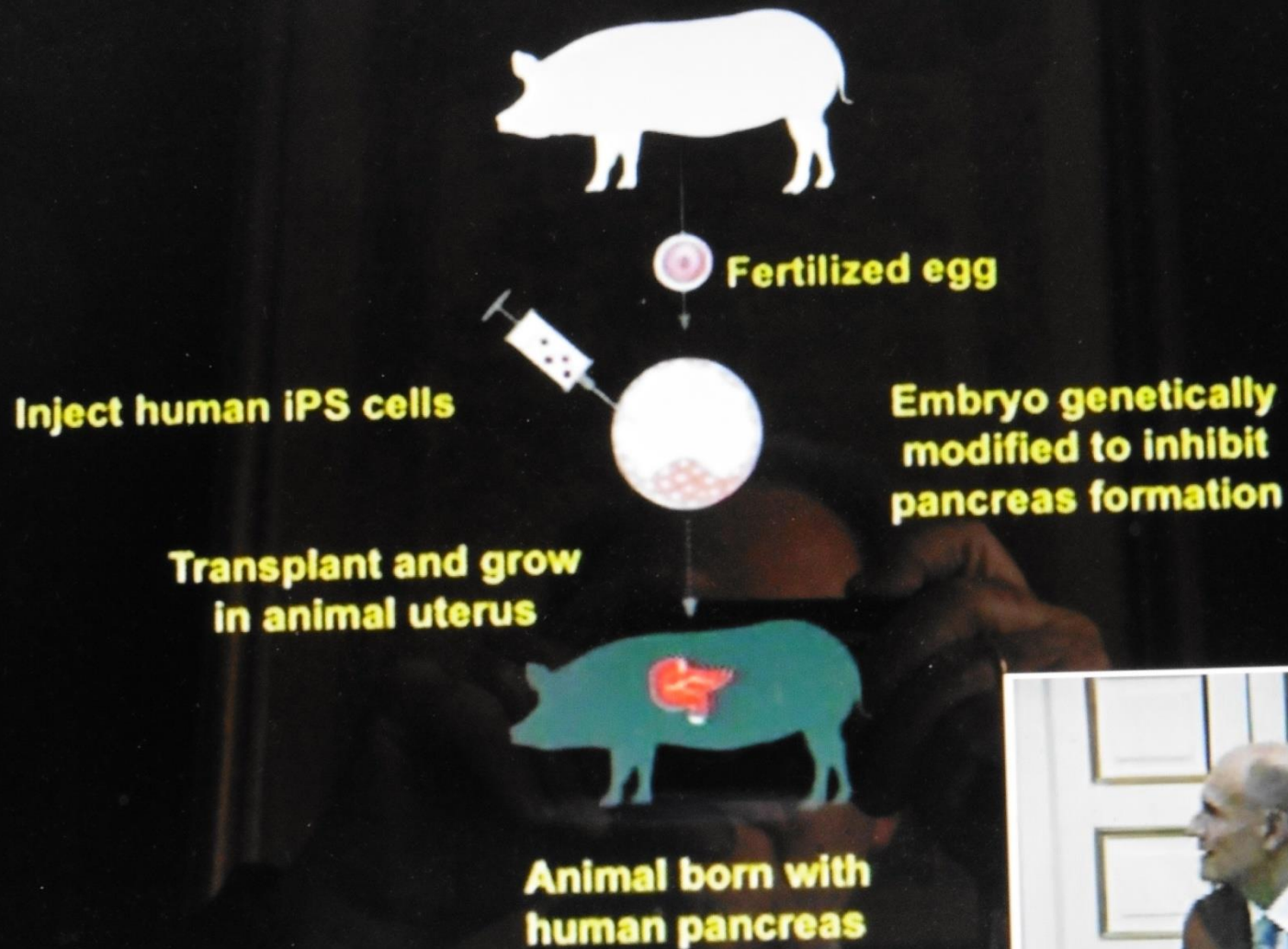




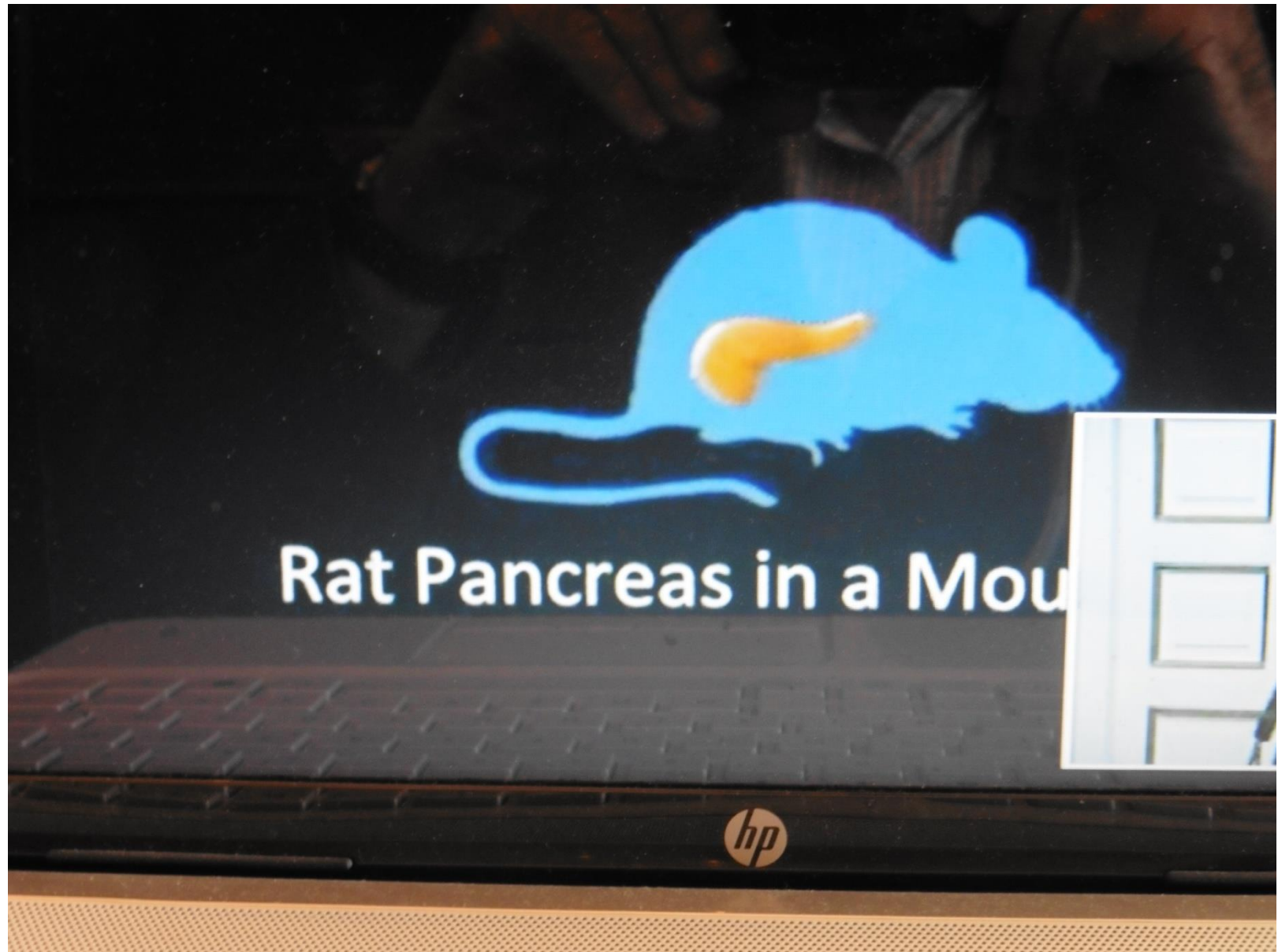




QUIMERAS HUMANAS INTERESPECÍFICAS



QUIMERAS RATÓN/RATA PÁNCREAS



Modifying the Mammalian Genome

Johannes Wilbertz-ISTT



Pronuclear microinjection

1980 → ...



ADDING A GENE

Johannes Wilbertz-ISTT



ES / iPS cells

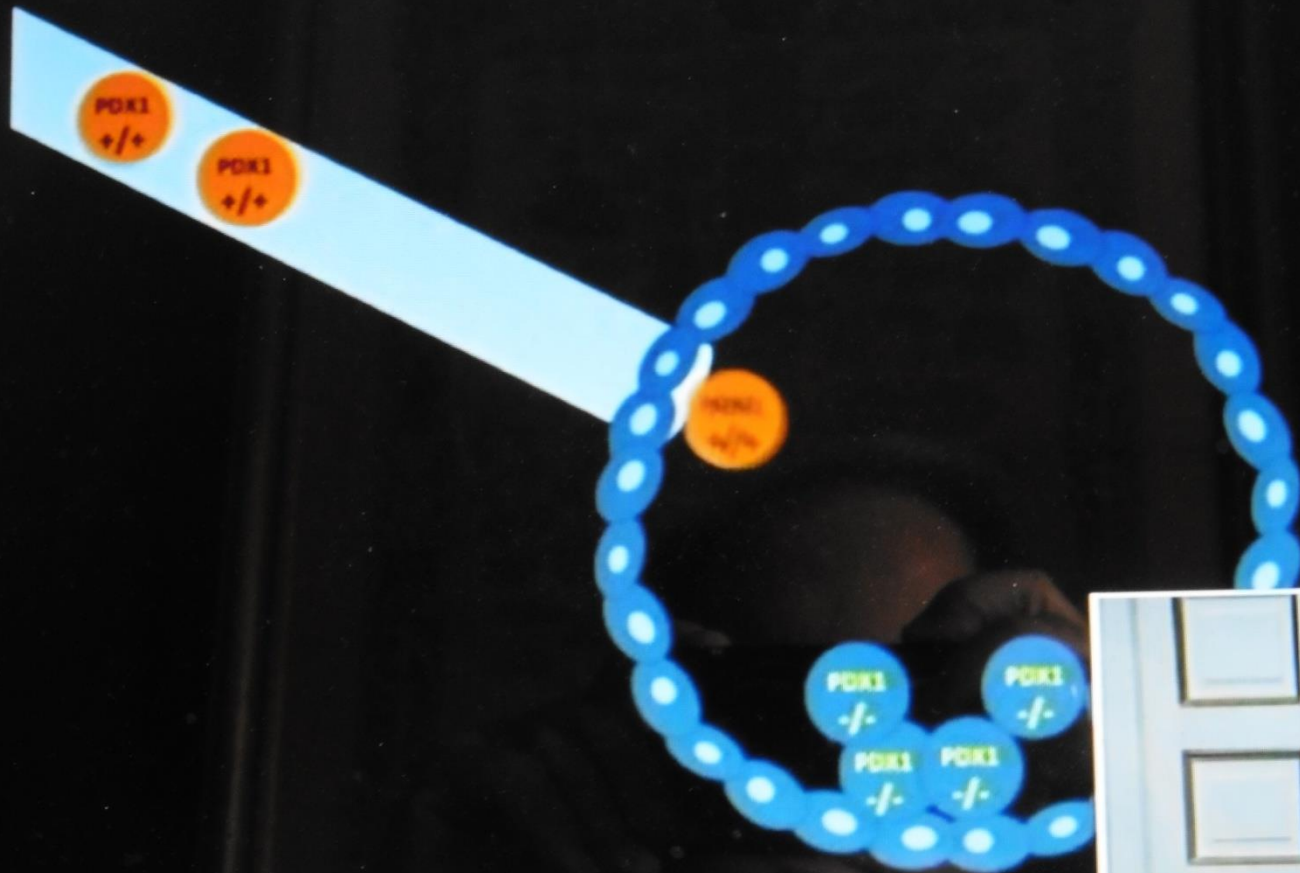
1986 → ...



DELETING A GENE

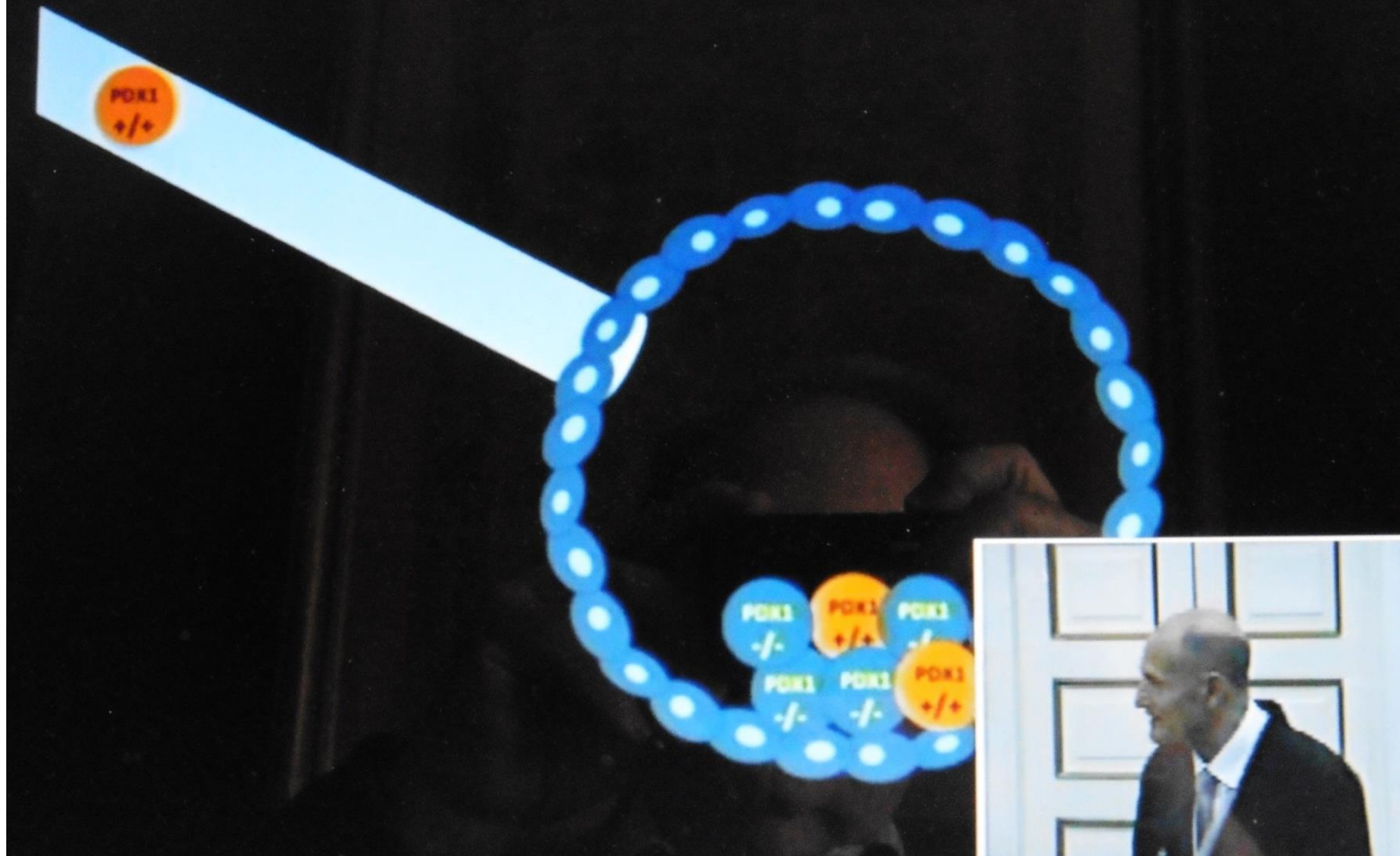
QUIMERAS RATÓN/RATA PÁNCREAS

Blastocyst complementation:
Rat/Mouse



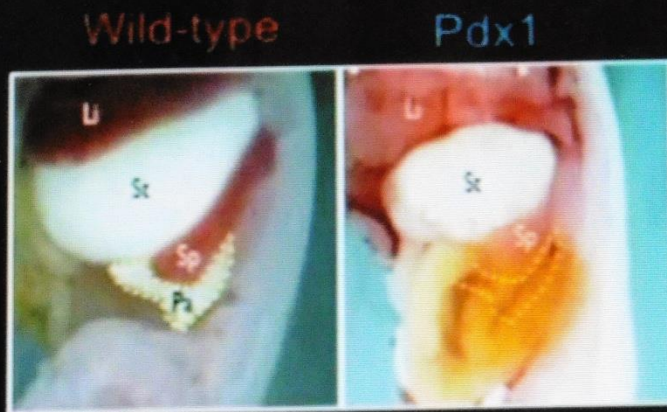
QUIMERAS RATÓN/RATA PÁNCREAS

Blastocyst complementation:
Rat/Mouse

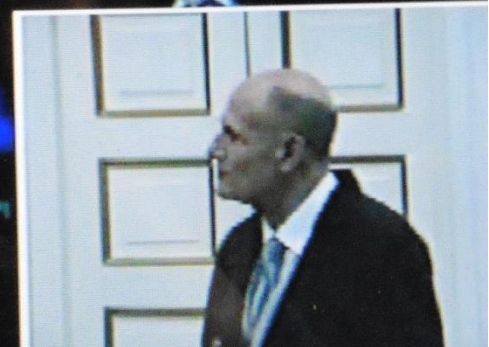
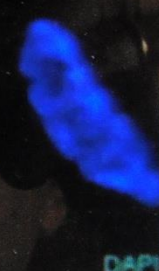
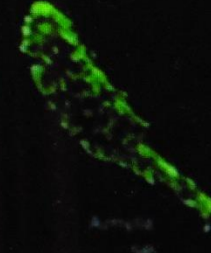
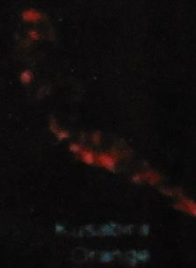


QUIMERAS RATÓN/RATA PÁNCREAS

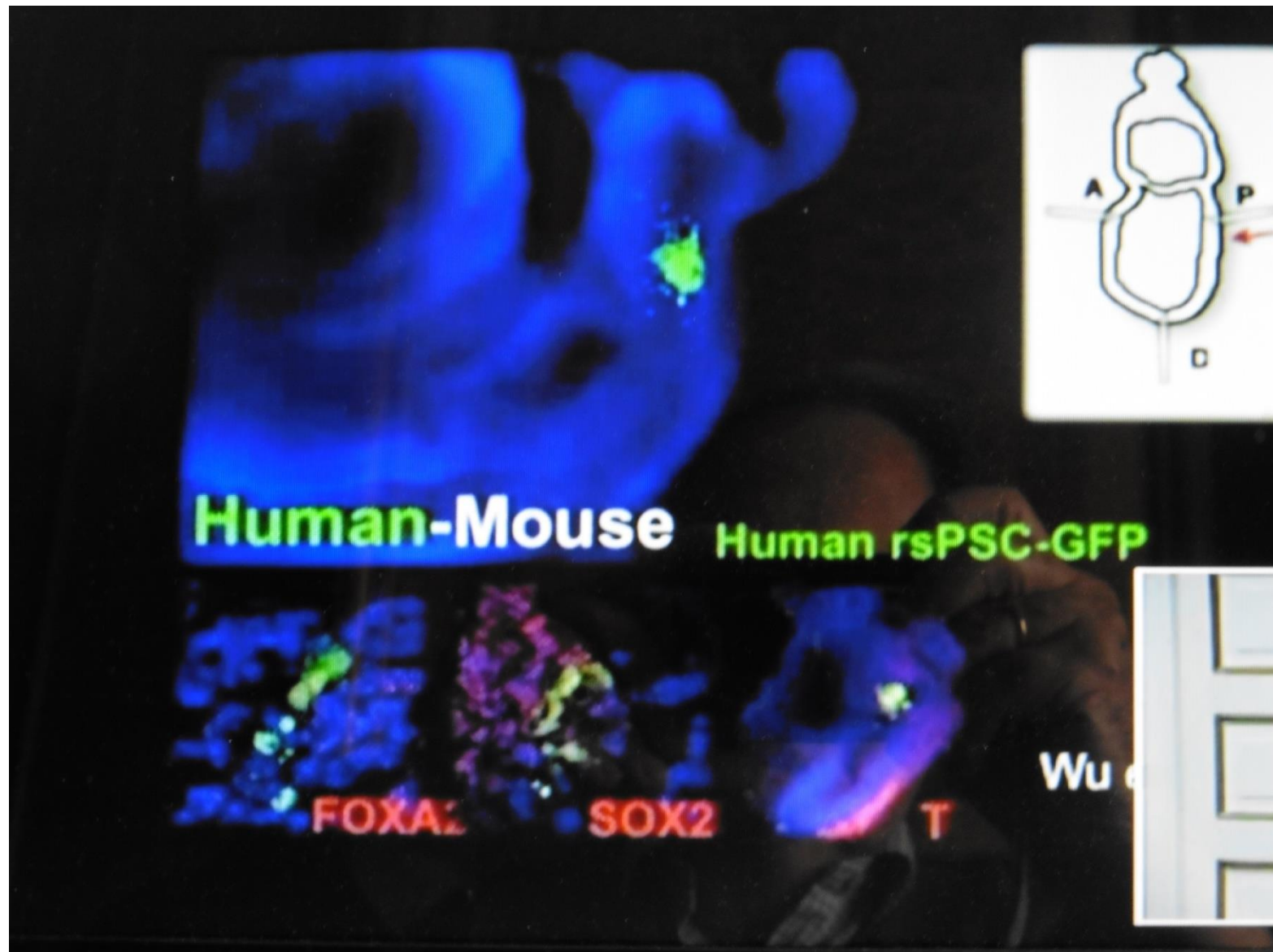
Proof of concept-pancreas



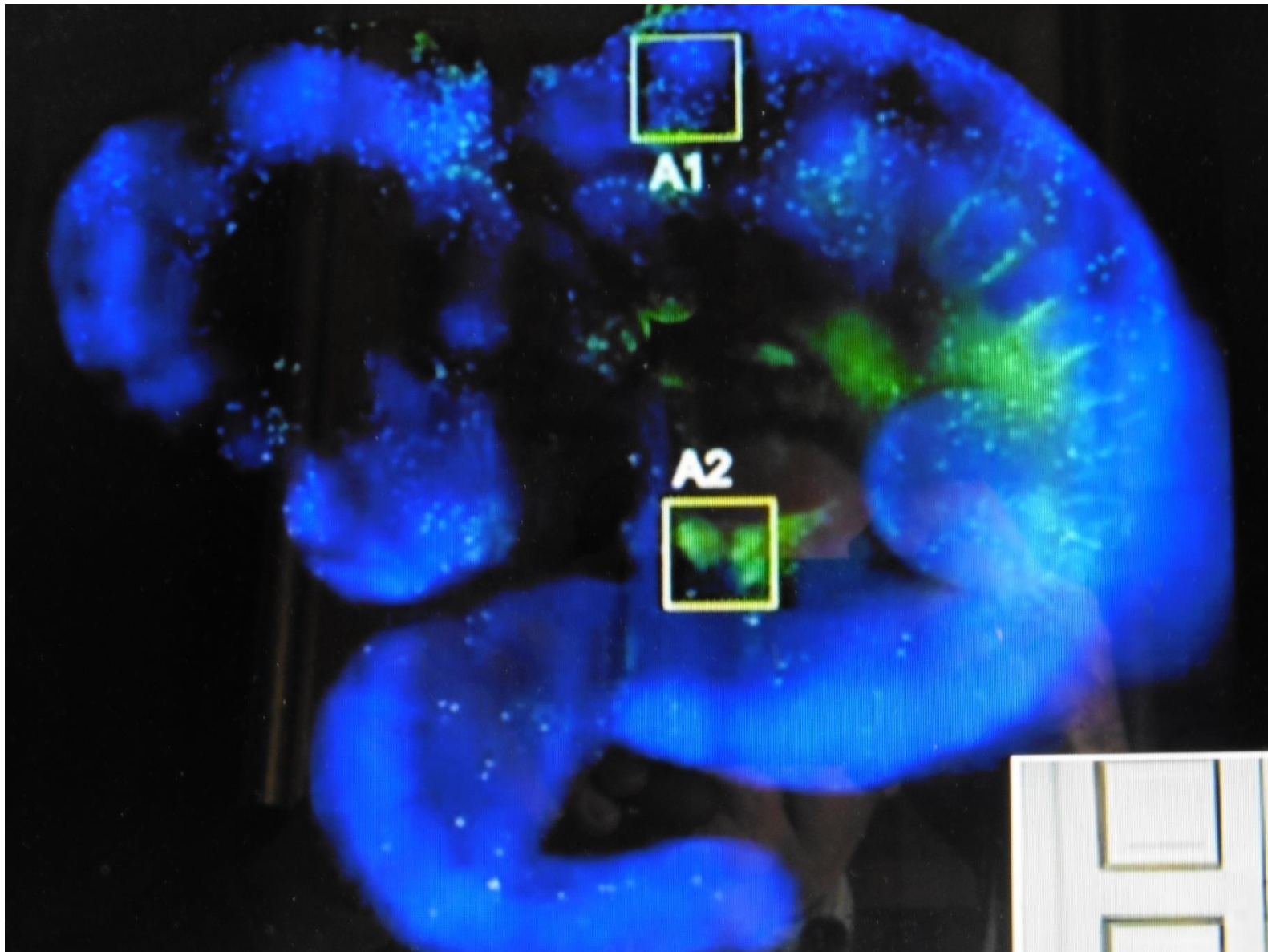
Pdx1^{-/-} + Rat iPSCs



QUIMERA RATÓN/HUMANA



QUIMERA RATÓN/ HUMANA



QUIMERAS HUMANAS INTERESPECÍFICAS

Similarities in early embryo develop

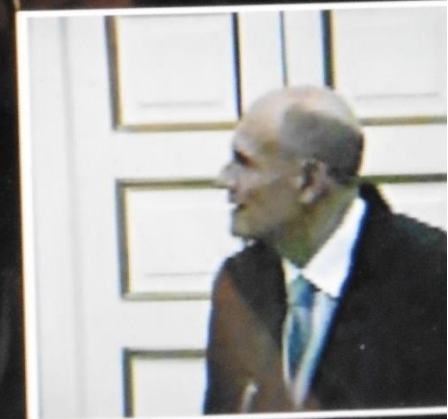
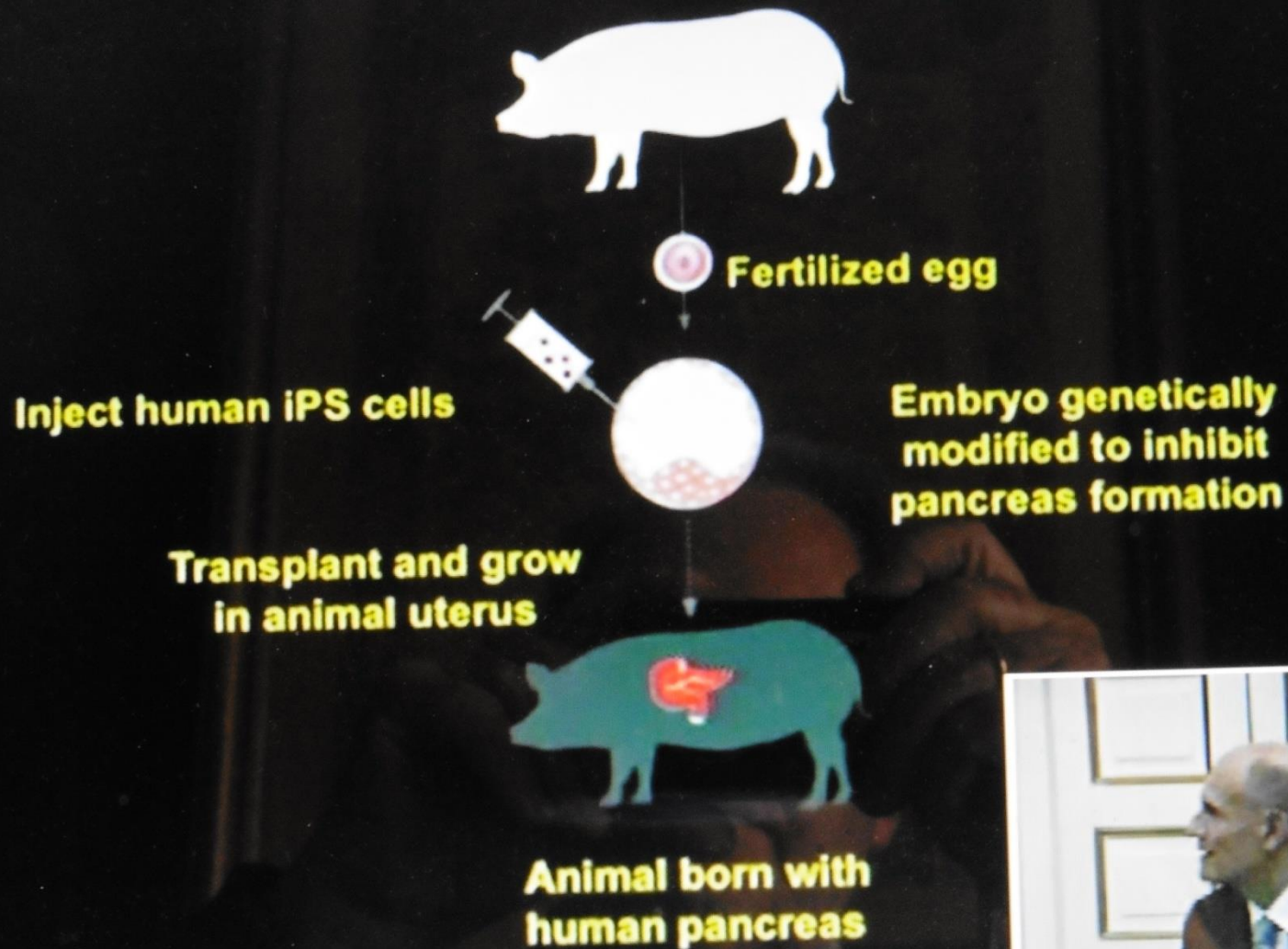


QUIMERAS HUMANAS INTERESPECÍFICAS

Similarities in early embryo development



QUIMERAS HUMANAS INTERESPECÍFICAS

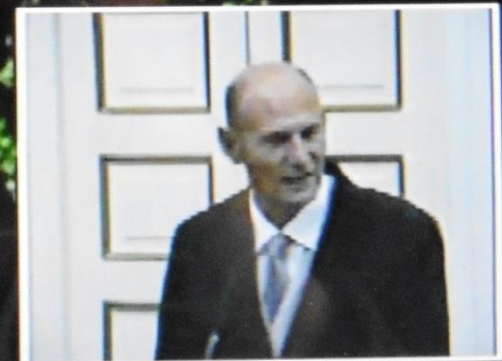


QUIMERAS HUMANAS INTERESPECÍFICAS



QUIMERA CERDO/ HUMANA

Human-Pig Chimeric embryos



QUIMERAS HUMANAS INTERESPECÍFICAS

¿Es posible la complementación quimérica interespecífica?

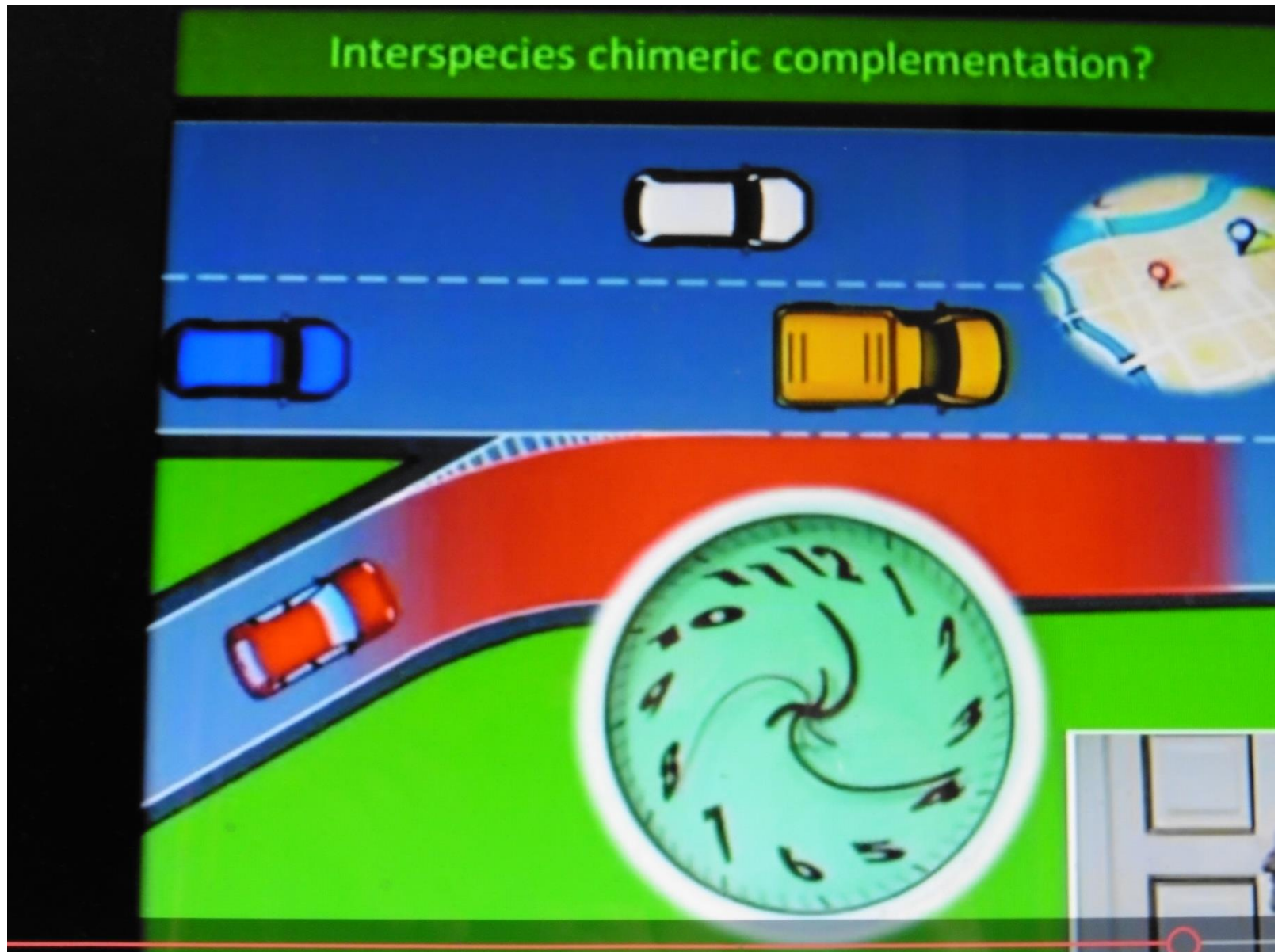
Problemas a resolver desde la ciencia básica

- **Xeno-pluripotencia hPSCs**
- **Heterocronía**
- **Competición interespecífica célula a célula**
- **Estimulación celular especie específica**
- **Respuesta inmune**
- **Seguridad**

QUIMERAS HUMANAS INTERESPECÍFICAS



QUIMERAS HUMANAS INTERESPECÍFICAS

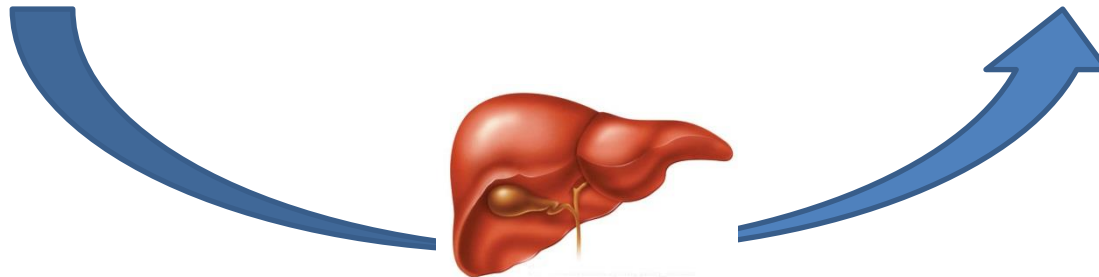


CRISPR-Cas and animal biotechnology

Xenotransplantation



PERV



EDICIÓN GENÓMICA

CONSIDERACIONES ÉTICAS

- **La Ciencia es imparable (S. Ochoa): dos lecturas (el progreso científico es continuo y los científicos no están dispuestos a parar: ¿problemas bioéticos?)**
- **Todo lo que se pueda hacer, se hará**
- **Todo lo que se pueda hacer, hay que hacerlo: el imperativo tecnológico**
- **El Principio de responsabilidad (Hans Jonas 1979: Ensayo de una ética para la civilización tecnológica)**

EDICIÓN GENÓMICA

CONSIDERACIONES ÉTICAS

**El Principio de responsabilidad (Hans Jonas 1979:
Ensayo de una ética para la civilización tecnológica)**

“La tesis de partida de este libro es que la promesa de la técnica moderna se ha convertido en una amenaza, o que la amenaza ha quedado indisolublemente asociada a la promesa...Lo que hoy puede hacer el hombre –y después, en el ejercicio insoslayable de ese poder, tiene que seguir haciendo– carece de parangón en la experiencia pasada”

EDICIÓN GENÓMICA

CONSIDERACIONES ÉTICAS

- Una obviedad ética: las técnicas por sí mismas no son malas, sino que pueden ser malas sus aplicaciones
- Cuando no podíamos hacerlo era fácil decir que no deberíamos hacerlo (J. Travis, 2015, Making the cut. *Science*, 350:1456)

GENÉTICA Y BIOÉTICA: UN DIÁLOGO INTERDISCIPLINAR

Marshall W. Nirenberg (1927-2010) Will society be prepared? *Science*, 157:425-633, 1967

“...el hombre puede ser capaz de programar sus propias células con información sintética mucho antes de que pueda valorar adecuadamente las consecuencias a largo plazo de tales alteraciones, mucho antes de que sea capaz de formular metas y mucho antes de que pueda resolver los problemas éticos y morales que surgirán. Cuando el hombre llegue a ser capaz de dar instrucciones a sus propias células deberá contenerse de hacerlo hasta que tenga la clarividencia suficiente para usar su conocimiento en beneficio de la humanidad.”