

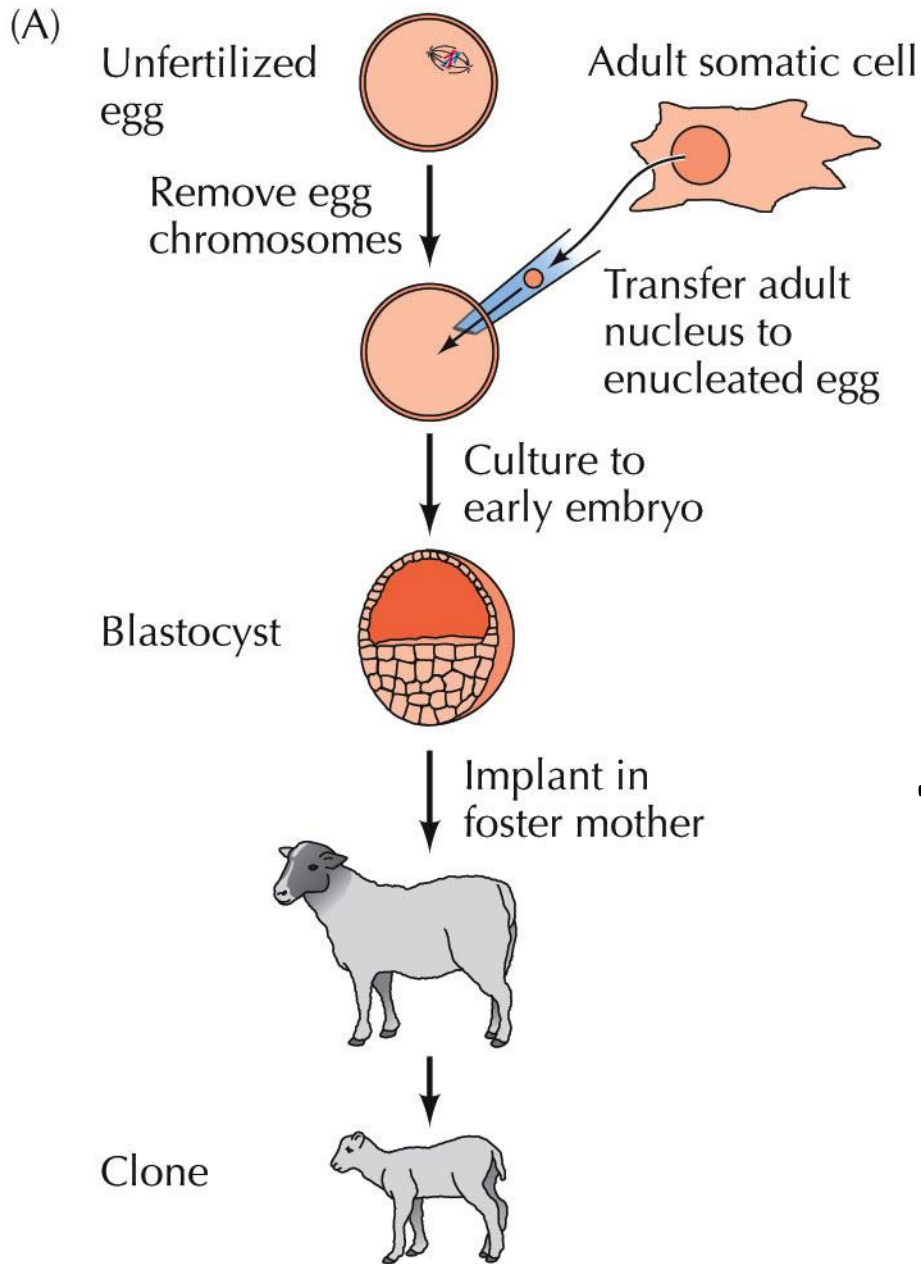
Pasado, presente y futuro de la Edición Genómica

Aplicaciones de la Ingeniería Genética

Reprogramación Celular

Febrero de 2019

Máster en Genética y Evolución
(Especialidad Agroalimentaria)



Transferencia nuclear

Ratón SuperP53

- Copia extra de P53 supresor de tumores (“resistente al cáncer”).
- 15% más longevo



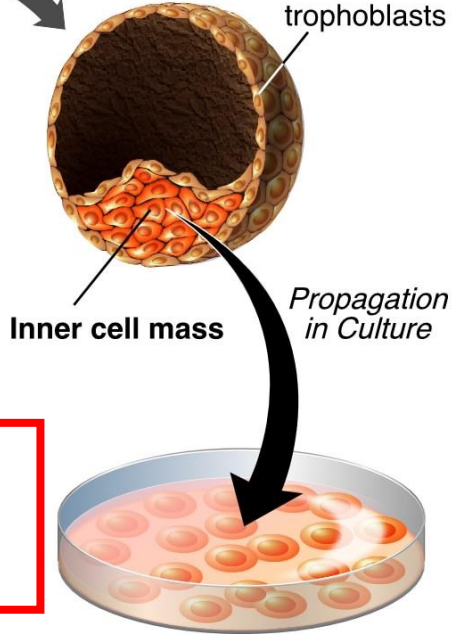
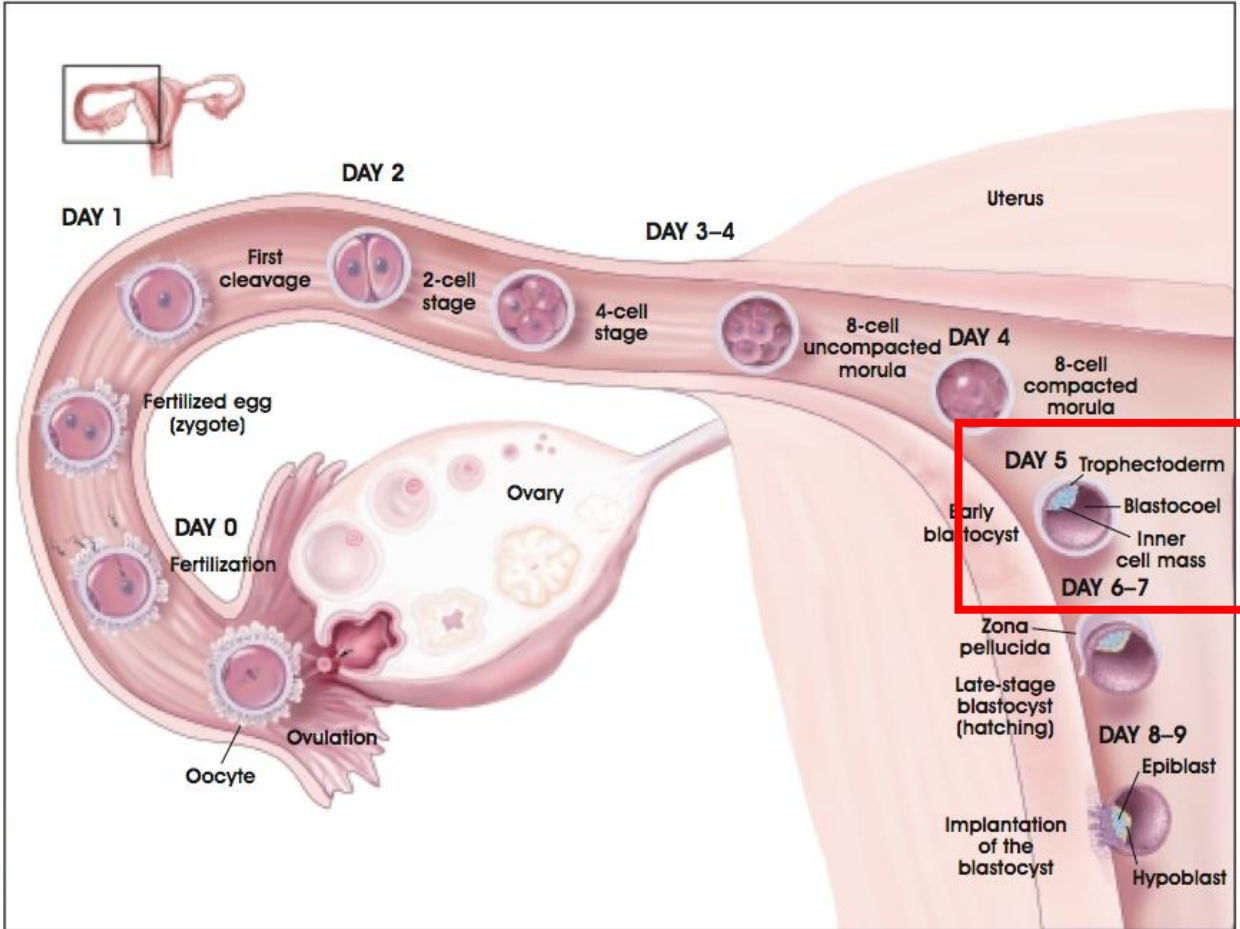
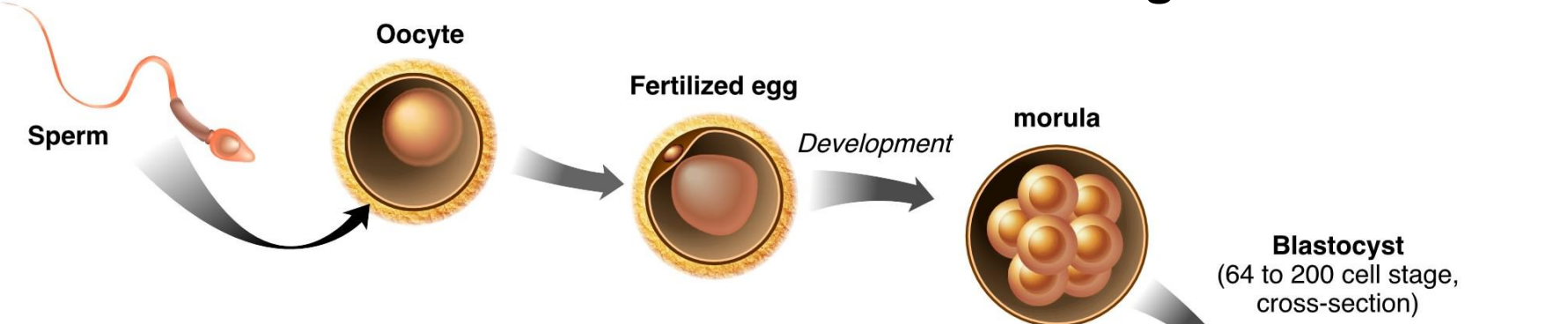
Ratón Triple

- 40% más longevo

**ACTIVIDAD
TELOMERASA**



Embriogénesis humana

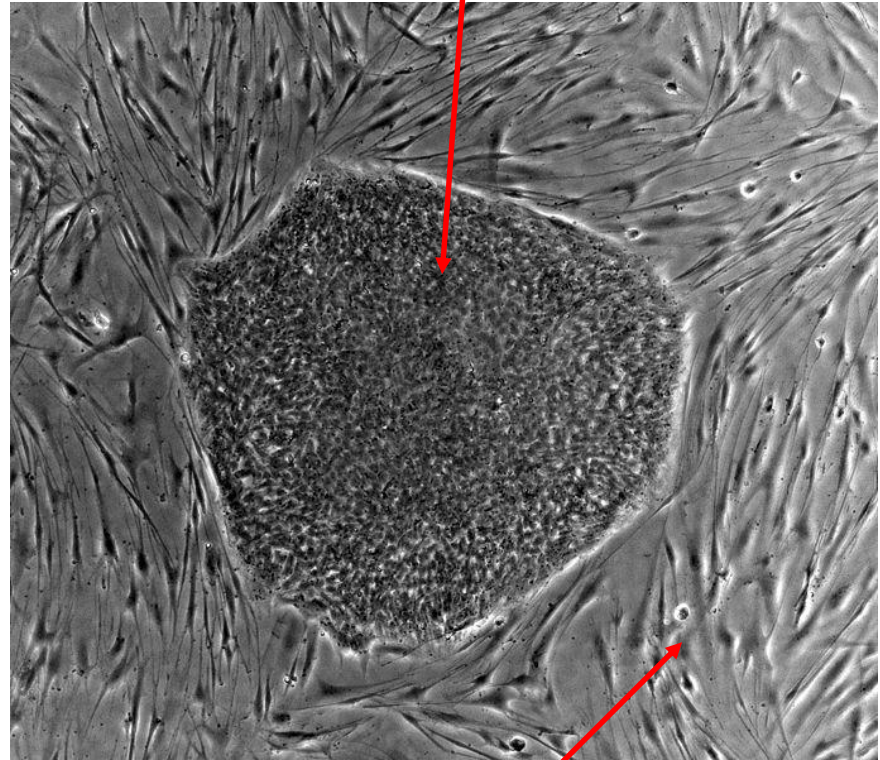


Blastocisto humano

Masa celular interna
(Inner cell mass)



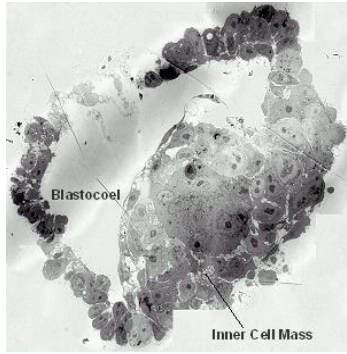
Células troncales humanas
(ES cells)



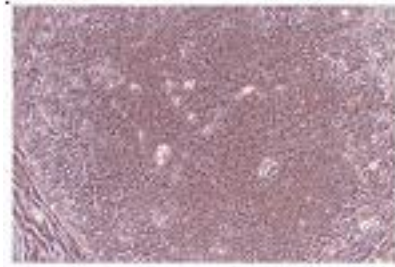
Mouse fibroblasts feeder layer

Terapia celular con células troncales

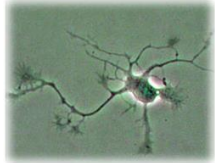
Bancos de células genotipadas y producidas bajo condiciones de Good Manufacturing Practice (cGMP)



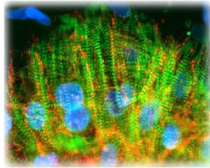
Blastocyst



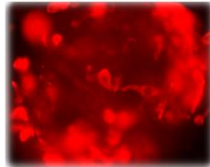
Human Embryonic Stem Cells



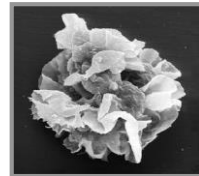
Neuronas



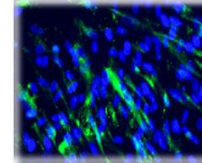
Cardiomiocitos



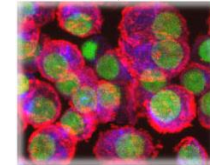
Células beta



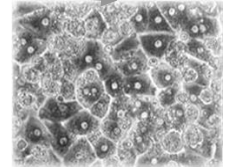
Células dendríticas



Osteoblastos



Condrocitos



Hepatocitos



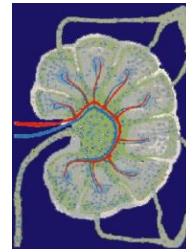
Fallo hepático
Drug discovery



Artritis

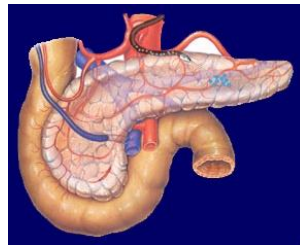


Osteoporosis
Roturas de hueso

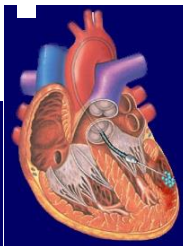


Inducción de
tolerancia frente
a antígenos

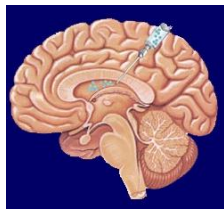
Immunoterapia
contra el cáncer



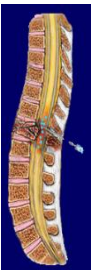
Diabetes



Fallo
cardíaco



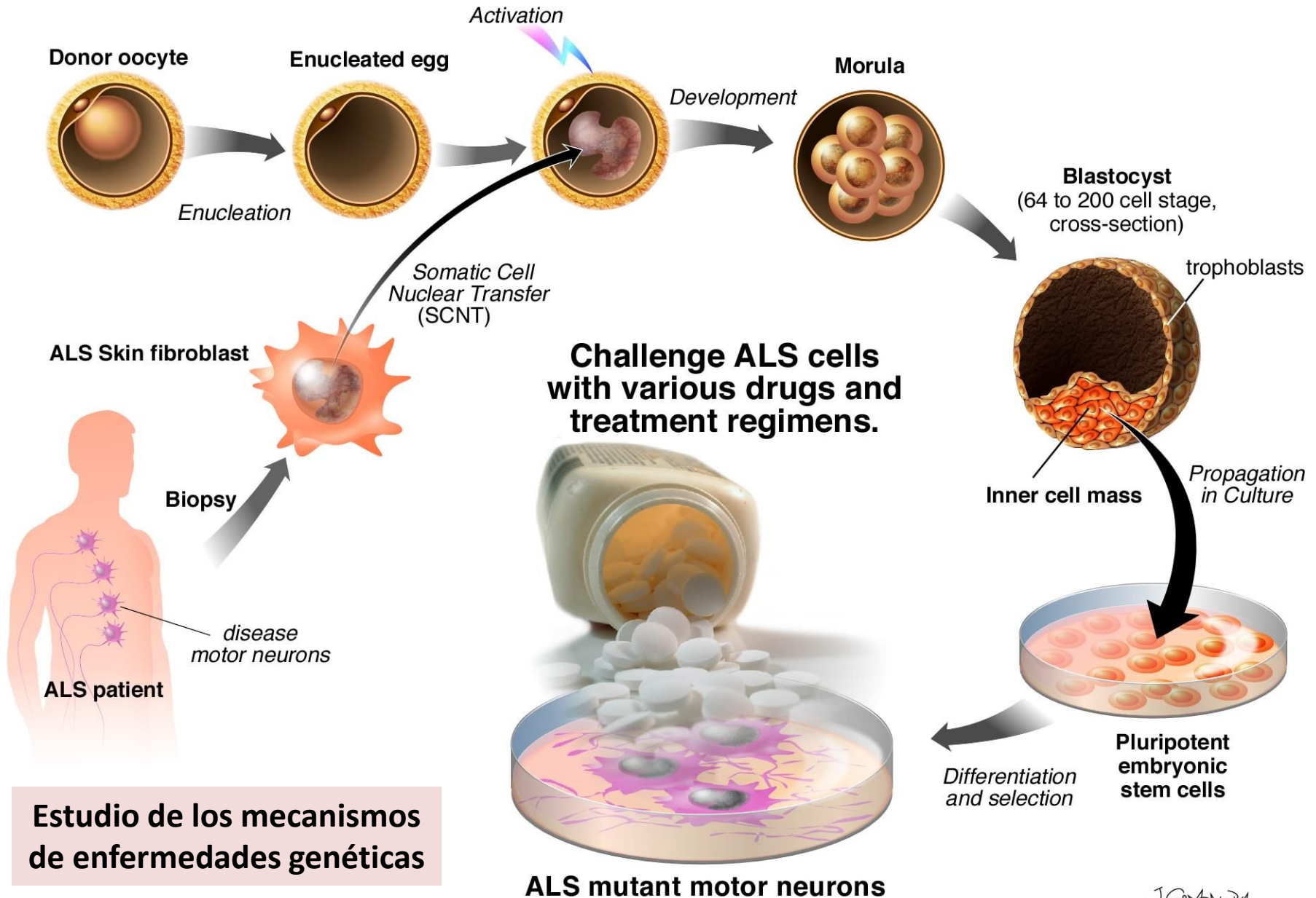
Parkinson's



Lesión
medular

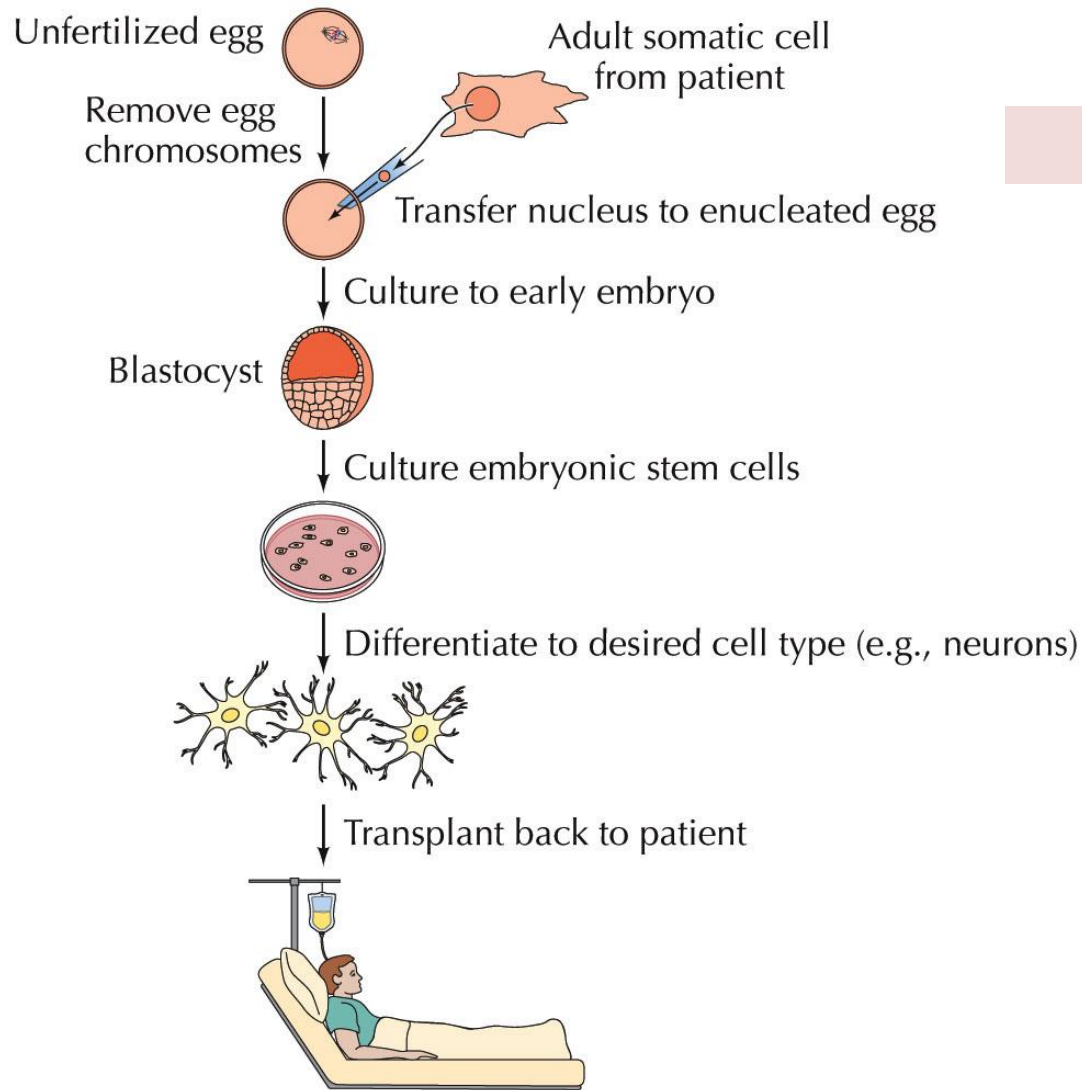
➔ Terapia celular

Usos de la clonación terapéutica



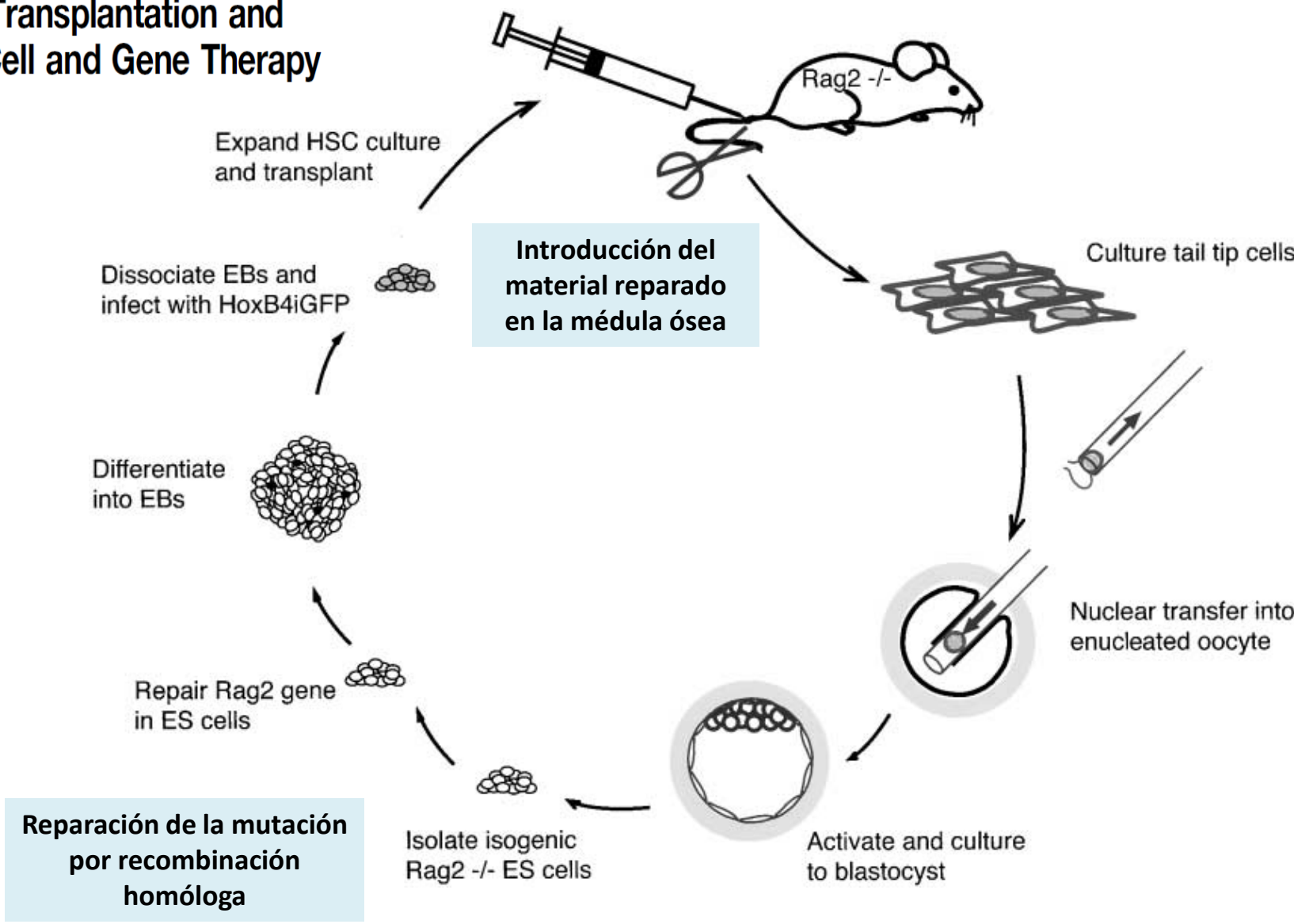
Estudio de los mecanismos de enfermedades genéticas

Usos de la clonación terapéutica

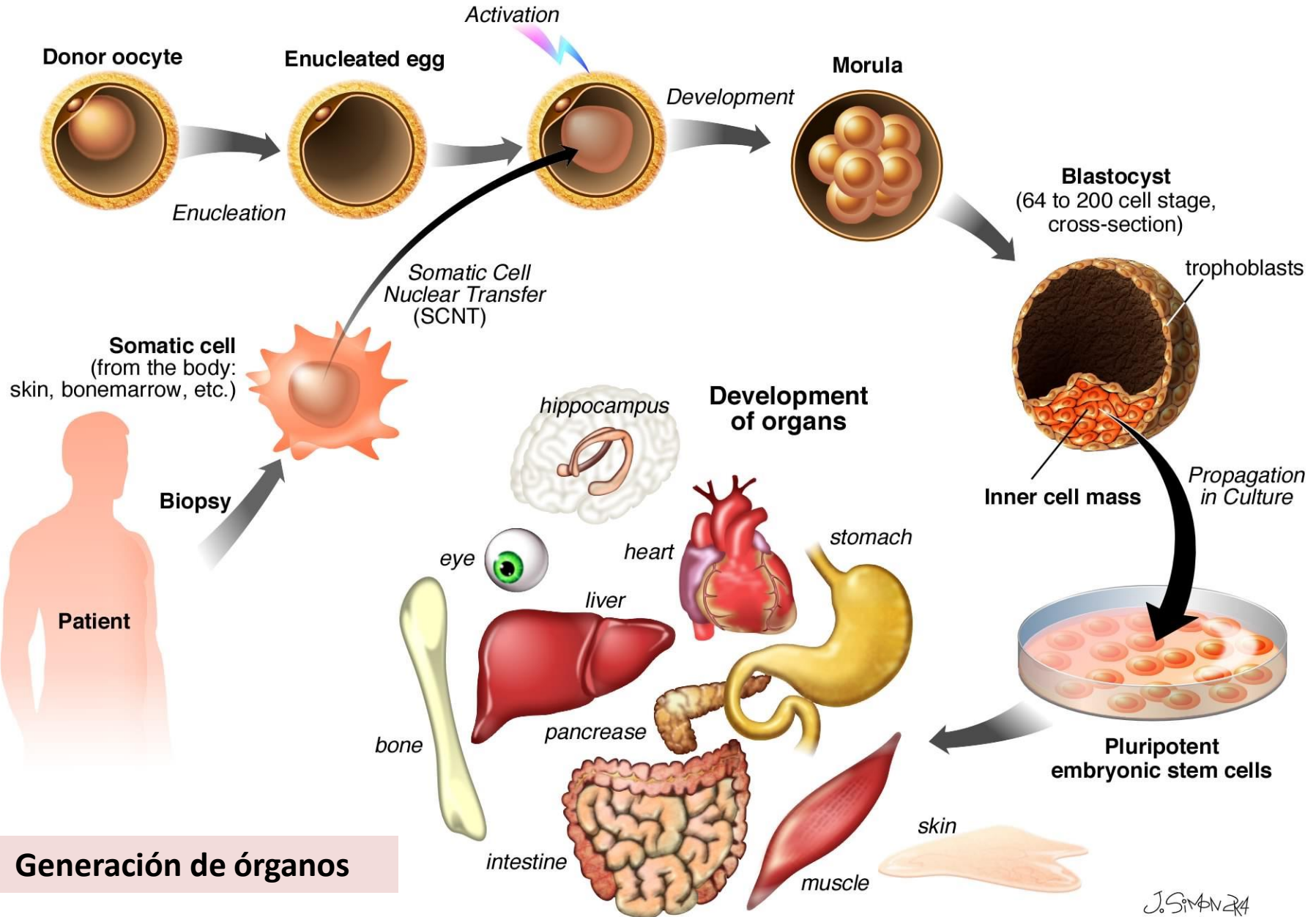


Terapia celular

Correction of a Genetic Defect by Nuclear Transplantation and Combined Cell and Gene Therapy



Usos de la clonación terapéutica



People in the US affected by diseases that may be helped by stem cell research

<u>Condition</u>	<u>Number of Persons Affected</u>
Cardiovascular diseases	58 Million
Autoimmune diseases	30 Million
Diabetes	16 Million
Osteoporosis	10 Million
Cancer	8.2 Million
Alzheimer's disease	4 Million
Parkinson's disease	1.5 Million
Burns (severe)	0.3 Million
Spinal cord injuries	0.25 Million
Birth defects	150,000 (per year)
Total	128.4 Million

Data from the Patients' Coalition for Urgent Research, Washington, DC
(according to Perry, Ref. 267).

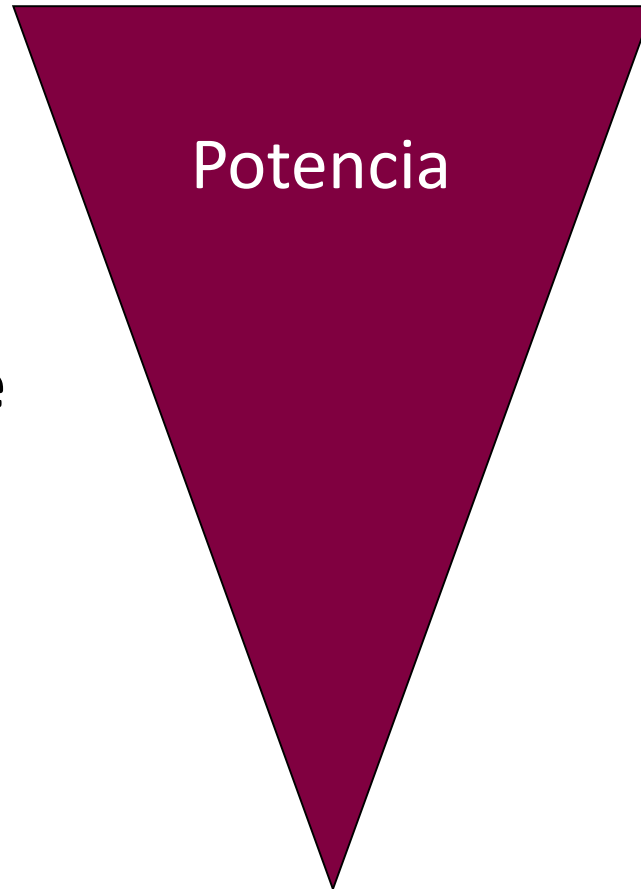
**Enfermedades genéticas con células troncales disponibles
obtenidas a partir de embriones
sobrantes de fecundación in Vitro (14 en total)**

Disease (responsible gene)	Recapitulated phenotype
Huntington (Huntingtin)	Not determined
Cystic Fibrosis (CFTR)	Not determined
X-linked myotubular myopathy (MTM1)	Not determined
Turner syndrome (Monosomy X)	Not determined
Fabry syndrome (GLA)	Not determined
Multiple endocrine neoplasia Type 2 (RET)	Not determined
Marfan syndrome (FBN1)	Not determined
Charcot-Marie Tooth Type 1A (PMP22)	Not determined
Facioscapulohumeral muscular dystrophy	Not determined
Spino-cerebellar Ataxia type 2 (ATXN2)	Not determined
Spino-cerebellar Ataxia type 7 (ATXN2)	Not determined
Fragile-X Syndrome (FRM1)	Extension of FRM1 expression during early differentiation
Myotonic dystrophy type 1 (DMPK)	Detection of the ribonuclear inclusions NMDAR1 alternate splicing defect Defect in neuritogenesis and synaptogenesis in hESCs-derived motoneurons
Lesh-Nihan Syndrome (HRPT1)	Absence of HRPT1 activity
Introduction of the mutation by homologous recombination	Increased production of uric acid

Reprogramación celular

Objetivo: manipular la totipotencia celular

- **Totipotente**
- **Pluripotente**
- **Multipotente**
- **Oligopotente**
- **Unipotente**



Célula somática

Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

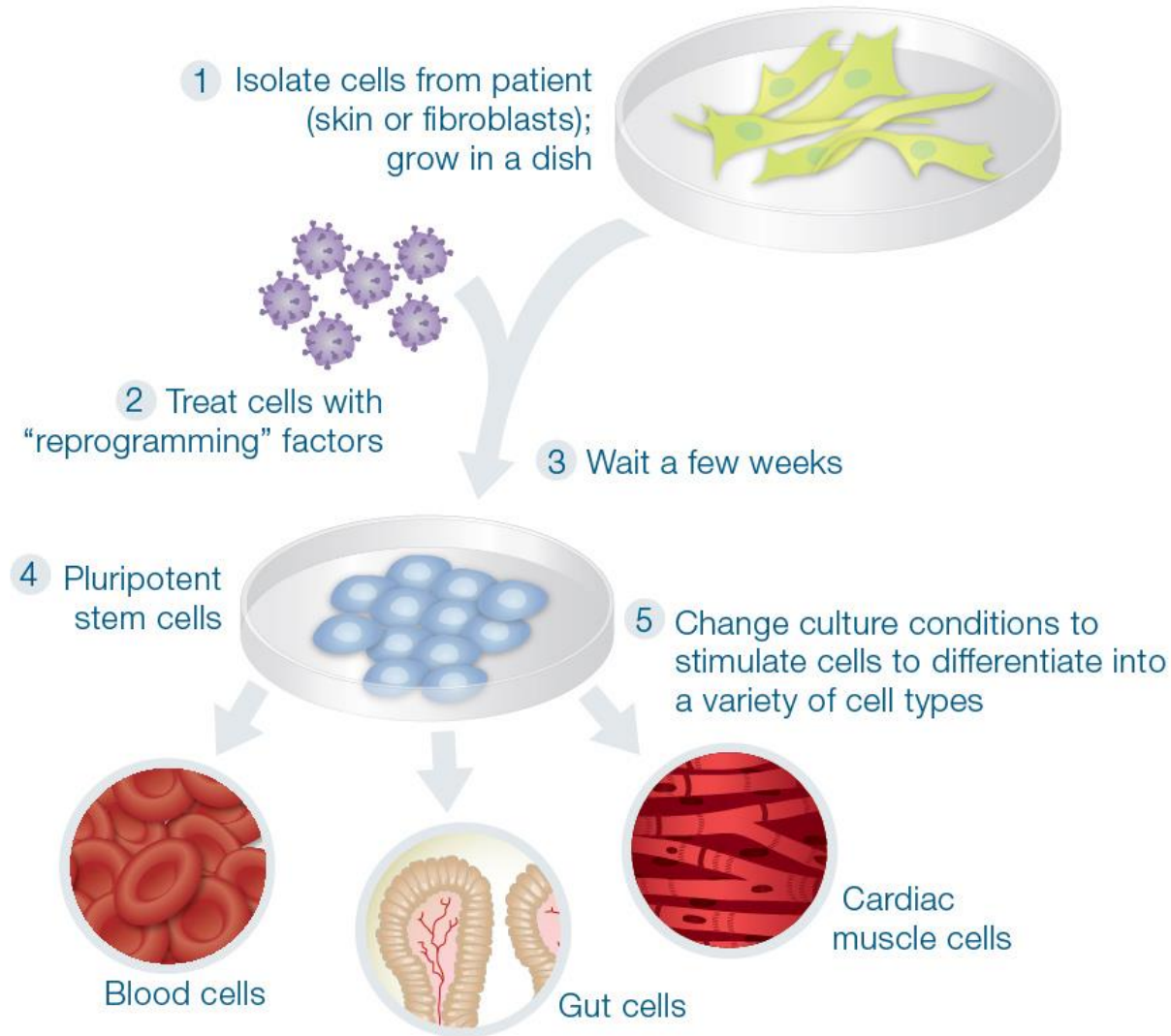
¹ Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

² CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

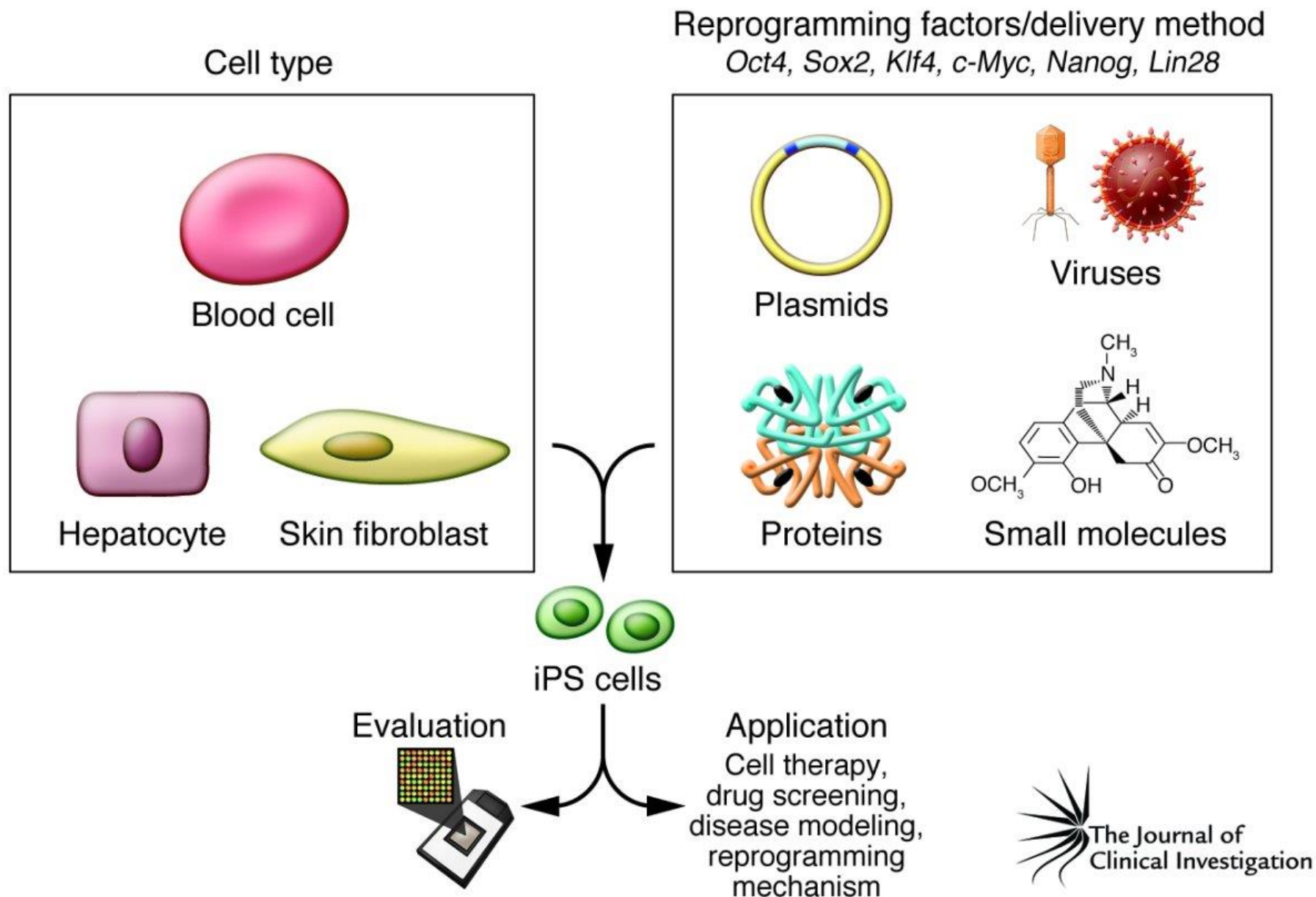
24 factores de transcripción candidatos : Ecat1, Dpp5(Esg1), Fbx015, Nanog, ERas, Dnmt3l, Ecat8, Gdf3, Sox15, Dppa4, Dppa2, Fthl17, Sall4, **Oct4**, **Sox2**, Rex1, Utf1, Tcl1, Dppa3, **Klf4**, b-cat, **cMyc**, Stat3, Grb2



Creating **iPS** cells



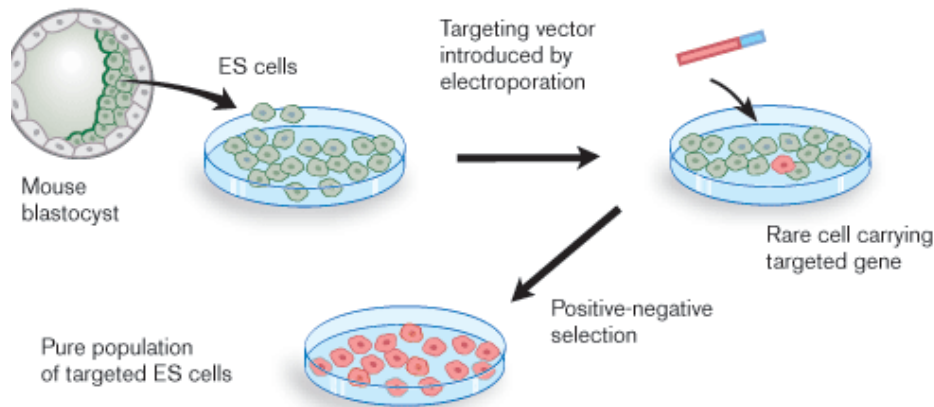
Métodos de reprogramación y tipos celulares reprogramados



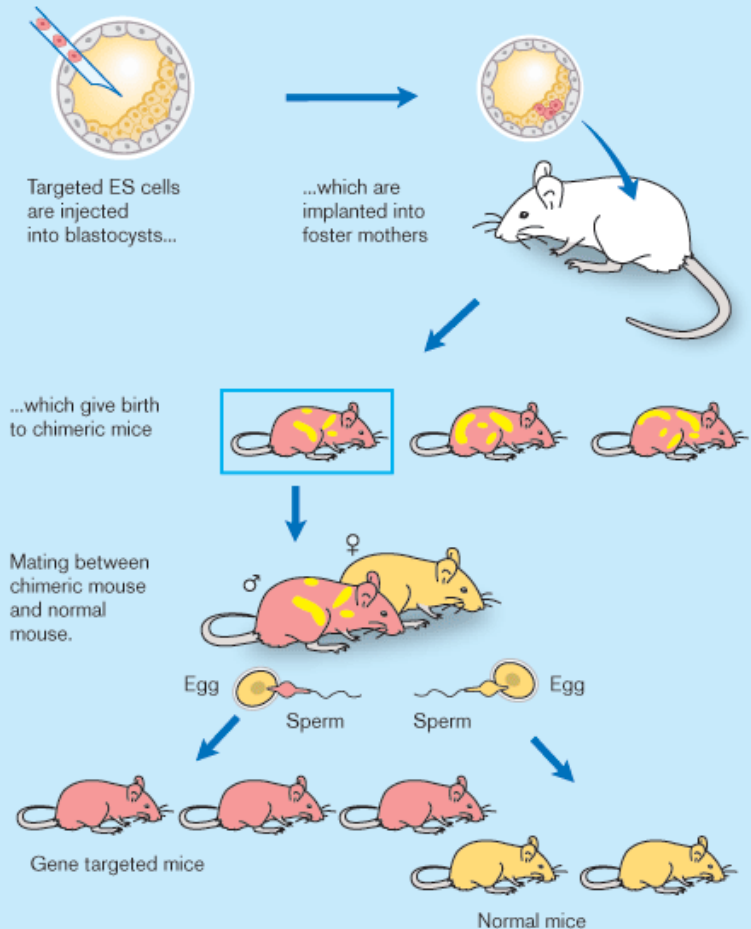
Criterios para definir la calidad de una célula pluripotente inducida (iPS)

- **Immunocitoquímica:** células positivas para fosfatasa alcalina y factores de transcripción propios de estados pluripotentes (Oct4, Klf3, Sox2, NANOG, etc)
- **Pérdida de metilación** en los promotores endógenos de genes de pluripotencia (Oct4, Sox2, Nanog etc).
- **Expresión de antígenos** de expresión detectables por “sorting”: Tra-1-81(+), Tra-1-60(+), SSEA3(+), SSEA4(+)
- Habilidad de diferenciarse en las tres **líneas germinales** (ectodermo, mesodermo, endodermo) durante la formación de cuerpos embrionarios (*in vitro*)
- Formación de **quimeras y transmisión germinal**
- **Complementación tetraploide**

Formación de quimeras y transmisión germinal: “Gene-targeting” en células troncales de ratón



B. Generation of gene targeted mice



Complementación tetraploide

iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation

Xiao-yang Zhao^{1,2*}, Wei Li^{1,2*}, Zhuo Lv^{1,2*}, Lei Liu¹, Man Tong^{1,2}, Tang Hai¹, Jie Hao^{1,2}, Chang-long Guo^{1,2}, Qing-wen Ma³, Liu Wang¹, Fanyi Zeng^{3,4} & Qi Zhou¹

Adult mice generated from induced pluripotent stem cells

Michael J. Boland^{1*}, Jennifer L. Hazen^{1*}, Kristopher L. Nazor^{1*}, Alberto R. Rodriguez², Wesley Gifford³, Greg Martin², Sergey Kupriyanov² & Kristin K. Baldwin¹

Cell Stem Cell

Brief Report

iPS Cells Can Support Full-Term Development of Tetraploid Blastocyst-Complemented Embryos

Lan Kang,^{1,2} Jianle Wang,² Yu Zhang,² Zhaohui Kou,² and Shaorong Gao^{2,*}

¹Graduate Program, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

²National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China

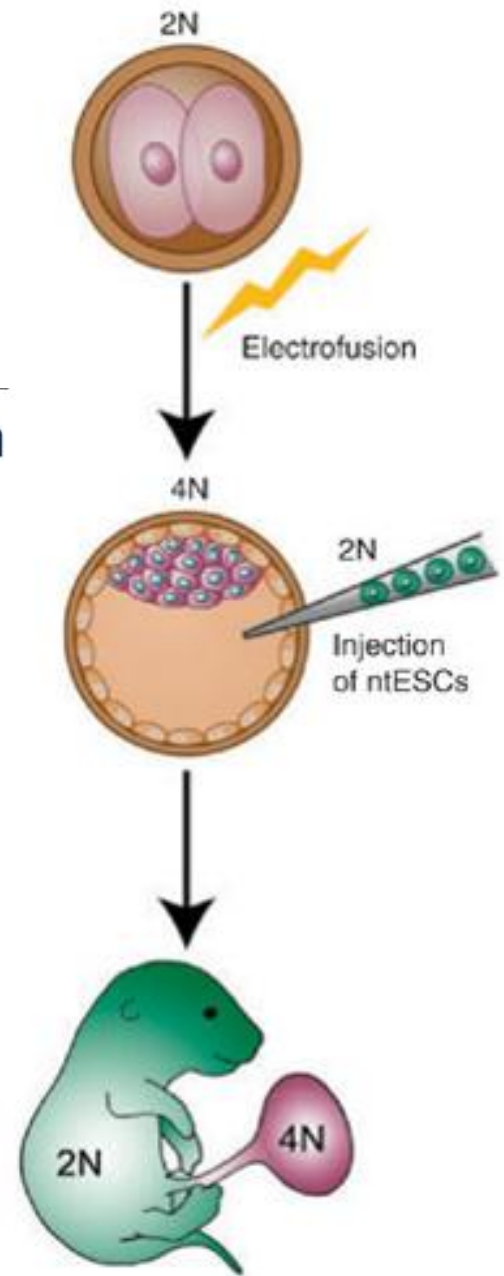
*Correspondence: gaosharong@nibs.ac.cn

DOI 10.1016/j.stem.2009.07.001

Cell Research 21, 546-549 (March 2011) | doi:10.1038/cr.2010.164

Viable mice produced from three-factor induced pluripotent stem (iPS) cells through tetraploid complementation

Lan Kang, Tong Wu, Yu Tao, Ye Yuan, Jing He, Yu Zhang, Tong Luo, Zhaohui Kou and Shaorong Gao



Clonación terapéutica con células iPS

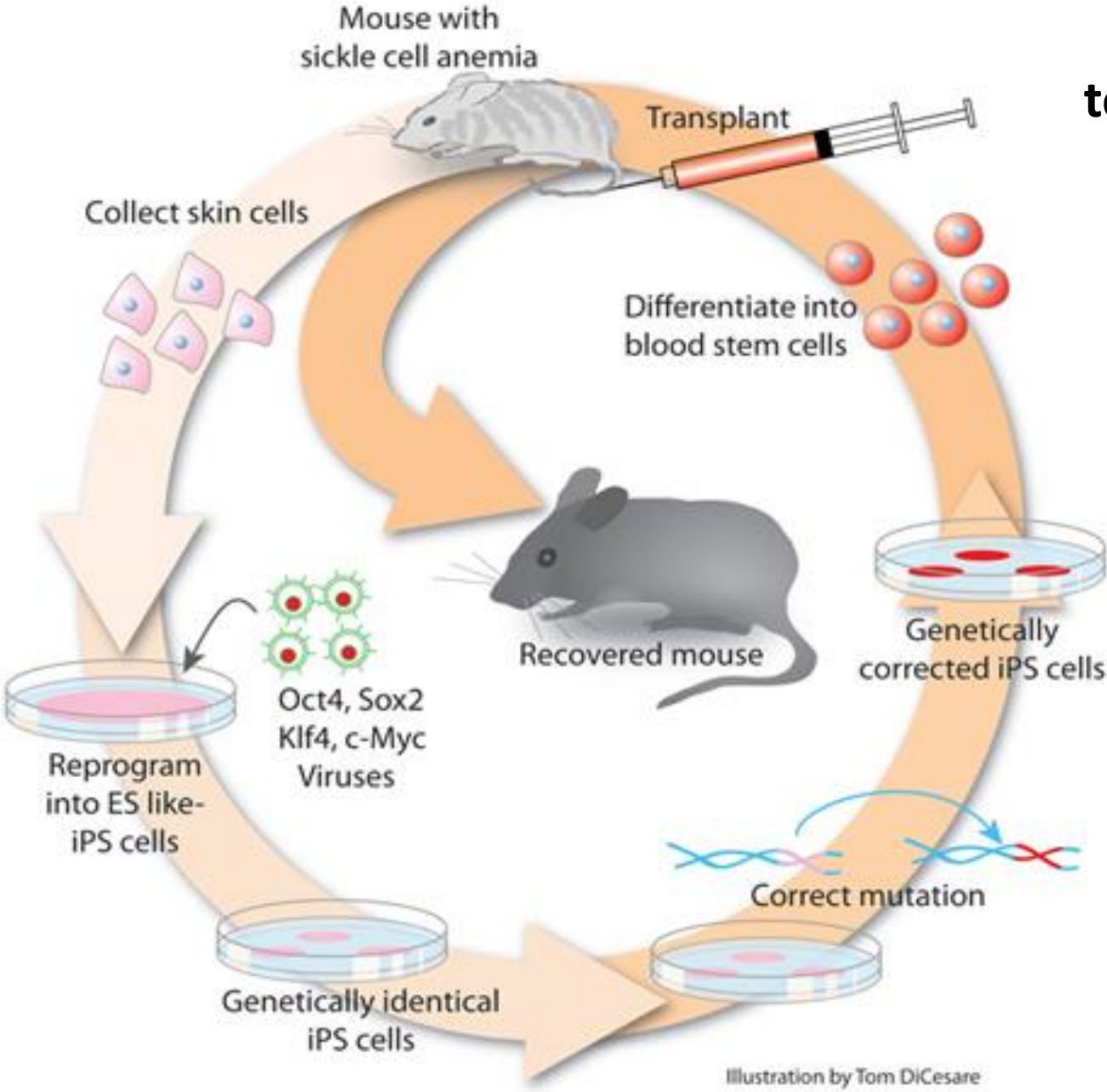


Illustration by Tom DiCesare



Rudimentary egg and sperm cells made from stem cells

A feat achieved for the first time in humans could be a step towards a cure for infertility.

[David Cyranoski](#)

24 December 2014

Oocyte production from mouse pluripotent stem cells in culture

[Katsuhiko Hayashi](#), [Orié Hikabe](#), [Nobuhiko Hamazaki](#), [Go Nagamatsu](#), [So Shimamoto](#) & [Norio Hamada](#)

[Hayashi's group](#)

Protocol Exchange (2016) | [doi:10.1038/protex.2016.065](https://doi.org/10.1038/protex.2016.065)

Published online 19 October 2016

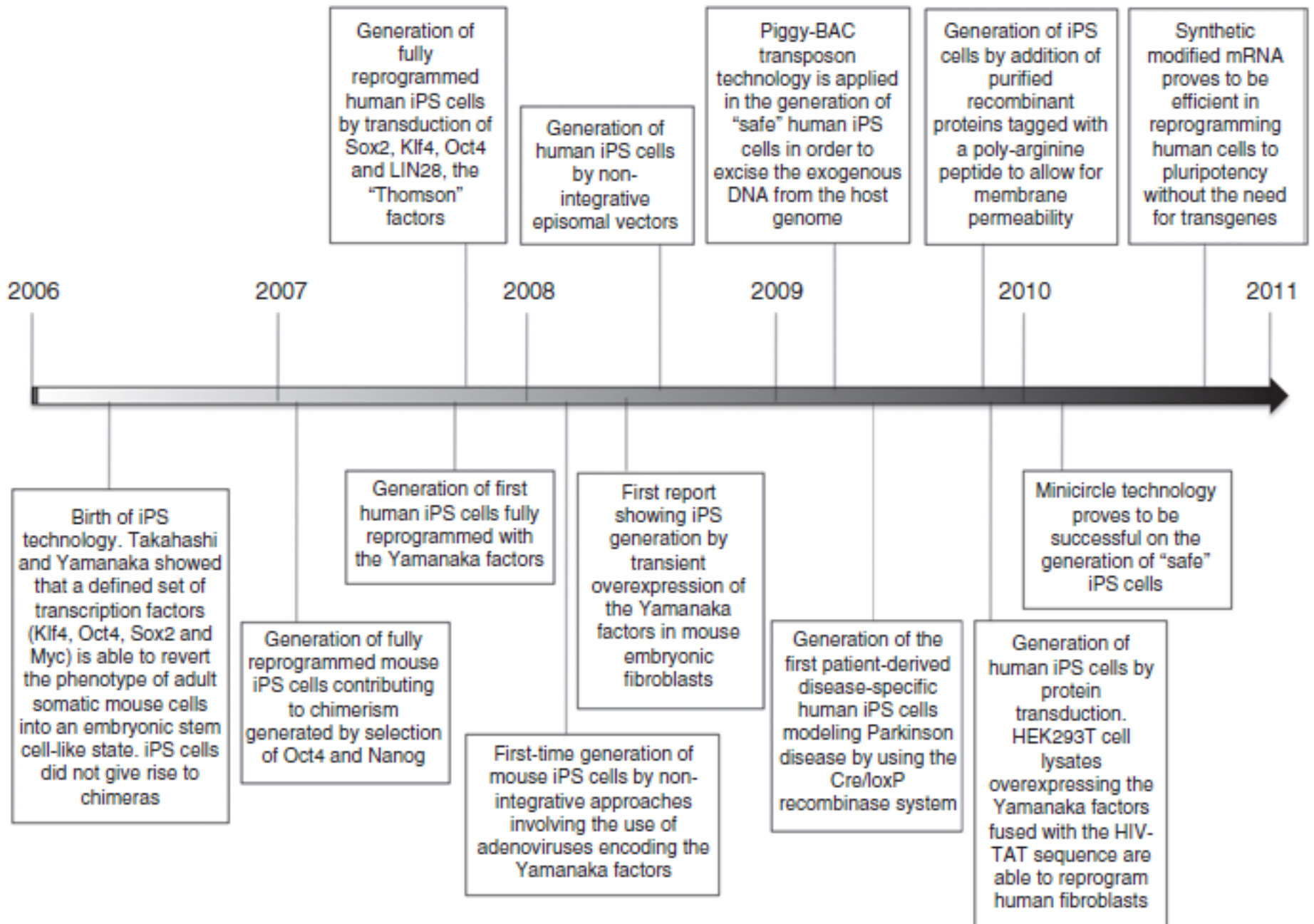
Article

Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells

[Katsuhiko Hayashi](#)^{1, 3}, [Hiroshi Ohta](#)^{1, 3}, [Kazuki Kurimoto](#)^{1, 3}, [Shinya Aramaki](#)¹, [Mitinori Saitou](#)^{1, 2, 3}  

Mouse and human iPS cells have been generated in a variety of ways

Cell type	Reprogramming factors	Method of delivery	Timeline (wk)	Efficiency	Genomic integration	Genomic integration removed	Refs.
Mouse							
MEFs	O,S,K,M	Retroviral vectors	2–3	0.01%–0.050%	Yes	No	10, 12–15
MEFs	O,S,K	Retroviral vectors	3–4	0.001%–0.01%	Yes	No	56, 65, 98
Hepatocytes and stomach cells	O,S,K,M or O,S,K	Retroviral vectors	2–3	0.5%–3%	Yes	No	46
Neural stem cells	O,S,K,M or O,S,K or O,K,M or O,S,M	Retroviral vectors	1–4	0.1%–5%	Yes	No	48, 99
Neural stem cells	O,K or O,M or O	Retroviral vectors	2–4	0.1%–0.2%	Yes	No	32, 100
B lymphocytes	O,S,K,M	Lentiviral vectors ^A	2–3	0.01%–0.1%	Yes	No	34
Hepatocytes	O,S,K,M	Adenoviral vectors	4–5	0.0001%–0.001%	No	–	29
MEFs	O,S,K,M	Plasmid transient transfection	3–4	0.0001%–0.001%	No	–	30
MEFs	O,S,K,M	piggyBac transposon ^A	2	NR	Yes	Yes	67
MEFs	O,S,K,M	Nonviral plasmid transfection	2	2.5%	Yes	Yes	66
MEFs	O,S,K,M or O,S,K + VPA	Recombinant proteins	4–5	0.002%–0.008%	No	–	31
MEFs	O,K + Bix and BayK	Retroviral vectors	2–3	0.007%–0.02%	Yes	No	60
MEFs	O,S,K,M	Plasmid nucleofection	2–3	NR	No	–	68
MEFs, TTFs	O,S,K,M	Single lentiviral vector ^A	2–3	0.5%	Yes	No	63
MEFs, TTFs	O,K,M + RepSox or O,K + RepSox	Retroviral vectors	2	~1%	Yes	No	61
Human							
Skin fibroblasts and bone marrow mesenchymal cells	O,S,K,M or O,S,K,M,T,SV or O,S,K,M,N or O,S,K	Retroviral vectors	2–5	0.001%–1%	Yes	No	2, 16, 18, 19
Skin fibroblasts	O,S,K or O,S + VPA	Retroviral vectors	4	0.001%–0.01%	Yes	No	57
Keratinocytes	O,S,K,M or O,S,K	Retroviral vectors	1–2	1%	Yes	No	49
Peripheral blood cells	O,S,K,M	Retroviral vectors	2	0.01%–0.02%	Yes	No	50
Skin fibroblasts and keratinocytes	O,S,K,M or O,S,K,M,N	Lentiviral vectors ^A	3–4	0.002%	Yes	No	101
Skin fibroblasts	O,S,N,L or O,S,N,L,M,K	Lentiviral vectors	2–3	0.01%–1%	Yes	No	17, 20, 33
Skin fibroblasts	O,S,K,M or O,S,K	Lentiviral vectors ^A	3–5	NR	Yes	Partial ^B	36
Embryonic fibroblasts	O,S,K,M	piggyBac transposon ^A	2–4	NR	Yes	No	67
Embryonic fibroblasts	O,S,K,M	piggyBac transposon ^A	2–4	0.005%–0.01%	Yes	No	66
Skin fibroblasts	O,S,N,L,M,K,SV	Episomal vectors	NR	0.003%–0.006%	No	–	33
Adipose stem cells	O,S,K,M	Lentiviral vectors	2–3	0.2%	Yes	No	51
Skin fibroblasts	O,S,K,M	Recombinant proteins ^C	8	0.001%	No	–	32



Método	Características/Ventajas/Desventajas
Retroviral	Integración genómica, infección células en división, eficiencia generación iPS media/alta
Lentiviral	Integración genómica, infección de células en división y quiescentes, vectores policistrónicos disponibles, expresión inducible de transgenes, eliminación transgenes mediante CRE/loxP, eficiencia generación iPS alta
Transposon	Integración genómica, vector policistrónico disponible, expresión inducible de transgenes, eliminación de transgenes mediante transposasa, potencial para terapia génica, eficiencia generación iPS alta
Fago C31 integrasa	Integración genómica, vector policistrónico, expresión inducible, potencial para terapia génica, excisión de transgenes mediante Cre/loxP, eficiencia generación iPS media
Adenovirus	Baja posibilidad de integración genómica, vector policistrónico, potencial para terapia génica, eficiencia de generación de iPS baja
Virus Sendai	Sin integración genómica, eficiencia generación iPS media/alta
Plásmido	Baja posibilidad de integración, eficiencia generación iPS muy baja
Plásmido Episomal	Baja posibilidad de integración, eficiencia generación iPS muy baja
Proteína	Sin integración genómica, múltiples transducciones, eficiencia generación iPS muy baja
Minicírculo	Baja posibilidad de integración genómica, múltiples transfecciones, muy baja eficiencia
mRNA	Sin integración genómica, múltiples transfecciones, alta eficiencia

Reparación mediante “gene-targeting” del genoma humano en células iPS

Estrategia	vector	Delivery	homología eficiencia	Pros	Contras	Innovaciones
Modificación de La técnica original de gene targeting en mES cells	Plásmido linearizado	Electroporación Transfección nucleofección	5-13kb 1-14.6% 27-40%	Diseño fácil Simple de adoptar	Baja eficiencia de targeting	Desarrollo de moléculas químicas para la mejora de clonogenicidad
Recombinación Homóloga con BACs	BAC linearizado	Electroporación	82.5-195kb 21-27%	Fácil de adoptar Posibilidad de reparar ambos alelos	Difícil encontrar los eventos de targeting	Desarrollo de la tecnología de recombineering
Mediado por virus	HDAdv o AAV	Infección viral	2-3kb AAV (33-45%) 12-22kb HDAdV (19-90%)	Delivery eficiente con poca citotoxicidad	Las proteínas virales pueden inducir una respuesta inmune	Desarrollo de virus no integrativos
Modificación del Genoma mediante zinc finger nucleasas	Plásmidos expresando ZFN junto con Plásmidos linearizados con homología	Transfección Nucleofección Infección	1-4kb ZFN (5-100%)	Alta eficiencia de targeting	Experiencia en ingeniería de proteínas Mutagénesis indeseada de otros lugares e el genoma	Desarrollo de la tecnología de Zinc fingers

Células iPS/Modelos animales/Secuenciación tercera generación

