

INGENIERÍA GENÉTICA APLICADA

Carrera: Microbiología

Plan de estudios: 2023

Área de Formación: Aplicada

Año: Cuarto

Régimen de Cursada: Cuatrimestral

Carácter: Obligatoria

Carga horaria total: 70 horas

Carga horaria teórica: 20 horas

Carga horaria práctica: 50 horas

OBJETIVO GENERAL DEL CURSO

Comprender los procedimientos necesarios para obtener un organismo eucariota recombinante, el cual puede utilizarse en la producción de inmunógenos, fármacos, enzimas, organismos quiméricos, entre otros. Profundizar el conocimiento de las metodologías prácticas en el laboratorio de Ingeniería Genética Aplicada, como primer paso en el desarrollo de un producto recombinante. Sentar las bases para los cursos de Bioprocesos y Producción de biológicos que abordan los procesos de escalado en la producción y purificado del producto recombinante.

OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Se espera que **al final del curso** el estudiante:

- Adquiera un lenguaje técnico, a través de la lectura y exposición grupal de artículos científicos relacionados con el temario del curso.
- Desarrolle progresivamente un aprendizaje autónomo, y sea capaz de elaborar en forma grupal ideas para resolver problemáticas tratadas en el curso.
- Desarrolle habilidades metodológicas teóricas y prácticas que le permitan aplicar los conocimientos adquiridos para el desarrollo de un producto proteico recombinante en organismos superiores.

CONTENIDOS MÍNIMOS

Introducción a la Ingeniería genética. Propiedades de los vectores de clonado y expresión eucariota. Subclonación. Levaduras y hongos, manipulación genética. Clonado y expresión en levaduras. Métodos de transformación de levaduras. Protoplastos y electroporación. Vectores de clonado para *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Clonado y expresión en plantas. Vectores para plantas. Genes reporteros en plantas transformadas: GUS, luciferasa, GFP Sistemas de transformación en plantas. Transferencia de ADN con micropartículas (Gen Gun) y electroporación. Clonado y expresión en células de insecto. Composición genómica y ciclo de vida de los baculovirus. Baculovirus como vectores de expresión para células de insecto. Clonado y expresión en células de mamíferos. Expresión de genes exógenos en células de mamíferos. Tipos de vectores: plásmidos y virus (adeno y retrovirus). Concentración y purificación de los productos de expresión: precipitación alcohólica, *salting out*. Mutagénesis genómica dirigida. Genómica reversa en virus. Mutagénesis genómica al azar para estudios de genómica funcional, aplicaciones y ejemplificación de casos. Sistema CRISPR-Cas como herramienta de expresión de genes. RNAi.

PROGRAMA ANALÍTICO

UNIDAD N° I: CLONADO MOLECULAR EN EUCARIOTAS

Componentes principales de un vector de expresión eucariota. Propiedades de los vectores de clonado y expresión. Inductores de la expresión. Nuevos sistemas de clonado molecular recombinogénico (Gateway)

UNIDAD N° II: MANIPULACIÓN GENÉTICA DE HONGOS (LEVADURAS)

Vectores de clonado para levaduras, estructura y métodos de selección. Sistemas comerciales de expresión de proteínas en levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis*. Metodologías de clonado y expresión heteróloga en levaduras. Métodos de transformación de levaduras. Selección de transformantes, medios de cultivos selectivos para transformantes. Inducción de la expresión de proteínas. Modificaciones postraduccionales de los productos proteicos en levaduras.

UNIDAD N° III: CLONADO Y EXPRESIÓN EN CÉLULAS DE INSECTO

Contenidos teóricos: composición genómica y ciclo de vida de los baculovirus. Los Baculovirus como vectores de expresión para células de insecto. Plásmidos lanzadera, estructura y metodologías de selección. Diferentes metodologías comerciales. Clonado de genes en el sistema (BAC to BAC). Metodologías de transfección de ADN de Bacmídico. Líneas celulares de insectos y manipulación de cultivos de células de insectos. Modificaciones postraduccionales de los productos proteicos en células de insecto. Expresión y purificación.

UNIDAD N° IV: CLONADO Y EXPRESIÓN EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Tipos de vectores: plásmidos y virus (adeno y retrovirus). Transferencia horizontal de ácidos nucleicos a células eucariotas (Transposones y retrotransposones). Líneas celulares de mamíferos más utilizadas en investigación e industria: BHK-21, RK-13, VERO, CHO, HELA. Hibridomas. Expresión de genes exógenos en células de mamíferos. Animales transgénicos como biorreactores.

UNIDAD N° V: CLONADO Y EXPRESIÓN EN PLANTAS

Vectores de expresión para plantas. Genes reporteros en plantas transformadas: GUS, luciferasa, GFP. Sistemas de transformación en plantas (sistema de transferencia de genes basados en *Agrobacterium tumefaciens*). Transferencia de ADN con micropartículas (Gen Gun) y electroporación. Modelo de *Arabidopsis thaliana*. Los virus vegetales como herramientas para la transferencia de genes. Silenciamiento como mecanismo de defensa en la planta. Uso de plantas en la industria.

UNIDAD N° VI: LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Optimización de la expresión en cada sistema de expresión. Diferentes metodologías para la concentración y purificación de los productos de expresión: precipitación alcohólica, *salting out*, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad por unión a iones metálicos IMAC o por proteína de unión a maltosa MBP. Técnicas para determinar el grado de plegamiento de las proteínas. Electroforesis bidimensional, espectroscopias de masas y secuenciación peptídica.

UNIDAD N° VII: MUTAGENESIS GENÓMICA

Mutagénesis genómica dirigida. Genómica reversa en virus. Mutagénesis genómica al azar para estudios de genómica funcional, aplicaciones y ejemplificación de casos. Sistema CRISPR-Cas como herramienta de expresión de genes. RNAi.

METODOLOGÍA DE ENSEÑANZA

Cada APO será un encuentro presencial de 5 horas, donde se recuperan conceptos previos que sirven como andamiaje para construir los conocimientos propios del curso. Se utilizarán diversas metodologías didácticas: preguntas-respuestas, videos, simulaciones, páginas web. A continuación, se realizará la actividad de taller y/o prácticas de laboratorio.

Todos los materiales e información necesaria y requerida para el desarrollo del curso se encontrarán disponibles en el Aula Virtual Moodle FCV UNLP con sincronización SIU-Guaraní.

Cada APO estará asociada a la resolución de guías de estudio/guías de problemas, análisis de trabajos científicos en idioma inglés de temas afines y exposición en forma individual de los mismos. Para ello se brindarán contenidos básicos y complementarios en diversos formatos (videos, páginas web) orientados a la actividad participativa y los aportes que brinden los alumnos en la resolución de ejercicios.

Se procederá a realizar en forma práctica todos los pasos necesarios para el clonado y expresión de una proteína de interés en un sistema de expresión eucariota. Dichos pasos incluirán desde el diseño de primers específicos, armado de las construcciones en los distintos vectores de clonado y expresión *in silico* y en forma práctica. Para ello los estudiantes se dividirán en grupos. Cada grupo llevará a cabo la parte experimental independientemente. También se podrá realizar la actividad con antelación y observación el día correspondiente a la misma.

DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES TEÓRICAS Y PRÁCTICAS

■ Actividades teóricas

Se va a desarrollar en un aula con cañón y pizarrón donde se reunirán los docentes y los estudiantes. Se abordará la clase teórica del día, en forma de presentación por parte del docente a cargo del curso.

■ Actividades prácticas

Consistirá en la resolución de las guías de problemas, seminario-taller y prácticas de laboratorio.

Las prácticas de laboratorio se desarrollarán en el laboratorio de virología, para ello los docentes del curso dividirán a los estudiantes en grupos y se les asignará al comienzo del curso, la realización de un trabajo práctico por etapas consecutivas basado en el clonado y expresión de un gen de interés.

Se realizará un seguimiento personalizado del alumno en cuanto a participación y empeño puesto en la tarea de aprendizaje, expresión conceptual (adecuada utilización de vocabulario técnico, fluidez y claridad de expresión), y aprovechamiento de la actividad práctica: confección de informes, capacidad de relacionar nuevos conceptos con otros adquiridos previamente. Correcta utilización de las normas de Bioseguridad y especialmente en lo que respecta a elementos de seguridad personal (guardapolvo, guantes descartables, barbijo, anteojos). Una parte muy importante de este curso es que el estudiante trabaje en equipo con compromiso y responsabilidad social para asumir su papel profesional.

METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

Evaluación conceptual continua: Se considerará como estrategia evaluativa del curso, el modelo de evaluación continua, donde se realizarán distintas preguntas, debates, análisis de artículos científicos relacionados con los diversos temas y metodologías a tratar en el curso. Dichas actividades serán dirigidas y moderadas por los docentes del curso. La finalidad de dichas actividades es curar contenidos tratados en cursos y utilizarlos de andamiaje para construir nuevos conocimientos.

Evaluación formal sumativa: Se realizará una única evaluación parcial escrita (3 instancias). El parcial se confeccionará en base a los temas dictados, actividades prácticas y a las guías de actividades elaboradas por el personal docente del Curso. Se evaluará la capacidad de análisis y resolución de problemas planteados.

Los estudiantes deberán aprobar con nota de cuatro (4) puntos o superior. Aquellos estudiantes que obtengan nota siete (7) o superior, aprobarán el curso Ingeniería Genética Aplicada por el sistema de promoción; con un promedio inferior a 7 (siete) puntos, deberán rendir EFI en las fechas que el CD determine a tal efecto.

BIBLIOGRAFÍA

■ Molecular cloning: a laboratory manual / Joseph. Sambrook, David W. Russell. 2001. Includes bibliographical references and index. ISBN 978-1-936113-41-5. Un ejemplar disponible en la Cátedra.

■ Molecular Cell Biology. 4th edition. H. Lodish, et al., ed., W.H. Freeman, 2000, 1184 pp., ISBN-10 0-7167-3706-X. ISBN-13 978-0-7167-3706-X. Molecular genetics of Bacteria. Larry Snyder and Wendy Champness. 1997. American Society for Microbiology. Washington DC. USA. Un ejemplar disponible en la Cátedra.

■ Bac-to-Bac™ Baculovirus Expression System USER GUIDE An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins Manufacturer: Life Technologies Corporation | 5781 Van Allen Way | Carlsbad, CA 92008. 2004. Un ejemplar en la cátedra.

■ Pichia Expression Kit For expression of recombinant proteins in Pichia pastoris. Life Technologies Corporation | 5781 Van Allen Way | Carlsbad, CA 92008. 2009. Un ejemplar disponible en la cátedra.