

PROGRAMA de Ingeniería Genética II

Carrera/s: *Licenciatura en Biotecnología*

Asignatura: *Ingeniería Genética II*

Núcleo al que pertenece: *Complementario Electivo (Ciclo Superior de la Orientación Genética Molecular); Complementario Adicional (Ciclo Superior de la Orientación Bioprocesos)¹*

Profesores/as: *Mariano N. Belaich, María Laura Migliori*

Correlatividades previas: *Ingeniería Genética I*

Objetivos:

- *Que el/la estudiante tenga conocimientos amplios sobre sintaxis génica para a partir de allí, entender la información genómica y a su vez, poder plantear estrategias que deriven en su manipulación.*
- *Que el/la estudiante sea capaz de formular planes de trabajo de Investigación y Desarrollo donde la ingeniería genética sea central en el enfoque metodológico.*
- *Que el/la estudiante se familiarice con la literatura científica original, tomándola como referente en la construcción y divulgación del conocimiento.*
- *Que el/la estudiante se familiarice con el trabajo de laboratorio centrado en biología celular y molecular con fines biotecnológicos.*

Contenidos mínimos:

Genética estructural avanzada. Clonado Molecular tradicional y recombinogénico. Disciplinas ómicas y tecnologías biológicas de *high throughput*. Variantes de PCR cuantitativa y amplificaciones isotérmicas; aplicaciones. Técnicas para el análisis de transcritos. Hibridación en microarreglos. Procesos biotecnológicos de células eucariotas. Sistemas eucarióticos, virales y no virales, para la expresión de genes heterólogos. Metodologías de transfección. Terapia génica. Oligonucleótidos antisentido. Ribozimas. ARN de interferencia. Edición de genomas. Empleo de células madre

¹ En plan vigente, Res CS N° 125/19. Para el plan Res CS N° 277/11, pertenece al Núcleo de Orientación. Para el Plan Res CS N° 181/03 pertenece al Núcleo Orientado y se denomina "Ingeniería Genética Aplicada".

(stem cells) en terapia de organismos superiores. Introducción a la biología sintética; aplicaciones.

Carga horaria semanal:

8 horas por semana.

Programa analítico:

MÓDULO 1: INGENIERÍA GENÉTICA Y CLONADO MOLECULAR

Fundamentos: La biotecnología moderna necesita de la Ingeniería genética, y ésta de las metodologías del clonado molecular. Por ello, en esta etapa se contextualizará a la biotecnología en función de sus alcances y sectores de aplicación (salud humana y veterinaria, agrobiotecnología, biotecnología ambiental e industrial), y se reverá todo lo relativo a las técnicas tradicionales que permiten realizar construcciones genéticas para diversos fines. A partir de allí, se profundizará en todos los nuevos sistemas de clonado molecular basados en integrasas y en otras actividades enzimáticas.

Contenidos teóricos: Definiciones sobre biotecnología clásica y moderna, impactos y perspectivas. La genética como ciencia central en la biología. Sujetos de manipulación: biodiversidad de organismos y virus. Modelos celulares y de organismos enteros para la experimentación. Ingeniería Genética. Clonado Molecular tradicional. Técnicas estándares de identidad para ácidos nucleicos: mapas físicos, hibridación, PCR, secuenciación. Nuevos sistemas de clonado molecular. Métodos de transferencia horizontal de ácidos nucleicos a células procariontas y eucariotas.

Contenidos prácticos: Diseño de construcciones genéticas *in silico* utilizando diferentes estrategias para el clonado molecular (tradicionales y nuevas). Cultivo de células eucariotas y transfección de ácidos nucleicos.

MÓDULO 2: TECNOLOGÍAS GENÓMICAS

Fundamentos: Para generar bienes y servicios útiles basados en ingeniería genética es vital en primer lugar disponer de información de secuencias y de conocimiento sobre la función de cada uno de los componentes del gen y de los genomas. En esta etapa se analizarán cuestiones generales de sintaxis génica y citogenética, y se describirán todos los nuevos procedimientos para la adquisición de información genómica. Además, se discutirán metodologías moleculares para la identificación y cuantificación de genomas en muestras problema.

Contenidos teóricos: Arquitectura y sintaxis génica en los genomas de bacterias, arqueas, eucariotas, organelas y virus. Moviloma. Epigenómica. Técnicas citogenéticas. Proyectos genomas y nuevos métodos de secuenciación (NGS). Proyectos asociados y aplicaciones en la determinación de genomas de

individuos y de fósiles. Metagenómica. Identificación molecular de genomas por diversos métodos enzimáticos y sus aplicaciones en el diagnóstico: Real Time PCR, métodos isotérmicos, *whole genome amplification*, entre otros.

Contenidos prácticos: Taller de literatura científica asociada. Identificación y cuantificación de DNA viral mediante métodos enzimáticos (PCR semicuantitativa, Real Time-PCR).

MÓDULO 3: TECNOLOGÍAS TRANSCRIPTÓMICAS

Fundamentos: La constitución de la materia viva, o su fenotipo, deriva de una compleja interacción entre la información contenida en los genomas y el ambiente. Ya descritos los nuevos procedimientos para la adquisición de secuencias en el módulo anterior, y discutidos algunos aspectos centrales de la sintaxis génica, nos abocaremos a visibilizar los nuevos conceptos relativos a la transcripción, a los transcritos, y a su regulación. A partir de ellos discutiremos aplicaciones concretas y se analizarán las tecnologías actuales de análisis global de transcriptomas.

Contenidos teóricos: Transcripción de genomas y su regulación. ARN de interferencia y microARNs. *Splicing* alternativo y *trans-splicing*. Ribozimas. Técnicas para la determinación global de transcriptomas y sus aplicaciones. Microarreglos para la evaluación de transcriptomas. Metodologías de *knock down* génico en organismos y modelos celulares.

Contenidos prácticos: Taller de literatura científica asociada. Aplicación de RNA de interferencia en el modelo animal *Caenorhabditis elegans*.

MÓDULO 4: TECNOLOGÍAS PROTEÓMICAS

Fundamentos: Los genomas poseen numerosos genes, donde cada una de estas secuencias puede ser capaz de generar varios transcritos, y a su vez, cada uno de estos puede producir más de un polipéptido. En consecuencia, la proteómica es una ventana de análisis en biología molecular de suma trascendencia. En función de ello, en este módulo se reverán los procesos de traducción proteica y todas las tecnologías actuales útiles para la determinación y comparación de proteomas.

Contenidos teóricos: Traducción de proteínas y su regulación en procariotas y eucariotas. Modificaciones postraduccionales típicas según organismos y función. Caracterización de proteínas *in vitro* e *in vivo*. Técnicas para la determinación global de proteomas. Electroforesis bidimensional, espectroscopias de masas y secuenciación peptídica. Aplicaciones.

Contenidos prácticos: Taller de literatura científica asociada.

MÓDULO 5: TECNOLOGÍAS INTERACTÓMICAS

Fundamentos: Comprendidas las metodologías actuales de generación de conocimiento sobre información genómica, transcriptómica y proteómica, pasaremos a analizar las tecnologías asociadas a la determinación de los mapas de interacciones entre las moléculas de la célula, lo cual derivará en descubrir parte de la compleja red que transforma a la materia viva en un sistema activo capaz de transformar energía, consumir insumos del ambiente, y responder ante sus estímulos e injurias.

Contenidos teóricos: Metodologías *high throughput* para la determinación de interacciones intermoleculares en la célula, *in vivo* e *in vitro* (ácidos nucleicos entre sí, ácidos nucleicos con proteínas, proteínas con proteínas). Aplicaciones.

Contenidos prácticos: Taller de literatura científica asociada.

MÓDULO 6: EDICIÓN GENÓMICA

Fundamentos: Los módulos anteriores se centran en la descripción molecular de la materia viva sumando procedimientos aplicables a cualquier entidad biológica que habita este planeta. A partir de aquí, utilizaremos dicha información para discutir las tecnologías vigentes que existen para manipular organismos y virus de un modo deliberado.

Contenidos teóricos: Definición y utilidad de OGMs (Organismos Genéticamente Modificados) y VGMs (Virus Genéticamente Modificados). Clonación de organismos. Fecundación y desarrollo en organismos eucariotas. Mutagénesis genómica dirigida: métodos tradicionales y modernos. Aplicación de las nucleasas sitio específicas: nucleasas Zinc Finger, TALEN y CRISPR/Cas. Sistema Cre-loxp. Genética reversa en virus. Aplicaciones en la biodiversidad y ejemplificación de casos. Mutagénesis genómica al azar para estudios de genómica funcional: métodos tradicionales y modernos. Aplicaciones y ejemplificación de casos. Biofábricas.

Contenidos prácticos: Taller de literatura científica asociada. Diseño de construcciones genéticas *in silico*. Mutagénesis genómica dirigida sobre un virus.

MÓDULO 7: EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN CONTEXTOS HETERÓLOGOS

Fundamentos: Las proteínas son moléculas trascendentes para la vida, lo cual deriva en que su producción se ha transformado en central para diversas aplicaciones que van desde la salud hasta las industrias. En este módulo se discutirán varios sistemas de expresión de proteínas en contextos heterólogos y su utilidad en función de las características de los polipéptidos y en los costos para su producción.

Contenidos teóricos: Definición de proteínas recombinantes y aplicaciones. Sistemas libres de células. Sistemas bacterianos. Sistemas para Levaduras y otros hongos. Sistemas de células eucariotas en cultivos *in vitro*. Sistemas virales para células de mamíferos. Cultivo de células animales en monocapa y

suspensión. Uso de *microcarriers*. Los baculovirus como sistemas de expresión en eucariotas. Organismos como biorreactores.

Contenidos prácticos: Taller de literatura científica asociada. Utilización de baculovirus para la expresión de una proteína en células de insecto y/o larvas.

MÓDULO 8: TERAPIA GÉNICA

Fundamentos: El componente genético en el desarrollo de una enfermedad presenta diferente relevancia en función de su impacto. En ciertos casos, determinadas mutaciones condicionan la generación de cuadros clínicos de alta incapacidad y riesgo de muerte, siendo la única oportunidad de cura la aplicación de nueva información genética, tanto para reparar esas células o para matarlas. En dicho contexto, se discutirán los procedimientos en desarrollo sobre terapia génica y las tecnologías disponibles para encararla.

Contenidos teóricos: Relevancia del componente genético en el desarrollo de enfermedades. Identificación de acciones terapéuticas. Genes terapéuticos. Terapia génica *in vivo*. Vehículos virales y no virales. Ejemplificación de casos. Terapia génica *ex vivo*. Relevancia de las células madre. Ejemplificación de casos. Terapia génica germinal.

Contenidos prácticos: Taller de literatura científica asociada. Evaluación de un vehículo viral (baculovirus) en un organismo modelo (*Caenorhabditis elegans*).

MÓDULO 9: BIOLOGÍA SINTÉTICA

Fundamentos: En los últimos años, la biología dio un salto cualitativo y dejó de interesarse sólo en comprender los mecanismos moleculares que gobiernan a la naturaleza viva, sino también a modificarlos de manera tal de reprogramar a los organismos y virus, o incluso a sintetizarlos a medida. Este nuevo escenario revolucionario promete transformar a la biotecnología tal cual la conocemos, poniéndola en una nueva dimensión nunca antes vista: la programación y/o reprogramación de funciones vitales.

Contenidos teóricos: Definiciones e historia sobre la biología sintética. *Biobricks*: sensores, reguladores, conectores, actuadores. Composición de dispositivos y circuitos complejos. Puertas lógicas. Sistemas sintetizadores, sensores, *strickers* y buscadores. Diseño y conformación de circuitos génicos. Metodologías de ensamblaje. Síntesis de genomas. Edición de genomas: su reescritura y reducción. Estudio de casos en salud, ambiente y agricultura. Perspectivas del campo científico.

Contenidos prácticos: Taller de literatura científica asociada. Diseño *in silico* de circuitos genéticos para aplicaciones concretas.

Trabajos Prácticos de Laboratorio

Trabajo práctico N°1

Título: Desarrollo de una plataforma biotecnológica sobre el baculovirus autóctono AgMNPV.

Objetivo general: Desarrollo y evaluación de una nueva plataforma biotecnológica baculoviral que asista en la expresión de proteínas en contextos eucariotas, en la vehiculización de genes terapéuticos en animales, y en la formulación de biocontroladores de plagas agrícolas locales.

Objetivos específicos:

1. Modificar el genoma del baculovirus AgMNPV introduciéndole funciones de replicación y modificación en *Escherichia coli* (Bácmido-Ag).
2. Evaluar la generación de AgMNPV recombinantes derivados del Bácmido-Ag, útiles para la expresión de proteínas en entornos eucariotas.
3. Evaluar la generación de AgMNPV recombinantes derivados del Bácmido-Ag, útiles para generar bioplaguicidas.
4. Evaluar la generación de AgMNPV recombinantes derivados del Bácmido-Ag, útiles para transducir mamíferos y otros animales no susceptibles.

Actividades a realizar: Para llevar adelante el trabajo se realizarán actividades tales como, observaciones microscópicas de líneas celulares, purificación de gDNA viral mediante metodologías tradicionales, purificación plasmídica mediante *miniprep* por lisis alcalina, estimaciones de concentración de ácidos nucleicos mediante la detección de sus propiedades espectroscópicas, y mediante *real time* PCR (qPCR) empleando química SyBrGreen. También se llevarán a cabo electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa en condiciones tradicionales de corrida y tinción, ensayos de transfección e infección en cultivos *in vitro*, ensayos de expresión proteica mediante SDS-PAGE con el sistema tris-glicina, y posteriores tinciones con *Coomassie Brilliant Blue*. Finalmente, se realizarán ensayos de transducción sobre células humanas HEK-293, y sobre larvas L4 de *C. elegans*.

Trabajo práctico N°2

Título: ARN de interferencia en *Caenorhabditis elegans*.

Objetivo general: Evaluar la utilidad del silenciamiento génico postranscripcional en el modelo animal *C. elegans* (cepa *wild type*), y de esta forma poder utilizar este organismo modelo en investigación para el estudio de diversas enfermedades humanas.

Objetivos específicos:

1. Disponer de una población sincronizada de *C. elegans*.
2. Describir el fenotipo de nematodos adultos alimentados con bacterias modificadas mediante ingeniería genética (cepa HT115DE3) que expresan los dsRNA.

Actividades a realizar: Para llevar adelante el trabajo se realizarán actividades tales como, observaciones de nematodos mediante lupa o microscopio de bajo aumento, sincronización de poblaciones de nematodos al mismo estadio de desarrollo mediante el método de cloro, y se realizarán ensayos de RNA de interferencia mediante alimentación de larvas L1 de *C. elegans* con bacterias modificadas mediante ingeniería genética que expresan el ARNdc (RNAi *feeding*).

Ambos trabajos prácticos se realizan en varias jornadas de laboratorio.

Bibliografía:

Obligatoria

Bittencourt D, Auboeuf D. 2012. Capítulo 36. *Analysis of Co-transcriptional RNA Processing by RNA-ChIP Assay*. Ales Vancura (ed.), *Transcriptional Regulation: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 809, Springer Science+Business Media.

Frese KS, Katus HA and Meder B. 2013. *Next-Generation Sequencing: From Understanding Biology to Personalized Medicine*. *Biology*, 2, 378-398.

Gerstein MB, Bruce C., Rozowsky JS, et al. 2007. *What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition*. 17: 669-681 *Genome Res*.

Illumina Inc. 2012. *An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology*.

López M, Mallorquín P. y Vega M. 2002. *Microarrays y biochips de AND*. Genoma España, Salud humana. Fundación española para el desarrollo en la investigación en genómica y proteómica.

Malone JH, Oliver B. 2011. *Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome*. *BMC Biol*. 9:34.

Margulis L, Chapman J. 2009. *Kingdom and Domains. An illustrated guide to the phyla of life on earth*. Michael J. Chapman — 4th ed.

Marioni JC, Stephens M, Mason CE, et al. 2008. *RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 18:1509-1517.

Michel PE, Reymond F, Arnaud IL, et al. 2003. *Protein fractionation in a multicompartiment device using Off-Gel isoelectric focusing*. *Electrophoresis*. 24(1-2):3-11.

Miyamoto-Sato E, Ishizaka M, Horisawa K, et al. 2005. *Cell-free cotranslation and selection using in vitro virus for high-throughput analysis of protein-protein interactions and complexes*. *Genome Res*. 15(5):710-7.

Myllykangas S, Buenrostro J, Ji HP. 2012. *Overview of Sequencing Technology Platforms*. Capítulo 2, en N. Rodríguez-Ezpeleta et al. (eds.), *Bioinformatics for High Throughput Sequencing*.

Stynen B, Tourneau H, Tavernier J, Van Dijck P. 2012. *Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 76(2):331-82.

Villa GP. 2002. *Espectroscopía de masas*. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México.

Wang Z, Gerstein M and Snyder M. 2009. *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. Nature Reviews. Genetics. 10: 57-63.

Complementaria

Brown TA. 2010. *Gene Cloning and DNA analysis, an introduction*. Wiley-Blackwell Publishing, 6ta Edición.

Eid J, Fehr A, Gray J, et al. 2009. *Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules*. Science vol 323.

Integrated DNA technologies, Inc. 2012. *Strategies for Attaching Oligonucleotides to Solid Supports*.

Koonin E. *Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics*. Annu. Rev. Genet. 2005. 39:309-38.

Lilley KS, Friedman DB. 2004. *All about dige: quantification technology for differential-display 2d-gel proteomics*. Expert rev proteomics. 1(4):401-9.

Lodge J, Lund P, Minchin S. 2007. *Gene Cloning, Principles and applications*. Taylor & Francis Group, Reino Unido.

McGettigan PA. 2013. *Transcriptomics in the RNA-seq era*. Current Opinion in Chemical Biology. 17:4-11

Moreira D, Lopez-García P. 2009. *Ten reasons to exclude viruses from the tree of life*. Nature Reviews Microbiology 7, 306-311.

Nicholl DS. 2008. *An introduction to Genetic Engineering*. Cambridge University Press. 3ra Edición.

Pigliucci M. 2009. *An Extended Synthesis for Evolutionary Biology*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1168: 218-228.

Primrose SB y Twyman RM. 2006. *Principles of gene manipulation and genomics*. Blackwell Publishing, 7ma Edición.

Ronaghi M. 2001. *Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing*. Genome Res. 11: 3-11.

Siefert JL. 2009. *Defining the mobilome*. Methods Mol Biol. 2009;532:13-27.

La bibliografía que no se encuentra en la Biblioteca de la UNQ es suministrada por los docentes, ya sea porque se dispone de las versiones electrónicas y/o se dispone del ejemplar en el grupo de investigación asociado.

Organización de las clases:

La asignatura se organiza en clases teóricas, seminarios de lectura y discusión de artículos científicos, clases de resolución de situaciones problemáticas y jornadas de laboratorio. El trabajo áulico incluye impartición de clases magistrales mezcladas con modalidad aula-taller.

Modalidad de evaluación:

Las/os estudiantes deben realizar 3 trabajos domiciliarios grupales que involucren la propuesta de planes de trabajo (con formato preestablecido) en base a temáticas asociadas a los contenidos del curso. Los mismos deben ser entregados en formato papel y defendidos oralmente. También, la/os estudiantes deben realizar 2 informes de laboratorio asociados a las jornadas experimentales planificadas (con un formato preestablecido), exponer trabajos publicados en revistas científicas internacionales y rendir 1 examen escrito y presencial al final de cursada. Todas las instancias de evaluación cuentan con su recuperatorio.

Aprobación de la asignatura según Régimen de Estudios vigente de la Universidad Nacional de Quilmes:

La aprobación de la materia bajo el régimen de regularidad requerirá: Una asistencia no inferior al 75 % en las clases presenciales previstas, y cumplir con al menos una de las siguientes posibilidades:

- (a) la obtención de un promedio mínimo de 7 puntos en las instancias parciales de evaluación y de un mínimo de 6 puntos en cada una de ellas.
- (b) la obtención de un mínimo de 4 puntos en cada instancia parcial de evaluación y en el examen integrador, el que será obligatorio en estos casos. Este examen se tomará dentro de los plazos del curso.

Los/as alumnos/as que obtuvieron un mínimo de 4 puntos en cada una de las instancias parciales de evaluación y no hubieran aprobado el examen integrador mencionado en el Inc. b), deberán rendir un examen integrador, o en su reemplazo la estrategia de evaluación integradora final que el programa del curso establezca, que el cuerpo docente administrará en los lapsos estipulados por la UNQ.

Modalidad de evaluación exámenes libres:

En la modalidad de libre, se evaluarán los contenidos de la asignatura con un examen escrito, un examen oral e instancias de evaluación similares a las realizadas en la modalidad presencial. Los contenidos a evaluar serán los especificados anteriormente incluyendo demostraciones teóricas, laboratorios y problemas de aplicación.

Anexo II

CRONOGRAMA TENTATIVO

Semana	Tema/unidad	Actividad*			Evaluación
		Teórico	Práctico		
			Res Prob.	Lab.	
1	Marco conceptual sobre Biotecnología e Ingeniería Genética	Teórico			
2	Clonado molecular	Teórico/Res. Prob.			
2	Trabajo con <i>software</i> en computadoras. Inicio primer trabajo domiciliario	Lab.			X
3	Arquitectura genómica y sintaxis génica	Teórico			
4	Métodos de secuenciación de última generación	Teórico			
4	Métodos de secuenciación de última generación: aplicación en genómica y epigenómica	Teórico/Discusión <i>papers</i>			
5	Trabajo Lab. 1: Purificación de ácidos nucleicos de diferentes fuentes	Lab.			
5	Hibridación en microarreglos	Teórico			
6	Métodos de secuenciación de última generación: aplicación en análisis de transcritos	Teórico/Discusión <i>papers</i>			
7	PCR: punto final/tiempo real/digital	Teórico/Res. Prob.			
7	Trabajo Lab. 1: PCR (punto final/tiempo real)	Lab.			
7	Inicio segundo trabajo domiciliario				X
8	Diagnóstico de ácidos nucleicos con métodos isotérmicos	Teórico/Discusión <i>papers</i>			
8	Exposición de Primer trabajo domiciliario				X
8	ARNs no codificantes	Teórico			
9	Aplicaciones ARNs no codificantes	Teórico/Res. Prob.			

9	Trabajo Lab. 1: clonado molecular recombinogénico (a)	Lab	
9	Trabajo Lab. 2: Aplicaciones ARNs no codificantes	Lab	
10	Proteómica: estudios <i>high-throuputh</i>	Teórico/Res. Prob.	
10	Interactómica: estudios <i>high-throuputh</i>	Teórico/Res. Prob.	
10	Inicio tercer trabajo domiciliario		X
11	Trabajo Lab. 1: clonado molecular recombinogénico (b)	Lab.	
11	Mutagénesis genómica	Teórico	
12	Terapia génica	Teórico	
12	Exposición segundo trabajo domiciliario		X
13	Trabajo Lab. 1: transfección en células eucariotas	Lab.	
13	Resolución de problemas/Discusión de <i>papers</i>	Res. Prob./Discusión <i>papers</i>	
14	Biología Sintética (a)	Teórico	
14	Biología sintética (b)	Teórico	
14	Entrega de Informe de laboratorio 2		X
15	Trabajo Lab. 1: Infección de células eucariotas	Lab.	
15	Resolución de problemas integradores	Res. Prob.	
16	Trabajo Lab. 1: Ensayos biológicos en modelos animales	Lab.	
16	Exposición tercer trabajo domiciliario		X
17	Examen integrador		X
17	Entrega de Informe de laboratorio 1		X
17	Exposición Trabajo domiciliario 3		X
18	Recuperatorios		X
18	Integrador		X

*INDIQUE CON UNA CRUZ LA MODALIDAD