

## **MODUL: 1**

**ASSIGNATURA:** **Enginyeria Genètica i Trangènesi**

**CRÈDITS :**

**COORDINADORS DE  
L'ASSIGNATURA:** **Ricard Albalat, Pedro Marrero i Manuel Palacín**

## **1 OBJECTIUS I JUSTIFICACIÓ DE L'ASSIGNATURA**

### **1.1 Justificació de l'assignatura**

Aquesta assignatura abarca coneixements teòrics i pràctics que es consideren necessaris pel correcte desenvolupament del Màster de Biotecnologia. L'assignatura s'impartirà a llicenciats amb nocions bàsiques en tècniques de DNA recombinant i intentarà aprofundir en el coneixement d'aquestes tècniques i de les eines necessàries per la manipulació de gens *in vitro* i *in vivo*. Aquest aprenentatge constitueix el substrat bàsic sobre el qual fonamentar els coneixements del Màster i per tant cursar aquesta assignatura és imprescindible pel correcte seguiment d'altres assignatures del Màster.

### **1.2 Objectius**

L'objectiu de l'assignatura és presentar les tècniques més avançades de manipulació del DNA, i l'aplicació d'aquestes tècniques en l'estudi de processos biològics, biotecnològics i relacionats amb la sanitat. Es pretén que, un cop cursada l'assignatura, l'alumne pugui accedir i comprendre els avenços que dia a dia es produeixen en el coneixement biològic utilitzant la tecnologia del DNA recombinant. El programa teòric que aquí s'adjunta ha estat elaborat amb l'ànim d'oferir una visió avançada de la tecnologia del DNA recombinant, i s'ha fet sobre la base que l'alumne o be ja té coneixements de Genètica General, Genètica Molecular, Bioquímica i Biologia Molecular o be cursarà les matèries pont de Genètica, Bioquímica i Biologia Molecular, i Biologia Cel.lular.

## **2 CONTINGUTS, TEMARI I PROFESSORS PARTICIPANTS**

**Tema 1. Vectors i tècniques de clonació a Procariotes.** Plasmidis, bacteriofags, cosmidis i BACs. Clonació independent d'enzims de restricció. Llibreries genòmiques i de cDNA. Llibreries d'expressió. (3 hores. Departament de. Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia).

**Tema 2. Vectors i tècniques de clonació a Eucariotes.** Transfecció i selecció de gens en cèl.lules de mamífers. Transfeccions transitòries i estables: mètodes de selecció, sistemes de inducció. Transfecció reversa. Gens reporters i etiquetes més freqüentment utilitzades. Línies cel.lulars productores. Regulació de l'expressió a la baixa (shRNA). Avantatges i inconvenients dels diferents mètodes (5 hores. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia).

**Tema 3. Mètodes de transgènesi animal.** Mètodes de transferència de gens a cèl.lules germinals i obtenció de soques transgèniques murines: microinjecció, transfecció de cèl.lules ES i transferència nuclear. Variables i problemes. Clonació per transferència nuclear. Factors cel.lulars limitants i canvis epigenètics que limiten l'ús de cèl.lules diferenciades. Knock-outs de gens per *gene targeting*. Integració no específica i integració per recombinació homòloga. Disseny d'un experiment de *gene targeting*. Knock-ins. Knock-outs condicionals: el sistema Cre-loxP. Knock-down: RNAi i morfolinis. Aplicacions dels transgènics a la ciència bàsica: anàlisi de regulació gènica, estudis d'expressió ectòpica i aïllament de nous gens: enhacer-, gene- i promoter traps. Transgènesi en animals no mamífers. Aplicacions biotecnològiques dels transgènics. La transgènesi en la millora animal. Els animals transgènics com a bioreactors per a la síntesi de proteïnes "terapèutiques". Animals transgènics com models animals de malalties humanes. (10 hores. Departament de Genètica, Facultat de Biologia / Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia).

**Tema 4. Mètodes de transgènesi vegetal.** Enginyeria genètica en sistemes vegetals. Cultius vegetals *in vitro*. El plasmidi Ti com a vector. Vectors derivats de Ti. Altres mètodes de transferència de gens a plantes: microbombardeig, vectors virals i transformació de plastidis. Selecció de les cèl.lules transfectades i generació de la planta sencera. Síntesi i aplicacions de variants vegetals transgèniques. Síntesi de soja transgènica resistent a l'acció del glifosat. Síntesi de blat de moro resistent a l'insecte barrenador. Expressió de l'antígen de superfície del virus de l'Hepatitis B en plantes transgèniques. Expressió del gen antisentit de la ACC oxidasa en el tomàquet i el meló. Increment de la producció de cultius de tabac que sobreexpressen fitocroms. Obtenció de variants de *Triticum* que expressen el gen que codifica per a una subunitat de gluteïna. (5 hores. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia).

**Tema 5. Síntesis de proteïnes recombinants.** Sistemes d'expressió *in vitro* i *in vivo*. Expressió heteròloga a procarotes. Expressió de proteïnes independents i de fusió. Expressió de proteïnes citoplasmàtiques, de membrana o de secreció. Sistemes de purificació per cromatografia tradicional o cromatografia d'afinitat. Problemes i solucions a la síntesi de proteïnes recombinants. Expressió heteròloga a llevats. Tipus d'expressió. Sistemes alternatius a *S. cerevisiae*: expressió a *P. pastoris*. Expressió heteròloga a cèl.lules d'insecte amb vectors derivats de Baculovirus. (6 hores. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia).

**Tema 6. Mutagènesi dirigida.** Tècniques de mutagènesi. Mutagènesi dirigida mitjançant oligonucleòtids: mètodes per 'single primer' i mètodes per 'double primer'. Mutagènesi dirigida mitjançant PCR. Intercanvi de cassette. Sistemes d'expressió i mutagènesi múltiple: *Phage Display*. (2 hores. Departament de Genètica, Facultat de Biologia).

**Tema 7. Anàlisi d'interaccions proteiques.** El sistema del doble híbrid. Projectes 'Interactoma'. Problemes i alternatives: sistemes *ras* i *split-ubiquitin*. Variants: One hybrid, tri-hybrid i reverse two hybrid. Doble híbrid a *E. coli* i a cèl.lules de mamífer. Sistemes de co-precipitacions i chips de proteïnes. Sistemes de microsequenciació. Espectrometria de masses: peptide mass fingerprint i espectra MS/MS.(4 hores Departament de Genètica, Facultat de Biologia).

**Professors Participants:** Ricard Albalat (Dpt. Genètica, Facultat de Biologia)  
Perdro Marrero (Dpt. Bioquímica i Biol. Mol., Facultat de Farmàcia)  
Manuel Palacín (Dpt. Bioquímica i Biol. Mol., Facultat de Biologia)  
i altre professorat dels departaments implicats.

### 3 AVALUACIÓ

#### 3.1 Criteris d'avaluació

En el procés d'avaluació es valoraran els diferents aspectes que conformen l'aprenentatge de l'assignatura: coneixement adquirits, assistència i participació en el desenvolupament de l'assignatura. Tot i que per la qualificació final es valoraran majoritàriament els coneixements de l'alumne a través d'un examen, les pràctiques de laboratori i el treball no presencial (veure apartat 4.2.1) seran necessaris per superar amb èxit l'avaluació. Així, la realització de les pràctiques i del treball no presencial seran premisses indispensables per poder ser avaluat.

#### 3.2 Procediments de l'avaluació

L'avaluació dels coneixements es farà mitjançant un examen tipus test de resposta múltiple. La prova constarà de 50 preguntes, 45 sobre els coneixements teòrics i 5 sobre conceptes relacionats directament amb les pràctiques realitzades. Totes les preguntes tindran el mateix valor (un punt) i cada pregunta constarà de quatre possibles respostes (a, b, c i d) entre les que l'estudiant haurà de triar l'opció correcta. La puntuació final es corregirà per la probabilitat d'encertar les respostes a l'atzar. El treball no presencial de l'alumne serà valorat pel professor i contribuirà, amb un màxim del 10%, a la nota final de l'assignatura.

## 4 RECURSOS D'APRENTATGE I MÈTODES D' ENSENYAMENT

### 4.1 Ensenyament presencial

#### 4.1.1 Classes teòriques

Les classes teòriques són l'element principal pel desenvolupament de l'assignatura. L'exposició dels continguts ha de ser clara, ordenada i en escala creixent de dificultat. A les classes teòriques, a més la clàssica pissarra, s'utilitzarà abundant material gràfic, –presentacions per ordinador, vídeos, etc–,

per tal de facilitar la transmissió dels coneixements i la comprensió de processos complexos. L'alumne tindrà accés a aquest material gràfic a través dels Dossiers Electrònics de la Biblioteca de la Facultat.

Malgrat, que les classes es plantegen com de tipus 'classe magistral' no es renunciarà a una participació activa de l'alumne, fomentant en tot moment el diàleg i les preguntes. L'interacció i participació de l'alumne serà especialment important en els seminaris. Es proposa que com a part del treball no presencial, els alumnes preparin seminaris sobre aspectes concrets del temari. Aquests seminaris seran presentats i discutits a classe. Finalment, dins de les classes teòriques es podran incloure conferències d'investigadors avesats en determinades metodologies per tal d'apropar a l'alumne a la recerca en enginyeria genètica més actual.

Es preveu que serien necessàries un mínim de 35 hores per poder desenvolupar els temes del detallats a l'apartat 2 de la proposta, els seminaris preparats pels alumnes i les conferències invitades al llarg del curs.

#### **4.1.2 Ensenyament pràctic**

Donat el caràcter experimental de l'assignatura, les classes pràctiques no són un complement de les classes teòriques, sinó una part fonamental de l'assignatura. Malgrat la complexitat de les tècniques actuals d'enginyeria genètica, es proposa la realització de dues pràctiques de laboratori que encaixen perfectament amb el temari de l'assignatura (veure l'apartat 7). L'alumne treballaria paral·lelament amb dues metodologies que es complementen sota un mateix concepte unificador: les anàlisis d'interaccions proteiques. Es preveuen necessàries un mínim de 20 hores de laboratori per la realització d'aquesta activitat. Donada la dificultat de les metodologies, la disponibilitat de laboratoris i el material que es disposa, es proposa la participació de dos professors amb un màxim de 16 alumnes per grup de pràctiques. La realització d'aquestes pràctiques es troba condicionada a la disponibilitat dels recursos que, sota els criteris d'excel·lència i competitivitat de la nostra Universitat, són necessaris per a una activitat d'aquest tipus.

### **4.2 Treball no presencial**

#### **4.2.1 Tasques a desenvolupar**

El treball no presencial de l'alumne es concentrarà en la preparació de seminaris sobre temes concrets del temari. En general, els seminaris serveixen de complement a les classes teòriques, són una forma idònia per que l'alumne entri en contacte amb els temes de recerca, i li permeten que s'acostumi a la preparació i exposició d'un treball experimental. Els alumnes formarien grups de treball, triarien un tema d'entre un llistat proposat pel professor, l'estudiarien en profunditat i l'explicarien davant als seus companys. Aquest tipus de seminari pot ser de difícil organització si el nombre d'alumnes és elevat, però s'haurien d'intentar implementar en aquesta assignatura. A més del temps d'exposició i discussió a classe (considerat dins de l'apartat de classes teòriques) es preveuen un mínim de 5 hores de treball no presencial per part de l'alumne.

#### **4.2.2 Estudi de l'alumne**

El temps que cada alumne pot necessitar per estudiar i assimilar els conceptes és molt variable doncs depenen de les capacitats i aptituds de cada persona. A més, la diversitat en la formació dels alumnes que poden cursar aquest postgrau és gran (licenciats en Biologia, Bioquímica, Ciències ambientals, Química, Enginyeria química, Farmàcia, Medicina, Veterinària, Ciència i tecnologia dels aliments, Enginyeria i tecnologia de materials, Tecnologia forestal, Informàtica i Ciències del Mar), fet que condiciona significativament les necessitats particulars d'hores d'estudi. En termes generals, es preveuen un mínim de 40 hores d'estudi per poder superar adequadament aquesta assignatura.

## 5 BIBLIOGRAFIA

- STRACHAN, T., and READ A. P. *Human Molecular Genetics* 3. Garland Publishers. Tercera edició. 2004.
- WATSON, J. D. *Recombinant DNA*. 2a ed. Nova York: Scientific American Books, 1992.
- WATSON, J.D., BAKER T.A., BELL S.P., GANN A., LEVINE M. & LOSICK R. *Molecular Biology of the Gene* (3rd. edition). Benjamin Cummings-CSHL Press. 2004.
- BROWN, T.A. *Genomes* 2. Taylor & Francis Books Ltd, 2002
- BROWN, T.A. (2001). *Gene Cloning* (4th. Edition). Blackwell Science. 2001.
- GLICK B.R. and PASTERNAK J.J. (2003) *Molecular Biotechnology* 3rd Ed. ASM Press. 2003.
- IZQUIERDO. M. *Ingeniería Genética y Transferencia Génica*. Ediciones Pirámide. 1999.
- PERERA J., TORMO A. & GARCÍA J.L. *Ingeniería Genética* vol. 1. y vol. 2. Editorial Síntesis. 2002.
- PRIMROSE, S.B., TWYMAN, R.M. & OLD, R.W. *Principles of Gene Manipulation* (6th Edition). Blackwell Science. 2001.
- SEDIVY, J.M. and JOYNER , A. L. *Gene Targeting*. W.H Freeman and company. New York. 1992.

## 6 TUTORIES

La tutoria és una acció docent d'orientació dirigida a impulsar i facilitar el desenvolupament integral dels estudiants, en la seva dimensió intel·lectual, afectiva, personal i social, en línia amb el plantejament de qualitat des de la perspectiva de l'estudiant. Per tant, seguint les directerius de la Universitat de Barcelona, la tutoria d'aquesta assignatura hauria de facilitar el seguiment acadèmic individualitzat dels estudiants en la planificació i desenvolupament del seu itinerari acadèmic. La tutoria canalitza i dinamitza les relacions de l'alumnat amb els diferents segments d'atenció a l'estudiant, tant de caràcter administratiu, docent, organitzatiu i de serveis.

## 7 PRÀCTIQUES DE LABORATORI

### ANÀLISIS D'INTERACIONS PROTEIQUES

L'interès de l'anàlisi de interaccions proteiques és rellevant donat que la majoria de processos biològics a molts nivells (molecular, cel·lular, tissular,...) es basen en interaccions i reconeixement entre proteïnes. Hi ha bàsicament dues estratègies per a estudiar aquestes interaccions: el sistema del doble híbrid o "two-hybrid system" i les coprecipitacions amb proteïnes de fusió o "pull-down".

#### PRÀCTICA 1. ANÀLISI PER "TWO-HYBRID SYSTEM" EN LLEVATS

La base experimental del mètode es basa en la presència en els cromosomes del llevat d'un gen reporter o marcador que està sota el control d'un promotor mínim, de manera que sense activació extra de la transcripció, pràcticament no hi haurà síntesi de proteïna reportera. Immediatament a 5' dels elements del promotor mínim hi ha una regió de DNA (operador) que és reconeguda de manera específica per una proteïna (DBP). Perquè es doni expressió del gen reporter caldrà la presència d'un activador de la transcripció. Però com que aquest no té capacitat per unir-se directament al DNA, necessitarà un pont d'unió cap al gen que ha d'activar. Aquest pont s'aconsegueix si en el llevat hi ha: a) una proteïna de fusió entre la proteïna d'unió al DNA i una proteïna X; b) una proteïna de fusió entre l'activador i una proteïna Y; c) la proteïna X i Y poden unir-se entre sí. Així doncs, l'expressió del gen reporter en les cèl·lules de llevat s'interpreta com la capacitat de les proteïnes X i Y d'interaccionar.

#### PRÀCTICA 2. ANÀLISI D'INTERACCIÓ DE PROTEÏNES *IN VITRO* MITJANÇANT UN ASSAIG DE *PULL DOWN*

L'assaig de *pull down* és una tècnica útil a l'hora de descriure la interacció entre dues proteïnes determinades i/o de localitzar els dominis proteics responsables d'aquesta. Per tal de realitzar l'assaig, és necessari disposar d'una proteïna pura y "etiquetada", proteïna recombinant, que serà utilitzada per la captura o *pull-down* de la proteïna problema.

La proteïna recombinant, fusionada a GST (Glutatió-S-Transferasa), es purificarà a partir d'un cultiu d'*E.coli*, gràcies a l'afinitat de l'etiqueta pel glutatió, unit a una resina de sefarosa. La proteïna purificada s'incubarà amb la proteïna objecte d'estudi produïda en un sistema de transcripció i traducció *in vitro* (TnT). Finalment l'etiqueta serà utilitzada per la precipitació de la proteïna recombinant i s'analitzarà per *Western Blot* la presència de la proteïna problema en el precipitat.