

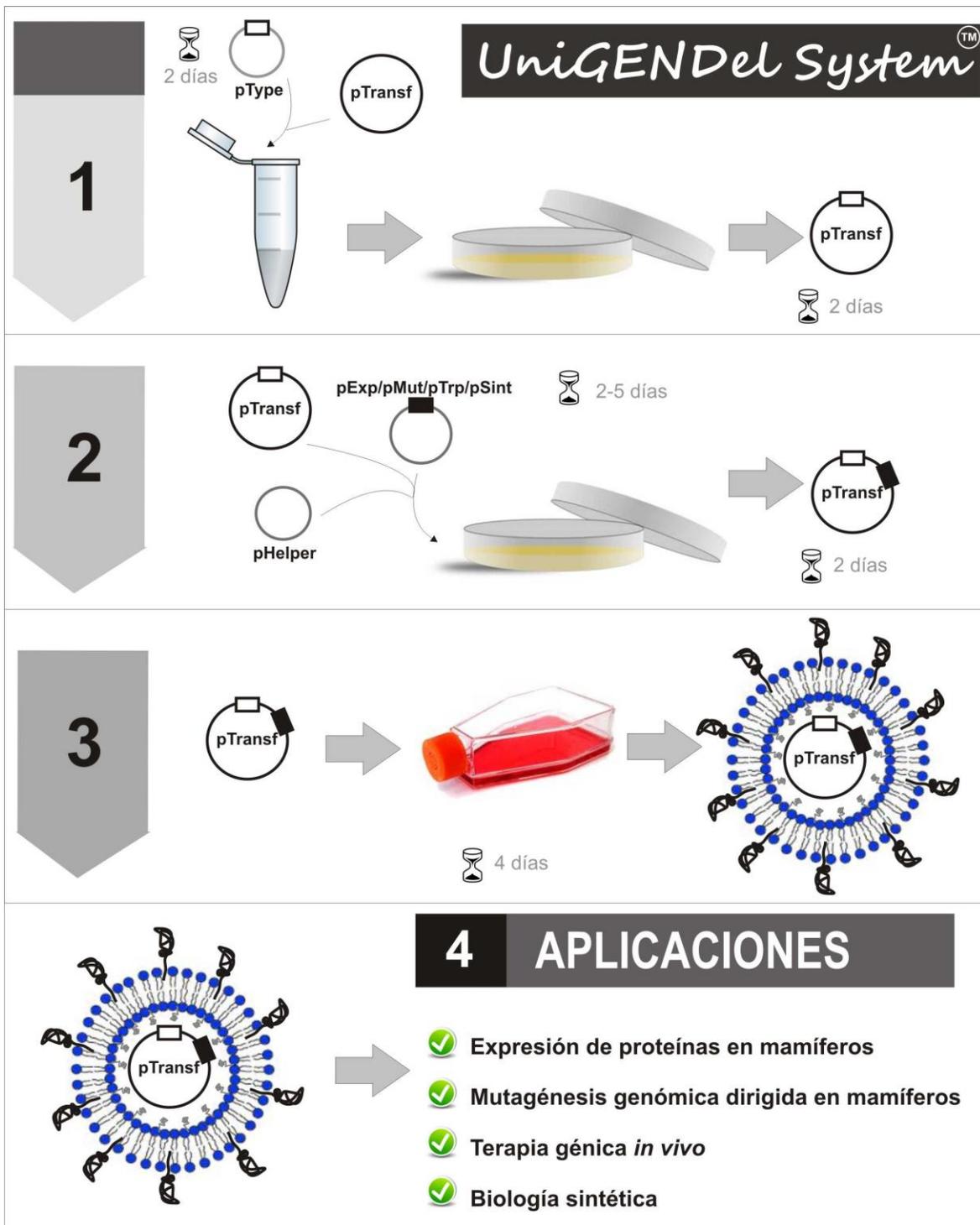
Problemas integradores

Problema 1

La **ingeniería genética** involucra la manipulación deliberada y racional de los ácidos nucleicos, con el fin de generar nuevas informaciones biológicas con sentido funcional para la producción de bienes y servicios. Entre sus aplicaciones, la mutagénesis genómica dirigida, el silenciamiento transcripcional asociado a terapias génicas, la expresión de proteínas, o la programación de nuevas funciones biológicas celulares aparecen como tópicos centrales de abordaje.

A pesar de la gran disponibilidad de herramientas existentes, aún permanece como muy relevante la necesidad de desarrollar nuevos sistemas moleculares que posibiliten la rápida construcción de quimeras genéticas y su posterior transferencia horizontal a los tipos celulares deseados, y en particular a células de mamíferos, materia viva donde pueda desarrollarse la función previamente diseñada.

Pensando en tales cuestiones, usted ha sido contratado por una empresa biotecnológica nacional para diseñar, generar y evaluar un nuevo sistema que permita el clonado molecular de secuencias de interés, y su posterior transferencia a células animales (**Universal Gene Delivery system**, o **UniGENDel system versión 1.0**). Esta herramienta que pretende ser comercializada prontamente, contará para su aplicación de 4 etapas centrales (ver folleto publicitario en la página siguiente) a través de los cuales se podrán obtener los productos finales a medida de los requisitos del cliente. Cabe aclararse que **UniGENDel System** estará conformado sólo por plásmidos, ya que las cargas enzimáticas necesarias para alguno de sus pasos no serán suministradas y deberán ser adquiridas por los clientes.



A continuación se describen las características funcionales de cada uno de los plásmidos que formarán parte del sistema:

Plásmido	Características
Plásmido de transferencia (pTransf)	<i>Plásmido de Escherichia coli</i>
	<i>Función de clonado molecular recombinogénico dentro de las bacterias</i>
	<i>Función inducible para su replicación en células de mamífero</i>
	<i>Función inducible de encapsidación y brotación en células de mamífero* (eliminable in vivo)</i>
	<i>Función de transducción para células de mamífero con posibilidad de generar el pseudo-tipo de interés por métodos recombinogénicos ex vivo.</i>
Plásmidos para pseudo-tipo (pType)	<i>Capacidad dadora de un gen funcional en mamíferos para producir una proteína de envoltura. pType: Plásmido de entrada. Se considera a pTransf como plásmido de destino final.</i>
Plásmido colaborador (pHelper)	<i>Aporta el factor colaborador necesario para la recombinogénesis in vivo para modificar el pTransf con pExp, pMut, pTrp, o pSint.</i>
Plásmido Donor para expresión de proteínas (pExp)	<i>Capacidad dadora hacia el pTransf de un gen funcional en mamíferos, constitutivo y facilitando que la proteína recombinante a producirse sea adecuadamente purificable</i>
Plásmido Donor para mutagénesis genómica dirigida (pMut)	<i>Capacidad dadora hacia el pTransf de un casete para recombinación homóloga y/o actividad nucleasa específica</i>
Plásmido Donor para terapia génica (pTrp)	<i>Capacidad dadora hacia el pTransf de un casete que contiene una secuencia de interés para producir knock down y lo necesario para integrarse en el genoma humano en un locus preciso.</i>
Plásmido Donor para programar nuevas funciones celulares (biosensor) (pSint)	<i>Capacidad dadora hacia el pTransf de un operón eucariota constitutivo codificante para cualquiera de dos potenciales proteínas (una sensora y otra reguladora), más un gen independiente definido que funcione como actuador, y lo necesario para asegurar la integración al genoma humano en un locus específico.</i>

*brotación basada en la proteína Z de los arenavirus (capacidad de generar vesículas de membrana sin necesidad de otros factores)

En función de lo anterior,

- 1) Diseñe el contenido composicional detallado de cada uno de los plásmidos antes especificados, señalando de dónde obtendrá cada componente de secuencia y cuál será su función en el sistema *UniGENDeI*.
- 2) Evalúe el funcionamiento del sistema *UniGENDeI*, tanto para su función básica (generación de un plásmido de transferencia pseudo-tipado que exprese GFP utilizando el pTransf y el pExp, demostración de la formación de partículas virales en cultivos *in vitro* de células humanas, y demostración de su capacidad para soportar sucesivas infecciones), como para alguna de las otras aplicaciones particulares antes definidas (la que usted elija de la etapa 4 que figura en el folleto publicitario).

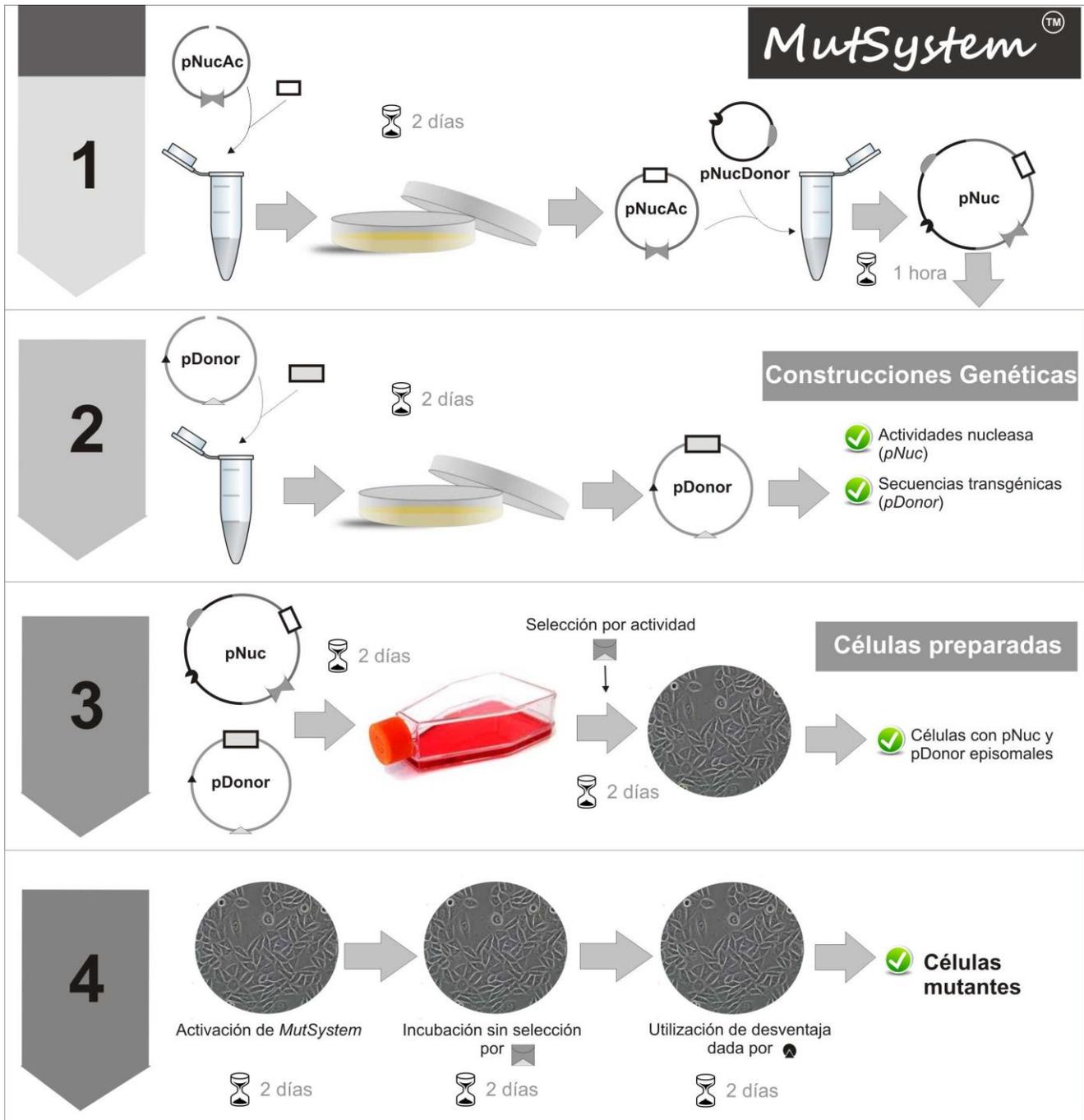
Problema 2

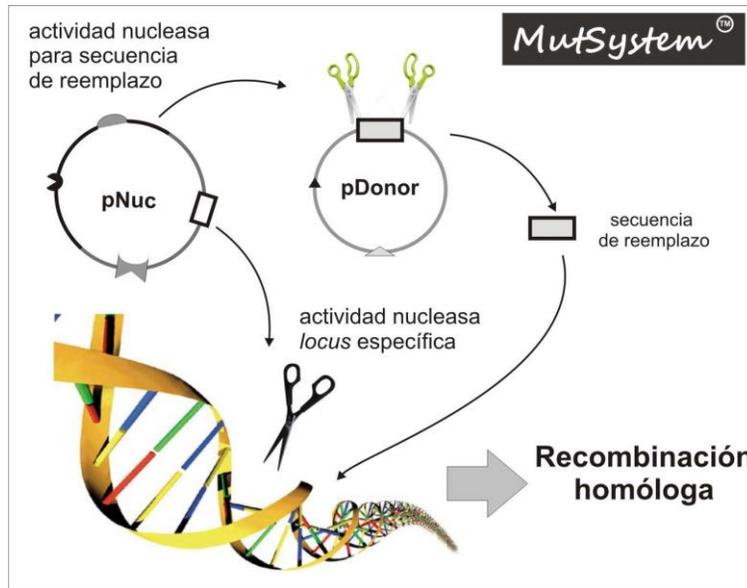
La **ingeniería genética** involucra la manipulación deliberada y racional de los ácidos nucleicos, con el fin de generar nuevas informaciones biológicas con sentido funcional para la producción de bienes y servicios. Entre sus aplicaciones, la mutagénesis genómica es una de los procedimientos más abordados, ya que permite modificar los genotipos naturales para generar nuevas variantes de organismos con características superiores a los silvestres.

En función de lo anterior, usted se incorporó en una empresa biotecnológica nacional que pretende comercializar un sistema facilitador para la generación de organismos mutantes (**MutSystem**), focalizado en la producción de mutagénesis genómicas en sitios dirigidos mediadas por recombinación homóloga.

El **kit MutSystem** estará conformado por tres plásmidos (ver tabla con descripciones), los cuales permitirán que el cliente pueda realizar la mutación deseada en las células animales de interés, ya sea para la producción de proteínas recombinantes, para funciones de biología sintética, para estudios de genómica funcional en modelos celulares o para la producción de animales genéticamente modificados, entre otras posibles aplicaciones.

A continuación se muestran los folletos publicitarios del sistema, donde se informa sobre las etapas involucradas necesarias para la generación de las células mutantes.





Plásmido	Características
Plásmido Nucleasa Sitio aceptor (pNucAc)	<i>Plásmido de Escherichia coli</i>
	<i>Función actividad nucleasa constitutiva (sin capacidad de unión a DNA diana)</i>
	<i>Función de clonado molecular para la introducción de la especificidad a DNA diana requerida por la nucleasa (actividad inducible)</i>
	<i>Función inducible para su replicación en células animales</i>
	<i>Función de recombinación sitio específica para cointegración con pNucDonor</i>
	<i>Función de ventaja para complementar con el pNucDonor y pDonor</i>
Plásmido Nucleasa para Donor (pNucDonor)	<i>Plásmido de Escherichia coli</i>
	<i>Función de ventaja para complementar con el pNucAc y pDonor</i>
	<i>Función nucleasa específica para pDonor (actividad inducible).</i>
	<i>Función de recombinación sitio específica para cointegración con pNucAc</i>
	<i>Función de desventaja para complementar con pDonor (actividad controlable).</i>

Plásmido Donor (pDonor)	<i>Plásmido de Escherichia coli</i>
	<i>Funciones de reconocimiento específico a la nucleasa codificada por pNucDonor</i>
	<i>Función de clonado molecular para la introducción de la secuencia de reemplazo.</i>
	<i>Función inducible para su replicación en células animales</i>
	<i>Función de ventaja para complementar con el pNucAc y pNucDonor.</i>
	<i>Función inducible de desventaja para complementar con pNuc</i>

En función de lo anterior,

- 1) Diseñe el contenido composicional detallado de cada uno de los plásmidos antes especificados, señalando de dónde obtendrá cada componente de secuencia y cuál será su función en la herramienta **MutSystem**.
- 2) Evalúe el funcionamiento de **MutSystem** en células animales, tanto para producir un *knock out* específico como para realizar un *knock in*. También, estudie el éxito del sistema (porcentaje de células mutantes sobre el total de células obtenidas en la última etapa, y porcentaje de homocigocis para la mutación respecto del total de células mutantes) ya que le piden esa información para agregar en el manual de instrucciones.

Problema 3

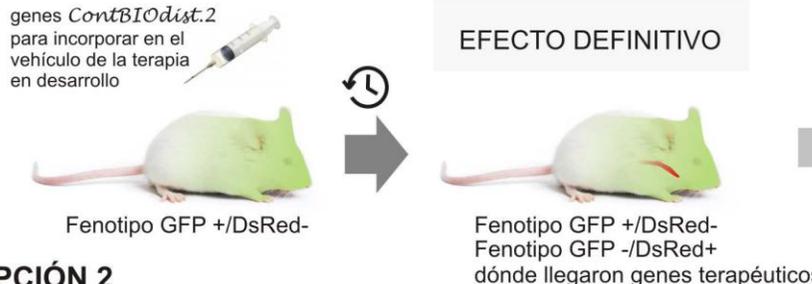
La terapia génica es un procedimiento biotecnológico que ha recobrado vigencia en los últimos años, existiendo miles de desarrollos a lo largo del planeta y disponiéndose ya de los primeros productos comerciales en el mercado.

En vistas de la enorme potencialidad de la técnica, un grupo de investigación de la Universidad Nacional de Quilmes lo contrata a Usted para colaborar en el desarrollo de una plataforma tecnológica dirigida al estudio de sistemas de vehiculización de genes terapéuticos en mamíferos, producto que será transferido a una importante industria farmacéutica. En particular, su grupo pretende desarrollar un modelo animal que permita generar evidencias *in vivo* sobre la biodistribución de genes terapéuticos administrados con diferentes vehículos y por diversas vías, más proponer y evaluar a una variante de baculovirus como sistema transportador. Estos virus cuando se aplican en mamíferos se denominan BacMam, y son muy

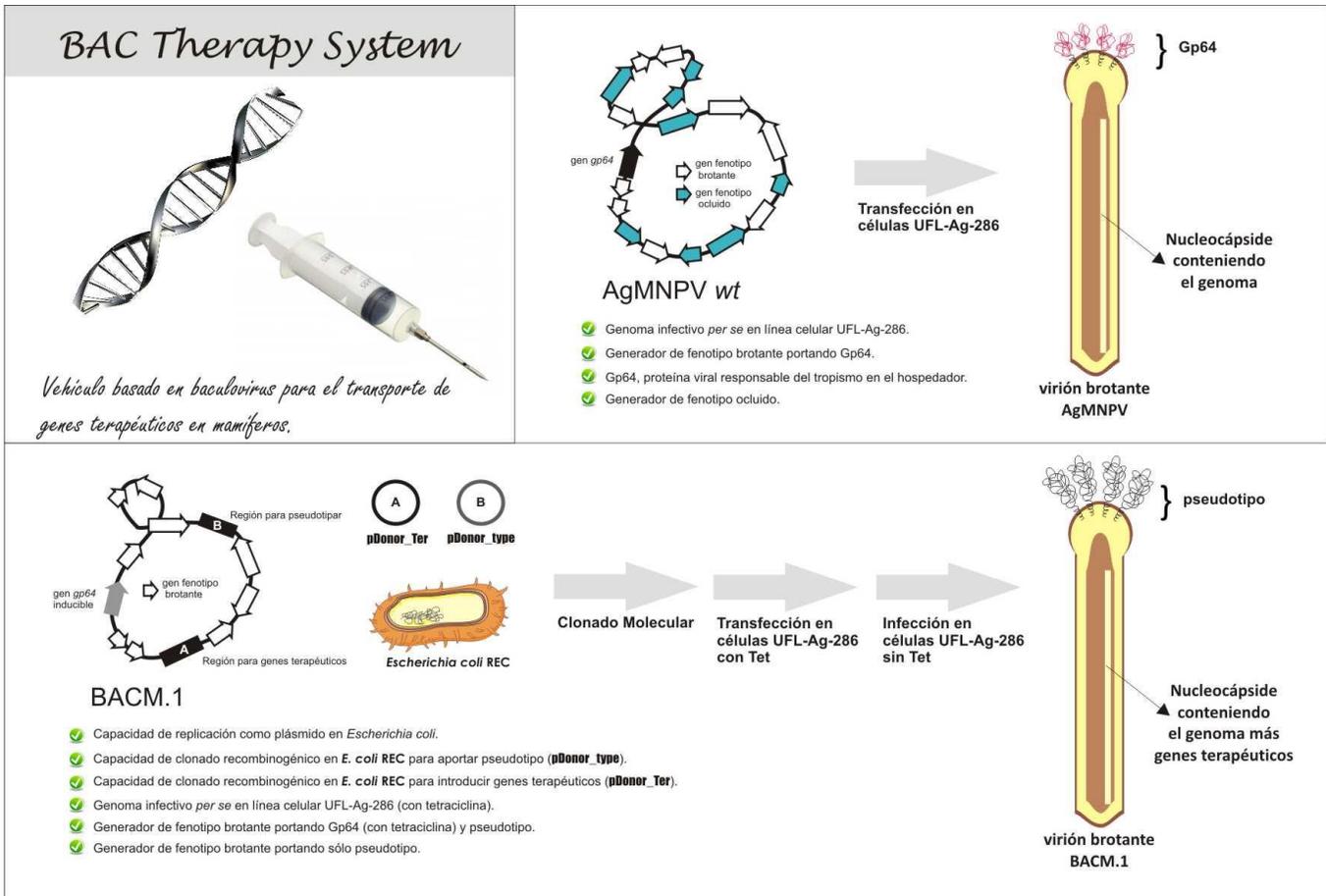
útiles ya que no despiertan respuesta inmune específica y pueden transportar transgenes de gran longitud. Sin embargo, podrían ser optimizados en tales fines debido a que de los dos fenotipos virales (viriones brotantes y ocluidos), sólo uno (viriones brotantes) es capaz de transducir células de mamíferos.

Por tales cuestiones, le solicitan que proponga un plan de trabajo para cumplir con los siguientes desarrollos:

- a) Un ratón BALB/c transgénico que exprese en todas sus células GFP, y la potencialidad de expresar DsRed por transactivación con genes transferidos. A su vez, la expresión de GFP debería también poder ser definitivamente eliminada por transactivación con genes transferidos, lo cual debería conducir a una expresión constitutiva de DsRed. Su denominación será **Ratón GR**.
- b) Los genes necesarios para afectar transitoriamente el fenotipo GFP, para activar el fenotipo DsRed (denominados genes **ContBIOdist.1**), y el necesario para afectar definitivamente a GFP transformando en constitutivo el fenotipo DsRed (denominado **ContBIOdist.2**).
- c) Un BacMam con genoma reducido (sin los genes responsables del fenotipo correspondiente a los viriones ocluidos), con posibilidad de pseudotipar utilizando el dominio transmembrana de la proteína viral GP64 (proteína fusogénica del virión), y también con la potencialidad de introducir los genes terapéuticos de interés (por ejemplo, los anteriores para el control de la biodistribución). Su denominación será **BAC Therapy System**.

<p><i>Ratón GR</i></p>  <p><i>Organismo modelo para el desarrollo de vehículos para terapia génica</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ GFP constitutivo en todas las células ✓ DsRed transactivable sólo mediante transferencia horizontal de genes ✓ GFP eliminable sólo mediante transferencia horizontal de genes ✓ DsRed constitutivo sólo mediante eliminación de GFP.
<p>Evaluación de vehículos para terapia génica mediante imágenes <i>in vivo</i> no invasivas</p>	
<p>genes <i>ContBIODist.1</i> para incorporar en el vehículo de la terapia en desarrollo</p>  <p>Fenotipo GFP +/DsRed- Fenotipo GFP +/DsRed- Fenotipo GFP -/DsRed+ dónde llegó el vehículo Fenotipo GFP +/DsRed-</p> <p>OPCIÓN 1</p>	
<p>genes <i>ContBIODist.2</i> para incorporar en el vehículo de la terapia en desarrollo</p>  <p>Fenotipo GFP +/DsRed- Fenotipo GFP +/DsRed- Fenotipo GFP -/DsRed+ dónde llegaron genes terapéuticos</p> <p>OPCIÓN 2</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-left: 600px;"> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Determinación del tropismo de los vehículos en desarrollo, tanto de manera transiente como definitiva. ✓ Evaluación de la duración del efecto, si se utilizó el sistema transiente. </div>	

Folleto publicitario sobre el ratón GR y los genes *ContBIODist.1* y *ContBIODist.2*



Folleto publicitario sobre el BAC Therapy System.

En función de lo anterior,

- 1) Diseñe el contenido composicional de las secuencias que se desean introducir en el genoma del **ratón GR**, y de las denominadas **ContBIODist.1** y **ContBIODist.2**. Además, proponga un flujo de trabajo para validar el correcto funcionamiento del sistema en un modelo celular (línea M-MSV-Balb/3T3), sin modificar el genoma de las células.
- 2) Proponga un flujo de trabajo para obtener una población homocigota de ratones BALB/c transgénicos introduciéndole las secuencias antes validadas (cepa GR), indicando las actividades experimentales correspondientes para cada instancia.
- 3) Proponga un flujo de trabajo para generar el virus **BAC.1** a partir del baculovirus AgMNPV. Para ello, debe realizar la delección de algunos genes responsables del fenotipo ocluido (*poliedrina* y 7 genes denominados *pifs* -*per os infectivity factors*-). A su vez, considere que el genoma viral funcione como bácido en *Escherichia coli*, que tenga la posibilidad de ser pseudotipado (utilizando el dominio transmembrana de GP64)

y que se le puedan insertar genes terapéuticos mediante procedimientos recombinogénicos en *Escherichia coli*. Para ello debe diseñar la cepa ***E. coli REC*** y los plásmidos **pDonor_Type** y **pDonor_Ter**.

- 4) Proponga un flujo de trabajo donde evalúe el funcionamiento del **BAC Therapy system** y de los **ratones GR**. Para ello, construya un **BAC.1 pseudotipado** con el dominio extracelular de la proteína transmembrana del virus **VSV**, y utilizando como transgenes a **ContBIODist.1** en una primera instancia, y luego, a **ContBIODist.2**. Considere estudiar la duración del efecto y la correcta certificación del tropismo del vehículo.

Problema 4

La biología sintética es un campo en constante crecimiento. El diseño de nuevas funciones biológicas promete una revolución futura, incluso superior a la que la biotecnología moderna prodigó al mundo a partir de los años 80 del siglo pasado. En vistas de ese posible auge, Usted y un grupo de amigos decidieron iniciar un emprendimiento cuyos fines incluyen el diseño y generación de herramientas y pruebas de concepto basadas en biología sintética para diferentes demandas actuales.

En particular, decidieron comenzar por la generación de dos plataformas tecnológicas para la confección de *Biobricks* (**EvolBind.1**; **EvolSensor.1**), y con la propuesta de una bacteria que permita actuar como sensor y degradador del herbicida glifosato (**EcoliGli**). Este aminofosfonato es muy utilizado para evitar el crecimiento de malezas en los cultivos, y si bien es aceptado en tales funciones como el compuesto menos dañino para el ambiente y la salud humana, puede acumularse en algunos tipos de suelos a causa de la composición de los mismos o debido a una aplicación por fuera de las normas establecidas.

A continuación se describen las consideraciones técnicas de los tres productos en desarrollo:

- a) Una plataforma tecnológica denominada **EvolBind.1** conformada por una cepa de *Escherichia coli* (**EcoliRecFF**), y los plásmidos **pActivatorA** y **pActivatorB**. La bacteria expresa de manera inducible las 10 proteínas del fago filamentoso F1 a partir de su genoma, y es capaz también de generar un fenotipo recombinogénico. El vector **pActivatorA** es repicable y encapsidable por la maquinaria del fago F1, y permite expresar de manera constitutiva una proteína de fusión con un dominio activador de la transcripción (capturador de la RNA polimerasa celular), mientras que el otro dominio debe aportarlo el usuario. En tanto, el **pActivatorB** expresa de

manera condicional (activable por la unión de la proteína generada por pActivatorA a una secuencia aportada por el usuario) un polipéptido que induce la expresión de las proteínas del fago filamentosos, lo que debería conducir a la producción de pseudo-virus.

- b) Una plataforma tecnológica denominada **EvoISensor.1** conformada por una cepa de *Escherichia coli* (**EcoliRec**) y el plásmido **pSensor**. La bacteria es capaz de generar un fenotipo recombinogénico. El plásmido permite el clonado de aptámeros (que funcionarán como RNA) para la producción de sensores para moléculas pequeñas.
- c) Una *Escherichia coli* capaz de sentir la presencia de glifosato y catalizar su hidrólisis. Se denomina **EcoliGli** y utiliza un aptámero como sensor del herbicida, dando como respuesta a su presencia la producción de fluorescencia y capacidad hidrolítica del compuesto.

Los Folletos publicitarios sobre EvoIBind.1, EvoISensor.1 y EcoliGli se encuentran al final del examen.

En función de lo anterior,

- 1) Diseñe el contenido composicional de los plásmidos **pActivatorA** y **pActivatorB**, y de las modificaciones genómicas que requiera hacerle a una cepa de *Escherichia coli* para generar **EcoliRecFF**. Indique los pasos procedimentales necesarios para la utilización del sistema **EvoIBind.1** demostrando su funcionamiento al generar un *Biobrick* que sea activador de la transcripción de una secuencia de 50 pb ausente en el genoma de la bacteria.
- 2) Diseñe el contenido composicional del plásmido **pSensor**, y de las modificaciones genómicas que requiera hacerle a una cepa de *Escherichia coli* para generar **EcoliRec**. Indique los pasos procedimentales necesarios para la utilización del sistema **EvoISensor.1** y demuestre su funcionamiento generando un *Biobrick* que sea sensor para glifosato.
- 3) Construya la *Escherichia coli* denominada **EcoliGli**, y demuestre su funcionamiento. Considere para tal fin los *biobricks* que usted produjo en los puntos anteriores, y como enzima hidrolítica una proteína con tales funciones aislada de una *Pseudomonas sp.* proveniente del suelo.

