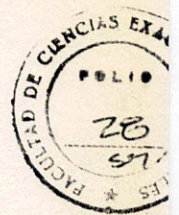


Q.B. 1998

8



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

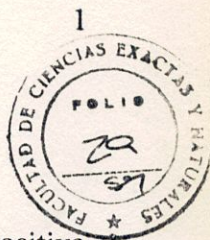
- 1.-DEPARTAMENTO: **QUIMICA BIOLÓGICA.**
- 2.-CARRERA DE: a) Licenciatura en Orientación
- b) Doctorado y/o Post-Grado: **Postgrado en Ciencias Química, Ciencias Biológicas, Ciencias Médicas y afines.**
- c) Profesorado en
- d) Cursos técnicos en Meteorología
- e) Cursos de Idiomas
- 3.- **2do. cuatrimestre de 1998**
- 4.-Nº DE CODIGO DE CARRERA:
- 5.-MATERIA: **"Introducción a la teoría y práctica de los vectores virales"**
Nº DE CODIGO: **aún no posee por tratarse de un curso nuevo.**
- 6.-PUNTAJE PROPUESTO:
- 7.-PLAN DE ESTUDIO AÑO: ---
- 8.-CARACTER DE LA MATERIA: **postgrado**
- 9.-DURACION: **2 semanas**
- 10.-HORAS DE CLASE SEMANALES:
- a) Teóricas **10** d) Seminarios
- b) Problemas **10** e) Teórico-problemas
- c) Laboratorio **20** f) Teórico-prácticas
- g) Total **40** hs.
- 11.-CARGA HORARIA TOTAL: **80** hs
- 12.-ASIGNATURAS CORRELATIVAS: **Graduados de Ciencias Biológicas y de la Salud.**
- 13.-FORMA DE EVALUACION: **Examen oral y escrito.**
- 14.-PROGRAMA ANALITICO: **Se adjunta.**
- 15.-BIBLIOGRAFIA: **Se adjunta.**

Fecha 29/4/98
 Firma Profesor [Signature]
 Aclaración firma CELOTO

Firma Director [Signature]
 Aclaración firma **DR. ERNESTO J. MASSOUH**
 DIRECTOR ADJUNTO.
 DEP. QUIMICA BIOLÓGICA
 FCEN-UBA

APROBADO POR RESOLUCION 09 1760/98

Introducción a la teoría y práctica de los vectores virales



Programa teórico (aproximadamente 18 horas distribuidas en 6 clases).

Módulo 1: Nociones básicas de biología molecular. Estructura de los genes. Regulación positiva y negativa de la expresión génica. Factores de transcripción y rol de la cromatina. ADN y proteínas recombinantes. Nociones básicas de virología. Virus integrativos y no integrativos, virus citoplasmáticos o nucleares, virus líticos, persistentes y latentes.

Módulo 2: Modos de introducción del ADN en células y en organismos eucariotes. Definición de transgénesis en general y de terapia génica en particular. Transgénesis in vivo, in vitro y ex vivo. Transgénesis somática y germinal. Métodos químicos, físicos y biológicos de introducción del ADN. Los vectores virales, ventajas y desventajas en relación a otros modos de transgénesis. Propiedades generales de los vectores virales: vectores episomales y vectores integrativos, vectores líticos, vectores latentes, vectores atenuados, vectores incompetentes. Elección del tipo de vector. Estabilidad y expresión del vector y del transgen. Inmunidad específica y no específica.

Módulo 3: Los vectores episomales. El modelo herpético. Introducción a la biología de los virus herpéticos. El virus del herpes simplex de tipo 1 (HSV-1). Ciclo lítico y ciclo latente. Vectores recombinantes salvajes, atenuados y defectivos. Vectores defectivos de tipo amplicón. Modo de producción de ambos tipos de vectores. Ejemplos de utilización: terapia génica de enfermedades genéticas, neurodegenerativas y tumores cerebrales, cartografía de conexiones sinápticas del sistema nervioso central. Utilización en investigación básica.

Módulo 4: Los vectores integrativos. El modelo retroviral. Introducción a los retrovirus. Retrovirus de tipo C y lentivirus. Construcción de vectores retrovirales. Las líneas celulares de encapsidación y las líneas celulares productoras. Producción de vectores retrovirales en sistema transitorio. Los vectores derivados de HIV. Utilización de vectores retrovirales en terapia génica y en investigación básica: estudio de líneas celulares y selección de clones celulares.

Módulo 5: Otros vectores: vectores derivados de adenovirus y de virus adeno-asociados (parvovirus). Breve introducción a la biología de ambos tipos de virus y a la construcción de vectores derivados de ambos modelos. Vectores derivados de virus a ARN. Vectores derivados de baculovirus. Ejemplos prácticos de utilización de estos vectores.

Módulo 6: Discusión general. Ventajas y desventajas de cada sistema de vectores. Problemas éticos y de seguridad. Confinamiento de vectores. Aspectos jurídicos y económicos. La terapia génica hoy. Protocolos clínicos actualmente en desarrollo. Conclusiones.

Módulo 7: Evaluación mediante coloquio y examen escrito de problemas y/o de preguntas.

Bibliografía

1. Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. Glorioso J, N de Luca and D J Fink. *Ann. ReV. Microbiol.* 49: 675-710 (1995).
2. Les vecteurs herpétiques pour le transfert de gènes. A L Epstein. *Médecine/Sciences* 8, 902-911 (1992).
3. Novel vectors for gene therapy. D Strayer. *Adv. Drug Delivery Rev.* 17: 230-238 (1995).
4. Defective herpes simplex virus type 1 vectors harboring gag, pol, and env genes can be used to rescue defective retrovirus vectors. N Savard, F L Cosset and A L Epstein. *J Virol.* 71: 4111-4117 (1997).
5. HSV-1 amplicons. Advantages and disadvantages of a versatile vector system. A L Epstein. *Restorative Neurology and Neuroscience* 8, 41-43 (1995).
6. A cosmid based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. C Cunningham and A J Davison. *Virology* 197: 116-124 (1993).
7. Helper virus free transfer of herpes simplex virus tupe 1 plasmid vectors into neural cells. C Fraefel, S Song, F. Lim, P Lang, L Yu, Y Wang, P Wild and A I Geller. *J Virol.* 70: 7190-7197 (1996);
8. *Thérapie Génique, l'ADN médicament.* Coordonné par Axel Kahn. Editions John Libbey Eurotext (1993).

Introducción a la teoría y práctica de los vectores virales



Programa teórico (aproximadamente 18 horas distribuidas en 6 clases).

Módulo 1: Nociones básicas de biología molecular. Estructura de los genes. Regulación positiva y negativa de la expresión génica. Factores de transcripción y rol de la cromatina. ADN y proteínas recombinantes. Nociones básicas de virología. Virus integrativos y no integrativos, virus citoplasmáticos o nucleares, virus líticos, persistentes y latentes.

Módulo 2: Modos de introducción del ADN en células y en organismos eucariotes. Definición de transgénesis en general y de terapia génica en particular. Transgénesis in vivo, in vitro y ex vitro. Transgénesis somática y germinal. Métodos químicos, físicos y biológicos de introducción del ADN. Los vectores virales, ventajas y desventajas en relación a otros modos de transgénesis. Propiedades generales de los vectores virales: vectores episomales y vectores integrativos, vectores líticos, vectores latentes, vectores atenuados, vectores incompetentes. Elección del tipo de vector. Estabilidad y expresión del vector y del transgen. Inmunidad específica y no específica.

Módulo 3: Los vectores episomales. El modelo herpético. Introducción a la biología de los virus herpéticos. El virus del herpes simplex de tipo 1 (HSV-1). Ciclo lítico y ciclo latente. Vectores recombinantes salvajes, atenuados y defectivos. Vectores defectivos de tipo amplicón. Modo de producción de ambos tipos de vectores. Ejemplos de utilización: terapia génica de enfermedades genéticas, neurodegenerativas y tumores cerebrales, cartografía de conexiones sinápticas del sistema nervioso central. Utilización en investigación básica.

Módulo 4: Los vectores integrativos. El modelo retroviral. Introducción a los retrovirus. Retrovirus de tipo C y lentivirus. Construcción de vectores retrovirales. Las líneas celulares de encapsidación y las líneas celulares productoras. Producción de vectores retrovirales en sistema transitorio. Los vectores derivados de HIV. Utilización de vectores retrovirales en terapia génica y en investigación básica: estudio de líneas celulares y selección de clones celulares.

Módulo 5: Otros vectores: vectores derivados de adenovirus y de virus adeno-asociados (parvovirus). Breve introducción a la biología de ambos tipos de virus y a la construcción de vectores derivados de ambos modelos. Vectores derivados de virus a ARN. Vectores derivados de baculovirus. Ejemplos prácticos de utilización de estos vectores.

Módulo 6: Discusión general. Ventajas y desventajas de cada sistema de vectores. Problemas éticos y de seguridad. Confinamiento de vectores. Aspectos jurídicos y económicos. La terapia génica hoy. Protocolos clínicos actualmente en desarrollo. Conclusiones.

Módulo 7: Evaluación mediante coloquio y examen escrito de problemas y/o de preguntas.



Trabajos prácticos.

Se utilizarán vectores derivados del HSV-1. Estos podrán ser vectores recombinantes o vectores de tipo amplicón. En todos los casos el transgen marcador será el gen bacteriano LacZ, expresando la β -galactosidasa, cuya actividad será puesta en evidencia gracias a la utilización de tests X-gal.

Los objetivos de los trabajos prácticos son: (a) transmitir y experimentar la noción de complementación genética en trans, utilizando vectores recombinantes y (b) construir y utilizar un vector defectivo de tipo amplicón.

TP N° 1 (5 días): Complementación de vectores recombinantes incompetentes, expresando el gen de la β -galactosidasa. Dos cepas virales, defectivas en genes esenciales diferentes (cepa D30EBA, defectiva en el gen ICP4 y cepa CgalDel42, defectiva en el gen UL42) serán utilizadas para infectar células transcomplementantes (células E5 y V9 respectivamente) o no transcomplementantes (células VERO). En el caso de la utilización de células no transcomplementantes (no permisivas a la infección), la complementación en trans será aportada (i) por coinfección con el vector defectivo en la otra función (perteneciente a otro grupo de complementación) o (ii) por transfección con un plásmido expresando la función ausente. De este modo, tres tipos diferentes de complementación serán puestos en evidencia. En todos los casos se fijarán las células y se colorearán con X-gal 3 días después de la infección. Se realizarán todos los controles positivos y negativos requeridos para la comprensión del trabajo práctico.

TP N° 2 (7 días): Construcción de un vector de tipo amplicón expresando la β -galactosidasa. Las células (BHK-21) serán (i) transfectadas con un plásmido de tipo amplicón y sobre-infectadas el día siguiente con una cepa viral HSV-1 salvaje (virus auxiliar) o (ii) cotransfectadas por el plásmido amplicón y un juego de cinco cósmidos conteniendo el conjunto de genes virales, pero en los cuales ha sido eliminada la señal de encapsidación viral. Tres días más tarde serán titulados tanto el virus auxiliar como el vector amplicón producidos por las células (formación de placas de lisis virales en el caso del virus auxiliar, test X-gal en el caso del vector amplicón). Se realizarán todos los controles positivos y negativos requeridos para la comprensión del trabajo práctico.



Bibliografía

1. Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. Glorioso J, N de Luca and D J Fink. *Ann. Rev. Microbiol.* 49: 675-710 (1995).
2. Les vecteurs herpétiques pour le transfert de gènes. A L Epstein. *Médecine/Sciences* 8, 902-911 (1992).
3. Novel vectors for gene therapy. D Strayer. *Adv. Drug Delivery Rev.* 17: 230-238 (1995).
4. Defective herpes simplex virus type 1 vectors harboring gag, pol, and env genes can be used to rescue defective retrovirus vectors. N Savard, F L Cosset and A L Epstein. *J Virol.* 71: 4111-4117 (1997).
5. HSV-1 amplicons. Advantages and disadvantages of a versatile vector system. A L Epstein. *Restorative Neurology and Neuroscience* 8, 41-43 (1995).
6. A cosmid based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. C Cunningham and A J Davison. *Virology* 197: 116-124 (1993).
7. Helper virus free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. C Fraefel, S Song, F. Lim, P Lang, L Yu, Y Wang, P Wild and A I Geller. *J Virol.* 70: 7190-7197 (1996);
8. *Thérapie Génique, l'ADN médicament.* Coordonné par Axel Kahn. Editions John Libbey Eurotext (1993).