

DEPARTAMENTO: Ciencias Biológicas

ASIGNATURA: Ingeniería Genética —

Ingeniería Genética

CARRERA: Lic. en Ciencias Biológicas y  
Doctorado

ORIENTACION: Genética Molecular  
Biotecnología

B1986

21

CARACTER: Optativo

DURACION DE LA MATERIA: 1 Cuatrimestre

HORAS DE CLASE: a) Teóricas: 8

b) Problemas: 3

c) Laboratorio: 3 semanas full time d) Seminarios: 3

e) Totales: 14 + 3 semanas "full time"

ASIGNATURAS CORRELATIVAS: (Solo para Licenciatura) - Microbiología e Inmunología  
- Una de estas dos: Biología  
Molecular o Genética Molecular

### PROGRAMA

1. Plásmidos. Propiedades generales y asociadas (resistencias a antibióticos, bacteriocinas, toxinas, fermentación). Transferencia: conjugadores, no conjugativos, movilizables. Replicación: relajada, controlada, número de copias, amplificación - disociación.
2. Transposones. Elementos de inserción simple IS. Sitios de integración. Secuencias repetidas e invertidas. Transposasas. IS y evolución. Formación de plásmidos conjugativos de resistencia a drogas. Tn-3, Tn-10, Tn-5, etc. Fago Mu: mecanismo de integración; replicación; ciclo lítico. El genoma Mu como transposón y su utilización en el estudio de genes regulatorios en bacteria. Modelos de transposición. Transposición en eucariotes.
3. Clivaje, ligado, modificación y síntesis "in vitro" de moléculas de DNA. Nucleasas; diferentes tipos. Endonucleasas de restricción, diferentes tipos, y descripción de las más importantes. Palíndromos. Metilación del DNA. Ligasas de DNA y RNA; tipos de ligadura; uso preferencial de la enzima de *E. coli* y la inducida por el fago T4. Defosforilación y fosforilación de ácidos nucleicos, fosfatasa alcalina y quinasa de polinucleótidos. Enzimas polimerizantes del DNA. Transferasa terminal y adición de cadenas poliméricas. DNA polimerasa I, actividad polimerizante y actividades nucleolíticas, fragmentos proteolíticos, "proof reading", "nick translation", "filling-in" y polimerización en molde y copia; usos preferentes de la enzima y de su fragmento "grande" (Klenow). DNA polimerasa de T4. Transcriptasa reversa: estructura y características. RNAsa H.
4. Clonado de genes en bacterias. Los plásmidos como vehículos de clonado, características generales, pBR322, plásmidos de la familia pUC, pAT153, características de los huéspedes más comunes. Los derivados del fago como vehículo de clonado; Charon-4; Gt10 y Gt11. Empaque "in vitro". Cósmidos. El sistema del fago M13, características generales. Huéspedes bacterianos más comunes. Estrategias de clonado. Preparación de genotecas. Técnicas para la preparación de un

Aprobado por Resolución 001052/00

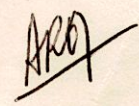
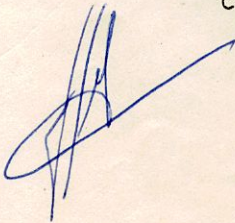
ARSA

DNA copia. Inserción del DNA copia en un vehículo de clonado, "blunt-ends", "sticky-ends", cadenas homopoliméricas, linkers, etc. Preparación de genotecas de DNA copia sin o con expresión de funciones. El sistema del fago SP6 para la obtención de transcritos específicos. Clonado en Bacillus.

5. Selección de recombinantes y caracterización. Métodos genéticos, inmunológicos y por hibridización. Aislamiento del gen. Restricción y experimentos shot-gun. Reconocimiento de clones. Selección de mRNA y arresto de la traducción "in vitro" con el cDNA clonado.
6. Métodos para la caracterización de secuencias génicas. Mapas de restricción. Secuenciación del DNA. Métodos de copia de un templado a partir de "primer" (iniciadores). Terminadores de cadena. Uso de dideoxinucleótidos. Aplicación de fragmentos clonados en fago M13. Secuencias flanqueantes universales. Clonado al azar en M13 mp7. Método químico de Maxam y Gilbert, de Hohn y Church & Gilbert.
7. Síntesis de oligodeoxinucleótidos. Métodos de fosfotriéster y triéster de fosfito. Purificación y caracterización de los oligonucleótidos. Uso de genes sintéticos. Oligonucleótidos como sondas de hibridización o iniciadores específicos. Mutagénesis dirigida mediada por DNA sintético.
8. Expresión de genes eucarióticos en bacterias. Promotores y terminadores de la transcripción. Sitios de contacto. Regulación positiva. Construcción de vehículos de clonado y expresión en E. coli. Ej.: vectores pK0, pLG, etc. Secuencias de reconocimiento del ribosoma. Sec. Shine-Dalgarno. Marco de lectura. Eficiencia en transcripción y traducción. Vectores pEX. Señal para transporte a membrana. Secreción y estabilidad de proteínas. Ej.: preproquimosina. Clonado y expresión en levaduras. Plásmidos, híbridos de levadura y bacteria. Vectores de transformación de levaduras. (expresión de interferón, renina, etc. en levaduras).



9. Clonado en células eucariotes. Transfección de genes en células eucariotes. Métodos: precipitación con  $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}$ , fusión de protoplastos, microinyección. Líneas celulares utilizadas. Aislamiento de genes transferidos. Transfección de DNA de elevado peso molecular: clonado de genes transformantes. Vectores virales: SV40, adenovirus, retrovirus. Aplicaciones: estudio de secuencias ENHANCER. Retrovirus como herramientas para el estudio de la diferenciación.
10. Introducción de genes heterólogos en animales. Construcción de genes por fusión. Secuencias reguladoras. Promotor de la metalotioneína. Integración de los genes heterólogos al DNA cromosómico. Inducción de la expresión. Expresión en ratones transgénicos. Metilación de los nuevos genes. Transmisión hereditaria. Expresión de la hormona de crecimiento. Fusión: metalotioneína-hormona de crecimiento humana. Corrección parcial de enfermedades hereditarias.
11. Clonado en plantas. Vectores de transformación en plantas. Cauliflower Mosaic virus. Agrobacterium tumefaciens. Estructura del plásmido Ti y sus propiedades como vector. Transferencia genética a través de fusión de protoplastos. Transformación en plantas. Expresión de genes bacterianos. Clonado de la Ribulosa P carboxilasa. Expresión de los genes en plantas regeneradas. Progenies.
12. Biología Molecular de la fijación del nitrógeno. Genes de nodulación. Especificidad. Formación del bacteroide. Estructura y función. Metabolismo. Sistema de permeasas. Nitrogenasas. Bioquímica de su funcionamiento. Requerimientos y cofactores. Operón Nif. Estructura. Genes reguladores. Inducción por proteínas responsables de la utilización del  $\text{NH}_4$ . Transferencia de los genes nif. Regulación de su expresión.
13. Estructura y organización de los genes de eucariotes. Secuencias únicas y repetitivas. Métodos para determinar el número de copias y la localización cromosómica y subcromosómica de los genes. Genes transcriptos por la RNA polimerasa II. Intrones y exones. Relaciones entre exones y dominios funcionales y estructurales de las proteínas. Familias de genes. Pseudogenes. Secuencias "consenso" para la iniciación y terminación de la transcripción. Maduración (splicing) del RNA.



Mecanismos de splicing. Papel de los RNA nucleares pequeños. Casos particulares de splicing: splicing autocatalítico en Tetrahymena; splicing en mitocondrias de levaduras, madurasas. Splicing alternativo y uso diferencial de promotores: alfa amilasa, inmunoglobulinas, calcitonina, fibronectina y otros casos. Estructura de RNA mensajero. Modificaciones post-transcripcionales. Pre y pro polipéptidos. Secuencias para proteínas de exportación y de membrana. Poliproteínas  
Inmunoglobulinas: genes esparcidos. Maduración de las células B y rearreglo génico. Producción de anticuerpos

14. El uso de las técnicas del DNA recombinante en el diagnóstico prenatal y pre-sintomático de enfermedades hereditarias. Enfermedades en las que se conoce el gen defectuoso: talasemias, anemia falciforme, deficiencia en alfa I, antitripsina, etc. Enfermedades en las que no se conoce el gen defectuoso: Corea de Huntington, hipertrigliceridemias y otras. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Consideraciones para una futura terapia genética.
15. Estructura de cromatina y expresión genética. Empaquetamiento del DNA eucariótico. Nucleosomas. Sensibilidad a las nucleasas. Topología y transcripción.

#### BIBLIOGRAFIA

- Williamson, R. (editor) Genetic Engineering 1, 2, 3 y 4  
Academic Press, London, 1981, 1982, 1983.
- Watson, J.D., Tooze, J. y Kúrtz, D.T. Recombinant DNA. A short Course, Scientific American Books, Freeman, New York, 1983.
- Lewin, B, "Genes" (1983) or "Genes II" (1985) J. Willey & Sons
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982.
- Trabajos originales en revistas científicas como Cell, Proc. Natl. Acad. Sci., EMBO J., J. Biol. Chem., J. Bacteriol., Nucleic Acid Res., etc.

Dr. Juan C. GIACCHI

En representación de la Junta Académica Departamental