

B- 2001  
10



**Universidad de Buenos Aires**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Ciencias Biológicas

Int. Güiraldes 2620  
Ciudad Universitaria - Pab. II, 4° Piso  
CP:1428 Nuñez, Ciudad Autónoma de Buenos Aires  
Argentina

O: <http://www.bg.fcen.uba.ar>

Carrera: Licenciatura en Ciencias Biológicas	Código de la carrera: 05
Carrera: Doctorado en Ciencias Biológicas	Código de la carrera: 55
	Código de la materia: 7111

**NOMBRE DE LA MATERIA: INGENIERIA GENETICA**

CARÁCTER:	[SI / NO]	PUNTAJE:
Curso obligatorio de licenciatura (plan )	NO	
Curso optativo de licenciatura (plan )	SI	5 puntos
Curso de postgrado	SI	5 puntos

Duración de la materia: 16 semanas.	Cuatrimstre en que se dicta: 2do.
Frecuencia en que se dicta: todos los años	

Horas de clases:	Hs.
Teóricas	8
Problemas	2
Laboratorios	40*
Seminarios	2
Carga horaria semanal:	12
Carga horaria total cuatrimestral:	248

(\* Postiores a las teóricas

Asignaturas correlativas:	Genética I o Regulación Metabólica
Forma de Evaluación:	Examen final.

Profesor/a a cargo:		
Firma:		
Aclaración:	Dr. Héctor N. Torres	Fecha: 2 /7/2001

DR. JUAN C. REBORADA  
DIRECTOR  
DPTO. CS. BIOLÓGICAS

## PROGRAMA TEORICO

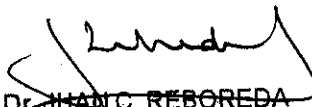
**1. Ingeniería Genética: definiciones y concepto. Enzimas que hidrolizan y/o modifican a los ácidos nucleicos.** Restricción y modificación: concepto. Tipos de endonucleasas de restricción. Concepto de Palindrome, isoesquizómeros. Distintas clases de endonucleasas del Tipo II. Métodos para elaborar un mapa de restricción. Metilasas. Nucleasas de cadena única. DNAsas de cadena doble. DNA ligasas. DNA polimerasa I: reacciones que cataliza y sus funciones. Fragmento de Klenow. "Polymerase Chain reaction". El uso de la Taq polimerasa. Otras DNA polimerasas: T4 y T7. Transferasa terminal. RNA polimerasas. Métodos para la marcación radioactiva de moléculas de ácidos nucleicos. Marcación del RNA. Transcriptasa reversa. Preparación de un c-DNA: métodos clásicos, método de la RNAsa H.

**2. Hibridización de los ácidos nucleicos.** Concepto de Rot y Cot. Factores que afectan la velocidad de hibridización. Fórmulas de aplicación usual. Procedimientos generales: hibridización en medio líquido y sobre membranas. Tipos de membranas.

**3. Concepto de clonado molecular.** Elementos en el clonado: fragmento, vector, huésped, transformación y selección. Fragmento a clonar: diferentes tipos y orígenes. Bancos de genes. Relación de Clark y Carbon. Transformación: métodos y eficiencia. Vectores de clonado en bacterias: elección por tamaño de fragmento. Los plásmidos como vehículos de clonado. Características generales: número de copias, replicación relajada, incompatibilidad, control de la replicación, funciones "marcadoras", sitios únicos. Plásmidos inicialmente más utilizados en Ingeniería Genética: pBR322, pAT153 y familia de los pUCs incluido BlueScript. Clonado direccional. Los derivados del fago  $\lambda$ . Mecanismo de empaque. Empaque *in vitro*. Charon 4A,  $\lambda$ gt10 y  $\lambda$ gt11: sus diferentes usos y huéspedes. Estrategias de inserción de fragmentos a clonar. Cósmidos. El sistema M13: formas replicativas y no replicativas. Características del empaque y de la "placa". Derivados del M13 como vectores de clonado. Complementación intracistrónica de la  $\beta$ -galactosidasa, fragmento  $\alpha$ . Características de un "polylinker". Características del huésped. Utilización del sistema M13 en la secuenciación del DNA y en la generación de "sondas". Vectores "blueScript". Sistema de clonado y expresión en fago  $\lambda$ . *Screening* inmunológico. Preparación de proteínas de fusión. Selección de anticuerpos específicos.

**4. 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 pKO, pLG, etc. Secuencias de reconocimiento del ribosoma. Sec. Shine-Dalgarno. Marco de lectura. Eficiencia en transcripción y traducción. Vectores pET. Señal para transporte de 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).

**5. Selección de recombinantes y caracterización.** Métodos genéticos 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. Uso de oligonucleótidos como sondas de hibridización.

  
Dr. JUAN C. REBORADA  
DIRECTOR  
DPTO. CS. BIOLÓGICAS

  
Dr. HECTOR N. TORRES  
Director  
INGEBI - CONICET

**6. Métodos para la caracterización de secuencias génicas.** Mapas de restricción. Secuenciación del DNA. Métodos de copia de un templado a partir del *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. *Cyclone*.

**7. Estructura y organización de los genes de eucariotas.** Secuencias únicas y repetitivas. Métodos para determinar el número de copias y la localización cromosómica y subcromosómica de los genes. Genes transcritos por la RNA polimerasa II. Intrones y exones: métodos para su mapeo. Métodos para determinar los extremos 5' y 3' de los mRNAs (mapeo con nucleasa S1). *Splicing* alternativo: su detección. Transcritos de SP6 polimerasa y su uso. Obtención de cDNA *in vivo* mediante vectores retrovirales.

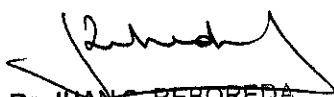
**8. Transfección y expresión en células eucariotas.** Cultivo de células eucariotas: cultivos primarios, líneas celulares, requerimientos. Métodos de transfección: precipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, liposomas, transfección mediada por receptor, virus recombinantes. Transfección *in vivo* por inyección directa de DNA. Expresión transiente vs. estable. Plásmidos como vectores de expresión en células eucariotas. Genes *reporter*. Aplicaciones.


**9. Terapia génica.** Aplicaciones. Enfermedades genéticas monogénicas: fibrosis quística, enfermedades metabólicas. Enfermedades adquiridas: cáncer, cardiovasculares, virosis. Metodología: *in vivo*, *ex vivo*. Genes suicidas. Vectores virales: retrovirus, adenovirus, herpesvirus, lentivirus. Vectores no virales: lipoplex, poliplex, conjugados moleculares. Terapia y mejoramiento, aspectos éticos.

**10. Síntesis de oligodeoxinucleótidos.** Métodos de fosfotriéster y triéster de fosfito. Purificación y caracterización de los oligonucleótidos. Uso de genes sintéticos. Mutagénesis dirigida mediada por DNA sintético.

**11. Diagnóstico y filiación.** Diagnóstico de enfermedades hereditarias. Diagnóstico directo y por ligamiento. Talasemias, anemia falciforme, fibrosis quística, distrofia muscular de Duchenne, distrofia miotónica, corea Huntington. Mutaciones puntuales e hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo (ASO). Mutaciones dinámicas: amplificación de tripletes. Anticipación. RFLP (restriction fragment length polymorphisms) y ligamiento. Microsatélites y estudios de ligamiento. Estudios de paternidad y filiación. Minisatélites de Jeffreys. Sistemas multilocus, multialélicos. Sistemas unilocus, multialélicos: VNTRs. Uso de microsatélites en estudios de filiación: tri y tetra nucleótidos. Estudio de polimorfismos de secuencia en el DNA mitocondrial. Diagnóstico de enfermedades infecciosas: PCR, RT-PCR, PCR anidada. Determinación de carga viral para HCV y HIV-1.

**12. Técnicas de amplificación génica.** Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). Criterios de selección de secuencias *target* y *primers*. Variaciones de la técnica: hot start PCR, pan-handle PCR. PCR-ELISA. PCR cuantitativo: sistemas de PCR competitiva y taq-man. Métodos alternativos de amplificación: reacción en cadena de la ligasa, Q-beta replicasa, NASBA, Branched-DNA. Aplicación de estas metodologías al clonado y al diagnóstico.

  
Dr. JUAN C. REBORADA  
DIRECTOR  
DPTO. CS. BIOLÓGICAS

  
Dr. HECTOR N. TORRES  
Director  
INGEBI - CONICET

**13. Proyecto Genoma Humano y la época post-genómica.** Mapa genético y mapa físico del genoma humano. Marcadores genéticos. Su uso en la construcción de mapas. Su importancia en la secuenciación de un genoma. El concepto del enfoque genoma total vs. genoma de cada cromosoma. Secuenciación shot-gun de genomas bacterianos. Su aplicación al genoma humano. El mapa físico es innecesario?. Y después de la secuencia, qué?. La era post-genómica. Proteoma y networking. Otros desarrollos post-genómicos.

**14. Animales transgénicos.** Técnicas de transferencia de DNA. Construcción de genes por fusión. Secuencias reguladoras. Promotores generales y específicos. Metalotioneína. Integración de genes heterólogos al DNA cromosómico. Inducción de la expresión. Ratones transgénicos. Transmisión hereditaria. Expresión del gen de la hormona de crecimiento. Promotores. Regulación. Integración. Análisis del DNA, RNA, proteínas de fusión. Mecanismos de regulación. Corrección parcial de enfermedades hereditarias: enanismo, anemias, hipercolesterolemias, thyl-elastasa, antígenos SV40, cmyc, cfos,  $\alpha$ -fetoproteínas, insulina,  $\gamma$  y  $\beta$ -globina, protamina,  $\beta$ -lactoglobulina, esterilidad, etc. Corrección y obtención de mutantes. Farmer genes. Producción de proteínas humanas en animales transgénicos. Sistema Cre-loxP. Recombinación homóloga. Knock out.


**15. Técnicas de transformación vegetal.** Elección de sistemas de transformación. Sistemas basados en *Agrobacterium*. Vectores de cointegración y vectores binarios. Procedimientos de cocultivo y elección de explantos. Transformación *in vivo* mediante infiltración con *Agrobacterium*. Genes de selección y genes reporteros. Utilización de *Agrobacterium* como sistema de "gene tagging".


**16. Sistemas de transferencia directa de genes.** Transformación de protoplastos mediante métodos químicos o electroporación. Bombardeo con microproyectiles (biobalística). Electroporación de tejidos organizados. Otros métodos. Sistemas de transferencia de genes basados en virus vegetales. Caulimovirus, geminivirus y virus a RNA de simple cadena como vectores de transformación. Limitaciones y ventajas de los virus vegetales como vectores de expresión. Agroinfección.

**17. Silenciamiento génico:** influencia del entorno genómico, localización cromosómica. Silenciamiento dependiente de homología de secuencias, detección del DNA extraño, inactivación. Silenciamiento postranscripcional, cosupresión.

**18. Uso de levaduras en Ingeniería Genética: Sistema de doble híbrido.** Características generales de *Saccharomyces cerevisiae*. Transcripción de levaduras. Fundamentos del sistema de doble híbrido. Vectores. Genes reporteros. Control de especificidad. Usos del sistema de doble híbrido. Distintos sistemas de doble híbrido.

**19. Bioinformática.** Búsquedas en las principales bases de datos. Alineamientos y búsquedas de secuencias. Clasificación de proteínas y asignación funcional. Análisis filogenético y genómica comparativa. "Microarrays" y genómica funcional.

  
Dr. JUAN C. REBORADA  
DIRECTOR  
DPTO. CS. BIOLÓGICAS

  
Dr. HECTOR W. TORRES  
Director  
INGEBI - CONICET

## PROGRAMA PRACTICO

Utilización de sistema de dos híbridos en levaduras para estudiar la interacción proteína-proteína:

- 1- Subclonado inserto en plásmido de levadura. Hacer placas de levaduras para transformación. Números de la ligada.
- 2- Ligación (6 hrs a RT). Transformación de *E. coli*. Ligación, transformación, PCR.
- 3- Selección por PCR de recombinantes. Cultivos ON de transformantes. Secuenciación, transformación de levaduras.
- 4- Minipreps. Secuenciación por PCR. Armado geles de secuencia. Cultivo ON de levadura en YPD.
- 5- Corrida del gel de secuencia. Transformación de levaduras. Dos híbridos.
- 6- Lectura de secuencia. Placas de levadura recombinantes: replica plating en His-. Filtro de  $\beta$ -gal. Cultivo líquido (24 hrs) para ensayo  $\beta$ -gal. Inmunoprecipitación, geles, western blot.
- 7- Cultivo líquido: ensayo  $\beta$ -gal. Obtención de extractos proteicos. Inmunoprecipitación. Corrida de geles de SDS-PAGE.
- 8- Western blot de la inmunoprecipitación.
- 9- Conclusiones generales.

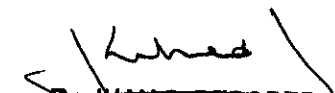
## BIBLIOGRAFIA

(para conocimientos previos)

- Alberts *et al*; Molecular Biology of the Cell.
- Davis *et al* (Dulbecco); Microbiology.
- De Robertis y De Robertis; Biología Molecular y Celular.
- Watson; Molecular Biology of the Gene.
- Stryer; Biochemistry.
- Lewin, Genes V.

## BIBLIOGRAFIA PARA INGENIERIA GENETICA

- "Molecular Cloning. A laboratory manual". Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. Cold Spring Harbor (ed.); Box 100, Cold Spring Harbor, New York 11724, USA (1982), 2da. edición (3 tomos) (1989).
- "Recombinant DNA. A short course". Watson, J.D., Tooze, J. and Kurtz, D.T.W.H. Scientific American Books (Ed.) Freeman and Company; 41 Madison Ave., New York 10010, USA (1994).
- "Genetic Engineering", Vols 1, 2, 3, 4. Robert Williamson (Ed.) . Academic Press Inc. 111, 5th. Avenue, New York 10003, USA (1981, 1982, 1983).
- "Principios de manipulación genética. Introducción a la Ingeniería Genética". Old, R.W. and Primrose, S.B., Editorial Acribia S.A., Royo 23, 50006 Zaragoza, España (1987).
- "Current protocols in molecular biology". Vols. 1 y 2. Willey-Interscience (1998).
- "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology - Methods in Enzymology", Vol. 194, Christine Guthrie, Gerald R. Fink, Academic Press (1994).

  
Dr. JUAN C. REBORADA  
DIRECTOR  
DPTO. CS. BIOLÓGICAS

  
Dr. HECTOR N. TORRES  
Director  
INGEBI - CONICET