

INGEBI *Plan* 1997

(2)



1



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
U.B.A.

- 1.- Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular -INGEBI-
- 2.- Carrera: a) Licenciaturas en Ciencias Biológicas y Ciencias Químicas.
b) Doctorado y/o post-grado.
- 3.- 2* Cuatrimestre de 1997.
- 4.- Código de carrera:
- 5.- Materia: **INGENIERIA GENETICA** (Código 7111).
- 6.- Puntaje propuesto: 5 puntos.
- 7.- Plan de estudio:
- 8.- Carácter de la materia: Optativa.
- 9.- Duración: Un cuatrimestre.
- 10.- Horas de clases semanal:

a) Teóricas: 8.	d) Seminarios: 2.
b) Problemas: 2.	e) Teórico-problemas: --
c) Laboratorio: 40.	f) Teórico-prácticas: --

Total horas: 12.
- 11.- Carga horaria total: 240.
- 12.- Asignaturas correlativas: --
- 13.- Forma de evaluación: examen escrito.
- 14.- Programa analítico:

Bce

DR. BEATRIZ GONZALEZ
SECRETARIA ACADÉMICA
DEPTO. DE BIOLÓGICAS Y NATURALES


Dra. MIRTHA M. FLAWIÁ
PROFESOR TITULAR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UBA


Dr. HECTOR N. TORRES
Director
INGEBI - CONICET

APROBADO POR RESOLUCION *ED 2052197*

PROGRAMA TEORICO

1. Ingeniería Genética: definiciones y concepto. Enzimas que hidrolizan y/o modifican a los ácidos nucleicos. Restricción y modificación: concepto. Tipos de nucleasas de restricción. Endonucleasas del Tipo I y del Tipo II. Concepto de Palindrome, "Sticky Ends". Puntas "recesivas" y "protruyentes", Isoesquizómeros. Distintas clases de endonucleasas del Tipo II. Métodos para elaborar un mapa de restricción. Endonucleasas del Tipo III. Metilasas asociadas a endonucleasas de los Tipos I y III. Metilasas *dam* y *dcm*. Metilasa Eco RI. Metilación en eucariotes. Nucleasas de cadena única: S1, de *Neurospora*, de Mung Bean, BAL-31. Reparación del DNA dañado: concepto y tipos de daños. Mecanismos de excisión y reparación. Enzimas intervinientes en el proceso de reparación del DNA. Endonucleasas AP y III. DNAsas de cadena doble: exonucleasa VII. RNA ligasa. DNA polimerasa I: reacciones que cataliza y sus funciones. Características de sus fragmentos. Fragmento de Klenow: "End-filling" y "primer extension". Polimerasa "entera". "Nick translation". "Polymerase Chain reaction". El uso de la Taq polimerasa. Otras DNA polimerasas: T4 y T7. Transferasa terminal. RNA polimerasas: SP6, T3 y T7. Métodos para la marcación radiactiva de moléculas de ácidos nucleicos. Marcación del DNA: "Nick translation", síntesis por remplazo, "5'-end labeling", "3'-end labeling", "end-filling", "random priming". Marcación del RNA. Actividades específicas de las distintas "sondas" marcadas. Transcriptasa reversa. Preparación de un c-DNA: métodos clásicos, método de la RNAsa H.

2. Hibridización de los ácidos nucleicos. Modelo de Britten, Davidson y Kohne. Concepto de Rot y Cot. Hibridización en función de Rot y Cot. Cot 1/2 y las diferentes especies de DNA en un genoma. Factores que afectan la velocidad de hibridización: longitud de cadena, composición, fuerza iónica, viscosidad, temperatura, agentes desnaturalizantes, pH, "mismatching". Fórmulas de aplicación usual. Procedimientos generales: hibridización en medio líquido y sobre membranas. Tipos de membranas. "Dot-blot", "Southern-blot". Hibridización de colonias. Hibridización de placas.

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. Elementos a considerar: longitud de fragmento, tamaño del genoma, probabilidad, 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. Estrategias de inserción de fragmentos a clonar: extremos defosforilados y PstI-"tailing".

BUEI

Plásmidos utilizados para la síntesis de RNA. Los derivados del fago λ . Mecanismo de empaque. Empaque *in vitro*. Charon 4A, λ gt10 y λ 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 β -galactosidasa, fragmento α . Características de un "polylinker". Características del huésped. Utilización del sistema M13 en la secuenciación del DNA y en la generación de "sondas". Vectores "blue scribe". Estructura. Usos: clonado en polylinker, transcripción, rescate de DNA de simple cadena, delección *exo-mung*. Estrategias para la selección de un vector.

4. Sistema de clonado y expresión en fago λ . *Screening* inmunológico. Preparación de proteínas de fusión. Selección de anticuerpos específicos.

5. 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 pEX. 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).

6. 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.

7. 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*.

8. 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.

9. Clonado de células eucariotas. 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. Estructura de cromatina: sitios hipersensibles a nucleasas, método indirecto de marcado de extremos, *foot-printing* con DNAsa I y con exonucleasas, método de retardo en geles de agarosa, digestión con nucleasa micrococcal.

10. Introducción de genes heterólogos en animales. 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, *thyl-elastasa*, antígenos SV40, *cmyc*, *cfos*, α -fetoproteínas, insulina, γ y β -globina, protamina, β -lactoglobulina, esterilidad, etc. Corrección y obtención de mutantes. Farmer genes.

11. Clonado y secuenciación de genoma humano.

12. Clonado en plantas. Vectores de transformación vegetal: biología del *Agrobacterium tumefaciens*. Sistemas derivados de *Agrobacterium*. Vectores de cointegración. Vectores binarios. Sistemas basados en virus vegetales: CaMV, virus a RNA de cadena positiva. Métodos de transformación directa: transformación con fusógenos, métodos de "bombardeo génico", inyección de protoplastos, transformación con polen. Promotores y marcadores comúnmente usados en transformación vegetal. Ingeniería genética de la fijación simbiótica del nitrógeno. *Rhizobium*-leguminosas.

13. 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.

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 α_1 , 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.

Bu
UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA
LIBRARY
UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY

PROGRAMA PRACTICO

Las técnicas que se utilizarán en la parte práctica son:

- Preparación de RNA total a partir de células en cultivo.
- Cortes con enzimas de restricción.
- Preparación de fragmentos de DNA.
- Preparación de sondas radioactivas (*fill-in*, extensión de *primer* y marcado al azar).
- Mapeo con nucleasa S1.
- *Northern blot*.
- *Southern blot*.
- Subclonado en el fago M13.
- *Screening* radioactivo.
- Preparación de DNA simple cadena de M13.
- Secuenciación por el método de Sanger.
- Fabricación de una bacteria lisógena del fago Lambda gt11.
- Inducción de la proteína de fusión.
- Geles de poliacrilamida para proteínas.
- *Western blot*.

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.
- Lehninger; Bioquímica.

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 (1983).
- "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 (1989).


Dra. MIRTHA M. FLAVIA
PROFESOR TITULAR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UBA


Dr. HECTOR N. TORRES
Director
INGEBI - CONICET


B.C.G.
ACADEMIA