

129.B
1986

DEPARTAMENTO: Química Biológica

Nombre del curso: "CURSO SUPERIOR DE INGENIERIA GENETICA"

Carácter del curso: Doctorado, ampliación de conocimientos, actualización.

Duración : 16 semanas

Horas de clases: 10 hs,

Responsables: Dres. Héctor N. Torres, Norberto D. Judewicz, Alberto R. Kornblihtt,
Mirtha M. Flawiá.



Dr. Héctor N. Torres
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
GENÉTICA ANIMAL Y HUMANA, ROSARIO



Dra. Mirtha M. Flawiá
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGENIERIA - CONICET

Aprobado por Resolución ED 153/86

437 695 A/6 "A"



Ministerio de Educación y Justicia

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR (INGEBI)

PROGRAMA DEL CURSO SUPERIOR DE INGENIERIA GENETICA - 1986 -

1. Introducción de ácidos nucleicos en bacterias. Conjugación, transformación, transducción, transfección. Fusión de protoplastos inducida por Ca^{2+} , por PEG, por choque eléctrico (en bacterias y levaduras).
2. Vectores. Fragmentos de ADN; tamaño, extremidades, protección. Liposomas. Bacteriofagos: temperados (ciclo lítico, ciclo lisogénico λ) virulentos, virus, cósmidos.
3. Plásmidos. Propiedades generales y asociadas (resistencias a antibióticos, bacteriocinas, toxinas, fermentación). Transferencia: conjugadores, no conjugativos, movilizables. Replicación: relajada, controlada, número de copias amplificación - disociación.
4. Interacciones vector-huésped. Recombinación, legítima, ilegítima, dependiente o no de huésped. Expresión. Ejemplo de dependencia de huésped (Flac en diferentes gram⁻, plásmidos de gram⁻ en gram⁺). Inducción zigótica. Respuesta SOS. Adición de ácidos nucleicos dañados por uv y reparación. Restricción. Modificación inducida o no por fagos.
5. 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.
6. 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. Palíndromes. Metilación del DNA. Ligasas de DNA y RNA; tipos de ligadura; uso preferencial de la enzima de *E. coli* y la inducida por el fagocito T4. Defosforilación y fosforilación de ácidos nucleicos, fosfatasas alcalinas 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. Transcritasa reversa: estructura y características. RNAsa H.
7. 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 λ como vehículo de clonado; Charon-4; λ Gt10 y λ 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 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. /...



Ministerio de Educación y Justicia

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR (INGEBI)

PROGRAMA/2.

8. Selección de recombinantes y caracterización. Métodos genéticos, inmunológicos y por hibridación. 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.
9. Métodos para la caracterización de secuencias génicas. Mapas de restricción. Secuenciación del DNA. Métodos de copia de un templado a partir de "primer" (iniciadores). Método + y -. Ribosustitución. Análisis de fragmentos cortos. Terminadores de cadena. Uso de dideoxynucleótidos. Aplicación a fragmentos clonados en fago M13. Secuenciación de transcritos reversos de RNA. Secuencias flanqueantes universales. Clonado al azar en M13 mp7. Método químico de Maxam y Gilbert.
10. Síntesis de oligodeoxinucleótidos. Métodos de fosfodiéster, fosfortriéster, y triéster de fosfito. Utilización de soporte sólido. Uso de dímeros. Purificación y caracterización de los oligonucleótidos. Uso de genes sintéticos. Oligonucleótidos como sondas de hibridación o iniciadores específicos. Mutagenesis dirigida mediada por DNA sintético. Oligonucleótidos como sondas específicas para detectar enfermedades congénitas.
11. 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 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.
12. Clonado en células eucariotes. Transfección de genes en células eucariotes. Métodos: precipitación con $(PO_4)_2Ca_3$, 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.
13. 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.
14. 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.



Ministerio de Educación y Justicia

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR (INGEBI)

PROGRAMA/ 3.

15. 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 NH_4 . Transferencia de los genes *nif*. Regulación de su expresión.
16. 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 transcritos 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 posttranscripcionales. Pre y pro polipéptidos. Secuencias para proteínas de exportación y de membrana. Poliproteínas. Inmunoglobulinas: genes esparcidos. Maduración de las células B y rearrreglo génico. Producción de anticuerpos.
17. El uso de las técnicas del DNA recombinante en el diagnóstico pre-natal 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.
18. Cáncer. Análisis genético de las etapas precoces de la progresión tumoral: oncogenes. Cromosomas y cancer.
19. Del huevo al embrión, del embrión al adulto: jerarquía de la expresión genética. El aporte de la genética clásica y celular. Genes homeóticos. Genes responsables de función hepática. Moscas curadas: primer aporte de la terapia génica.
20. Métodos de estudio teóricos y experimentales. Evolución de secuencias codificantes y de secuencias intercaladas. Secuencias flanqueantes. Familias de multigenes. El gen de globina. Pseudogenes.



Ministerio de Educación y Justicia

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR (INGEBI)

PROGRAMA / 4.

DICTARAN EL CURSO:

- Bolillas 1 á 4 inclusive: Dra.Carmen S.Rivas
- Bolilla 5: Dr. Diego De Mendoza.
- Bolillas 6 y 7 : Dr.Héctor N.Torres
- Bolilla 8: Dr.Alejandro Mentaberry
- Bolilla 9, 10 y 11: Dr.Norberto Judewicz.
- Bolilla 12: Dr.Mariano Levin
- X - Bolillas 13, 14 y 15: Dra. Mirtha M.Flawiá.
- Bolilla 16 : Dr.Alberto R.Kornblihtt y Dr. Mariano Levin
- Bolilla 17: Dr.Alberto R. Konrblihtt
- Bolillas 18 y 19 : Dr.Mariano Levin
- Bolilla 20: Dr. Alejandro Mentaberry



Ministerio de Educación y Justicia

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR (INGEBI)

BIBLIOGRAFIA

Genetic Engineering. Vol 1, 2,3,4 Ed R Williamson. Academic Press 1981-1982-1983 y 1984.

Genes Benjamin Lewin Ed. Wily 1983.

Principles of Gene Manipulation Old and Primrose- Ed. Blackwell 1980

Recombinant DNA. A short Course . J Watson. Scientific American. Freeman and Co. 1984.

Gene expression B.Lewin Vol 1 ,2 y 3 Wiley Inc. Co. Science

DNA replication A Kornberg

Molecular cloning A Laboratory Manual. Maniatis CSH 1982.

DIRECTOR N. TORRES
DIRECTOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGICA MOLECULAR

DRA. MIRTHA MARIA FLAWIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGICA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGENIERIA GENETICA

XXXXXX
XXXXXX

DEPARTAMENTO: Química Biológica

Nombre del curso: "Seminario de Ingeniería Genética".

Carácter: Postgrado y Doctorado

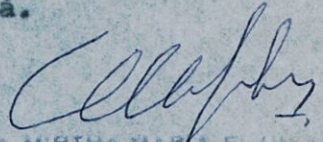
Duración : 22 semanas

Horas de clase: 8 horas semanales

Responsables: Dr. Héctor N. Torres y Dra. Mirtha M. Flawiá.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOLÓGICA MOLECULAR



DRA. MIRTHA MARÍA FLAWIÁ
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGENIERÍA - CONICET