



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

27910  
1986

DEPARTAMENTO: QUIMICA BIOLOGICA

ASIGNATURA: CURSO DE INGENIERIA GENETICA - AÑO 1986

CARRERA: DOCTORADO (POST-GRADO)

CARACTER: optativa

DURACION DE LA MATERIA: 3 meses

HORAS SEMANALES: a) Teóricas: 10 hs.

b) Problemas y Seminarios: 4 hs.

c) Laboratorio: 4 semanas "full time"

RESPONSABLES: Dr. Héctor M. Torres

Dr. Norberto D. Judewicz

Dra. Mirtha M. Flawiá

Dra. Carmen Sánchez de Rivas

Dr. Alberto R. Kornblihtt

Dr. Gerardo Glikin

Dra. Cella E. Coto

Directora Interina  
Departamento de Química Biológica

Aprobado por Resolución 20648/86



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. 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 T<sub>4</sub>. Defosforilación y fosforilación de ácidos nucleicos, fosfatasa 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 T<sub>4</sub>. 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

Dra. Cella E. Coto  
Directora Interina  
Departamento de Química Biológica



Ministerio de Educación y Justicia

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

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

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, inmunoquímicos 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. Clonando 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).

Dra. Cella E. Coto

Directora Interina

Departamento de Química Biológica



Ministerio de Educación y Justicia

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

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

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 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.

Dra. Celia E. Coto  
Directora Interina  
Departamento de Química Biológica



Ministerio de Educación y Justicia

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

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

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 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 génica.
15. Estructura de cromatina y expresión genética. Empaquetamiento del DNA eucariótico. Nucleosomas. Sensibilidad a las nucleasas. Topología y transcripción.

Dra. Celia E. Coto

Directora Adjunta

Departamento de Química Biológica

1.- INTRODUCCION de: GUIA DE TRABAJOS PRACTICOS del CURSO DE INGENIERIA GENETICA

Este trabajo práctico intenta mostrar a pequeña escala y en un lapso breve lo que es un proyecto de clonado y caracterización de una secuencia específica a partir de un genoma completo. Concretamente, se busca aislar el promotor izquierdo del bacteriofago lambda. En consecuencia, el DNA genómico completo de este virus se cortará con enzimas de restricción (ver esquema general) y la totalidad de los fragmentos generados se ligarán con el plásmido pK0-1, a su vez adecuadamente cortado. Los plásmidos recombinantes así obtenidos se introducirán en bacterias y se seleccionarán las transformadas en base a la resistencia a ampicilina conferida por el vector. De esta manera, se habrá generado una suerte de "library" del fago lambda. Se podrá entonces identificar el clon buscado por hibridación con un "probe" radioactivo específico preparado a tal efecto (esta etapa tiene algo de artificial ya que implica que se conoce el mapa de restricción antes de clonar el gen, lo cual es bastante raro). A continuación, el o los clones obtenidos se caracterizarán y confirmarán desde un punto de vista bioquímico por el tamaño de los fragmentos de restricción de sus plásmidos y la capacidad de hibridar con un "probe" en un "Southern blot", así como directamente por la secuencia nucleotídica de la zona promotora. También se realizará una caracterización genética de los clones, aprovechando las propiedades del vector usado. El plásmido pK0-1, en efecto, posee un gen de galactoquinasa inactivo por el único hecho de carecer de secuencia promotora. La sola inserción de un promotor en el extremo 5' del gen, y en la orientación correcta, será capaz en consecuencia de reestablecer su expresión.

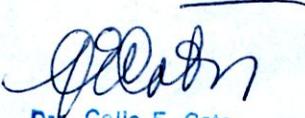
Por lo tanto, la confirmación funcional de la identidad de los plásmidos consistirá en que estos deberán ser capaces de revertir por transformación un fenotipo galactosa menos a "wild type".

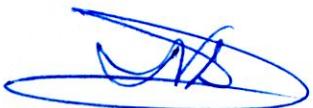
  
Dra. Celia E. Coto  
Directora Interina  
Departamento de Genética Biológica



BIBLIOGRAFIA GENERAL

- Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- K. Mc Kenney, H. Shimatake, D. Court, V. Schmeissner, C. Brady and M. Rosenberg. Gene Amplification and Analysis. Vol. 2, pag. 383-415. J. Chirikjan and T. Papas Eds.. Elsevier. North Holland, New York.
- Molecular Biology of The Cell. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson. Garland Publ. Inc. New York & London (1983).
- Recombinant DNA. A Short Course. J. D. Watson, J. Tooze, D. Kurtz. Scientific American Books (1983).
- Gene Expression 2. B. Lewin (1980).
- Genetic Engineering 1-2-3-4. R. Williamson. Acad. Press (1981).

  
Dr. Celia E. Coto  
Directora Interina  
Departamento de Química Biológica

  
Dr. NORBERTO JUDEWICZ