



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

15QB88
post-grad

DEPARTAMENTO: QUIMICA BIOLOGICA

ASIGNATURA: CURSO DE INGENIERIA GENETICA - AÑO 1987

CARRERA: DOCTORADO (POST-GRADO)

CARACTER: optativa

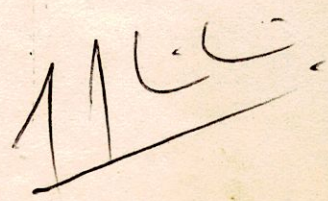
DURACION DE LA MATERIA: 3 meses

HORAS SEMANALES: a) Teóricas: 8 hs.
b) Problemas y Seminarios: 5 hs.
c) Laboratorio: 4 semanas "full time"

RESPONSABLES: 1) Dr. Héctor N. Torres
2) Dr. Alberto R. Kornblihtt
3) Dr. Norberto D. Judewicz
4) Dr. Gerardo C. Glikin
5) Dra. Carmen Sánchez de Rivas

Dra. SILVIA M. MORENO
Directora Adjunta Int. Ina
Departamento de Química Biológica


DRA. CELIA E. COTO
DIRECTORA INTERINA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLÓGICA



Aprobado por Resolución 00627/88



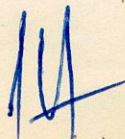
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DEL CURSO "INGENIERIA GENETICA" - 1987

1. 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, 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. Transcriptasa reversa: estructura y características. RNAsa H.
2. Plásmidos. Propiedades generales y asociadas (resistencias a antibióticos, bacteriocinas, toxinas, fermentación). Transferencia: conjugadores, no conjugativos, movilizables. Replicación: relajada, controlada, número de copias, amplificación - disociación.
3. 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.

Dra. SILVIA M. MORENO
Directora Adjunta Interina
Departamento de Química Biológica

Dra. CELIA E. GOTO
DIRECTORA INTERINA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLÓGICA


Dr. GLIKIN

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 λ como vehículo de clonado; Charon-4. Cósmidos. El sistema de 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 y T7 polimerasa para la obtención de transcriptos específicos. Vector tipo "Blue scribe".

5. Sistema de clonado y expresión en fago λ gt11. "Screening" inmunológico. Preparación de proteínas de fusión. Selección de anticuerpos específicos.

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. 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

Dra. SILVIA M. MORENO

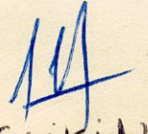
Directora Adjunta Interina

Departamento de Química Biológica


DRA. DELIA E. GOTO

DIRECTORA INTERINA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA


Dr. GLIKIN

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 levadura).

10. 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.

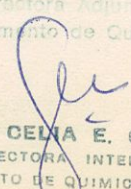
Vectores virales: SV40, adenovirus, retrovirus. Aplicaciones: estudio de secuencias "ENHANCER". Retrovirus como herramientas para el estudio de la diferenciación. Estructura de cromatina: sitios hipersensibles a nucleasas, método indirecto de marcado de extremos, "foot-printing" con DNasa I y con exonucleasas, método de retardo en geles de agarosa, digestión con nucleasa micrococcal.


11. 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. Transformación de Drosophila. Elementos P. Disgénesis híbrida.

12. 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. Expresión de los genes en plantas regeneradas. Progenies.

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: 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.

Dra. SILVIA M. MORENO
Directora Adjunta Interina
Departamento de Química Biológica

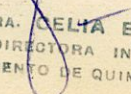

DRA. CELINA E. GOTO
DIRECTORA INTERINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

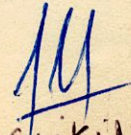

Dr. GLIKIN

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 genética.

15. Clonado en Bacillus. Importancia y particularidades del huésped (exoenzimas-esporulación). Particularidades de los sistemas de transcripción y traducción (RNA polimerasas-factores σ -secuencias SD). Vectores (plásmidos-fagos- cósmidos-transposones). Introducción del DNA (transformación(es)-transducción-coconjugación). Recombinación(es)-restricción-modificación. Estabilidad de los genes clonados.

Dra. SILVIA M. MORENO
Directora Adjunta Interina
Departamento de Química Biológica


DRA. DELTA E. GOTO
DIRECTORA INTERINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA



Dr. GLIKIN

BIBLIOGRAFIA GENERAL (CURSO DE INGENIERIA GENETICA)

- MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL - Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.; Cold Spring Harbor Laboratory (Ed.); Box 100, Cold Spring Harbor, New York 11724, USA (1982)
- 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 Avenue New York, New York 10010, USA (1983)
- GENETIC ENGINEERING - Vols 1, 2, 3, 4, Robert Williamson (Ed.), Academic Press Inc. 111, 5th Avenue, New York, New York 10003, USA (1981, 1981, 1982, 1983)
- PRINCIPIOS DE MANIPULACION GENETICA. INTRODUCCION A LA INGENIERIA GENETICA Old, R.W. and Primrose, S.B., Editorial Acribia S.A., Royo 23, 50006 Zaragoza, España (1987)

Dra. SILVIA M. MORENO
Directora Adjunta Interina
Departamento de Genética Biológica

28 de Agosto de 1984. -


Dr. GLIKIN