

PROGRAMA DEL CURSO "INGENIERIA GENETICA"

1. Corte, 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, fosfatasa alcalina 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: conjugativos, no conjugativos, movilizables. Replicación: relajada, controlada, número de copias, amplificación-disociación.

3. 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 de polimerasa para la obtención de transcritos específicos. Vector tipo *Blue scribe*.

4. 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.

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 de *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. Sistema de clonado y expresión en fago λgt11. *Screening* inmunológico. Preparación de proteínas de fusión. Selección de anticuerpos específicos.

AA

6. Métodos para la caracterización de secuencias génicas. Mapas de restricción. Secuenciación del DNA. Métodos de copia de un molde 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. Síntesis de oligodeoxinucleótidos. Método de fosfotriéster y triéster de fosfito. Purificación y caracterización de los oligonucleótidos. Uso de genes sintéticos. Mutagénesis dirigida mediada por DNA sintético.

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

9. Clonado en células eucariotes. Transfección de genes en células eucariotes. Métodos: precipitación con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 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. 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.

11. 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 polimerasa SP6 y su uso. Obtención de cDNA *in vivo* mediante vectores retrovirales.

M

12. 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 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.

13. Clonado y expresión en levaduras. Plásmidos, híbridos de levadura y bacteria. Vectores de transformación de levaduras (expresión de interferón, renina, etc).

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. Expresión de los genes en plantas regeneradas. Progenies.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

- 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. 1,2,3,4,5 Robert Williamson (Ed.), Academic Press Inc., 111 5th Avenue, New York, New York 10003, USA (1981,1981,1982,1983,1986).
- 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).
- MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, A Laboratory Manual. Hogan, B., Constantini, F. and Lacy, E. Cold Spring Harbor Laboratory (Ed.); Box 100, Cold Spring Harbor, New York 11724, USA (1986).
- BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY. Davis, L., Dibner, M. and Batley, J. Elsevier Science Publishing Co., Inc. 52 Vanderbilt Avenue, New York, New York 10017, USA (1986).

14