

20/91 (7466-90)

Q. B 1991

443709/7-A

4

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA

ASIGNATURA: INGENIERIA GENETICA

CARRERA/S: QUIMICA, BIOLOGIA

ORIENTACION: POST-GRADO

CARACTER: OPTATIVA

DURACION DE LA MATERIA: CUATRIMESTRAL

HORAS DE CLASE:

- a) Teóricas 80 hs.
- b) Problemas 20 hs.
- c) Laboratorio 90 hs.
- d) Seminarios 30 hs.
- e) Totales 220 hs.

PROGRAMA DE LAS CLASES TEORICAS

1. Ingeniería Genética: Definiciones y Concepto. Enzimas que Hidrolizan y/o Modifican a los Acidos 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 Unica: 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 de  $\lambda$ , Exonucleasa III y DNasa I. DNAsas de Cadena Unica: Exonucleasa VII. RNAsa H. RNAsa I. Transferasas que Modifican los Acidos Nucleicos: sus Distintos Tipos. Fosfatasa Alcalinas; Polinucleótido Quinasa de T4; DNA Ligasas: Diferentes Tipos, Características de los Distintos Extremos a Ligar; 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 Acidos Nucleicos; Marcación del DNA: "Nick Translation", Síntesis por Reemplazo, "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.

*[Handwritten Signature]*

*[Handwritten Initials]*

**SUSANA Z. B. DE PASSERON**  
DIRECTORA  
DTG QUIMICA BIOLOGICA

rehabado por Resolución 00 1596/91



2. Hibridización de los Acidos 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 Desnaturalizante, pH, "Mismatching"; Formulas de Aplicación Usual. Procedimientos Generales: Hibridización en Medio Líquido y Sobre Membranas; Tipos de Membranas. "Dot-Blot", "Southern-Blot", "Northern-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 Unicos. 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". Plásmidos Utilizados para la Síntesis de RNA. Los Derivados del Fago \_ como Vehículos de Clonado. Estructura Genómica del Fago \_; Mecanismo de Empaque. Empaque in vitro. Charon 4A, gt10 y 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  $\beta$ -Galactosidasa, Fragmento  $\alpha$ ; Características de un "Polylinker"; Características del Huésped. Utilización del Sistema M13 en la Secuenciación del DNA y en la generación de "sondas". Vectores "BlueScribe": Estructura. Usos: Clonado en Polylinker, Transcripción, Rescate de DNA de simple cadena, Deleción Exo-Mung. Estrategias para la selección de un vector.

4. Sistema de clonado y expresión en fago . 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 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).

  
DRA. SUSANA D. B. DE PASSERON  
DIRECTORA  
DTG. QUÍMICA BIOLÓGICA

14



6. 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.

7. Selección de recombinantes y caracterización. Métodos genéticos 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. Uso de oligonucleótidos como sondas de hibridación.

8. 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.

9. 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.

10. Clonado en células eucariotas. Transfección de genes en células eucariotes. Métodos: precipitación con  $(PO_4)_2Ca$ , 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. Células de insectos: uso de baculovirus. 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. 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; c-myc; c-fos;  $\alpha$ -feto-proteínas; insulina;  $\alpha$ - y  $\beta$ -globina; protamina;  $\beta$ -lactoglobulina. Esterilidad, etc. Corrección y obtención de mutantes. Farmer genes.



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 transcriptos 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. Transcriptos 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  $\alpha_1$ , 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.

#### BIBLIOGRAFIA GENERAL (CURSO DE INGENIERIA GENETICA)

- MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 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, 5. Robert Williamson (Ed.), Academic Press Inc. 111, 5th Avenue, New York 10003, USA (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).
- CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, vols. 1 y 2. Ausubel, F.M. (Ed.), John Willey and Sons, 605 Third Avenue, 10158 New York (1989).

  
DRA. SUSANA C. DE PASSEGGI  
DIRECTORA  
Dpto. QUIMICA BIOLÓGICA

14



## TRABAJOS PRACTICOS DE INGENIERIA GENETICA

- 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 (con inserto)
- Inducción de la proteína de fusión
- Geles de poliacrilamida para proteínas
- Western blot

Septiembre de 1991

FIRMA PROFESOR:

*Gerardo Aikin*

FIRMA DIRECTOR:

Aclaración Firma:

*Gerardo Aikin*

Aclaración Firma:

*Susana D. B. de Passequin*

DR.<sup>a</sup> M. SUSANA D. B. DE PASSEGIN  
DIRECTORA  
DTE. QUIMICA BIOLÓGICA