

PROGRAMA DE LA ASIGNATURA
GENÉTICA 2
OPCIÓN: BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

SEM.	CÓDIGO	TEORÍA H/S	PRÁCT H/S	LAB. H/S	UNIDAD CRÉDITO	PRELACIÓN
8	13103	3	0	6	6	12301

I. DESCRIPCIÓN

I.1. UBICACIÓN DENTRO DE LA LICENCIATURA

Se trata de una asignatura teórico-práctica perteneciente a la Opción Biología Experimental dentro del Pensum de la Lic. Biología, Facultad de Ciencias de la ULA.

I.2. DURACIÓN Y UNIDADES CRÉDITOS

El tiempo de duración es de un semestre (aprox. 16 semanas efectivas de clase). tiene asignado un total de 6 unidades créditos, equivalentes a 9 hs/semana: 3 hs. de Teoría y 6 hs. de Laboratorio.

I.3. OBJETIVOS GENERALES

Se desarrolla como un curso dirigido al estudio de sistemas procariotas. Está concebido con el propósito de aportar conocimientos básicos que le permitan a los cursantes iniciarse en el manejo y aplicación de las manipulaciones genéticas, con fines científicos y/o de aplicación práctica y en la Biotecnología.

En ese sentido, se estudian las propiedades genético-fisiológicas de ciertos elementos extracrosomales naturales que han sido el soporte biológico clave en el desarrollo y progreso de las manipulaciones genéticas.

II. PROGRAMA TEÓRICO

II.1. OBJETIVOS

Está dirigido hacia el estudio de tres grandes aspectos:

- i. Los elementos genéticos utilizados en la construcción de los sistemas huésped-hospedador para propiciar arreglos cromosomales, modificar el patrimonio genético de las especies, obtener fusión de genes, clonaje de genes particulares y su expresión, etc. Para ello se presentan los modelos de organización estructural y funcional de los elementos genéticos móviles (IS, Tn, Fago Mu), plásmidos y episomas (fago, factor F, factores R y Col); se consideran las interacciones genéticas propias y las que se establecen entre unos y otros, y con el hospedador.
- ii. Los mecanismos moleculares que participan en la transferencia de la información genética (transformación, transferencia, conjugación), mantenimiento estable en el hospedador receptor (sistema de restricción-modificación, mecanismos de recombinación genética), posterior transmisión a la descendencia filial (heredabilidad estable).
- iii. Las metodologías utilizadas en las manipulaciones genéticas, tanto "in vivo" como "in vitro". Se discuten comparativamente las bases teóricas, aplicación, alcances y limitaciones. La utilidad de los elementos genéticos móviles y plásmidos en las técnicas de recombinación genética.

II.2. CONTENIDO PROGRAMÁTICO

El programa está estructurado en dos partes, las cuales secuencialmente son las siguientes:

PARTE I. ESTUDIOS GENÉTICOS Y FISIOLÓGICOS DE LOS ELEMENTOS EXTRACROSOMALES.

- I) Elementos móviles o transponibles. Descubrimiento. Clasificación de los elementos IS, Tn y Mu. Propiedades generales. Organización genética y funcional. Expresión de sus genes y regulación. Mecanismos de movilización integrativa y regulación del proceso. Integración mutagénica y sus efectos: aberraciones cromosomales, polaridad, terminación de transcripción y cambios en los mecanismos de regulación. Comparación con la mutagénesis química. Ejemplos de elementos móviles en eucariotas. Origen e importancia evolutiva de los elementos móviles.

- II) El fago como modelo de diferenciación celular. Ciclo de vida. Mapa genético lineal del fago. Organización funcional y transcripción de los genes: localización de promotores, operadores, señales de terminación y genes inmediatamente tempranos, tempranos y tardíos. Regulación de la expresión genética. Proteínas reguladoras y su modo de acción. Funciones aportadas por el huésped. Control de la síntesis del represor: establecimiento y mantenimiento de la lisogenia. Circuitos de control positivo y negativo durante el desarrollo lítico: funciones inmediatamente tempranas, tempranas y tardías. Lisogenia e inducción del profago. Participación de la proteína recA y del sistema SOS. Replicación del ADN del fago: modos de replicación y funciones involucradas.
- III) F como modelo de factor sexual. Propiedades generales. Organización genética y funcional del genoma de F. Sistema genético involucrado en la transferencia de F por conjugación. Movilización de marcadores cromosomales mediada por F y funciones involucradas. Transmisión del factor F: replicación vegetativa y su regulación. Incompatibilidad entre factores F y otros plásmidos. Exclusión de superficie.
- IV) Factores R y factores Col. Origen y clasificación. Importancia médica y ecológica. Organización genética y funcional. Factores R: genes de resistencia a drogas, control genético y mecanismo de resistencia; participación de los Tn. Factores Col: síntesis de colicina y su modo de acción. Fenómenos de inmunidad, resistencia y tolerancia. Mantenimiento y transmisión de los factores R y Col: replicación vegetativa y funciones involucradas; curación. Interacción entre plásmidos. Transferencia conjugacional e inhibición de la fertilidad (fi): sistema genético involucrado y mutantes drd. Formación de cointegrados: papel de los elementos IS y Tn. Movilización de plásmidos Tra.
- V) Transformación y transfección como procesos de transferencia de información genética. Cinética de transformación y eficiencia de este proceso. Competencia de poblaciones bacterianas. Entrada del ADN donante y su expresión. Barreras genéticas: sistemas de restricción y modificación. Mutantes del sistema y métodos de selección. Enzimas de restricción conocidas, modo de acción y utilidad en las manipulaciones genéticas "in vitro".
- VI) Integración de la información genética en el genoma hospedador. Recombinación generalizada: modelos propuestos

a nivel molecular, funciones involucradas y papel de la proteína recA. Comparación con el sistema de recombinación general del fago. Procesos de recombinación aditiva. Modelo de Campbell para la integración específica y escisión del ADN de. Funciones involucradas. Mecanismo de integración y escisión del factor F y formación de cepas Hfr. Mecanismos de formación de partículas transductoras del fago y factores F de la cabeza y de la cola. Comparación con la movilización integrativa (por transposición o translocación) de los IS, Tn y del fago Mu.

PARTE II. MANIPULACIONES GENÉTICAS EN PROCARIOTAS:

- I) Técnicas de Ingeniería Genética "in vitro": posibilidad de introducir ADN extranjero en una célula receptora. Necesidad de vehículos de clonaje o vectores. Propiedades de los vectores y de la célula receptora. Utilidad de los fagos y plásmidos. Fabricación de nuevos vectores, Métodos para obtener preparaciones de ADN. Métodos de clonaje para la obtención de moléculas de ADN híbridas o quimeras por recombinación "in vitro": utilidad de las enzimas de restricción, transferasas terminales y ligasas. Introducción del ADN quimera en células receptoras biológicamente funcionales (transformación y/o transfección) y selección de las células recombinantes que recibieron el clon. Métodos genéticos y ventajas de utilizar marcadores fenotípicos. Demostración de la presencia del clon. Métodos bioquímicos de selección. Métodos para la amplificación del clon. Ejemplos de clonaje de genes eucariotas en vectores procariotas y/o eucariotas y selección. Métodos de secuenciamiento de ADN y construcción de genotecas. Técnicas bioquímicas y de Biología Molecular de utilidad en las manipulaciones genéticas.
- II) Técnicas de Endo-Ingeniería Genética. Empleo de los elementos genéticos extracromosomales en el clonaje "in vivo": fagos atemperados (λ , ϕ 80, Mu), plásmidos y transposones. Utilidad de los transposones en una variedad de otras manipulaciones genéticas "in vivo". Fusión de genes y proteínas mediada por el fago Mu. ejemplos de procesos involucrados en la transferencia de genes "in vivo" entre organismos procariotas y eucariotas: plásmido Ti de *Agrobacterium*.

III. PROGRAMA DE LABORATORIO

III.1. OBJETIVOS

Suministrar conocimientos teórico-experimental sobre el manejo de microorganismos y elementos extracromosomales procariotas, además de las metodologías fundamentales en Biología Molecular que son de utilidad en las manipulaciones genéticas y en Biotecnología.

III.2. CONTENIDO PROGRAMÁTICO

Los conocimientos serán aplicados en el desarrollo de un pequeño proyecto de investigación experimental. El contenido del proyecto puede ser variable, no obstante, la selección del tema a desarrollar contempla aspectos genéticos, fisiológicos y bioquímicos descritos en el programa del curso teórico.

IV. BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA.

Se utilizan *LIBROS Y MANUALES DE LABORATORIO* elaborados con fines didácticos. No obstante, la mayor parte de la bibliografía que se maneja son trabajos originales publicados en revistas científicas. La descripción de la bibliografía es suministrada a lo largo del curso.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA PARA GENÉTICA II
Semestre B-94
(Trabajos prácticos)

1. Way et al. (1984). *Gene* 32: 369-79. New Tn10 derivatives for transposon mutagenesis and for construction of lacZ operon fusions by transposition.
2. Silhavy et al. (1984). *Experiments with Gene Fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory.
3. Miller (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
4. Kleckner et al. (1977). *J. Mol. Biol.* 116: 125. Genetic engineering in vivo using translocatable drug resistance elements. *New methods in bacterial genetics*.
5. Eds. Grinsted and Bennet (1988). *Methods in Microbiology*, Vol. 21, 2nda. Edition, Academic Press.
6. Ed. Miller (1991). *Methods in Enzymology. Bacterial Genetic Systems*, Vol. 204, Academic Press.
7. Ed. Balows et al. (1992). *The Prokaryotes*, 2nda. Edition, Springer-Verlag.
8. Rieger et al. (1991). *Glossary of Genetics. Classical and Molecular*, 5ta. Edition, Springer-Verlag.
9. Miller (1992). *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
10. Bachmann (1990). *Microbiol. Rev.* 54: 130-197. Linkage map of *Escherichia coli*.
11. Singer et al. (1989). *Microbiol. Rev.* 53: 1-24. A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*.
12. Sambrook et al. (1989). *molecular Cloning. A laboratory manual*, 2nda. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
13. Chauthaiwale et al. (1992). *Microbiol. Rev.* 56: 577-591. Bacteriophage lambda as a cloning vector.
14. Silhavy and Beckwith (1985). *microbiol. Rev.* 49: 398-418. Uses of lac fusions for the study of biological problems.
15. Manoil (1990). *J. Bacteriol.* 172: 1035-1042. Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties.
16. Choe and Reznikoff (1991). *J. Bacteriol.* 173: 6139-6146. Anaerobically expressed *Escherichia coli* genes identified by operon fusion techniques.
17. Bremer et al. (1985). *J. Bacteriol.* 162: 1092-1099. Transposable lambda placMu bacteriophages for creating lacZ operon fusions and Kanamycin resistance insertions in *Escherichia coli*.

TEXTOS RECOMENDADOS PARA GENÉTICA II

- Beckwith. J. & D. Zipser. (Eds.). The lactose operon. Cold Spring Harbor laboratory. 1970.
- Davis. R., D. Botstein & J. Roth. (Eds.) Advanced Bacterial Genetic. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1980.
- Freifelder. D. Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. Ed. Reverte. S.A., 1979.
- Grinsted J. & Bennett P. (Eds.) Methods in Microbiology: Plasmids Technology, Academic Press. Vol. 21, 19 2nda. Ed., 1988.
- Lewin B. Gene Expressions: Bacterial genomes. Jhon Wiley & Sons, London, Vol. 1, 1975.
- Lewin B. Gene Expressions-3: Plasmids & Phages. Jhon Wiley & Sons, London, Vol. 3, 1977.
- Lewin B. Gene Expressions. Jhon Wiley & Sons, London, 2nda. Ed., 1985.
- Lewin B. Genes IV. Cell Press. Mass. Oxford University Press. Walton Street, Oxford OX2 6DP. 1990.
- Lewin B. Genes. Editorial Reverté. S.A. (versión española de Genes, 3ra. Ed.), 1991.
- Bukhari A. Shapiro J. & Adhya S. DNA inserion elements. plasmids and episomes. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, 1977.
- Miller, J.H. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972.
- Miller J. A Short course in Bacterial Genetics. cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.
- Rieger R., A. Michaelis & Green M. Glossary: Classical and Molecular. Ed. Spring-Verlag. Berlin Heidelberg NY. 7ta. Ed., 1991.
- Symonds N., A. Toussaint, P Van de Putte & M. Home (Eds.). Phage Mu, Cold Spring Harbor Laboratory, Cols Spring Harbor, N.Y., 1987.
- Ternynck Th. y Avrameas. Técnicas inmunoenzimáticas, Grupo Editorial Iberoamericana, 1989.
- Towbin H. & J. Gordon. Immunoblotting and Dot Immunobinding, Current status and outlook. J. Immunol. Methods, 72: 313, 1984.
- Sambrook J., Fritsch & T. Maniatis. Molecular cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 2da. Ed.
- Serrano J. y García J: MAnual de Genética Molecular. Ed. Síntesis, 1990.
- Streips, U. & Yasbin, R. (Eds.). Modern Microbial Genetics, Willey-Liss, 1991.
- Methods in Enzymology, vol. 204, 1991.

