

## **BT 41A BIOLOGIA MOLECULAR I**

**Curso dictado para la carrera de Ingeniería Civil en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas**

### **PROGRAMA 2005**

**Coordinador**      **Dra. Oriana Salazar**  
**Requisitos:**      **BT35A**  
**Docentes:**        **Dr Oriana Salazar**  
                          **Dr. Francisco Pérez**  
                          **Dr. Cecilia Rojas**  
                          **Dr. Mónica Vásquez**

### **OBJETIVOS DEL CURSO**

**Proporcionar un conocimiento teórico actualizado de genética molecular básica, centrado en los mecanismos moleculares de preservación, transmisión y expresión de la información génica**

### **CONTENIDO DEL CURSO**

#### **INTRODUCCIÓN**

La mayoría de las aplicaciones biotecnológicas de punta se sustentan en el desarrollo alcanzado por la tecnología del DNA recombinante, también conocida como ingeniería genética. A su vez, esta tecnología se fundamenta en la genética molecular. El curso está orientado a enseñar al alumno los mecanismos moleculares de la transmisión, preservación y variación de la información genética, así como de la expresión génica y de su regulación. Se abordará los fundamentos de las técnicas que permiten la manipulación de la información genética.

#### **PARTE I                    GENETICA MOLECULAR**

#### **CAPITULO I:            DNA: EL MATERIAL GENETICO**

**Química y estructura del DNA.** Su objetivo es que el alumno la estructura molecular, las propiedades físicas y químicas del DNA en cuanto constituyen la bases sus propiedades biológicas. Así mismo, se analizará aspectos generales de la organización supramolecular Del DNA, abordando las diferencias entre eucariontes y procariontes.

- polímero lineal de desoxirribonucleótidos
- los desoxirribonucleótidos
- hebra doble antiparalela (complementariedad de bases)
- propiedades ópticas
- polianión
- efecto de ácidos y álcalis
- interacción con colorantes
- superenrollamiento-propiedades hidrodinámicas
- nucleosomas-cromatina-fibra de cromatina-cromosomas.

## **CAPITULO 2. CONSERVACIÓN DE LA INFORMACION GENETICA**

**Replicación del DNA.** Su objetivo es que el alumno comprenda los mecanismos generales de la replicación del DNA como base de la preservación de la información genética; que conozca los componentes fundamentales de la maquinaria de replicación, comparando organismos procariontes y eucariontes. Modelos de replicación.

- Mecanismo de la replicación del DNA replicación semiconservativa  
reacción de polimerización
- Maquinaria replicativa en eucariontes y procariontes
- Horquilla de replicación en eucariontes y procariontes
- Modelos de replicación cromosoma bacteriano  
cromosoma de eucarionte  
telómeros  
DNA extracromosómico

**Reparación del DNA.** Su objetivo es que el alumno conozca los mecanismos de corrección de errores de polimerización y de daño en el DNA

- Edición
- Tipos de daños mas frecuentes despurinaciones  
desaminaciones  
dimerización
- Mecanismos de reparación
- Sistema SOS

## **CAPITULO 3. VARIABILIDAD DE LA INFORMACION GENETICA**

Su objetivo es que el alumno conozca los mecanismos de modificación de la secuencia nucleotídica del DNA que constituye la base de la variabilidad de la información genética que subyace a la evolución.

- Recombinación
- Crossing over
- Transferencia de información genética en bacterias  
Conjugación  
Bacteriófagos transductores
- Elementos genéticos móviles
- Mutaciones
- Evolución de la información genética

## **CAPITULO 4. EXPRESION GENICA**

Su objetivo es que el alumno entienda la naturaleza de la información codificada en el DNA y los procesos involucrados en su decodificación. Así mismo que comprenda la trascendencia de la regulación de la expresión génica en la especialización y diferenciación de células, tejidos y organismos.

**Transcripción.** - Biosíntesis del RNA

- Composición del RNA-propiedades químicas-estructura
- Reacción de transcripción en procariontes y eucariontes
  - inicio
  - elongación
  - término
  - inhibidores
- Procesamiento postranscripcional del RNA
  - "splicing" catalizado por spliceosoma
  - "splicing" autocatalítico
- Regulación de la transcripción en procariontes y eucariontes
  - Mecanismos generales
  - Mecanismos específicos
- Elementos regulatorios
  - secuencias regulatorias
  - factores de transcripción
- Edición

### **Traducción**

- Código genético
- Reacción de biosíntesis
  - Etapas
  - Farmacología
- Maquinaria de biosíntesis de proteínas
  - Ribosomas
  - rRNAs
  - tRNAs
  - enzimas
- Regulación de la biosíntesis de proteínas
  - Eucariontes
  - Procariontes

## **CAPITULO 5. ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACION GENETICA**

- Concepto de gen
- Estructura de los genes
  - Unidad transcripcional
  - Región regulatoria
  - Organización en procariontes
  - Organización en eucariontes:
    - Genes clase I
    - Genes clase II
    - Genes clase III
- Genoma
  - genes
  - seudogenes
  - secuencias intergénicas
  - eucariontes vs procariontes
  - secuencias repetidas
    - secuencias satélite
    - secuencias repetidas dispersas
    - SINES

## LINES

- Genomas extranucleares en eucariontes
  - Mitocondria
  - Cloroplastos
- Mapas genéticos y mapas físicos

### **PARTE 2. TECNOLOGIA DEL DNA RECOMBINANTE**

Su objetivo es que el alumno comprenda los fundamentos de las técnicas que permiten la manipulación del DNA como base de la ingeniería genética y de la biotecnología.

#### **CAPITULO 6. HERRAMIENTAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE MOLECULAS DE DNA RECOMBINANTE**

Parte I: Enzimas para la construcción de moléculas de DNA recombinante

1. Nucleasas
  - Endonucleasas
  - Exonucleasas
  - Endonucleasas de restricción
2. Fosfatasas (fosfomonoesterasas)
3. Polinucleótido quinasa de T4
4. Ligasas
  - DNA ligasa de *E. coli*
  - DNA ligasa de T4
  - RNA ligasa de T4
5. Desoxinucleotidil transferasa terminal
6. Poli A plimerasa
7. DNA polimerasas
  - DNA pol I de *E. coli* (fragmento Klenow)
  - DNA pol de T4
  - Sequenase
  - DNA pol termoestables
  - Transcriptasa reversa
8. RNA polimerasas
  - SP6, T7, T3
9. Topoisomerasa I

Parte II. Vectores para la construcción de moléculas recombinantes

1. Vectores procarióticos
  - Plasmidios
  - Bacteriófagos
    - M13
    - Lambda
  - Fagémidos
  - Cosmidios y fasmidios
  - Vectores shuttle
2. Vectores eucarioticos
  1. Para levaduras
    - Plasmidios

- Vectores ARS
- Minicromosomas o YACs
- 2. Para plantas
  - Vectores derivados de pTi
  - Virus recombinantes
- 3. Para células de mamíferos
  - Transformación transitoria
  - Transformación permanente

## **CAPITULO 7. INGENIERIA DE GENES**

### **Creación de moléculas recombinantes**

1. Tipos de inserto
2. Ligación de insertos en vectores
3. Introducción de DNA recombinante en la célula hospedero

### **Análisis de los recombinantes**

1. Construcción de mutantes
  - a. Supresión e inserción de secuencias
  - b. Mutagénesis sitio dirigido
2. Creación de quimeras
  - Creación de quimeras (proteínas fusionadas)

## **CAPITULO 8. CLONAMIENTO DE GENES**

### **Clonamiento**

#### **Construcción de genotecas**

Tipos de genotecas: genómicas, de cDNA

#### **Estrategias para el clonamiento de genes particulares**

Rastreo de genes específicos en una genoteca

- Sondas oligonucleotídicas
  - a. gen homólogo
  - b. guessmer y oligos degenerados
  - c. sintetizada por PCR
- Anticuerpos
- Differential display

Construcción de genoteca enriquecida en el cDNA de interés

- Obtención de mRNA desde polisomas
- Sustracción o hibridación diferencial
- Selección por expresión funcional
- Selección por supresión de la expresión funcional

Estrategias para la obtención de clones de DNA genómico particulares

- A partir de un clon de cDNA
- Identificar el cromosoma (o porción de él) donde reside el gen de interés.
  - Basado en datos de ligamiento genético
  - Utilizando híbridos somáticos

## Fundamento en alteraciones citogenéticas

### Caracterización del clon aislado

- Análisis físico del DNA clonado
  - mapa de restricción
  - secuenciación
  - análisis de secuencia
    - predicción de estructura secundaria
    - identificación de regiones funcionales
      - unidad transcripcional
      - secuencias reguladoras cis
- Análisis de la función del DNA clonado por expresión in vitro

## **CAPITULO 9. EXPRESION DE MOLECULAS DE DNA RECOMBINANTE IN VIVO**

1. Análisis funcional del DNA clonado en células aisladas
  - Caracterización del producto génico ( transcritos, polipéptidos)
    - a Sistemas de expresión para análisis funcional
    - b Estudios de relación entre estructura primaria y función
  - Supresión o inactivación de genes
    - a RNA o DNA antisense
    - b Recombinación homóloga
2. Análisis funcional de genes en individuos completos
  - a Inactivación de genes en individuos completos
    - Mutagénesis por inserción
      - Gene targeting
      - Knockout
      - Aplicaciones
  - b Obtención de individuos transgénicos
    - Introducción de genes en animales y vegetales
      - Células germinales- individuos transgénicos
      - Células somáticas
      - Células troncales o embrionarias
3. Seres vivos como biorreactores: expresión estable de genes foráneos
  - Procariontes
  - Eucariontes
    - Células en cultivo
      - levaduras
      - Células de insecto
      - Células de mamífero
    - Animales
    - Vegetales