

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

1. DESCRIPCIÓN DE LA ASIGNATURA

Grado:	Biotecnología
Asignatura:	Genética Molecular
Módulo:	Bioquímica y la Biología Molecular
Departamento:	Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica
Año académico:	2012-2013
Semestre:	segundo
Créditos totales:	4,5 ECTS
Curso:	2º
Carácter:	Obligatoria
Lengua de impartición:	Español

Modelo de docencia:	B1	
a. Enseñanzas Básicas (EB):		60%
b. Enseñanzas de Prácticas y Desarrollo (EPD):		40%
c. Actividades Dirigidas (AD):		-

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

2. EQUIPO DOCENTE

2.1. Responsable de la asignatura Rafael Rodríguez Daga

2.2. Profesores

Nombre:	Rafael Rodríguez Daga
Centro:	Facultad de Ciencias Experimentales
Departamento:	Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica
Área:	Genética
Categoría:	Profesor Titular
Horario de tutorías:	Lunes 17-18h
Número de despacho:	E22 Despacho 19 (2ª planta)
E-mail:	rroddag@upo.es
Teléfono:	954977551

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

3. UBICACIÓN EN EL PLAN FORMATIVO

3.1. Descripción de los objetivos

Conocer la estructura de los genomas eucariotas y las distintas estrategias de regulación génica
Conocer en qué consiste la epigenética y la importancia de ésta en la reprogramación celular
Conocer los mecanismos básicos de la morfogénesis celular
Conocer los mecanismos de regulación del ciclo celular eucariota
Conocer los mecanismos de control del envejecimiento
Conocer qué son las células madre y su importancia en terapia regenerativa
Descifrar rutas genéticas a partir de fenotipos de mutantes

3.2. Aportaciones al plan formativo

La Genética Molecular es una materia básica que está encuadrada en el módulo didáctico que comprende la Bioquímica y la Biología Molecular.
La Genética Molecular aporta dentro de este módulo los conceptos básicos de regulación de la expresión génica eucariota así como la descripción de distintos procesos biológicos como el control del ciclo celular o la reprogramación celular. El objetivo es formar al estudiante en el manejo y entendimiento a nivel molecular de las rutas genéticas que controlan dichos procesos con el objetivo de poder aplicar este conocimiento al desarrollo de estrategias biotecnológicas para curar o paliar enfermedades, como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, etc., enfermedades que resultan de la desregulación de los procesos que estudiamos.

3.3. Recomendaciones o conocimientos previos requeridos

Pre-requisitos esenciales: Tener conocimientos básicos de Genética General e Ingeniería Genética.

Pre-requisitos aconsejables: Conocimiento del Inglés y manejo de bases de datos de bibliografía.

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

4. COMPETENCIAS

4.1 Competencias de la Titulación que se desarrollan en la asignatura

Desarrollar las habilidades de aprendizaje necesarias que permitan al estudiante emprender, con un elevado nivel de autonomía, estudios posteriores.

Conocer y comprender los procesos biológicos generales desde un punto de vista molecular.

Utilizar la literatura científica y técnica de vanguardia.

Desarrollar las habilidades de trabajo y discusión en grupo.

Desarrollar la capacidad creativa.

Comprender la aplicabilidad de los conocimientos que se adquieren.

Saber analizar, sintetizar y utilizar el razonamiento crítico en ciencia.

Comprender el método científico.

Trabajar de forma adecuada en un laboratorio biológico.

Conocer y aplicar las herramientas, técnicas y protocolos de experimentación en el laboratorio.

Cultivar y manipular microorganismos.

Adquirir, desarrollar y aplicar las principales técnicas de preparación, tinción y observación de muestras biológicas.

Adquirir las capacidades de observación e interpretación de los resultados obtenidos.

4.2. Competencias del Módulo que se desarrollan en la asignatura

1. Diseñar estrategias genéticas para abordar un problema biológico.
2. Inferir rutas genéticas a partir de fenotipos de mutantes y de cambios de expresión.
3. Describir los mecanismos moleculares de los principales procesos celulares.
4. Trabajar de forma adecuada en laboratorios de bioquímica y biología molecular, incluyendo seguridad, manipulación de residuos.

4.3. Competencias particulares de la asignatura

Competencias particulares de la asignatura para cada una de las distintas actividades propuestas en la asignatura:

I. Competencias instrumentales relacionadas con los contenidos

1. Conocimiento y comprensión de los procesos biológicos a nivel molecular.
2. Familiarizarse con los conceptos teóricos y principios fundamentales de la asignatura tales como: la regulación de la expresión génica, control del ciclo, morfogénesis, etc.

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

II. Competencias instrumentales relacionadas con las prácticas de laboratorio

1. Adquirir manejo instrumental y hábitos de trabajo en un laboratorio.
2. Familiarizarse con el diseño, análisis, e interpretación de experimentos y resultados científicos.

III. Competencias personales relacionadas con las prácticas de laboratorio

1. Trabajar de forma adecuada en un laboratorio biológico
2. Conocer y aplicar las herramientas, técnicas y protocolos de experimentación.
3. Realizar cultivos de microorganismos.
4. Adquirir, desarrollar y aplicar las principales técnicas de preparación, tinción y observación de muestras biológicas.
5. Diseñar, analizar e interpretar los resultados de experimentos dirigidos a la interrupción de una función génica en sus variantes más habituales.
6. Analizar e interpretar diferentes estrategias de regulación de la expresión génica.

IV. Competencias personales relacionadas con el estudio personal

1. Estudio, reflexión y asimilación de los conceptos teóricos.
2. Acercamiento a la literatura científica y técnica de vanguardia.
3. Búsqueda y selección de información relacionada con la asignatura en bases de datos bibliográficas.

V. Competencias personales relacionadas con la realización de ejercicios individualmente y en equipo.

1. Adquirir dominio en la resolución de problemas.
2. Adquirir hábitos de exposición y discusión sobre resultados y temas científicos.

VI. Competencias personales relacionadas con el desarrollo, redacción y presentación trabajos científicos

1. Adquirir hábitos de lectura, redacción y exposición de trabajos científicos.
2. Desarrollo de los métodos de adquisición, interpretación y análisis de la información biológica, mediante el estudio de manuales, monografías, ensayos, y sobre todo artículos científicos relevantes.
3. Familiarización con la literatura científica y técnica de vanguardia.
4. Saber realizar búsquedas en las principales bases de datos bibliográficos.

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

VII. Competencias personales relacionadas con la pruebas escritas y exámenes.

1. Demostrar los conocimientos adquiridos.
2. Expresarse adecuadamente en términos científicos y utilizar la nomenclatura y terminología específica.

5. CONTENIDOS DE LA ASIGNATURA (TEMARIO)

TEMARIO RESUMIDO

TEORÍA:

BLOQUE I

TEMA I. El DNA: La molécula de la vida

TEMA II. Control espacio-temporal de la expresión génica

BLOQUE II

TEMA III. Control del ciclo celular

TEMA IV. Morfogénesis celular

TEMA V. Introducción al desarrollo

BLOQUE III

TEMA VI. Envejecimiento celular y sistémico

TEMA VII. Células madre

PRÁCTICAS:

Práctica I. Análisis de mutantes condicionales en genes que controlan el ciclo celular y la morfogénesis en la levadura de fisión S. Pombe. Estudio de la respuesta celular a agentes genotóxicos: importancia de los mecanismos de checkpoint.

Resumen

La idea de esta práctica es conocer los mecanismos de control del ciclo celular y la morfogénesis mediante el análisis de una colección de mutantes de ciclo celular, (mutantes deficientes en alguna transición del ciclo celular) y mutantes en morfogénesis (mutantes en genes que determinan la forma celular). Mediante el análisis de estos mutantes diseñaremos rutas génicas que expliquen los fenotipos observados y discutiremos las consecuencias de una mal funcionamiento de los mecanismos de control de ambos procesos.

Práctica II. Disección de la ruta genética de entrada en dauer utilizando mutantes

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

funcionales mediante ARN de interferencia (RNAi) en *Caenorhabditis elegans*.

Resumen

La técnica de RNA de interferencia permite la inactivación selectiva de un gen o transcrito mediante la expresión de un RNA antisentido del mRNA del gen que se pretende inactivar. Esta técnica se utiliza en muy diversos organismos, pero es especialmente eficaz y fácil de realizar en *C. elegans*. El fenotipo a estudiar será la formación de dauer, un estadio de resistencia de este gusano. Durante el desarrollo de esta práctica utilizaremos conjuntamente RNAi y mutantes termosensibles en la ruta de formación de dauer para diseñar una ruta genética que explique los resultados fenotípicos y de epistasia obtenidos.

TEMARIO COMPLETO

TEMA I. El DNA: La molécula de la vida.

1. Sentido del tema

El tema I es un tema introductorio en el que se pretende dar una visión actual de los genomas y de su incremento en complejidad desde procariotas hasta mamíferos. Revisaremos como acceder a las bases de datos de genomas donde podemos consultar las anotaciones sobre los distintos genes y analizar su estructura.

Dado que la mayor parte del genoma de organismos superiores poseen extensas regiones no codificantes y es en estas secuencias donde se encuentran dispersas normalmente las regiones reguladoras de la expresión génica, revisaremos diferentes métodos experimentales para estudiar estas secuencias.

2. Epígrafes del tema

Estructura del DNA. Tamaño y comparación de genomas. Organización de los genomas de procariotas y eucariotas. Bases de datos de Genomas. Conservación de genomas y sinténias. Identificación de regiones reguladoras en los genomas complejos: comparación de secuencias, ensayos de hipersensibilidad, geles de retardo e inmunoprecipitación de cromatina.

3. Materiales para estudiarlo

Además de la información teórica básica para entender los distintos conceptos teóricos podemos acceder a diferentes bases de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) para consultar el tamaño de distintos genomas, la relación DNA codificante / DNA no codificante, el número total de genes de un organismo, etc. Además revisaremos el término Ontología génica (GO) para poder manejarnos en las bases de datos y poder extraer información útil de las mismas. También podréis acceder al sitio: <http://www.dnai.org/> donde podréis acercaros más al genoma humano. La información

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

está en lengua inglesa por lo que esta actividad también será útil para mejorar nuestro nivel de Inglés e ir adquiriendo cada vez más soltura en el entendimiento del lenguaje y la terminología científica.

4. Método de trabajo aconsejado

El método de trabajo aconsejado es seguir las clases, consultar los manuales indicados y la información adicional que regularmente os dejaré en el sitio webCT y profundizar en el estudio y entendimiento de los conceptos básicos mediante la resolución de problemas que también colgaré en el sitio webCT.

5. Actividades a desarrollar

Una de las actividades de este tema será resolver problemas experimentales usando los conceptos teóricos vistos en clase y en la bibliografía de apoyo.

6. Competencias que se van a trabajar

La competencia que se va a trabajar en esta parte del temario es la resolución de problemas relacionados con la interacción DNA-proteína.

7. Dificultades principales

La principal dificultad que se pueden encontrar en este tema es el entendimiento de diferentes técnicas moleculares como los ensayos de sensibilidad a DNAsas o los geles de retardo. Para ello se harán series de problemas en las que haya que aplicar estas técnicas para resolverlos. Si fuera necesario se darían tutorías personales o en pequeños grupos para entender con claridad la metodología empleada.

8.1. Bibliografía básica para ampliar el tema.

Podréis encontrar información sobre este tema en los manuales:

Lewin B. Genes VII. Marbán, cop. 2003.

Klug W.S. Cummings, M.R. y Spencer C.A. 2006 “Conceptos de Genética”. Prentice Hall 2006.

8.2. Bibliografía más específica para profundizar sobre el tema

1. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. TRENDS in Genetics Vol.17 No.1 January 2001

2. Geles de retardo. EMSA or Gel Shift technique.

3. Footprinting: A method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA-binding ligands. Andrew J. Hampshire, David A. Rusling, Victoria J. Broughton-Head, Keith R. Fox. Methods 42 (2007) 128–140

TEMA II. 2. Control espacio-temporal de la expresión génica

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

1. Sentido del tema.

Una vez visto como se organiza la información genética, como está estructurada, y su complejidad en distintos organismos, en este tema veremos diferentes mecanismos que regulan cuándo, cómo y cuánto se usa de esa información que almacenan los genomas. En este tema comprobaremos que las secuencias reguladoras de la expresión génica están dispersas en enormes regiones intergénicas, aprenderemos diferentes métodos para identificar estas secuencias.

Por otro lado haremos una pequeña incursión en el emergente campo de la epigenética. El término epigenética se refiere a cambios en el fenotipo o cambios en la expresión génica, causado por mecanismos independientes de la secuencia del DNA.

2. Epígrafes

Parte I. Potenciadores y silenciadores de la transcripción. Análisis del transcriptoma mediante Microarrays. Control de calidad de las proteínas. Control de calidad del mRNA.

Parte II. Epigenética. Modificaciones de la cromatina. Modificaciones covalentes, islas CpG y metilación del DNA. Modificaciones covalentes de las histonas, acetilación, ubiquitinación, metilación, etc, Modificaciones no covalentes: remodelación de la cromatina, rotación del DNA sobre los nucleosomas y la función de las ATPasas. Mecanismo de “exposición lateral” para el reconocimiento de secuencias enrolladas sobre nucleosomas. Incorporación de variantes de histonas. RNA de interferencia y silenciamiento de la transcripción mediante iRNA. Terapias epigenéticas en el tratamiento del cáncer. Arquitectura nuclear y regulación de la expresión génica, la progeria como ejemplo. Factorías de transcripción, replicación y reparación. Territorios cromosómicos.

3. Materiales para estudiarlo.

Los materiales para trabajar este tema son sobre todo artículos científicos.

En este tema veremos nueva metodología como ensayos proteína-proteína, la técnica del bisulfito para determinar si una región está o no metilada, ensayos de actividad ATPasa necesaria para girar el DNA sobre los nucleosomas durante el remodelamiento de la cromatina, técnicas de FRAP (recuperación de la fluorescencia tras el quemado de la muestra) para determinar la dinámica de complejos DNA-proteína in vivo, técnica de FRET (transferencia de energía fluorescente resonante) para entender cómo se enrolla el DNA sobre un nucleosoma y su dinámica de asociación-disociación, etc.

4. Método de trabajo aconsejado.

En este tema se proponen varias lecturas en forma de artículos especializados. La lectura de toda esta información debe, lógicamente, generar preguntas y dudas que serán resueltas en tutorías.

Los aspectos más básicos del tema 2 pueden ser consultados en los manuales de genética indicados. La metodología necesaria para entender los conceptos de este tema

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

se explicará detenidamente en clase. Se propondrá una serie de problemas casi exclusiva sobre este tema que se dejará en el sitio webCT y se resolverá en clase.

5. Actividades a desarrollar

Una de las actividades de este tema será resolver problemas experimentales usando los conceptos teóricos vistos en clase y en la bibliografía de apoyo.

6. Competencias que se van a trabajar

La competencia que se va a trabajar en esta parte del temario es la resolución de problemas relacionados con la regulación de la expresión génica. Además es muy importante adquirir nuevos conocimientos de epigenética.

7. Dificultades principales

La dificultad principal de este tema es asimilar los conceptos de epigenética que normalmente son nuevos para todos. Se proponen numerosas lecturas complementarias y las tutorías que sean necesarias.

8. Bibliografía

8.1. Bibliografía básica para ampliar el tema.

1. Genética. Un enfoque conceptual. 2ª Edición. Pierce. En el capítulo 14 y 15 hay información sobre maduración de mRNA, y control traduccional.

2. Genética. Un enfoque conceptual. 2ª Edición. Pierce.

El capítulo 16 trata sobre regulación de la expresión génica haciendo especial interés en procariontes y por lo tanto complementa perfectamente lo que se ve en clase. Este texto además presenta numerosas figuras que hacen más fácil el entendimiento de la materia que se trata.

3. Klug W.S. Cummings, M.R. y Spencer C.A. 2006 “Conceptos de Genética”. Prentice Hall 2006. Capítulos 18 y 19 tratan la regulación de la expresión génica procarionte y eucariote respectivamente.

8.2. Bibliografía más específica para profundizar sobre el tema.

1. Structure, function and evolution of CpG island promoters. F. Antequera. (2003) Cell. Mol. Life Sci. 60 1647–1658.

2. Regulated Unproductive Splicing and Translation (RUST). Brenner Computational Biology Research Group. <http://compbio.berkeley.edu/people/ed/rust>

3. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. K. E Baker and R. Parke. Current Opinion in Cell Biology 2004, 16:293–299

Epigenética. Recomendando un monográfico que la prestigiosa revista Cell publicó en febrero de 2007. En este número de Cell los máximos expertos en el tema dan su visión actual sobre la epigenética.

4. Epigenetics: A Landscape Takes Shape

A. D. Goldberg, C. D. Allis, and E. Bernstein. 2007. Cell 128, 635-638

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

5. Noncoding RNAs and Gene Silencing. M. Zaratiegui, D. V. Irvine, and R. A. Martienssen. 2007. Cell 128, 763–776,
6. Chromatin Modifications and Their Function. T. Kouzarides. 2007 Cell 128, 693–705. 2007
7. Beyond the Sequence: Cellular Organization of Genome Function T. Misteli. 2007. Cell 128, 787–800.
8. The Dynamics of Chromatin Remodeling at Promoters. J. Mellor. 2005. Molecular Cell, Vol. 19, 147–157.
9. From Silencing to Gene Expression: Real-Time Analysis in Single Cells. Janicki et al. 2004. Cell, Vol. 116, 683–698.

TEMA III. Control del ciclo celular eucariota.

1. Sentido del tema.

Este tema forma parte del segundo bloque en el que veremos varios temas de especial relevancia en la ciencia actual. Uno de estos temas es el control del ciclo celular eucariota que tiene una enorme repercusión en el campo de la biomedicina, especialmente en relación con el cáncer.

El tema III tendrá una práctica asociada en el que se trabajaran los principales aspectos teóricos. Este tema está organizado temporalmente para poder realizar la práctica antes que la teoría, de esta forma simularemos como se descubrieron los principales hitos del control del ciclo celular sin información previa, siguiendo el método científico o método deductivo para luego ir viendo los conceptos teóricos en clase junto con el estudio de la bibliografía aconsejada.

2. Epígrafes.

Maquinaria de control de la división celular. Universalidad de la maquinaria de control del ciclo celular. Complejos CDK-ciclinas. Función de las ciclinas en reconocimiento del sustrato y localización subcelular del complejo CDK-Ciclina. Inhibidores de complejos CDK-ciclinas o CKIs. Control de la actividad CDK-ciclina por fosforilación-defosforilación. Modelo cuantitativo de control del ciclo celular. Puntos de control o “check-points” del ciclo celular. Desregulación del control del ciclo celular y Cáncer. Ensamble del huso mitótico. Proteínas que regulan la arquitectura del huso. El mecanismo molecular del checkpoint del huso. El cinetocoro y la maquinaria molecular de la captura de los cromosomas. Maquinaria molecular de segregación de los cromosomas. El proteasoma. y APC (complejo que promueve la anafase). El huso mitótico como diana de agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer.

3. Materiales para estudiarlo

En el año 2001 tres científicos, dos del Reino Unido y uno de Estados Unidos, recibieron el premio Nobel de fisiología y medicina por sus aportaciones al conocimiento de la maquinaria molecular que controla la división celular. Como

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

material de estudio os propongo que conozcáis las lecciones magistrales que dieron sendos científicos durante la entrega de premios. Destaco una frase del científico que acuñó el término checkpoint, Leland Hartwell, que empezó su lección magistral diciendo: “My research career has been motivated by a desire to understand cancer”.

En este tema además de los manuales y la bibliografía específica que se indicaran más adelante contaremos con un video en el que Gerald Fink, un prestigioso experto en el control del ciclo celular (<http://www.wi.mit.edu/research/faculty/fink.html>), nos da una visión histórica del descubrimiento de nuevos genes que controlan el ciclo celular mediante el aislamiento de mutantes termosensibles. Aunque el video se presenta en Inglés, al ser un video didáctico es fácilmente entendible. Además se podrá interrumpir para aclarar cualquier duda de cualquier tipo.

4. Método de trabajo aconsejado

En este tema contamos con la posibilidad de hacer una práctica relacionada lo que nos permite abordar este tema de forma diferente. La práctica precede cronológicamente al inicio del tema en clase por lo que, sin mucha información previa, nos acercaremos de forma deductiva y siguiendo el método científico a los genes que controlan el ciclo celular. Para ello, trabajaremos con una colección de mutantes que presentan defectos en diferentes puntos de control del ciclo celular. Deduiremos cuáles son los puntos de control del ciclo celular y estudiaremos los defectos de control del ciclo celular asociados a la falta de función de cada uno de ellos. Posteriormente estudiaremos la cinética de acumulación y destrucción de un regulador clave del ciclo celular en un microscopio de fluorescencia usando una fusión de este regulador a la proteína verde fluorescente (GFP). Este análisis nos va a servir para reforzar algunas ideas transmitidas en el tema de regulación de la expresión génica.

5. Actividades a desarrollar

La principal actividad a realizar en este tema es la práctica en la que habrá que responder a un cuestionario al final de la misma.

6. Competencias que se van a trabajar

Una de las competencias que se pretende desarrollar en este tema es la determinación de en qué momento del ciclo celular está bloqueada o enriquecida una población celular. Para ello combinaremos los datos extraídos de prácticas con otros que se verán en las clases teóricas.

7. Dificultades principales

Este tema no tiene grandes dificultades, pero, dado que el ciclo celular lo estudiamos usando varios organismos modelo, es importante que no se confundan los mecanismos que pueden ser diferentes entre distintos organismos.

8. Bibliografía

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

8.1. Bibliografía específica para profundizar sobre el tema

1. "The cell cycle control. Principles of control". David O. Morgan. Oxford University Press 2007. Este texto aporta una visión molecular detallada y totalmente actual de los mecanismos que controlan la división celular y su coordinación con el crecimiento celular. Los temas 1-4 tratan sobre los aspectos básicos del control del ciclo celular. El tema 5 la entrada en mitosis. En el capítulo 6-7 se trata el ensamblaje del huso mitótico y la salida de mitosis en gran detalle. El tema 8 trata de la citocinesis. En el capítulo 12 se da una visión actual de las moléculas y mecanismos cuya alteración resulta en la transformación de una célula normal en cancerosa.
2. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer (2009). Lapenna S, Giordano A.. Nat Rev Drug Discov. (7):547-66.
3. Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship (2008). Ricke RM, van Ree JH, van Deursen JM. Trends Genet. (9):457-66
4. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis (2009). Holland AJ, Cleveland DW. Nat Rev Mol Cell Biol. (7):478-87.
5. p65cdc18 plays a major role controlling the initiation of DNA replication in fission yeast (1995). Nishitani H, Nurse P. Cell. 83(3):397-405.
6. Cell cycle regulation of DNA replication (2007). Sclafani RA, Holzen TM. Annu Rev Genet. 41:237-80.

TEMA IV. Morfogénesis celular.

1. Sentido del tema.

En este tema estudiaremos los factores que determinan la generación de una forma celular determinada. En este tema combinaremos experimentos e ideas básicas obtenidas del estudio y caracterización molecular de mutantes de levaduras con experimentos realizados en neuronas. La alteración de la forma de las neuronas como, por ejemplo, en el número y distribución de sus ramificaciones, suelen tener un impacto muy importante es su actividad y supervivencia.

El Alzheimer es una enfermedad relativamente nueva y cuya etiología la encontramos en un colapso del transporte citoplasmático, lo que resulta en la degeneración de los axones y la pérdida de actividad neuronal. También revisamos en este tema la enorme importancia que tiene la morfogénesis, la arquitectura celular y el transporte citoplasmático mediado por proteínas motoras, en la memoria. Estudiaremos la motilidad celular, y su repercusión en desarrollo normal de un individuo y en el desarrollo y malignidad de los tumores. Las capacidades cognitivas y sus enfermedades

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

asociadas, la neurodegeneración o el cáncer son potenciales temas de presente y sobre todo futuro desarrollo biotecnológico, y es por ello por lo que en este tema se pretende revisar algunos conceptos e ideas a nivel molecular que puedan servir de estímulo intelectual y motivación al estudiante.

El tema IV tendrá una práctica asociada (ver apartado Prácticas). En esta práctica se trabajarán los principales aspectos teóricos y la metodología del tema de forma práctica. Este tema está organizado temporalmente para poder realizar la práctica antes que la teoría, de esta forma simularemos como se descubrieron los principales genes responsables de la forma celular en levaduras para posteriormente ir viendo los conceptos teóricos en clase y mediante el estudio de la bibliografía aconsejada.

2. Epígrafes.

El citoesqueleto: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Papel del citoesqueleto en el posicionamiento de estructuras celulares y en la determinación de los sitios de crecimiento celular y división. Dinámica y arquitectura de los microtúbulos. Función del citoesqueleto de Actina en citocinesis y migración celular. Maquinaria y regulación espacio-temporal de la polimerización de actina. Forminas. Complejos ARP2-3. Generación de fuerza mediante polimerización de actina. Alteración de la polimerización de la actina: Síndrome de Wiskott-Aldrich. Función del citoesqueleto de actina en la propulsión de listeria y en endocitosis. Proteínas motoras: miosina II, miosina V, kinesinas y dineina. Transporte neuronal, implicaciones en memoria. Alteración del transporte neuronal, degeneración celular y Alzheimer.

3. Materiales para estudiarlo

En esta parte del temario se estudian procesos muy dinámicos y muchos de los datos experimentales que se muestran están tomados gracias a la video microscopía, por lo que en clase se verán numerosos videos en los que se mostrarán experimentos que han sido pioneros en el campo. Además, trabajaremos con nuestras propias manos caracterizando mutantes de morfogénesis en la práctica de laboratorio que se ha diseñado para complementar esta parte del temario.

4. Método de trabajo aconsejado

El método de estudio de este tema es similar al anterior: primero mediante la caracterización de mutantes de morfogénesis en la práctica surgirán numerosas preguntas e ideas que más tarde se irán viendo en las clases teóricas. A su vez, las clases teóricas podrán ser complementadas con el material bibliográfico de apoyo para aquellos estudiantes que deseen profundizar más en el tema.

5. Actividades a desarrollar

La principal actividad a realizar en este tema es la práctica en la que habrá que responder a un cuestionario al final de la misma.

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

6. Competencias que se van a trabajar

Los estudiantes deben ser capaces en este tema de entender y distinguir los distintos polímeros celulares, conocer su función biológica, sus propiedades dinámicas, las moléculas motoras que viajan por ellos y las repercusiones que tienen mutaciones en los genes que lo forman o que controlan su ensamblaje y / o dinámica. Los estudiantes deben ser capaces de entender a nivel molecular qué ocurre en una enfermedad como el Alzheimer.

7. Dificultades principales

La dificultad principal de este tema es integrar los conceptos extraídos de modelos más simples como las levaduras, con los de células animales. Otra dificultad, motivada por la novedad conceptual al que se expone a los estudiantes en este tema, podría ser entender cómo ciertas moléculas y / o polímeros pueden generar fuerza y que esta fuerza la célula la usa para posicionar o mover estructuras u orgánulos celulares.

8. Bibliografía

8.1. Bibliografía específica para profundizar sobre el tema

1. Tau is actin up in Alzheimer's disease. (2007). Gallo G. Nat Cell Biol. (2):133-4.
- 2 Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. (2003). Joe Howard & Anthony A. Hyman. Nature Vol 422
3. Progressing actin: Formin as a processive elongation machine. (2004). David R. Kovar and Thomas D. Pollard. Nat Cell Biol. Vol 6.
4. Force Generation by Microtubule Assembly / Disassembly in Mitosis and Related Movements. (1995). Molecular Biology of the Cell Vol. 6, 1619-1640. Shinya Inoue and Edward D. Salmon.

TEMA V. Introducción al desarrollo.

1. Sentido del tema.

La biología del desarrollo es actualmente uno de los campos de investigación de relevancia en nuestro país. En este tema se pretende dar una visión general sobre algunos de los procesos básicos del desarrollo de un organismo que sirva al estudiante de estímulo para acercarse a este campo de la biología donde, además de la investigación básica, hay un campo enorme para el desarrollo biotecnológico.

El tema V tendrá una práctica asociada como se indica en el esquema del tema. En esta práctica usaremos el nemátodo *C. Elegans* como organismo modelo para conocer como durante el desarrollo de este organismo y en función de las condiciones nutricionales en que se encuentre, se toma la decisión de proseguir con el desarrollo normal hasta formar el organismo adulto o se activa un programa de resistencia en el que no se completa el desarrollo. Usando varios mutantes termosensibles en las rutas genéticas que determinan una u otra decisión y la tecnología del RNA de interferencia (iRNA) se generaran combinaciones de falta de función de genes clave en estas rutas que nos

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

permitirán reconstruir, a partir de los datos obtenidos, las rutas genéticas y el orden que ocupan los genes de estudio en estas rutas.

2. Epígrafes.

Rotura de la asimetría en el huevo de *C. elegans* tras la fertilización. Determinación del eje antero-posterior en embriones de *C. elegans*. Polarización del huevo tras la fertilización. Polarización de Par2-Par3 y de los gránulos P. Mecanismos que generan la división asimétrica en el estadio de una célula. Linajes celulares en *C. elegans*. Generación de los ejes antero-posterior y dorso-ventral en el huevo de *Drosophila melanogaster*. Gradiente de morfógenos. Genes homeóticos.

3. Materiales para estudiarlo

Además de la bibliografía para este tema os propongo varios sitios web para profundizar más en algunos de los epígrafes que se tratan en el mismo:

Sitio web donde poder profundizar y aprender más sobre linajes celulares:
<http://www.wormclassroom.org/Modules/CellLineage/clCE.html>.

Sitio web para consultar el desarrollo de *Drosophila*:
<http://flymove.unimuenster.de/Homepage.html>.

4. Método de trabajo aconsejado

Junto con las clases teóricas se verán artículos científicos que sirvan de apoyo a las mismas. Esta información se complementará con la práctica.

5. Actividades a desarrollar

La principal actividad a realizar en este tema es la práctica en la que habrá que responder a un cuestionario al final de la misma.

El Centro Andaluz de Biología del Desarrollo que se encuentra en el campus de la UPO cuenta con un día de puertas abiertas y puede ser una buena oportunidad para visitarlo, conocer sus instalaciones y recursos y conocer las distintas líneas de investigación que se están desarrollando en la actualidad.

Como actividad complementaria, es posible que podamos contar en este tema con algún experto del campo de la biología del desarrollo para que nos dé un seminario específico y podamos establecer turno de preguntas y discusión.

6. Competencias que se van a trabajar

Los estudiantes deberán conocer conceptualmente cómo se polariza un huevo, cómo se rompe la simetría para establecer los ejes polaridad, qué son los morfógenos, qué son los linajes celulares. Además, los estudiantes deberán ser capaces de distinguir las distintas fases larvianas de *C. elegans* e identificar individuos que han activado el programa de resistencia o programa dauer. Los estudiantes deberán ser capaces de construir rutas genéticas basados en los fenotipos de la combinación de mutantes

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

termosensibles y la inactivación génica mediante la técnica del RNA de interferencia.

7. Dificultades principales

Este tema habrá que integrar información que hemos visto hasta ahora en el temario como la regulación de la expresión génica o el control de la proliferación celular, con nuevas ideas como la comunicación célula-célula o los gradientes de morfógenos que van a generar dominios o linajes específicos comprometidos con un destino celular específico. Así mismo, algunos de los principios que hemos visto de organización celular y polaridad ahora los veremos en la organización del huevo donde hay que especificar, por ejemplo, los ejes dorso ventral y antero-posterior. Veremos que las moléculas y mecanismos de especificación y organización espacial son básicamente los mismos que a nivel subcelular pero el grado de complejidad es mucho mayor.

8. Bibliografía

8.1. Bibliografía básica para ampliar el tema.

Griffiths y col. "Genética" Mc Graw Hill 2000, tiene dos temas (22 y 23) dedicados a la genética del desarrollo donde se podrá consultar y profundizar más en alguno de los aspectos vistos en clase.

8.2. Bibliografía más específica para profundizar sobre el tema

1. From signals to patterns: space, time, and mathematics in developmental biology (2009). Lewis J. Science, 322:399-403.

2. The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo (1992). St Johnston D, Nüsslein-Volhard C. Cell. 68(2):201-19.

3. "Cell Determination" and "Cell Lineage" (2000). Chisholm, A.D. Chapters on in The Encyclopedia of Genetics. Academic Press.

TEMA VI. Envejecimiento celular y sistémico

1. Sentido del tema.

En este tema se estudiarán las diferentes teorías del envejecimiento, la relación entre la longevidad y otros factores como, el estrés, la restricción calórica o el sexo.

Este tema tendrá una práctica relacionada. En esta práctica conoceremos, usando a nematodo *C. elegans* como organismo modelo dos rutas genéticas que determinan la longevidad de este organismo y usaremos la técnica del RNA de interferencia para inactivar genes de estas rutas.

2. Epígrafes.

Teorías del envejecimiento. Longevidad replicativa. Telómeros y senescencia celular. Longevidad cronológica. Relación termo-tolerancia y longevidad. La función de los chaperones moleculares en la longevidad. Ruta de la insulina. Restricción calórica.

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

Mitocondrias y longevidad. Gónadas, sexo y longevidad.

3. Materiales para estudiarlo

Los materiales para estudiarlo, como en otros temas, serán el material de las clases teóricas junto con artículos científicos que sirvan de apoyo a las mismas. Esta información se complementará con la práctica en la que trabajaremos con el nemátodo *C. elegans*.

4. Método de trabajo aconsejado

Además de la bibliografía para este tema os propongo un sitio web para consultar y profundizar más sobre los aspectos del tema que os resulten más interesantes. <http://www.senescence.info/>.

5. Actividades a desarrollar

En este tema contamos con la colaboración de Manuel Jesús Muñoz, profesor del área de genética y experto en longevidad.

6. Competencias que se van a trabajar

Los estudiantes deberán conocer las distintas teorías del envejecimiento y su relación con otros procesos celulares como la restricción calórica o el estrés oxidativo. Deberán distinguir entre envejecimiento y senescencia entender la importancia de la telomerasa y su relación con la inmortalidad celular. Deberán, así mismo, familiarizarse con el manejo del nematodo *C. elegans* y conocer y aplicar la técnica del iRNA.

7. Dificultades principales

Este tema no es muy extenso y parte de la teoría está complementada con la práctica y, por la tanto, no tiene, a priori, grandes dificultades. Es importante durante la práctica saber distinguir bien entre genes que se inactivan por temperatura y aquellos que se inactivan mediante tecnología de interferencia del RNA. Durante la práctica, la principal dificultad es el manejo de *C. elegans*, la identificación de los individuos en distintas fases del desarrollo y la selección de gusanos en el estadio L1 para pasarlos a otras placas durante el experimento. Para esta actividad hay que tener paciencia ya que se requiere cierta habilidad y perseverancia, sobre todo al principio.

8. Bibliografía

8.1. Bibliografía básica para ampliar el tema.

La bibliografía de este tema es básicamente bibliografía especializada en forma de artículos científicos o revisiones que se detallan a continuación.

8.2. Bibliografía más específica para profundizar sobre el tema

1. Longevity and heat stress regulation in *Caenorhabditis elegans* (2003). Muñoz MJ. *Mech Ageing Dev.* 124(1):43-8.

2. Evolving views of telomerase and cancer. (2003) Blasco MA, Hahn WC. *Trends Cell*

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

Biol. Jun;13(6):289-94.

3. Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging (2005). Blasco MA. EMBO J. 24(6):1095-103. Epub 2005 Mar 10.

4. Lecciones magistrales de los laureados con el premio Nobel por su descubrimiento del RNA de interferencia: Andrew Z. FIRE Nobel lecture. Graig Mello Nobel lecture.

TEMA VII. Células Madre

2. Epígrafes.

Células madre totipotentes, pluripotentes y multipotentes. Plasticidad de las células madre. Células madres embrionarias, germinales y de adulto. Transferencia de núcleos a ovocitos. Reprogramación celular. Terapias experimentales basadas en células madre.

3. Materiales para estudiarlo

Este es un tema atípico en el sentido de que son los estudiantes los que lo preparan. En el apartado anterior de epígrafes se denotan algunos puntos de interés que deben ser cubiertos, pero el objetivo de este tema consiste en que sean los propios estudiantes los que pongan en juego todo lo aprendido hasta este momento.

Los trabajos no están limitados al tema de las células madre y se podrán hacer de cualquiera de los temas del temario en función de las inquietudes y preferencias de cada estudiante.

4. Método de trabajo aconsejado.

Este tema se desarrolla íntegramente a través de trabajos científicos realizados por los estudiantes. Los mejores trabajos se seleccionaran para su exposición en clase.

5. Actividades a desarrollar

Las actividades a realizar en este tema son la búsqueda bibliográfica, selección del material adecuado para cada trabajo, preparación de una presentación (sólo aquellos estudiantes cuyos trabajos hayan sido seleccionados) exposición de la misma y discusión posterior.

Las posibles dificultades que los estudiantes encuentran durante la selección, lectura, síntesis y escritura de su trabajo se podrán resolver en tutorías individuales.

6. Competencias que se van a trabajar

Los estudiante deben ser capaces de realizar un trabajo de búsqueda bibliográfica en bases de datos, seleccionar artículos de relevancia, y realizar un trabajo en los términos descritos anteriormente. Los estudiantes deberán conocer en qué consiste la reprogramación celular, los distintos tipos de células madre y la potencialidad de las mismas en terapias donde poder aplicar estrategias de desarrollo biotecnológico.

7. Dificultades principales

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

En este tema hay varias dificultades a las que el estudiante debe enfrentarse y cuya superación le servirá para el futuro sea cual sea su ocupación en el campo de la biotecnología. Una de estas dificultades es reflexionar sobre ¿qué me interesa? ¿qué puede ser más relevante ahora mismo? Los estudiantes no recibirán ninguna ayuda en este aspecto puesto que las inquietudes de cada uno es algo personal. Una vez resuelto este escollo, la siguiente dificultad suele ser dónde me informo sobre lo que me interesa. Dada la enorme accesibilidad que existe hoy en día a la información, la siguiente dificultad suele ser como seleccionar entre tanta información. Aquí, el estudiante puede consultar con el profesor en tutorías personalizadas pero debe siempre ir con una propuesta que será discutida. Más adelante, el estudiante se encontrará con las dificultades de entendimiento, síntesis, escritura y exposición de su trabajo. En algunos casos podría haber dificultades de entendimiento de términos científicos específicos en inglés. Normalmente, el estudiante puede pedir una tutoría para contar con el asesoramiento del profesor pero en muchas ocasiones estos problemas se suelen solucionar vía e-mail.

Aquellos estudiantes cuyos trabajos hayan sido seleccionados para su exposición en clase deberán afrontar, además, la dificultad normal de preparar una exposición y de transmitir la información de modo resumido y claro al resto de compañeros y profesor. Por último, estos estudiantes deberán ser capaces de entender las preguntas de sus compañeros y de responder razonadamente a las mismas.

8. Bibliografía

La bibliografía para los trabajos se buscará mediante herramientas de búsqueda bibliográfica tales como el PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>. Se aconseja no basar el trabajo sólo en revisiones y es preferible consultar revistas científicas de prestigio.

PRACTICAS:

Práctica I. Análisis de mutantes condicionales en genes que controlan el ciclo celular y la morfogénesis en la levadura de fisión *S. Pombe*.

Resumen

La idea de esta práctica es conocer el ciclo celular y la morfogénesis mediante el análisis de una colección de mutantes de ciclo celular, (mutantes deficientes en alguna transición del ciclo celular o que la aceleran) y mutantes en morfogénesis (mutantes en genes que determinan la forma celular). Mediante el análisis de estos mutantes diseñaremos rutas génicas que expliquen los fenotipos observados y discutiremos las consecuencias de un mal funcionamiento de estos mecanismos.

La práctica consta de dos partes:

1. Análisis de mutantes condicionales en genes que controlan el ciclo celular y la morfogénesis en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*.
2. Análisis de la cinética de acumulación nuclear de un regulador de ciclo celular.

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

3. Estudio de la respuesta celular a agentes genotóxicos: importancia de los mecanismos de checkpoint.

Introducción

1. Control del ciclo celular

La proliferación celular ocurre gracias a una elaborada red de proteínas que permiten que los cromosomas y otros componentes celulares sean duplicados y después repartidos entre dos células hijas. La progresión por el ciclo celular, el orden de los distintos eventos, así como la decisión de iniciar o no un nuevo ciclo de división está regulada por una intrincada red de proteínas reguladoras. Todos los organismos vivos unicelulares o pluricelulares poseen mecanismos que controlan el proceso de división celular. Los organismos unicelulares, siempre que las condiciones del medio sean favorables, se dividen hasta que se acaban los nutrientes disponibles. En organismos pluricelulares, en los que hay más de 200 tipos celulares distintos, unas células o tejidos se dividen con bastante frecuencia, como por ejemplo las células hematopoyéticas, mientras otras dejan de dividirse muy pronto en el desarrollo y no se dividen nunca más, como son las neuronas.

La desregulación de la proliferación celular puede producir la transformación celular y el origen de un cáncer por lo que el estudio del control del ciclo celular es uno de los temas de investigación más relevantes en la actualidad.

Gran parte de los avances en el conocimiento del ciclo celular eucariota se han obtenido gracias al estudio de organismos modelo como las levaduras. A principios de los años 90 se hizo un descubrimiento que fue clave para la humanidad. Unos científicos británicos consiguieron que una levadura que tenía mutado un gen esencial para dividirse lo hiciera cuando sustituían el gen mutado por el equivalente humano. A partir de este descubrimiento se supo que el control de la división celular era universal, esto es, todos los organismos eucariotas se dividen usando más o menos la misma maquinaria de regulación.

Durante la progresión por el ciclo de división celular, la célula duplica primero su material genético, durante la fase de Síntesis, y más tarde, durante Mitosis, segrega (“reparte”) la información genética entre las dos células hijas. El ciclo celular se completa con la partición de la célula madre en dos células hijas: este proceso se conoce como Citocinesis. Las fases de síntesis y mitosis están separadas temporalmente por dos periodos de tiempo que se conocen como G1 y G2 (del inglés Gap). El periodo entre la fase S y M se conoce como G2 y el tiempo que transcurre entre M y fase S se conoce como G1. Durante estos “gaps” las células se preparan para la siguiente fase del ciclo celular.

El orden temporal de estos eventos es clave para la supervivencia celular y la célula cuenta con mecanismos de control que aseguran este orden. Durante el ciclo celular, no sólo se duplica la información genética, también se duplica la masa celular y ambos procesos deben estar coordinados de algún modo para evitar, por ejemplo, que una célula se divida sin duplicar su información genética o su masa.

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

Una célula tiene por tanto que 1) decidir si se divide o no en función de determinadas señales, 2) ordenar los eventos de división de modo que la duplicación del DNA preceda a la segregación, la citocinesis ocurra sólo cuando ambos eventos hayan ocurrido, etc y 3) coordinar la división y segregación del DNA con el crecimiento celular. Pero, ¿Cómo regula la célula estos procesos a nivel molecular?

La progresión a lo largo del ciclo celular está controlada en varios puntos de control o transiciones. Durante el ciclo celular hay tres puntos de control claves para la supervivencia celular, la primera es la transición G1/S, la célula decide si entre en fase S o no, la transición G2/M, las células deciden si entran en mitosis y segregan el DNA y la tercera es la transición Metafase/Anafase durante mitosis, donde se decide si la célula está preparada o no para hacer citocinesis. Estas decisiones dependen normalmente de que eventos previos a cada transición se hayan completado con éxito.

Las búsquedas genéticas de mutantes de ciclo celular incapaces de hacer cualquiera de estas transiciones han permitido la identificación de numerosos genes reguladores necesarios para cada punto de control del ciclo. La mayoría de los genes que controlan el ciclo celular son esenciales (en su ausencia la levadura se muere) por lo que los mutantes fueron seleccionados como mutantes condicionales, por ejemplo, mutantes que a una temperatura (temperatura permisiva) presentan un fenotipo silvestre y a otra (temperatura restrictiva) un fenotipo letal de ciclo celular o cdc-.

2. Morfogénesis celular

Las células eucariotas pueden adquirir múltiples formas y cada una ellas está optimizada para realizar una determinada función. Una forma celular determinada se consigue polarizando el crecimiento celular. La alteración de la polaridad, y consiguientemente la forma celular, puede conllevar, por ejemplo a que las células pierdan sus propiedades de adhesión y se escapen de un tejido, lo que suele tener dramáticas consecuencias para el organismo. En contraste con el crecimiento isotrópico, en el que la célula crece por adición de nuevas membranas a cualquier parte de la célula, durante el crecimiento polarizado, toda la adición de membrana está dirigida a los sitios de crecimiento.

3. *Schizosaccharomyces pombe* como organismo modelo

En esta práctica vamos a utilizar la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* como organismo modelo eucariótico para estudiar el control del ciclo celular y la morfogénesis. *S. pombe* tiene forma cilíndrica y crece por extensión de las puntas hasta que alcanza un tamaño máximo de unas 14 micras, momento en el que activa la entrada en mitosis y posteriormente la citocinesis. Tras la citocinesis las células se dividen simétricamente generando dos células hijas de idéntico tamaño. Esta levadura ha emergido en los últimos años como organismo modelo porque es un organismo simple de manejar en el laboratorio, permite el análisis genético, se conoce su genoma completo, y presenta un mayor parentesco con células animales que la levadura de gemación *S. cerevisiae*, (el organismo modelo eucariota mejor estudiado hasta la fecha). Durante la mayor parte de su ciclo de vida *S. pombe* crece y se divide como un organismo haploide, y tiene por tanto una sola copia de todo su material genético. En

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

condiciones nutricionales pobres, *S. Pombe* deja de proliferar y activa un programa de diferenciación sexual. Dos células de distinto sexo se encuentran, conjugan y forman un cigoto diploide. Este cigoto entra en meiosis y se produce la recombinación y reparto de la información genética en cuatro células de resistencia, llamados ascosporas que son de nuevo haploides. Las ascosporas germinan cuando las condiciones nutricionales son de nuevo favorables o alguna de las combinaciones génicas resultantes de la meiosis permite crecer en las condiciones adversas que indujeron el programa de diferenciación sexual dando comienzo a un nuevo ciclo.

Usando *S. Pombe* como organismo modelo y estrategias genéticas similares a las que se emplearon para aislar mutantes de ciclo celular, se han aislado múltiples mutantes de morfogénesis. La clonación y caracterización de estos mutantes nos están permitiendo entender cómo se polariza una célula para adquirir una determinada forma.

Objetivo

El objetivo de la práctica consiste en el análisis fenotípico de una serie de mutantes condicionales de genes reguladores del control del ciclo celular y la morfogénesis. Mediante la visualización al microscopio de los mutantes en diferentes condiciones, el uso de varias tinciones, así como de información extra que se os va a suministrar, vamos a inferir en qué momento del ciclo se quedan bloqueados cada uno de los mutantes. Con esos datos pondremos una ruta de control del ciclo celular.

4. Metodología

Día 0. Inocular los distintos mutantes a 25°C y crecer durante unas 12 horas.

Día 1.

1. Inocular los distintos mutantes a la temperatura permisiva de 25°C y a la temperatura restrictiva de 36°C durante 4-6 horas.
2. Centrifugar 500 µl de cultivo durante 1 minuto a 13,000 rpm, resuspender en 5 µl del mismo medio y poner 2 µl en una porta objetos. Observar al microscopio y anotar fenotipo en la tabla suministrada.
3. Algunos componentes de cada grupo va a realizar además una tinción específica de núcleos (DAPI) y una tinción de septos (Calcoflúor) de los distintos mutantes. Los datos se compartirán con el resto del grupo.

Protocolo para la tinción de septos y sitios de crecimiento mediante Calcoflúor.

1. Recoger en un eppendorf 500 µl de cultivo de los mutantes 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 crecidos a temperatura restrictiva.
2. Añadir 5 µl de Calcofluor (3.5 mg/ml, 100X).
3. Centrifugar 1 min. a 13,000 rpm para concentrar la muestra
4. Eliminar el sobrenadante dejando 4-5 µl de la muestra en la base del eppendorf.
5. Poner 2 µl en un portaobjetos y colocar el cubreobjetos (no mover el cubreobjetos una vez esté en contacto con la muestra).
6. Observar al microscopio de fluorescencia.

Protocolo tinción de nucleos mediante DAPI.

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

1. Recoger en un eppendorf 500µl de cultivo de los mutantes 0, 2, 3, 4, 5, 6. crecidos a temperatura restrictiva.
2. Centrifugar 1 min. a 13,000 rpm, eliminar la mayoría del sobrenadante y resuspender las células en los restantes 5-10µl de la muestra.
3. Añadir 100µl de Etanol al 70% para fijar las células y dejar 1-2 minutos para la completa fijación.
4. Recoger 5-10 µl del precipitado de células y poner en un cubreobjetos y dejar secar la muestra completamente.
5. Añadir 2µl de DAPI (5mg/ml) y poner el cubreobjetos (no mover el cubreobjetos una vez esté en contacto con la muestra).
6. Observar al microscopio de fluorescencia.

Análisis de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) de los distintos mutantes. La técnica de citometría de flujo permite la identificación del momento del ciclo celular que está una población de células determinada.

Día 2.

B. Análisis de la cinética de acumulación nuclear de un regulador de ciclo celular. Se entregará a cada grupo unas imágenes en la que se muestra un cultivo asincrónico de *S. Pombe* expresando uno de los reguladores clave para el control del ciclo celular fusionado a GFP. Analizando el patrón de expresión a lo largo del ciclo celular podremos inferir de que tipo de regulador se trata.

Práctica II. Disección de la ruta genética de entrada en dauer utilizando mutantes funcionales mediante ARN de interferencia (RNAi) en *Caenorhabditis elegans*.

Resumen

La técnica de RNA de interferencia permite la inactivación selectiva de un gen o transcrito mediante la expresión de un RNA antisentido del mRNA del gen que se pretende inactivar. Esta técnica se utiliza en muy diversos organismos, pero es especialmente eficaz y fácil de realizar en *C. elegans*. El fenotipo a estudiar será la formación de dauer, un estadio de resistencia de este gusano. Durante el desarrollo de esta práctica utilizaremos conjuntamente RNAi y mutantes termosensibles en la ruta de formación de dauer para diseñar una ruta genética que explique los resultados fenotípicos y de epistasia obtenidos.

Introducción

El estudio de mutantes es la herramienta básica de la Genética. Ante la pregunta de cómo funciona una cosa, la aproximación más eficaz casi siempre ha sido estropearlo. Este ha sido el camino de la Genética clásica en la que, estudiando mutaciones espontáneas o provocadas, se han podido dilucidar el papel que tenían los productos de los genes mutados en los organismos estudiados.

Caenorhabditis elegans como organismo modelo

C. elegans es un organismo modelo al igual que lo son *D. melanogaster* o *E. coli*. Su utilización como tal se debe en gran parte al esfuerzo del Premio Nobel de Medicina

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

Sydney Brenner. Por su fácil manejo y sus posibilidades es conocido a veces como el E. coli de los organismos pluricelulares.

C. elegans es un nematodo de la familia Rhabditidae. El adulto mide aproximadamente 1,5 mm. Tiene alrededor de 1000 células de las cuales más de 300 son células nerviosas. Podemos encontrar tanto hermafroditas, como machos. Su rango de temperatura fisiológico va desde los 15° C al los 25° C. Durante su desarrollo larvario pasa por 4 estadios L1, L2, L3 y L4 antes de convertirse en un adulto (Figura 11). Un gusano adulto vive como media 15 días y durante su periodo fértil, que corresponde a los primeros días de su vida adulta, puede llegar a poner de 300 y 1000 huevos. Se encuentran generalmente en el suelo y se han hecho aislamientos de *C. elegans* prácticamente en todas las partes del mundo. Es posible cultivarlo tanto en medio líquido como en sólido y puede congelarse.

El estadio de resistencia de *C. elegans* o estadio Dauer

Existe un estadio de desarrollo larvario especial conocido como fase dauer. Es una forma de resistencia. Cuando las condiciones son adversas (poca comida y sobrepoblación) un *C. elegans* en fase L1 puede tomar la decisión de seguir un desarrollo normal o entrar en dauer, previo paso por un estadio L2 especial (L2d) (Figura 11). Así, la fase dauer sería equivalente al L3 del desarrollo habitual. Los individuos en un estadio dauer puede pasar varios meses sin alimentarse, siendo más resistente a diferentes estreses como la desecación o la temperatura. Cuando las condiciones vuelven a ser favorables estos individuos pueden retomar su desarrollo habitual y entrar en L4 para continuar con una vida adulta indistinguible de la de un gusano que no haya pasado por dicho estadio. El control genético de este fenómeno ha sido estudiado en profundidad.

La técnica del RNA de interferencia o iRNA.

El fenómeno de la interferencia por ARN se conoce desde hace relativamente poco tiempo. Durante los años 80 se publicaron algunos artículos en los que la expresión de ARN antisentido de un gen en células de plantas provocaba la inhibición de la expresión del propio gen. Más tarde, se describieron algunos fenómenos conocidos como silenciamiento génico de los que no se conocía bien ni el mecanismo ni la causa que lo provocaba. La primera publicación en la que se utiliza ARN de doble cadena para controlar la expresión génica es de 1998. Fire y Mello publicaron un artículo titulado: "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*". Inyectando ARN de doble cadena conseguían interferir la expresión de un gen. Más tarde los propios autores se dieron cuenta de que si le daban de comer a los gusanos bacterias que estuvieran sintetizando el mencionado ARN de doble cadena, también se producía el mismo fenómeno. Este trabajo les ha valido a estos investigadores el Nobel de Fisiología y Medicina.

Con este sistema de interferencia es posible conseguir mutantes transitorios para un determinado gen de interés; se habla de knockdown, por analogía con el término knockout que se utiliza para un mutante de pérdida de función total. La potencia de este

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

sistema es tremenda, porque de una manera rápida y sencilla podemos hacer estudios de genética (inactivamos un gen y vemos qué pasa) sin tener que fabricar o buscar el mutante. Además en la actualidad existen bibliotecas de RNAi en las que están representadas la mayoría de los genes de *C. elegans* con lo que solo tenemos que descongelar la bacteria que contenga el clon que nos interesa y hacer nuestro experimento. Además, estas bibliotecas nos permite hacer búsquedas masivas a lo largo de todos los genes representados en ella para ver si participan en algún proceso concreto. Podríamos ver, por ejemplo, todos los genes cuyo knockdown inducen el estadio dauer de forma constitutiva y los que nunca lo inducen en las condiciones fisiológicas en que debería hacerlo.

La interferencia mediante ARN es un fenómeno celular normal ampliamente utilizado por todos los organismos. Los iRNAs funcionarían como elemento regulador, aunque también podrían tener una función en la lucha contra las infecciones víricas. Actualmente existe un gran interés biotecnológico en este campo por las posibles aplicaciones terapéuticas de esta tecnología.

Objetivo: Diseñar una ruta genética que explique los fenotipos observados en relación a la formación de dauer en las diferentes condiciones y combinación de mutantes

Durante la práctica vamos a utilizar cepas mutantes que tienen afectados genes importantes para la regulación de la formación de dauer. Tendremos 3 cepas: N2 que es la cepa silvestre, mutante-2 (m577) y mutante-7 que forman dauer de una forma constitutiva a pesar de que no se den las condiciones ambientales que provocan la entrada en el estadio dauer. Esta entrada constitutiva en dauer si es dependiente de temperatura, solo a alta temperatura se da, puesto que los mutantes que usaremos son termosensibles.

Además utilizaremos bacterias que están transformadas con un plásmido que les permite producir grandes cantidades de ARN de doble cadena. Cada una de estas cepas bacterianas producirá un ARN específico para un gen determinado de *C. elegans* y las nombraremos como RNAi más el nombre del propio gen.

Día 1

Protocolo

Cada alumno tendrá 5 placas sembradas con bacterias que producirán 5 RNAi diferentes:

- iRNA-16
- iRNA-5
- iRNA-12
- iRNA-440 (control negativo)
- iRNA-22 (control positivo)

En cada una de las placas inocularemos 3 adultos hermafroditas de un mismo tipo de gusano mutante (que podrá ser o mutante-2 o mutante-7). Al menos un par de alumnos utilizaran la cepa silvestre N2 para el experimento, como control. Los gusanos los

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

dejamos creciendo y multiplicándose en una estufa a una temperatura de 25°C.

Día 2.

Revisamos a la lupa los fenotipos de los descendientes de los 3 hermafroditas que colocamos en las placas anotando si observamos dauers, adultos o ambos. Más tarde pondremos todos nuestros resultados en común.

6. METODOLOGÍA Y RECURSOS

METODOLOGÍA

Los métodos didácticos se pueden clasificar en varias categorías de acuerdo al tipo de enseñanza que se imparta, estos métodos son:

Tradicional: Lección magistral, prácticas, problemas y seminarios.

PBL: docencia basada en el uso de problemas reales y su resolución para el aprendizaje (problem based learning).

Web: docencia con utilización de la red como soporte para las actividades de alumnos y profesores.

Mixto: Uso de la metodología tradicional y de PBL.

Todos: Cuando se usan los tres tipos básicos: tradicional, PBL y web. Con diferente grado de implantación dependiente del tipo de asignaturas.

De acuerdo con esta clasificación, en la asignatura de Genética Molecular se usa un método didáctico mixto, basado en clases magistrales, prácticas, resolución de problemas y discusión en clase de los resultados y realización y exposición de trabajos científicos.

El uso de la web a través de la herramienta WebCT no se usa como método didáctico en sí, si no, como herramienta de interfase entre los estudiantes y el profesor para compartir contenidos y material didáctico, así como, un método permanente de comunicación que, a veces, es incluso en tiempo real.

Las clases presenciales se realizan en el aula y tienen una duración de unos 50 minutos. Los primeros 5 minutos de cada clase se emplean si es necesario para discutir aspectos de planificación así como para la resolver posibles dudas de la clase anterior.

Las clases prácticas se realizan en los laboratorios de prácticas y comienzan con una breve explicación del sentido de la práctica en concreto y una planificación de la misma. Se estimula el trabajo y la reflexión individual pero también el trabajo, la organización y

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

la planificación en grupo, que en definitiva en la forma de trabajo en la mayoría de las empresas y centros de investigación donde los estudiantes recalarán una vez terminen su formación.

Las series de problemas que se resuelven durante el curso pretende fomentar el conocimiento a través del estudio, el análisis y la resolución de los mismos. Aunque no sea el objetivo final, la resolución de problemas también fomenta el trabajo en grupo. La exposición y defensa en clase de la solución a las series de problemas obliga al trabajo y a la reflexión individual. Además de las series de problemas que se entregan al estudiante, se podrán entregar series de problemas extra (que no tienen puntuación) si durante el curso el profesor advierte de alguna laguna de conocimiento en algunos de los aspectos que sean necesarios para entender y razonar sobre cualquier parte de la asignatura.

Los trabajos científicos tienen como objetivo estimular la búsqueda bibliográfica, la selección de artículos científicos y temas de investigación relevantes en la actualidad, la exposición del estudiante a diferentes metodologías experimentales que deben entender e interpretar, primero, y exponer de forma coherente después, así como, un esfuerzo de síntesis, puesto que los trabajos, como hemos visto, tienen una extensión limitada.

Los estudiantes cuentan con la posibilidad de realizar tutorías individuales o en grupo por lo que cuentan durante todo el proceso de aprendizaje con el apoyo constante del profesor.

RECURSOS:

Los estudiantes cuentan con una serie de recursos para cumplir las competencias que de ellos se esperan. Estos recursos son:

1. Aulas para impartición de clases de teoría, seminarios, conferencias, debates, etc.

Las aulas están dotadas de una cañón de vídeo y de un ordenador con acceso directo a internet via WiFi. En general las clases están bien dotadas, contando con suficiente luz y aireación además de calefacción y aire acondicionado que funcionan con normalidad.

2. Laboratorios de Prácticas

Los laboratorios de prácticas cuentan con una instrumental adecuado y en buenas condiciones. El número de estudiantes por práctica está limitado por ley a 20 por lo que no se producen en ningún momento una masificación del laboratorio

3. Biblioteca

La biblioteca de la UPO además de ser un sitio de lectura y estudio es un sitio de convivencia para muchos estudiantes y es ahí donde se reúnen para realizar trabajos en equipo en muchos casos. La biblioteca cuenta con un gran número de manuales de texto disponibles para consulta. Ordenadores de acceso directo a internet y acceso directo a un gran número de revistas científicas. La universidad Pablo de Olavide cuenta con un gran número de suscripciones a revistas científicas de varias disciplinas. El acceso a estas revistas es gratuito para el estudiante.

4. Ordenadores

Los estudiantes cuentan con ordenadores de uso común, además y dado que muchos de ellos tienen sus propios equipos, la UPO posee una conexión inalámbrica a internet via

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

WiFi en todo el campus para dar servicio a esta necesidad.

5. Docencia virtual

La UPO tiene en funcionamiento una herramienta didáctica conocida como webCT que provee al profesor y al estudiante de un espacio para interactuar que puede ir desde la docencia virtual completa hasta el uso de esta herramienta como complemento a la interacción in situ y diaria.

7. EVALUACIÓN

La asignatura de Genética Molecular se evaluará de forma continua y la nota final será la suma de la nota del examen final y de las notas de las distintas actividades como son las dos series de problemas, un examen corto y la presentación de un trabajo escrito. Las puntuaciones para cada apartado son las siguientes:

Resumen de puntuaciones:

Series de problemas (2 x 0.5)	1 punto
Examen corto	2 punto
Trabajo	1 punto
Evaluación práctica I	1 punto
Evaluación práctica II	1 puntos
Examen final	4 puntos

El aprobado se consigue con 5 puntos.

Examen corto. Este examen consistirá en la resolución en clase y durante unos 45 minutos de uno o dos problemas similares al tipo de problema que se resuelven en la serie de problemas.

Examen final primera convocatoria

El examen final primera convocatoria. consistirá en la resolución de varios problemas parecidos a los que se han resuelto en las series de problemas y examen corto además de varias preguntas. En algunas de estas preguntas se evaluará positivamente la utilización de determinados términos, o palabras clave, previamente seleccionados por el profesor, siempre que el texto tenga sentido y sea coherente.

El examen final, segunda convocatoria. Este examen será del mismo tipo que en la primera convocatoria y se mantendrán todas las notas de la evaluación continua.

GUÍA DOCENTE

Curso 2012-2013

8. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Stem Cells Handbook. 2004.

Editor: Stewart Sell.

ISBN: 978-1-58829-113-4

MAP Kinase Signaling Protocols 2004

Editor: Rony Seger

ISBN: 0-89603-998-6

Cellular Programming and Reprogramming: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology). 2010

Editor: Sheng Ding

ISBN: 1607616904

Lewin B. Genes VII. Marbán, cop. 2003.

Klug W.S. Cummings, M.R. y Spencer C.A. 2006 “Conceptos de Genética”. Prentice Hall 2006.

Genética. Un enfoque conceptual. 2ª Edición. Pierce.

The cell cycle control. Principles of control. David O. Morgan. Oxford University Press 2007.

Griffiths y col. “Genética” Mc Graw Hill 2000