

**Máster 2009-2010 - UAM**  
**Módulo BM5: GENÓMICA, PROTEÓMICA Y MODIFICACIÓN GENÉTICA**  
**Másters de Biomedicina Molecular, Biotecnología,**  
**y de Biología Molecular y Celular**  
**28 Septiembre-3 Noviembre 2009 15:00-16:30 horas**  
**Aula I de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid**

**Profesores:**

**Jesús Cruces (IIB-UAM/CSIC) - coordinador**  
tel. 914975406  
[jesus.cruces@uam.es](mailto:jesus.cruces@uam.es)

**Lluís Montoliu (CNB-CSIC) - coordinador**  
tel. 915854844  
[montoliu@cnb.csic.es](mailto:montoliu@cnb.csic.es)

**Sagrario Ortega (CNIO)**  
tel. 912246987  
[sortega@cnio.es](mailto:sortega@cnio.es)

**Ignacio Palmero (IIB-UAM/CSIC)**  
tel. 915854491  
[ipalmero@iib.uam.es](mailto:ipalmero@iib.uam.es)

**Miguel Manzanares (CNIC)**  
tel. 914531311  
[mmanzanares@cnic.es](mailto:mmanzanares@cnic.es)

**José Fernández Piqueras (CBMSO-UAM/CSIC)**  
Tel. 911964627  
[jf.piqueras@uam.es](mailto:jf.piqueras@uam.es)

**Belén Peral (IIB-UAM/CSIC)**  
tel. 915854478  
[bperal@iib.uam.es](mailto:bperal@iib.uam.es)

**María Jesús Bullido (CBMSO-UAM/CSIC)**  
Tel. 911964567  
[mjbullido@cbm.uam.es](mailto:mjbullido@cbm.uam.es)

**Profesores invitados**

**Juan Antonio López (CNIC)**  
tel. 914531216  
[jalopez@cnic.es](mailto:jalopez@cnic.es)

**Damián García Olmo (Hospital La Paz)**  
tel. 914975494  
[damian.garcia@uam.es](mailto:damian.garcia@uam.es)

**Janet Hoenicka (Hospital 12 de Octubre)**  
tel. 913908765  
[jhoenicka.hdoc@salud.madrid.org](mailto:jhoenicka.hdoc@salud.madrid.org)

## PROGRAMA DE CLASES

### **Lunes, 28 de septiembre de 2009**

Presentación del módulo BM5.

#### **Coordinadores y Profesores**

Organización del Genoma Humano.

**José Fernández Piqueras**, CBMSO-UAM/CSIC

### **Martes, 29 de septiembre de 2009**

Mapas físicos del Genoma Humano

**Jesús Cruces**, IIB-UAM/CSIC

### **Miércoles, 30 de Septiembre de 2009**

Mapas genéticos. Análisis de ligamiento genético

**Belén Peral**, IIB-CSIC/UAM

### **Jueves, 1 de octubre de 2009**

Enfermedades hereditarias monogénicas. Mutaciones patológicas

**Belén Peral**, IIB-UAM/CSIC

### **Viernes, 2 de octubre de 2009**

Enfermedades complejas. Interacciones. Asociación genética. Polimorfismos de base única y de número de copia.

**Mª Jesús Bullido**, CBMSO-UAM/CSIC

### **Lunes, 5 de octubre de 2009**

Epigenética

**José Fernández Piqueras**, CBMSO-UAM/CSIC

### **Martes, 6 de octubre de 2009**

Herramientas genómicas para el estudio de patología humana

**Mª Jesús Bullido**, CBMSO-UAM/CSIC

### **Miércoles, 7 de octubre de 2009**

Proteómica: Aspectos básicos y aplicaciones al estudio de la fisiopatología humana

**Juan Antonio López**, CNIC

### **Jueves, 8 de octubre de 2009**

Realidades clínicas de la terapia celular. Aplicaciones e investigación traslacional.

**Damián García Olmo**, Hospital La Paz

### **Viernes, 9 de octubre de 2009**

Farmacogenética y farmacogenómica

**Janet Hoenicka**, Hospital 12 de Octubre

### **Lunes, 12 de octubre de 2009**

FESTIVO - Fiesta Nacional – **Día no lectivo**

**Martes, 13 de octubre de 2009**

**SEMINARIO PARTICIPATIVO 1**

**M<sup>a</sup> Jesús Bullido, Jesús Cruces, José Fernández Piqueras y Belén Peral**

**Miércoles, 14 de octubre de 2009**

Uso del ratón en biomedicina: historia, genética

**Miguel Manzanares, CNIC**

**Jueves, 15 de octubre de 2009**

Biología y desarrollo del ratón

**Miguel Manzanares, CNIC**

**Viernes, 16 de octubre de 2009**

Animales transgénicos clásicos, genómicos, inducibles, aplicaciones y limitaciones

**Lluís Montoliu, CNB-CSIC**

**Lunes, 19 de octubre de 2009**

FESTIVO - Fiesta de la Facultad de Medicina – **Día no lectivo**

**Martes, 20 de octubre de 2009**

Células ES y ratones Knockouts clásicos

**Sagrario Ortega, CNIO**

**Miércoles, 21 de octubre de 2009**

Ratones Knockouts inducibles/específicos de tejido, ratones knockins

**Sagrario Ortega, CNIO**

**Jueves, 22 de octubre de 2009**

Gene Traps (trampas génicas)

**Ignacio Palmero, IIB-UAM/CSIC**

**Viernes, 23 de octubre de 2009**

**SEMINARIO PARTICIPATIVO 2**

**Miguel Manzanares, Lluís Montoliu, Sagrario Ortega, Ignacio Palmero**

**Lunes, 26 de octubre de 2009**

Animales transgénicos con lentivirus, transposones, transferencia nuclear, nuevos métodos

**Lluís Montoliu, CNB-CSIC**

**Martes, 27 de octubre de 2009**

**SEMINARIO PARTICIPATIVO 3**

**Miguel Manzanares, Lluís Montoliu, Sagrario Ortega, Ignacio Palmero**

**Miércoles, 28 de octubre de 2009**

Análisis genómico funcional en el ratón: herramientas informáticas, casos prácticos

**Lluís Montoliu, CNB-CSIC**

**Jueves, 29 de octubre de 2009**

RNAi: fundamentos y aplicaciones en transgénesis animal

**Ignacio Palmero, IIB-CSIC/UAM**

**Viernes, 30 de octubre de 2009**

**SEMINARIO PARTICIPATIVO 4**

**Miguel Manzanares, Lluís Montoliu, Sagrario Ortega, Ignacio Palmero**

**Lunes, 2 de noviembre de 2009**

Proyección comentada de videos sobre ratones transgénicos, células ES y ratones knockout, Moderadores: **Lluís Montoliu, Sagrario Ortega**

**Martes, 3 de noviembre de 2009**

**EXAMEN MÓDULO BM5**

**M<sup>a</sup> Jesús Bullido, Jesús Cruces, José Fernández Piqueras, Miguel Manzanares, Lluís Montoliu, Sagrario Ortega, Ignacio Palmero y Belén Peral.**

## GUIONES DE CLASES

### **GENOME ORGANIZATION**

**José Fernández Piqueras, CBMSO-UAM/CSIC**

**Lunes, 28 de septiembre de 2009**

1. Structure and organization of the human genome
2. DNA sequences and patterns of distribution
3. Coding and non-coding genes
4. RNA interference
5. HapMap and ENCODE projects
6. The human gene in the post-ENCODE era

#### **References:**

- Feuk L, Carson AR and Scherer SW (2006) Structural variation in the human genome. *Nature Rev Genet* 7: 85-97.
- Gerstein et al (2007) What is a gene, post-ENCODE?. History and updated definition. *Genome Res* 17: 669-681.
- Huttenhofer A and Schattner P (2006) The principles of guiding by RNA: chimeric RNA-protein enzymes. *Nature Rev Genet* 7: 475-482.
- Levy et al (2007) The diploid genome of an individual human. *PLoS Biol* 5: e254.
- Lupski JR (2007) Structural variation in the human genome. *NEJM* 356: 1169-1171.
- Strachan T. and Reads (2004) *Human Molecular genetics* 3. Garland Science.
- Science: número monográfico de 16 de Febrero de 2001
- Nature: número monográfico de 15 de Febrero de 2001.
- The International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome *Nature* 437 (27 de Octubre)
- Southeimer EJ & Carthew RW (2005) Silence from within: siRNAs and miRNAs. *Cell* 122: 9-12.
- Zeng Y (2006) Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene* 25: 6156-6162.

## PHYSICAL MAPPING OF THE HUMAN GENOME: LOW- AND HIGH-RESOLUTION

Jesús Cruces, IIB-UAM/CSIC

Martes, 29 de septiembre de 2009

### 1. Physical Maps:

#### A. Low-Resolution Physical Maps:

- a. Chromosome mapping
- b. Somatic Cell Hybrid Panels
- c. Radiation hybrids panels

#### B. High-Resolution Physical Maps:

- a. Chromatin and DNA fiber FISH
- b. Long-range restriction mapping
- c. Assembly of high molecular weight genomic clones (contigs)
- d. STSs (Sequence Tag Sites) map
- e. ESTs (Expressed Sequence Tags) map

2. **Genetic Maps:** To be explained the next day.

3. **Integrated Physical And Genetic Maps: Genomic browsers.** Explained in BM1.

### References:

Brown, T.A. (2002). "Genomes". BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford. Second edition.

Strachan, T. and Read, A. (2004). "Human Molecular Genetics". BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford. Third edition.

Pasternak, D. (2005). "An Introduction to Human Molecular Genetics: Mechanisms of Inherited Diseases". Wiley-Liss. Second edition.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K and Walter, P. (2007) "Molecular Biology of the Cell". Garland. Fifth Edition.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P., (2007). "Molecular Cell Biology". Freeman. Sixth edition.

Dennis, C. and Gallagher, R. (2002). "The Human Genome". Palgrave Macmillan.

## MAPAS GENÉTICOS. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO GENÉTICO

Belén Peral, IIB-UAM/CSIC

Miércoles, 30 de septiembre de 2009

El mapa genético es otra estrategia para localizar genes en patología humana.

1. Principio de la combinación independiente. Genes ligados.
2. Concepto de ligamiento genético, frecuencia de recombinación, distancia genética.
3. Relación entre la distancia física y genética.
4. Marcadores genéticos.
5. Análisis de ligamiento genético. Concepto de lod score.
6. Tratamiento estadístico: análisis paramétricos y no paramétricos.

### Referencias

- Brown, T.A. (2002). "Genomes". BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford. Second edition.
- Read, A. and Donnay, D. (2009) "Nueva Genética Clínica" . Editorial Omega.
- Stratchan, T. and Read, A. (2004). "Human Molecular Genetics". BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford. Third edition.
- Ott, J (1985) "Analysis of human genetic linkage", John Hoskins Univer. Press Baltimore.
- Blanca E, Himes BE, Hunninghake GM, et al. (2009). Genome-wide Association Analysis Identifies *PDE4D* as an Asthma-Susceptibility Gene. *The American Journal of Human Genetics* 84(5) 581 – 593
- Sieh W, et al (2007) Accounting for Linkage Disequilibrium among Markers in Linkage Analysis: Impact of Haplotype Frequency Estimation and Molecular Haplotypes for a Gene in a Candidate Region for Alzheimer's Disease. *Human Heredity* 63(1):26-34
- The Autism Genome Project Consortium (2007) Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature Genetics* 39: 319-328
- Theusch E, Gitschier AB et al (2009). Genome-wide Study of Families with Absolute Pitch Reveals Linkage to 8q24.21 and Locus Heterogeneity. *The American Journal of Human Genetics* 85(1) 112-119
- Xiaoyi Gao, Eden R. Martin, Yutao Liu (2009). Genome-wide Linkage Screen in Familial Parkinson Disease Identifies Loci on Chromosomes 3 and 18. *The American Journal of Human Genetics* 84(4) 499-504

## ENFERMEDADES HEREDITARIAS MONOGÉNICAS. MUTACIONES PATOLÓGICAS

Belén Peral, IIB-UAM/CSIC

Jueves, 1 de octubre de 2009

1. Enfermedades monogénicas: Autosómicas Dominantes; Autosómicas Recesivas; Recesivas ligadas al cromosoma X; Dominantes ligadas al cromosoma X.
2. Enfermedades mitocondriales
3. Enfermedades complejas o de herencia poligénica.
4. Diagnóstico genético directo
5. Diagnóstico genético indirecto
6. Qué es una mutación y tipos de mutaciones
  - a. Silenciosas: Cambios sinónimos y Cambios no sinónimos
  - b. No-silenciosas: Cambios no sinónimos (cambios sin sentido, deleciones, inserciones, mutaciones que afectan al *splicing* de exones, al regiones reguladoras, etc.)
  - c. Mutaciones pueden modificar, o no, la fase de lectura: consecuencias.
7. Métodos de búsqueda de nuevas mutaciones y de localización de mutaciones identificadas

### Referencias

Brown, T.A. (2002). "Genomes". BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford. Second edition.

Read, A. and Donnay, D. (2009) "Nueva Genética Clínica" . Editorial Omega.

Strachan, T. and Read, A. (2004). "Human Molecular Genetics". BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford. Third edition.

Brook-Carter PT, Peral B, Ward CJ, et al. (1994). Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease - a contiguous gene syndrome. *Nature Genet* 8:328-332.

Peral B, Gamble V, San Millán JL, et al. (1995). Splicing mutations of the polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene induced by intronic deletion. *Hum Mol Genet* 4:569-57.

Peral B, Gamble V, Strong C, et al. (1997). Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 gene (*PKD1*) by a novel approach.. *Am J Hum Genet* 60: 1399-1410.

Rossetti S, Strmecki L, Burton S, et al. (2001). Mutation analysis of the entire *PKD1* Gene: Genetic and Diagnostic Implications. *Am J Hum Genet* Vol 68: 46-63.

## ENFERMEDADES COMPLEJAS. INTERACCIONES. ASOCIACIÓN GENÉTICA. POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA Y DE NÚMERO DE COPIA.

María Jesús Bullido, CBMSO-UAM/CSIC

Viernes, 2 de octubre de 2009

1. Enfermedades complejas o “cuantitativas”: Interacciones gen-gen, gen-factor ambiental. Módulos genéticos.
2. Métodos para estudiar la participación de los genes en las enfermedades complejas. Asociación/ligamiento. Análisis de asociación “genómicos” (GWAs).
3. Marcadores genéticos para el estudio de enfermedades complejas:
  - a. Polimorfismos de base única (SNPs); variantes de nº de copia (CNVs).
  - b. Bases de datos de variantes / haplotipos: dbSNP, DGV, HapMap.
  - c. Herramientas de selección de variantes funcionales: PupaSuite, F-SNP...
  - d. Bases de datos de polimorfismos asociados a enfermedades; ej: Alzgene, Polygenic Pathways.
4. Aplicaciones de la genética a las enfermedades complejas:
  - a. Estudio de mecanismos patogénicos.
  - b. Definición de “perfiles de riesgo”.
  - c. Búsqueda de dianas terapéuticas

### Referencias

- “Genetic Dissection of Complex Traits” (D. C. Rao and C. C. Gu, eds.), 2nd Edition (2008). Series “Advances in Genetics. Volume 60, Pages 1-760”. Academic Press, San Diego.
- Zhang X, Li L, Wei D, Yap Y, Chen F. Moving cancer diagnostics from bench to bedside. Trends Biotechnol. 2007 Apr;25(4):166-73. Review.
- Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. (2007) "Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database." Nat Genet 39(1): 17-23.
- Carter, CJ: Schizophrenia susceptibility genes converge on interlinked pathways related to glutamatergic transmission and long-term potentiation, oxidative stress and oligodendrocyte viability Schiz. Res, 86, 1-14, 2006
- Korn JM, Kuruvilla FG, McCarroll SA, Wysoker A, Nemesh J, Cawley S, Hubbell E, Veitch J, Collins PJ, Darvishi K, Lee C, Nizzari MM, Gabriel SB, Purcell S, Daly MJ, Altshuler D. (2008). Integrated genotype calling and association analysis of SNPs, common copy number polymorphisms and rare CNVs. Nat Genet. 40(10):1253-60
- Phillips C. Online resources for SNP analysis: a review and route map. Mol Biotechnol. 2007 Jan;35(1):65-97. Review.
- Teufel A, Krupp M, Weinmann A, Galle PR. Current bioinformatics tools in genomic biomedical research (Review). Int J Mol Med. 2006 Jun;17(6):967-73. Review.
- Reumers J, Conde L, Medina I, Maurer-Stroh S, Van Durme J, Dopazo J, Rousseau F, Schymkowitz J. Joint annotation of coding and non-coding single nucleotide polymorphisms and mutations in the SNPeffect and PupaSuite databases. Nucleic Acids Res. 2008 Jan;36(Database issue):D825-9. Epub 2007 Dec 17.
- Conde L, Vaquerizas JM, Dopazo H, Arbiza L, Reumers J, Rousseau F, Schymkowitz J, Dopazo J. PupaSuite: finding functional single nucleotide polymorphisms for large-scale genotyping purposes. Nucleic Acids Res. 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W621-5.
- Lee PH, Shatkay H. F-SNP: computationally predicted functional SNPs for disease association studies. Nucleic Acids Res. 2008 Jan;36(Database issue):D820-4. Epub 2007 Nov 5.

### Páginas web:

Entrez (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery>  
ENSEMBL <http://www.ensembl.org/index.html>  
UCSC <http://genome.ucsc.edu/>

### Bases de datos de variantes en el genoma humano

dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>  
HapMap: <http://www.hapmap.org/index.html.en>  
DGV: <http://projects.tcag.ca/variation/>

### Herramientas de búsqueda de SNPs funcionales

Pupasuite: <http://pupasuite.bioinfo.cipf.es/>  
F-SNP: <http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/>

Genes asociados con enfermedades neuropsiquiátricas complejas:

[www.alzgene.org](http://www.alzgene.org), [www.pdgene.org](http://www.pdgene.org), [www.szgene.org](http://www.szgene.org), [www.polygenicpathways.co.uk](http://www.polygenicpathways.co.uk)

## EPIGENETIC

José Fernández Piqueras, CBMSO-UAM/CSIC

Lunes, 5 de octubre de 2009

1. Concept of Epigenetic
2. Molecular mechanisms.
3. Epigenetic changes during gametogenesis and embryogenesis.
4. Gametic and post-zigotic imprinting.
5. Epigenetic, aging and cancer.

### References:

- Bernstein BE, Meissner A and Lander ES (2007) The mammalian epigenome Cell 128: 669-681.
- Feinberg AP et al (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. Nat Rev Genet 7: 21.
- Esteller M (2007) Cancer Epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nature Rev Genet 8: 286-298.
- Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. New England J Med. 358: 1148.
- Fraga M & Esteller M (2002) DNA methylation: a profile of methods and applications. Biotechniques 297: 1807.
- Jones PA & Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet 3: 415.
- Laird (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. Nature Rev Genet 3: 253-266
- Lee (2003) Molecular links between X-inactivation and autosomal imprinting: X-inactivation as a driving force for the evolution imprinting. Current Biol 13: 242-254
- Li (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development Nat Rev Genet 3: 662.
- Minucci S & Pelicci PG (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments of cancer. Nat Rev Cancer 6: 38.
- Park KY & Pfeifer K (2003) Epigenetic interplay. Nat Genet 34: 126.
- Reik W & Walter J (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. Nat Rev Genet 2: 21.
- Robertson KD (2006) DNA methylation and human disease. Nat Rev Genet 6: 597.
- Suzuki MM & Bird A (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nature Rev. Genet 9: 465.

## HERRAMIENTAS GENÓMICAS PARA EL ESTUDIO DE PATOLOGÍA HUMANA.

María Jesús Bullido, CBMSO-UAM/CSIC

Martes, 6 de octubre de 2009

1. *Microarrays* de DNA. Fundamento de la técnica.
2. Estudio del genoma a nivel de RNA. DNA *microarrays* como técnica para el análisis comparado de la expresión génica. Aplicaciones en biomedicina (Ejemplos).
3. Estudio del genoma a diferentes niveles: microRNA.
4. Estudio del genoma a diferentes niveles: variantes de *splicing*.
5. Estudio del genoma a diferentes niveles: SNPs. Aplicación a los estudios de asociación genética.
6. Estudio del genoma a diferentes niveles: variantes de número de copia (CNV).
7. Uso de *microarrays* en la clínica (Ejemplos).

### Referencias

- Beaudet AL, Belmont JW. Array-based DNA diagnostics: let the revolution begin. *Annu Rev Med.* 2008;59:113-29. Review.
- Trevino V, Falciani F, Barrera-Saldaña HA. DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. *Mol Med.* 2007 Sep-Oct;13(9-10):527-41. Review
- Nie L, Wu G, Culley DE, Scholten JC, Zhang W. Integrative analysis of transcriptomic and proteomic data: challenges, solutions and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2007 Apr-Jun;27(2):63-75. Review.
- Maynard JA, Myhre R, Roy B. Microarrays in infection and immunity. *Curr Opin Chem Biol.* 2007 Jun;11(3):306-15. Review

## PROTEÓMICA: ASPECTOS BÁSICOS Y APLICACIONES AL ESTUDIO DE LA FISIOPATOLOGÍA HUMANA.

Juan Antonio López, CNIC

Miércoles, 7 de octubre de 2009

Introducción a los conceptos básicos de la proteómica y su aplicación al estudio de los procesos biológicos y patológicos en humanos y modelos animales de sus enfermedades.

1. Proteómica. Definición.
2. Preparación de extractos proteicos.
3. Separación electroforética de proteínas: Geles bidimensionales (2-DE).
  - a. Isoelectroenfoco: Separación por punto isoeléctrico.
  - b. PAGE/SDS: Separación por tamaño aparente.
  - c. Tinción de proteínas.
4. Análisis de imágenes de geles.
5. Expresión proteica diferencial basada en geles 2D: DIGE.
6. Separación cromatográfica de proteínas y péptidos.
7. Identificación de proteínas: Espectrometría de masas (MS).
  - a. Fuentes de ionización MALDI y ESI.
  - b. Analizadores de masas: TOF, Trampa iónica, cuadrupolo, Orbitrap.
8. Expresión proteica diferencial basada en MS..
9. Modificaciones post-traduccionales; complejos proteicos..
10. Ejemplos de análisis proteómico diferencial en patologías humanas y modelos animales.

### Referencias

- Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003, 422, 198-207.
- Buey RM, Calvo E, Barasoain I, et al. Cyclostreptin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites. *Nature Chem. Biol.* 2007, 3, 117-125.
- Castillo L, Calvo E, Martínez AI, Ruiz-Herrera J, Valentin E, Lopez JA & Sentandreu R. A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. *Proteomics* 2008, 8, 3871–3881.
- Coiras M, Camafeita E, Ureña T, Lopez JA et al. Modifications in the human T cell proteome induced by intracellular HIV-1 Tat protein expression. *Proteomics* 2006, 6, S63-S73.
- Corton M, Botella-Carretero JI, Lopez JA, et al. Proteomic analysis of human omental adipose tissue in the polycystic ovary syndrome using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Hum Reprod* 2008, 23, 651-61.
- Corton, M., Villuendas, G., Botella, J. I, et al., Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide. *Proteomics* 2004, 4, 438-441.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M. et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics* 2005, 37, 391-400.
- Kumar C, Mann M. Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets. *FEBS Letters* 2009, 583, 1703–1712.
- Lizarbe TR, Garcia-Rama C, Tarin C, et al. Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair. *FASEB J* 2008, 22, 3207-3215.
- Mann M., Kelleherb NL. Precision proteomics: The case for high resolution and high mass accuracy. *Proc Natl Acad Sci* 2008, 105, 18132–18138.
- Pérez-Pérez R, Ortega-Delgado FJ. Et al. Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unlike biochemical and metabolic properties. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 1682–1693.
- Rollin R, Marco F, Camafeita E, et al. Differential proteome of bone marrow mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients. *Osteoarthr Cartil* 2008, 16, 929-35.
- Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004, 5, 699-711.

## REALIDADES CLÍNICAS DE LA TERAPIA CELULAR: APLICACIONES E INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL.

Damián García Olmo, Hospital La Paz

Jueves, 8 de octubre de 2009

1. Conceptos
  - a. Células madre
  - b. Terapia Celular
  - c. Medicina Regenerativa
2. Bases para una buena investigación traslacional en terapia celular
  - a. El ensayo clínico y sus fases
  - b. Bioseguridad
3. Ensayos clínicos en terapia celular
  - a. Desarrollo histórico
  - b. Situación actual: realidades clínicas
4. Terapia celular en cirugía: Nuestro proyecto
  - a. Células madre y cicatrización
  - b. Cura de fístulas con células madre: de la clínica al laboratorio...y del laboratorio a la clínica.
5. Una mirada al futuro

### **Referencias**

- García Olmo D, García Verdugo JM, Alemany J, Gutierrez Fuentes JA. Cell Therapy. Madrid: Editorial McGraw-Hill Interamericana; 2008
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284 (5411): 143-147.
- Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 102-108.
- García-Olmo D, Herreros D, García-Arranz M. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(9):1417-23.
- Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; 8 (6): 607-612.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6(11):1229-34.
- Morizono K, De Ugarte DA, Zhu M, Zuk P, Elbarbary A, Ashjian P, et al. Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles. *Hum Gene Ther*. 2003 Jan 1;14(1):59-66.
- Phinney DG, Prockop DJ. Mesenchymal stem/ Multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair current views. *Stem Cells* 2007; 25: 2896-2902.
- Planat-Bernard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells Physiological and Therapeutic Perspectives. *Circulation* 2004; 109: 656-663.
- Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2006;312(12):2169-79.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98 (9): 2615-2625.
- Rigotti G, Marchi A, Galià M, Baroni G, Benati D, Krampner M, et al. Clinical Treatment of Radiotherapy Tissue Damage by Lipoaspirate Transplant: A Healing Process Mediated by Adipose-Derived Adult Stem Cells. *Plast Reconstr Surg* 2007; 119(5):1409-1422.
- Rubio D, García-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2005 Apr 15; 65 (8):3035-9.
- Schuldt A, Rosen M, Gaudette G, Cohen I. Repairing damaged myocardium: evaluating cells used for cardiac regeneration. *Curr treat options Cardiovasc Med* 2008; 10:59-72.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131(5):861-72.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282 (5391): 1145-1147.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61 (4): 364-370.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brains of rats. *Exp Neurol* 2002; 174 (1): 11-20.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211-28.

## **FARMACOGENÉTICA Y FARMACOGENÓMICA**

**Janet Hoenicka, Hospital 12 de Octubre**

**Viernes, 9 de octubre de 2009**

1. Concepto y objetivos de la farmacogenética y farmacogenómica
2. Farmacogenética del metabolismo de fármacos
  - a. Reacciones de la Fase I: el gen CYP2D6
  - b. Reacciones de la Fase II: el gen TPMT
3. Herencia de rasgos farmacogenéticos
  - a. Estudios farmacogenéticos en pacientes con esquizofrenia
4. Farmacogenómica
  - a. Descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas
  - b. Diferenciación de análogos farmacológicos
  - c. Toxicogenómica

### **Referencias**

- Evans WE, Relling MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 2004; 429: 464–468.
- Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med* 2001; 250: 186–200.
- Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 2000; 356: 1667–1671.
- Goldstein DB, Tate SK, Sisodiya SM. Pharmacogenetics goes genomic. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 937–947.
- Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 193–200.
- Wilke RA, Lin DW, Roden DM, et al. Identifying genetic risk factors for serious adverse drug reactions: current progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:904-16. [Erratum, *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:185.]
- Página WEB de la relación actualizada entre fármacos, enfermedades y genes  
<http://www.pharmgkb.org/index.jsp>

## **SEMINARIO PARTICIPATIVO 1**

**M<sup>a</sup> Jesús Bullido, Jesús Cruces, José Fernández Piqueras y Belén Peral**

**Martes, 13 de octubre de 2009**

Discusión conjunta de publicaciones científicas seleccionadas. Participación de los alumnos.

### **Artículos para debatir:**

1. Takashima H, Boerkoel CF, John J, Saifi GM, Salih MA, Armstrong D, Mao Y, Quiocho FA, Roa BB, Nakagawa M, Stockton DW, Lupski JR. (2002) "Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet.* 32:267-72.
2. Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, Uruno K, Kumada S, Nishiyama K, Nishimura A, Okada I, Yoshimura Y, Hirai S, Kumada T, Hayasaka K, Fukuda A, Ogata K, Matsumoto N. (2009) "De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy". *Nat Genet.* 40:782-8.
3. Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, Santos J, Calin GA, Cigudosa JC, Croce CM, Fernández-Piqueras J, Malumbres M. (2008). "Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression". *Cancer Cell.* 13:496-506.
4. Recuero M, Vicente MC, Martínez-García A, Ramos MC, Carmona-Saez P, Sastre I, Aldudo J, Vilella E, Frank A, Bullido MJ, Valdivieso F. (2009). "A free radical-generating system induces the cholesterol biosynthesis pathway: a role in Alzheimer's disease". *Aging Cell.* 8:128-39.

## USO DEL RATÓN EN BIOMEDICINA: HISTORIA Y GENÉTICA.

Miguel Manzanares, CNIC

Miércoles, 14 de octubre de 2009

1. Que es un ratón?
2. La posición filogenética del ratón
3. Historia del ratón de laboratorio
4. Características biológicas básicas
5. Genética básica
6. Líneas genéticamente definidas
7. Genómica y mapas

### Referencias

Silver, L. M. (1995). *Mouse genetics: concepts and applications*. Oxford University Press.

<http://www.informatics.jax.org/silver/>

Benavides, F. J. y Guénet, J. L. (2003). *Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá.

Nagy, A., Gertszensten, M., Vintersten, K. y Behringer, R. (2003) *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual* (3<sup>rd</sup> ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Taft RA, Davisson M, Wiles MV. (2006). Know thy mouse. *Trends Genet.* Dec;22(12):649-53.

Rogner UC, Avner P. Congenic mice: cutting tools for complex immune disorders. *Nat Rev Immunol.* 2003 Mar;3(3):243-52.

International Mouse Knockout Consortium, Collins FS, Rossant J, Wurst W. A mouse for all reasons. *Cell.* 2007 Jan 12;128(1):9-13.

## BIOLOGÍA Y DESARROLLO DEL RATÓN

Miguel Manzanares, CNIC

Jueves, 15 de octubre de 2008

1. Formación de patrón
2. Bases genéticas del desarrollo embrionario
3. Desarrollo pre-implantación del ratón
4. Pluripotencia embrionaria
5. Pluripotencia en células troncales
6. Control génico de la pluripotencia

### Referencias

Gilbert, S.F. (2006) *Developmental biology* (8<sup>th</sup> ed.). Sinauer Associates.

<http://8e.devbio.com>

Wolpert, L et al. (2006). *Principles of development* (3<sup>rd</sup> ed.). Oxford University Press.

Kaufman, M. H. y Bard, J. B. L (1999). *The anatomical basis of mouse development*. Academic Press.

Kaufman, M. H. (1994). *The atlas of mouse development*. Academic Press.

Rossant J. Stem cells and early lineage development. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):527-31.

Silva J, Smith A. Capturing pluripotency. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):532-6.

Zernicka-Goetz M. Cleavage pattern and emerging asymmetry of the mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Dec;6(12):919-28.

Boiani M, Scholer HR. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6, 872-84.

Niwa H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134, 635-46.

Rossant J. (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* 19, 477-82.

Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J. (2006) Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn*. 235, 2301-14.

Beddington RS, Robertson EJ. Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell*. 1999 Jan 22;96(2):195-209.

Takaoka K, Yamamoto M, Hamada H. Origin of body axes in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev*. 2007 Aug;17(4):344-50.

Shiratori H, Hamada H. The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development*. 2006 Jun;133(11):2095-104.

[http://www.med.unc.edu/embryo\\_images/](http://www.med.unc.edu/embryo_images/)

## ANIMALES TRANSGÉNICOS CLÁSICOS, GENÓMICOS, INDUCIBLES, APLICACIONES Y LIMITACIONES

Lluís Montoliu, CNB-CSIC

Viernes, 16 de octubre de 2008

1. Definición de animal transgénico
2. Historia de la transgénesis animal
3. Tipos de animales transgénicos
4. Aplicaciones de los animales transgénicos en Biología, Biomedicina y Biotecnología
5. Factores a tener en cuenta en la generación de animales transgénicos
6. Penetrancia, expresividad, pleiotropía
7. Importancia del fondo genético en la generación y análisis de animales transgénicos
8. Definición de un transgén
9. Elementos reguladores de la expresión génica en transgenes
10. Aisladores genómicos
11. Cromosomas artificiales: BACs, YACs y PACs
12. Modificación de cromosomas artificiales
13. Transgénesis y genómica comparativa
14. ICSI (inyección intracitoplasmática de esperma) en transgénesis
15. Diferentes sistemas de expresión inducible
16. El sistema de la tetraciclina y sus variantes: tet-on y tet-off

### Referencias

- Palmiter RD, Brinster RL. Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet.* 1986;20:465-99.
- Giraldo P, Montoliu L. Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res.* 2001 Apr;10(2):83-103.
- Peterson KR. Transgenic mice carrying yeast artificial chromosomes. *Expert Rev Mol Med.* 2003 Apr 7;5(13):1-25.
- Schedl A, Montoliu L, Kelsey G, Schütz G. A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice. *Nature.* 1993 Mar 18;362(6417):258-61.
- Moreira PN, Giraldo P, Cozar P, Pozueta J, Jiménez A, Montoliu L, Gutiérrez-Adán A. Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod.* 2004 Dec;71(6):1943-7.
- Gerasimova TI, Corces VG. Chromatin insulators and boundaries: effects on transcription and nuclear organization. *Annu Rev Genet.* 2001;35:193-208.
- Recillas-Targa F, Valadez-Graham V, Farrell CM. Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis. *Bioessays.* 2004 Jul;26(7):796-807.
- Lunyak VV. Boundaries. Boundaries...Boundaries??? *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Jun;20(3):281-7.
- Wakeland E, Morel L, Achey K, Yui M, Longmate J. Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol Today.* 1997 Oct;18(10):472-7.
- Nadeau JH. Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet.* 2001 Mar;2(3):165-74.
- Molto E, Fernandez A, Montoliu L (2009) Boundaries in vertebrate genomes: different solutions to adequately insulate gene expression domains. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 8(4):283-296.
- Yamamoto A, Hen R, Dauer WT. The ons and offs of inducible transgenic technology: a review. *Neurobiol Dis.* 2001 Dec;8(6):923-32.
- Saez E, No D, West A, Evans RM. Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol.* 1997 Oct;8(5):608-16.
- Jaisser F. Inducible gene expression and gene modification in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Nov;11 Suppl 16:S95-S100.
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jurecic J, Ullmer C, Lübbert H, Bujard H. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 1;93(20):10933-8.

## **CÉLULAS ES Y RATONES KNOCKOUTS CLÁSICOS**

**Sagrario Ortega, CNIO**

**Martes, 20 de octubre de 2009**

1. Células madre embrionarias (células ES): origen y características
2. Células ES como vehículo de transferencia génica a la línea germinal
3. Pluripotencialidad de las células ES
4. Mantenimiento de la pluripotencialidad in vitro: condiciones de cultivo
5. Relación entre euploidía y pluripotencialidad
6. Establecimiento de nuevas líneas de células ES
7. Importancia del fondo genético de las células ES
8. Pluripotencialidad inducida (células iPS)
9. Concepto y generación de quimeras
10. Ratones derivados de células ES: complementación de embriones tetraploides
11. Modificación genética de las células ES
12. Vectores de gene-targeting: concepto y componentes básicos
13. Factores que afectan a la eficiencia de recombinación homóloga
14. Selección e identificación de clones recombinantes
15. Generación de alelos knockout (nulos)
16. Aplicaciones de los modelos knockout

### **Referencias**

- Gene Targeting: a Practical Approach, 2nd Edition (ed. A.L. Joyner). IRL Press at Oxford University Press, New York. (2003)
- Manipulating the Mouse Embryo 3rd edition. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten, K. and Behringer, R. CSH Laboratory Press. (2003)
- From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. Solter D. Nature Reviews in Genetics 7, 319 (2006)
- Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. Murry CE, Keller G. Cell. 132(4):661-80 (2008)
- Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Jaenisch R, Young R. Cell 132(4):567-82 (2008)
- Genetic modification-free reprogramming to induced pluripotent cells: fantasy or reality? Tada, T. Cell Stem Cell 3, 121 (2008)
- The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P. and Smith A. Nature 453, 519 (2008)
- Capturing pluripotency. Silva, J. and Smith A. Cell 132, 532 (2008)

## **RATONES KNOCKOUTS INDUCIBLES/ESPECÍFICOS DE TEJIDO, RATONES KNOCKINS**

**Sagrario Ortega, CNIO**

**Miércoles, 21 de octubre de 2009**

1. Sistemas de recombinación específicos de secuencia: Cre/lox y Flp/frt
2. Tipos de recombinación inducida por Cre y Flp
3. Sitios de reconocimiento heterólogos y sus aplicaciones
4. Generación de modelos condicionales
5. Generación de knockouts específicos de tejido
6. Líneas reporter de la actividad de Cre y Flp: el locus ROSA26
7. Control temporal de las recombinasas: sistemas inducibles
8. Inducción por tamoxifeno: control temporal de la actividad
9. Inducción/represión mediada por Tetraciclina: control temporal de la expresión
10. Generación de ratones knockin y sus aplicaciones

### **Referencias**

- Gene Targeting: a Practical Approach, 2nd Edition (ed. A.L. Joyner). IRL Press at Oxford University Press, New York. (2003)
- Manipulating the Mouse Embryo 3rd edition. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten, K. and Behringer, R. CSH Laboratory Press. (2003)
- Mammalian genome targeting using site-specific recombinases. García-Otín A.L. and Guillou, F. *Frontiers in Bioscience* 11, 1108 (2006)
- A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse. Schnütgen F, Doerflinger N, Calléja C, Wendling O, Chambon P, Ghyselinck NB. *Nature Biotech.* 21, 562-565 (2003)
- Engineering chromosomal rearrangements in mice. Yu. Y. and Bradley, A. *Nat. Rev. Genet.* (2001)
- Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells Leone DP, Genoud S, Atanoski S, Grausenburger R, Berger P, Metzger D, Macklin WB, Chambon P, Suter U. *Molecular and Cellular Neuroscience* 22 (2003)
- Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements. Forde A, Constien R, Gröne HJ, Hämmerling G, Arnold B. *Genesis* 33 (2002)
- Conditional control of gene expression in the mouse. Lewandoski M. *Nat. Rev. Genet.* 2, 743 (2002)
- Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells. Beard C, Hochedlinger K, Plath K, Wutz A, Jaenisch R. *Genesis* 44 (2006)
- Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. Farley FW, Soriano P, Steffen LS, Dymecki SM. *Genesis.* 28:106-10 (2000).

## **GENE TRAPS (TRAMPAS GÉNICAS)**

**Ignacio Palmero, IIB-UAM/CSIC**

**Jueves, 22 de octubre de 2009**

1. Inactivación génica mediante trampas génicas: Fundamentos y vectores
2. Aplicaciones: Transgénesis, screenings.
3. Colecciones públicas de clones genetráp.
4. Caso práctico: Genetráp como herramienta para el estudio de loci complejos.

### **Referencias**

- Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet.* 2001 Oct;2(10):756-68.
- Nord AS, Chang PJ, Conklin BR, Cox AV, Harper CA, Hicks GG, Huang CC, Johns SJ, Kawamoto M, Liu S, Meng EC, Morris JH, Rossant J, Ruiz P, Skarnes WC, Soriano P, Stanford WL, Stryke D, von Melchner H, Wurst W, Yamamura K, Young SG, Babbitt PC, Ferrin TE. The International Gene Trap Consortium Website: a portal to all publicly available gene trap cell lines in mouse. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1;34:D642-8.
- Yamamura K, Araki K. Gene trap mutagenesis in mice: new perspectives and tools in cancer research. *Cancer Sci.* 2008 Jan;99(1):1-6.
- Schnütgen F. Generation of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2006 Mar;5(1):15-8
- Páginas web: IGTC consortium: [www.genetráp.org](http://www.genetráp.org)

## SEMINARIO PARTICIPATIVO 2

Miguel Manzanares, Lluís Montoliu, Sagrario Ortega, Ignacio Palmero

Viernes, 23 de octubre de 2009

Discusión conjunta de publicaciones científicas seleccionadas. Participación de los alumnos.

### Artículos para debatir:

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
2. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1920-3. Epub 2007 Dec 6.
3. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20.

Publicaciones científicas adicionales de lectura recomendable:

- Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*. 2008 Apr 18;133(2):250-64.
- Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. *Science*. 2008 Feb 14.
- Wernig M, Lengner CJ, Hanna J, Lodato MA, Steine E, Foreman R, Staerk J, Markoulaki S, Jaenisch R. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol*. 2008 Jul 1.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008 Jan;26(1):101-6. Epub 2007 Nov 30.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008 Jan 10;451(7175):141-6.
- Silva J, Smith A. Capturing pluripotency. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):532-6.
- Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):567-82.
- Ying QL, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 2008 May 22;453(7194):519-23.
- Kim JB, Greber B, Araúz-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, Schöler HR. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature*. 2009 Aug 28.
- Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*. 2009 Aug 27;460(7259):1132-5. Epub 2009 Aug 9.
- Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, Maherali N, Kulalert W, Walsh RM, Khalil A, Rheinwald JG, Hochedlinger K. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*. 2009 Aug 27;460(7259):1145-8. Epub 2009 Aug 9.
- Marión RM, Strati K, Li H, Murga M, Blanco R, Ortega S, Fernandez-Capetillo O, Serrano M, Blasco MA. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*. 2009 Aug 27;460(7259):1149-53. Epub 2009 Aug 9.
- Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Cañamero M, Blasco MA, Serrano M. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature*. 2009 Aug 27;460(7259):1136-9. Epub 2009 Aug 9.
- Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, Wahl GM, Belmonte JC. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*. 2009 Aug 27;460(7259):1140-4. Epub 2009 Aug 9.

## ANIMALES TRANSGÉNICOS CON LENTIVIRUS, TRANSPOSONES, TRANSFERENCIA NUCLEAR, NUEVOS MÉTODOS

Lluís Montoliu, CNB-CSIC

Lunes, 26 de octubre de 2009

1. Transgenes indicadores (genes reporter)
2. Transgenes suicidas (ablación de tejidos)
3. Definición de ratón transgénico con expresión inducible
4. Transgénesis con lentivirus
5. Transgénesis con transposones
6. Transgénesis con *Zn-finger nucleasas*
7. Historia de la clonación animal
8. Aplicaciones de la clonación animal
9. Clonación y transgénesis animal
10. Clonación: casos particulares, métodos específicos de especie
11. Anomalías asociadas a la clonación
12. Clonación terapéutica
13. Clonación y medicina regenerativa

### Referencias

- Bustamante M, Tasinato A, Maurer F, Elkochairi I, Lepore MG, Arsenijevic Y, Pedrazzini T, Munier FL, Schorderet DF. Overexpression of a mutant form of TGFBI/BIGH3 induces retinal degeneration in transgenic mice. *Mol Vis*. 2008 Jun 13;14:1129-37.
- Carlson CM, Dupuy AJ, Fritz S, Roberg-Perez KJ, Fletcher CF, Largaespada DA. Transposon mutagenesis of the mouse germline. *Genetics*. 2003 Sep;165(1):243-56.
- Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*. 2005 Aug 12;122(3):473-83.
- Dupuy AJ, Akagi K, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA. Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system. *Nature*. 2005 Jul 14;436(7048):221-6.
- Kanatsu-Shinohara M, Kato M, Takehashi M, Morimoto H, Takashima S, Chuma S, Nakatsuji N, Hirabayashi M, Shinohara T. Production of Transgenic Rats via Lentiviral Transduction and Xenogeneic Transplantation of Spermatogonial Stem Cells. *Biol Reprod*. 2008 Aug 6.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*. 2002 Feb 1;295(5556):868-72.
- Ivics Z, Li MA, Mátés L, Boeke JD, Nagy A, Bradley A, Izsvák Z. Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat Methods*. 2009 Jun;6(6):415-22
- Mátés L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, Grzela DP, Schmitt A, Becker K, Matrai J, Ma L, Samara-Kuko E, Gysemans C, Pryputniewicz D, Miskey C, Fletcher B, Vandendriessche T, Ivics Z, Izsvák Z. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet*. 2009 Jun;41(6):753-61.
- Wu SC, Meir YJ, Coates CJ, Handler AM, Pelczar P, Moisyadi S, Kaminski JM. piggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to sleeping beauty, Tol2, and Mos1 in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 10;103(41):15008-13.
- Shinohara ET, Kaminski JM, Segal DJ, Pelczar P, Kolhe R, Ryan T, Coates CJ, Fraser MJ, Handler AM, Yanagimachi R, Moisyadi S. Active integration: new strategies for transgenesis. *Transgenic Res*. 2007 Jun;16(3):333-9.
- Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Ménoret S, Anegon I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*. 2009 Jul 24;325(5939):433.
- WEB para artículos de clonación: <http://www.cnb.csic.es/~transimp/stem.html>

### SEMINARIO PARTICIPATIVO 3

Miguel Manzanares, Lluís Montoliu, Sagrario Ortega, Ignacio Palmero

Martes, 27 de octubre de 2009

Discusión conjunta de publicaciones científicas seleccionadas. Participación de los alumnos.

#### Artículos para debatir:

1. **Ejemplo de uso de “TET-ON”** Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, Shen Q, O'Hagan R, Pantginis J, Zhou H, Horner JW 2nd, Cordon-Cardo C, Yancopoulos GD, DePinho RA. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature*. 1999 Jul 29;400(6743):468-72.
2. **Ejemplo de uso de “TET-OFF”** Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell*. 2000 Mar 31;101(1):57-66.
3. **Ejemplo de uso del sistema “LAC”** Cronin CA, Gluba W, Scrable H. The lac operator-repressor system is functional in the mouse. *Genes Dev*. 2001 Jun 15;15(12):1506-17.

Publicaciones científicas adicionales de lectura recomendable:

- No D, Yao TP, Evans RM. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 16;93(8):3346-51.
- Hong HK, Chong JL, Song W, Song EJ, Jyawook AA, Schook AC, Ko CH, Takahashi JS. Inducible and reversible Clock gene expression in brain using the tTA system for the study of circadian behavior. *PLoS Genet*. 2007 Feb 23;3(2):e33. Epub 2007 Jan 5.
- Michalon A, Koshibu K, Baumgärtel K, Spirig DH, Mansuy IM. Inducible and neuron-specific gene expression in the adult mouse brain with the rtTA2S-M2 system. *Genesis*. 2005 Dec;43(4):205-12.
- Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science*. 1995 Sep 8;269(5229):1427-9.
- Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res*. 1999 Nov 15;27(22):4324-7.
- Gossen M, Bonin AL, Freundlieb S, Bujard H. Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. *Curr Opin Biotechnol*. 1994 Oct;5(5):516-20.

## **ANÁLISIS GENÓMICO FUNCIONAL DEL RATÓN: HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS, CASOS PRÁCTICOS**

**Lluís Montoliu, CNB-CSIC**

**Miércoles, 28 de octubre de 2009**

ENSEMBL <http://www.ensembl.org>

The JACKSON Laboratory (Jax) <http://www.jax.org>

Mouse Genome Informatics (MGI) <http://www.informatics.jax.org/>

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

BACPAC Resources Center <http://bacpac.chori.org>

International Mouse Strain Resources (IMSR) <http://www.informatics.jax.org/imsr/>

European Mouse Mutant Archive <http://www.emmanet.org>

Eumorphia <http://www.eumorphia.org>

International Gene Trap Consortium (IGTC) <http://www.genetrap.org/>

Knock-Out Mouse Project (KOMP) <https://www.komp.org/>

European Mouse Conditional Mutagenesis (EUCOMM) <http://www.eucomm.org/>

North American Mouse Conditional Mutagenesis Program (NorCOMM) <http://norcomm.phenogenomics.ca/>

Color Genes <http://www.espcr.org/micemut/>

Mutant Mouse Regional Resource Centres <http://www.mmrrc.org/>

CRE-X-Mice Database <http://nagy.mshri.on.ca/cre/>

VISTA (tool for comparative genomic analysis) <http://genome.lbl.gov/vista/>

## **RNAi: FUNDAMENTOS y APLICACIONES EM TRANSGÉNESIS ANIMAL**

**Ignacio Palmero, IIB-CSIC/UAM**

**Jueves, 29 de octubre de 2009**

- 1.** Fundamentos de interferencia de RNA.
- 2.** Interferencia de RNA como herramienta. Conceptos generales
  - 2.1: Interferencia basada en oligos
  - 2.2: Interferencia basada en vectores.
  - 2.3: Genómica funcional con RNAi.
- 3.** Interferencia de RNA a nivel de organismo.
  - 3.1: Transgénesis
  - 3.2: RNAi in vivo. Aplicaciones terapéuticas.

### **Referencias**

- Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* 2005 Mar 1;19(5):517-29.
- Almeida R, Allshire RC. RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol.* 2005 May;15(5):251-8.
- Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet.* 2007 Mar;8(3):173-84.
- Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* 2007 May;23(5):243-9.
- Moffat J, Sabatini DM. Building mammalian signalling pathways with RNAi screens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Mar;7(3):177-87.
- Xia XG, Zhou H, Xu Z Transgenic RNAi: Accelerating and expanding reverse genetics in mammals. *Transgenic Res.* 2006 Jun;15(3):271-5.
- Páginas web: openbiosystems (RNAi) [www.openbiosystems.com/rnai/](http://www.openbiosystems.com/rnai/)
- Animación RNAi, Nature: [www.nature.com/focus/rnai/animations/index.html](http://www.nature.com/focus/rnai/animations/index.html)

## SEMINARIO PARTICIPATIVO 4

Miguel Manzanares, Lluís Montoliu, Sagrario Ortega, Ignacio Palmero

Viernes, 30 de octubre de 2009

Discusión conjunta de publicaciones científicas seleccionadas. Participación de los alumnos.

### Artículos para debatir:

1. **Models for temporal and conditional inactivation of a tumor suppressor gene:** Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*. 2007 Feb 8;445(7128):661-5
2. **Models for conditional activation of an oncogene:** Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Pérez-Gallego L, Dubus P, Sandgren EP, Barbacid M. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell*. 2007 Mar;11(3):291-302.
3. **Generation and use of “mosaic models”:** Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, Bennis RA, Sanes JR, Lichtman JW. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*. 2007 Nov 1;450(7166):56-62.

Publicaciones científicas adicionales de lectura recomendable:

Models for temporal and conditional inactivation of a tumor suppressor gene: Christophorou MA, Martin-Zanca D, Soucek L, Lawlor ER, Brown-Swigart L, Verschuren EW, Evan GI. Temporal dissection of p53 function in vitro and in vivo. *Nat Genet*. 2005 Jul;37(7):718-26.

Christophorou MA, Ringshausen I, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI. The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature*. 2006 Sep 14;443(7108):214-7.

Models for conditional activation of an oncogene: Guerra C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano V. and Barbacid, M. Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 2003. 4, 111-120.

Generation and use of “mosaic models”: Zong, H., Espinosa, J.S., Su, H.H., Muzumdar, M.D. and Luo, L. Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell* 2005 May; 121, 479-492

## PROYECCIÓN COMENTADA DE VIDEOS SOBRE RATONES TRANSGÉNICOS, CÉLULAS ES y RATONES KNOCKOUT

Moderadores: **Lluís Montoliu, Sagrario Ortega**

**Lunes, 2 de noviembre de 2009**

### **VIDEO 1:** Transgenic Techniques in Mice: A Video Guide

Instructors: Roger Pedersen, University of California, San Francisco; Janet Rossant, University of Toronto  
Cold Spring Harbor Laboratory Press

© 1989 • 68-minute video

NTSC • ISBN 0-87969-950-7 (OUT OF PRINT)

---

#### Description

The techniques employed to manipulate mouse embryos require a range of skills from the basic to the advanced. Many of these techniques are used in the manual *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Second Edition*. This video shows step-by-step demonstrations, with running commentary, of the following techniques:

Dissection of oviducts. Recovery of fertilized eggs. Removal of cumulus cells.

Recovery of embryos. Removal of the zona pellucide. Construction of aggregation chimeras.

Recovery of blastocysts.

DNA injection into pronuclei to produce transgenic embryos.

Nuclear transfer.

Blastocyst injection of inner cell mass and embryonic stem cells.

Vasectomizing male mice.

Oviduct transfer of manipulated embryos.

Uterine transfer of manipulated embryos.

Dissection of 6-1/2 and 7-1/2 day embryos.

Dissection of midgestation 12-1/2 day embryos and fetal membranes.

The instructors are Roger Pedersen (University of California, San Francisco) and Janet Rossant (University of Toronto), both experts with many years' experience in the development and teaching of these techniques.

Videotaped demonstration has already proved in other professions to be a valuable and effective teaching technique, especially for imparting the subtle tricks that spell the difference between success and frustration.

<http://www.cshlpress.com/default.tpl?action=full&--eqskudatarq=320>

### **VIDEO 2:** Targeted Mutagenesis in Mice: A Video Guide

By Roger A. Pedersen, University of California, San Francisco; Virginia Papaioannou, Columbia University; Alexandra Joyner, Mount Sinai Hospital and University of Toronto; Janet Rossant, Mount Sinai Hospital and University of Toronto

Cold Spring Harbor Laboratory Press

© 1993 • 70-minute video

PAL • ISBN 978-087969430-0

---

#### Description

Embryonic stem (ES) cells are important vehicles for transfer of genes into mice. When combined with normal pre-implantation embryos and transferred to foster mothers, ES cells contribute to the development of many different tissues, including the germline. When these cells are genetically manipulated, this approach discloses much about the function of specific genes.

Detailed methods for using ES cells are described in the manual *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Second Edition*.

This video guide complements *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Second Edition* and *Transgenic Techniques in Mice: A Video Guide*. It provides step-by-step demonstrations of the following procedures required for making mutant mice.

Contents

Demonstration 1: Starting embryonic stem (ES) cell lines

Demonstration 2: Making fibroblast feeder layers

Demonstration 3: Growing established ES cell lines

Demonstration 4: Targeting ES cell lines

Demonstration 5: Making chimeras with ES cells

Demonstration 6: Making a mouse

<http://www.cshlpress.com/default.tpl?action=full&cart=12226762131194528&--eqskudatarq=317>

**Additional videos** from the collection of the International Society for Transgenic Technologies (ISTT)  
<http://www.transtechsociety.org>

## **EXAMEN MÓDULO BM5**

**M<sup>a</sup> Jesús Bullido, Jesús Cruces, José Fernández Piqueras, Miguel Manzanares, Lluís Montoliu, Sagrario Ortega, Ignacio Palmero y Belén Peral**

**Martes, 3 de noviembre de 2009**

Examen tipo test, 50 preguntas con 5 respuestas (solamente una es la verdadera) sobre temas y aspectos discutidos durante las clases y material bibliográfico recomendado. Las respuestas incorrectas no reducen la nota.

## Módulo BM5, CRITERIOS DE CALIFICACIÓN

### Curso 2009-2010

**Asistencia (1 punto, 10%):** La asistencia es obligatoria. Aquellos alumnos que falten a dos o más clases de una semana perderán 0.5 puntos, que podrán recuperar con un trabajo escrito, de 2-3 páginas de extensión, de alguno de los temas tratados durante esa semana. Los que falten más de 5 días y no hayan presentado el trabajo o los trabajos oportunos perderán el punto entero.

**Participación (2 puntos, 20%):** Se valorará la participación de los alumnos a lo largo de todas las clases y, especialmente, durante los seminarios participativos. Se les pedirá que se identifiquen con su nombre antes de empezar a hablar y se anotará la intervención de esa persona.

**Trabajo (3 puntos, 30%):** A los alumnos se les asignará un gen de una lista de genes seleccionados por los profesores (96 genes) con objeto de que investigue y obtenga información genética, genómica, de su relación con posibles patologías humanas, de la existencia de modelos animales conocidos, etc.... Cada alumno tendrá un gen distinto. Los trabajos, de 4-5 páginas de extensión, se redactarán en inglés y se calificarán de 1 a 3 puntos en función de su calidad, de si han trascendido al mero recorta-pegar de internet/google/bases de datos, del esfuerzo de síntesis realizado, de la inclusión o referencia a todos o una gran mayoría de los temas tratados en clase, de la inclusión de referencias bibliográficas adicionales, etc..

**Examen (4 puntos, 40%):** El examen será de tipo test, con 50 preguntas de 5 respuestas cada una, (solo una es la verdadera). Las respuestas incorrectas no descontarán puntuación. 30 preguntas serán de la parte de "Modificación genética en mamíferos" y 20 preguntas serán de la parte de "Genómica y proteómica".