

## Máster 2008-2009

# Biomedicina Molecular Biotecnología Biología Molecular y Celular UAM

## Módulo BM5 GENÓMICA, PROTEÓMICA Y MODIFICACIÓN GENÉTICA

### Clases de la parte de “MODIFICACIÓN GENÉTICA”

**29 Septiembre-16 Octubre 2008**

Todos los días, 14:00-15:30 horas

**Aulas de la Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid**

#### Profesores:

**Miguel Manzanares (CNIC)**

tel. 914531311

[mmanzanares@cnic.es](mailto:mmanzanares@cnic.es)

**Lluís Montoliu (CNB-CSIC)**

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)

**PROGRAMA y GUIONES COMPLEMENTARIOS DE LAS CLASES  
(Actualizado: 29 de Septiembre de 2008)**

## PRIMERA SEMANA

### **Lunes, 29 de Septiembre de 2008**

Introducción al módulo BM5. Normativa general. Distribución de genes y publicaciones para trabajos.  
**Miguel Manzanares, Lluís Montoliu, Sagrario Ortega, Ignacio Palmero**

Uso del ratón en biomedicina: historia, genética  
**Miguel Manzanares, CNIC**

### **Martes, 30 de Septiembre de 2008**

Biología y desarrollo del ratón  
**Miguel Manzanares, CNIC**

### **Miércoles, 1 de Octubre de 2008**

Animales transgénicos clásicos, genómicos, aplicaciones y limitaciones  
**Lluís Montoliu, CNB-CSIC**

### **Jueves, 2 de Octubre de 2008**

Animales transgénicos inducibles, lentivirus, transposones, aplicaciones y limitaciones  
**Lluís Montoliu, CNB-CSIC**

### **Viernes, 3 de Octubre de 2008**

Discusión conjunta de publicaciones científicas seleccionadas. Participación de los alumnos.  
**Tema 1:** expresión génica inducible en animales transgénicos.  
Moderadores: **Miguel Manzanares, Lluís Montoliu, Sagrario Ortega, Ignacio Palmero**

## SEGUNDA SEMANA

### **Lunes, 6 de Octubre de 2008**

Transferencia nuclear, animales clónicos y transgénicos. Las nuevas células iPS. Relevancia en biotecnología y en biomedicina.  
**Lluís Montoliu, CNB-CSIC**

### **Martes, 7 de Octubre de 2008**

Células ES y ratones *Knockouts* clásicos  
**Sagrario Ortega, CNIO**

### **Miércoles, 8 de Octubre de 2008**

Ratones *Knockouts* inducibles/específicos de tejido, ratones *knockins*  
**Sagrario Ortega, CNIO**

### **Jueves, 9 de Octubre de 2008**

Análisis genómico funcional en el ratón: herramientas informáticas, casos prácticos  
**Lluís Montoliu, CNB-CSIC, Ignacio Palmero, IIB-CSIC/UAM**

### **Viernes, 10 de Octubre de 2008**

Discusión conjunta de publicaciones científicas seleccionadas. Participación de los alumnos.  
**Tema 2:** las células iPS. Relevancia en biología y en biomedicina.  
Moderadores: **Miguel Manzanares, Lluís Montoliu, Sagrario Ortega, Ignacio Palmero**

## TERCERA SEMANA

### **Lunes, 13 de Octubre de 2008**

RNAi: fundamentos y aplicaciones en transgenesis animal  
**Ignacio Palmero**, IIB-CSIC/UAM

### **Martes, 14 de Octubre de 2008**

*Gene Traps* (trampas génicas)  
**Ignacio Palmero**, IIB-CSIC/UAM

### **Miércoles, 15 de Octubre de 2008**

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

### **Jueves, 16 de Octubre de 2008**

Discusión conjunta de publicaciones científicas seleccionadas. Participación de los alumnos.  
**Tema 3:** Modelos animales para el estudio del cáncer con múltiples modificaciones genéticas.  
Moderadores: **Miguel Manzanares**, **Lluís Montoliu**, **Sagrario Ortega**, **Ignacio Palmero**

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

## **TEMA 1: Expresión génica inducible en animales transgénicos**

### **Publicaciones de lectura obligatoria:**

#### *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.

#### *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.

#### *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 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.

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

## **TEMA 2: las células iPS. Relevancia en biología y en biomedicina**

### **Publicaciones de lectura obligatoria:**

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.

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.

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 de lectura recomendable:**

Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creyghton 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, Batlle-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.

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

### **TEMA 3: Modelos animales para el estudio del cáncer con múltiples modificaciones genéticas.**

#### **Publicaciones de lectura obligatoria:**

##### **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

##### **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.

##### **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 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

# USO DEL RATÓN EN BIOMEDICINA: HISTORIA, GENÉTICA

## Miguel Manzanares, CNIC

- Que es un ratón?
- La posición filogenética del ratón
- Historia del ratón de laboratorio
- Características biológicas básicas
- Genética básica
- Líneas genéticamente definidas
- 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., Gertsenstein, M., Vintersten, K. y Behringer, R. (2003) Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual (3rd 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

- Formación de patrón
- Bases genéticas del desarrollo embrionario
- Desarrollo pre-implantación del ratón
- Pluripotencia embrionaria
- Pluripotencia en células troncales
- Control génico de la pluripotencia

### Referencias

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

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

Wolpert, L et al. (2006). *Principles of development* (3rd 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, aplicaciones y limitaciones

## Lluís Montoliu, CNB-CSIC

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

Referencias bibliográficas complementarias:

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.

# Animales transgénicos inducibles, lentivirus, transposones, aplicaciones y limitaciones

**Lluís Montoliu, CNB-CSIC**

1. Transgenes indicadores (genes *reporter*)
2. Transgenes suicidas (ablación de tejidos)
3. Definición de ratón transgénico con expresión inducible
4. Diferentes sistemas de expresión inducible
5. El sistema de la tetraciclina y sus variantes: *tet-on* y *tet-off*
6. El sistema del operon *lac*
7. Transgénesis con lentivirus
8. Transgénesis con transposones
9. Ejemplos de cada tipo y uso combinado de estrategias de transgénesis

## Referencias bibliográficas complementarias:

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, Jerecic 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.

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.

## Transferencia nuclear, animales clónicos y transgénicos. Las nuevas células iPS. Relevancia en biotecnología y en biomedicina.

**Lluís Montoliu, CNB-CSIC**

1. Historia de la clonación animal
2. Aplicaciones de la clonación animal
3. Primeros experimentos en anfibios
4. Primeros pasos en mamíferos
5. La oveja Dolly
6. Evolución tecnológica de métodos empleados en clonación animal
7. Clonación y transgénesis animal
8. Clonación: casos particulares, métodos específicos de especie
9. Clonación en ratón
10. Clonación y grado de diferenciación de la célula donadora del núcleo
11. Clonación en cerdo y xenotransplantes
12. Anomalías asociadas a la clonación
13. Clonación y células troncales pluripotentes (células madre)
14. Clonación terapéutica
15. Clonación y medicina regenerativa
16. Células pluripotentes inducibles (iPS).

En esta WEB encontraréis una extensa selección de artículos y documentos relativos a la clonación animal y las células troncales.

<http://www.cnb.csic.es/~transimp/stem.html>

# CÉLULAS ES Y RATONES *KNOCKOUT* CLÁSICOS

## SAGRARIO ORTEGA (CNIO)

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

### Bibliografía:

Gene Targeting: a Practical Approach, 2<sup>nd</sup> Edition (ed. A.L. Joyner). IRL Press at Oxford University Press, New York. (2003)

Manipulating the Mouse Embryo 3<sup>rd</sup> 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., Batlle-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)**

- Sistemas de recombinación específicos de secuencia: Cre/lox y Flp/frt
- Tipos de recombinación inducida por Cre y Flp
- Sitios de reconocimiento heterólogos y sus aplicaciones
- Generación de modelos condicionales
- Generación de knockouts específicos de tejido
- Líneas reporter de la actividad de Cre y Flp: el locus ROSA26
- Control temporal de las recombinasas: sistemas inducibles
- Inducción por tamoxifeno: control temporal de la actividad
- Inducción/represión mediada por Tetraciclina: control temporal de la expresión
- Generación de ratones knockin y sus aplicaciones

## **Bibliografía:**

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, Atanasoski 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).

## Análisis genómico funcional en el ratón: herramientas informáticas, casos prácticos **Lluís Montoliu**, CNB-CSIC, **Ignacio Palmero**, IIB-CSIC/UAM

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 en transgenesis animal

## Ignacio Palmero, IIB.

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: Genomica funcional con RNAi.
3. Interferencia de RNA a nivel de organismo.
  - 3.1: Transgénesis
  - 3.2: RNAi in vivo. Aplicaciones terapeuticas.

### *Bibliografía:*

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.

### *Paginas 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)

## Gene Traps (trampas génicas)

### Ignacio Palmero, IIB

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 compejos.

#### *Bibliografía:*

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

#### *Paginas web:*

IGTC consortium:

[www.genetráp.org/](http://www.genetráp.org/)



# Proyección comentada de videos sobre ratones transgénicos, células ES y ratones *knockout*

Moderadores: **Lluís Montoliu, Sagrario Ortega**

## **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>