

## Genética e Ingeniería del DNA (GID)

### **Breve descripción de la asignatura**

El curso contempla dos objetivos fundamentales:

a) que los estudiantes conozcan con detalle los procesos moleculares de expresión génica, desde el DNA hasta la síntesis del polipéptido codificado por el gen correspondiente, y cómo estos procesos pueden regularse en respuesta a señales, por la acción de proteínas o de pequeñas moléculas de RNA. En el curso se repasan todos los niveles de regulación haciéndose énfasis en aquellos mecanismos en los que los estudiantes tienen una menor formación: la regulación por pequeños RNAs y la regulación epigenética.

b) que los estudiantes conozcan las bases moleculares de la tecnología del DNA recombinante, así como las técnicas y herramientas utilizadas en dichos procesos.

Los contenidos se trabajarán mediante los siguientes métodos de aprendizaje:

- clases teóricas
- clases prácticas (Clonación mediante recombinación en *E. coli*)
- clases de discusión
- clases de problemas
- talleres prácticos (diseño de clonaciones o de oligos para su uso en PCR o RT-qPCR (aula de informática), búsqueda y caracterización de pequeños RNAs (aula de informática), etc.)
- contenidos virtuales
- actividades a realizar por los estudiantes cuya evaluación contribuirá a la evaluación final del curso.

La práctica de laboratorio “*Clonación mediante recombinación en E. coli*”. La co-transformación de una estirpe de *E. coli* con un plásmido linearizado y un fragmento linear de DNA con extremos homólogos a los extremos del plásmido puede dar lugar a la clonación de dicho fragmento en el plásmido mediante recombinación homóloga. El protocolo presentado aquí fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Finey en la Wayne State University por Jodi Parrish y Tom Limjindaporn. Este método ha sido utilizado para subclonar ORF y otro tipo de fragmentos en vectores plasmídicos de levadura y *E. coli*. Productos de PCR con una homología con cada extremo del vector de 21 pb proporcionan suficiente homología para ser subclonados por recombinación con buena eficiencia y fidelidad. El protocolo puede ser asimismo utilizado como método de clonación masiva (high throughput) con eficiencias que oscilan entre el 75-93%. En esta práctica vamos a utilizar una versión de este protocolo para la clonación individual de fragmentos de PCR.

Con estos contenidos se quiere completar y actualizar el conocimiento sobre regulación génica y modificación de DNA de los estudiantes, de forma que reciban una base de conocimiento esencial para cursar otras asignaturas del Master como “Biotecnología Ambiental”, “Producción de proteínas recombinantes”, Cultivo in vitro y transformación de plantas”, “Genómica, Proteómica y Metabolómica”, o “Cultivo y manipulación de células animales. Terapia génica”.

### **Conocimiento previo necesario**

Esta asignatura es obligatoria para todos los estudiantes del Máster con el fin de homogeneizar los conocimientos básicos en Genética que serán necesarios para cursar con éxito numerosas asignaturas del Máster. Los alumnos de Grados de Ciencias con una menor formación en Genética General e Ingeniería Genética como el grado de Química, Ingeniería Química, Farmacia o Ciencias Medio Ambientales,

podrán necesitar de lecturas previas de la asignatura que serán orientadas por los profesores de la misma.

### **Programa detallado de la asignatura**

- Tema 1.** Genes regulables. Niveles de regulación génica: regulación transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional. Las moléculas reguladoras: proteínas y RNA. Regulación transcripcional. Estructura y función de los promotores: secuencias reguladoras y sus características. Factores de transcripción. Estructura, propiedades y tipos de factores de transcripción en virus y procariontes: ejemplos. Estructura, propiedades y tipos de factores de transcripción en virus y eucariotes: ejemplos. Regulación post-transcripcional Procesamiento del RNAhn: splicing, estabilidad del RNAm. Ejemplos. Regulación traduccional. Regulación de la lectura de los RNA. RNA policistrónicos. Fases de lectura solapadas. Cambios de fase. Estructura del complejo de traducción. Regulación postraduccional. Modificaciones post-traduccionales y sus implicaciones en la regulación de la expresión de los genes. Procesamiento de proteínas. Fosforilación, acetilación, glicosilación, sumoilación, nedilación.
- Tema 2.** Regulación mediada por pequeños RNA. Descubrimiento de los pequeños RNAs. Tipos de pequeños RNAs. Los miRNA. Mecanismos de regulación mediada por pequeños RNA: silenciamiento génico postranscripcional.
- Tema 3.** DNA, cromatina y cromosomas. Eucromatina y heterocromatina. Regulación a nivel transcripcional. Marcas epigenéticas y epigenoma. Pequeños RNAs y cromatina. Epigenoma y ambiente. Herencia epigenética transgeneracional.
- Tema 4.** Clonación de DNA y vectores. Clonación clásica. Clonación por PCR. Clonación por topoisomerasas. Clonación Gateway. Clonación Goldenbraid. Vectores plasmídicos de bacterias y levaduras. Vectores virales. Cromosomas artificiales. Vectores lanzadera. Vectores de expresión en bacterias, levaduras, plantas y mamíferos. Sistemas de entrega. Aislamiento e identificación de genes. Identificación de clones por métodos genéticos: selección, contraselección, complementación.
- Tema 5.** Técnicas avanzadas de modificación del genoma en bacterias. Herramientas basadas en transposición: estrategias y aplicaciones. Herramientas basadas en recombinación: intercambio alélico clásico y *recombineering*. Aplicaciones Silenciamiento génico con asRNA en bacterias. Herramientas para la edición precisa de genomas bacterianos. Biología sintética: conceptos y aplicaciones.
- Tema 6.** Edición de los genomas de organismos superiores (TALEN/CRISPR/Cas). Técnicas de detección y localización espacial de genes y proteínas: hibridación "*in situ*". Localización de la expresión: uso de la GFP y GUS, etc. Técnicas de marcaje y de preparación de sondas. Proximity ligation assay. Técnicas de estudio de la expresión génica: RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR), PCR digital (dPCR). SmartFlare RNA Detection Probes. nCounter gene expression system.

**Práctica de Laboratorio:** Clonación mediante recombinación en *E. coli*.

## **Profesorado**

### **Dra. Beuzón López, Carmen (Area de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad Málaga).**

Es licenciada y doctora (1996) en Ciencias Biológicas por la Universidad de Sevilla. Ha sido becaria EMBO en Imperial College London (1998-1999) y Contratada MRC en Imperial College London (2000-2002). Posteriormente incorporada a la Universidad de Málaga como Profesor Asociado (2002-2003), continuo como Contratada Ramón y Cajal (2003-2007), Profesor Contratado Doctor (2007-2010), es Profesor Titular de Genética desde 2010. Su investigación actual se centra en dos líneas de investigación claramente definidas, que comparten como ejes centrales el estudio de la planta, y el uso de herramientas genómicas para análisis de procesos de interés básico y agronómico: Interacción con la planta de la bacteria patógena *Pseudomonas syringae*, y Análisis genómico de las bases moleculares de la determinación del porte y el vigor en olivo. (<http://www.ihsm.uma-csic.es/person.php?id=16>)

### **Dr. Govantes Romero, Fernando (Area de Genética, Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad Pablo de Olavide, Sevilla)**

Estudió Biología en la Universidad de Sevilla y se doctoró por la misma Universidad en 1996. Durante los años 1996 a 2000 completó su formación postdoctoral en la Universidad de California, Santa Barbara y la Universidad de California, Santa Barbara Los Angeles, donde se especializó en el estudio de los mecanismos moleculares de la regulación de la expresión génica en bacterias. En 2000 se incorporó al Área de Microbiología de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, donde es actualmente Profesor Titular y es Investigador Principal del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), la Universidad Pablo de Olavide y la Junta de Andalucía. En la actualidad, lidera un grupo de investigación en este centro dedicado a la regulación genética y fisiológica del desarrollo de biofilms bacterianos [http://www.cabd.es/es-research\\_groups-68-174-mecanismos-de-regulacion-genica-y-desarrollo-de-biofilms-bacterianos-resumen.html](http://www.cabd.es/es-research_groups-68-174-mecanismos-de-regulacion-genica-y-desarrollo-de-biofilms-bacterianos-resumen.html)

### **Dra. Castillo Garriga, Araceli (Area de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad Málaga)**

Estudió Ciencias Biológicas en la Universidad de Málaga y se doctoró por la misma Universidad en 2002. Durante los años 2004-2008, completó su formación postdoctoral en dos excelentes centros de investigación del Reino Unido, en Clare Hall Laboratories (Cancer Resarch UK, CRUK) y en el Wellcome Trust Centre for Cell Biology-University of Edinburgh, donde se especializó en el estudio de los fenómenos epigenéticos que controlan la formación de los centrómeros en levaduras. A finales de 2008 se incorporó al Área de Genética de la Universidad de Málaga donde es Profesor Contratado Doctor y forma parte del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM), centro mixto entre el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de Málaga. En la actualidad, lidera un grupo que estudia la importancia de las modificaciones epigenéticas en respuesta a estreses bióticos como la infección por virus y bacterias fitopatógenas (<http://www.ihsm.uma-csic.es/person.php?id=18>).

**Dra. Grande Pérez, Ana (Area de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad Málaga)**

Es licenciada y doctora (1998) en Ciencias Biológicas por la Universidad de Santiago de Compostela. En noviembre de 2004 se incorporó a la UMA con un contrato Ramón y Cajal y en enero de 2010 obtuvo un contrato de Profesora doctora. Desde diciembre de 2010 es Profesora Titular de Genética en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología en la Universidad de Málaga (UMA). Su carrera científica se ha completado con varias estancias predoctorales realizadas desde 1995 hasta 1998 en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Lund (Suecia) bajo la supervisión del Dr. Einar Everitt; y posdoctorales en 1999-2003 en la Unidad de Medicina Molecular y Terapia Génica del Departamento de Medicina, Universidad de Manchester (Reino Unido), bajo la supervisión de los Dres. Pedro R. Lowenstein y Esteban Domingo, y en 2003-2005 en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa con el Dr. Esteban Domingo. Recientemente ha realizado estancias breves de 3-5 meses en el Institut des Sciences du Vegetal, CNRS, (Francia) con el Dr. Bruno Gronenborn y en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC) con el Dr. Santiago Elena. Su investigación actual se centra en el estudio de la evolución de las cuasiespecies de virus de RNA y de DNA de cadena sencilla y de los mecanismos que introducen la variabilidad genética en el genoma viral. En particular está interesada en esclarecer las bases moleculares de una nueva estrategia antiviral conocida como mutagénesis letal empleando como sistemas modelo virus de plantas como el virus de RNA del mosaico del tabaco (TMV) y el virus de DNA de cadena sencilla, el geminivirus Tomato Yellow Leaf Curl Virus. (<http://www.ihsm.uma-csic.es/person.php?id=21>)

**Dr. Llave Correas, César (Centro de Investigaciones Biológicas, CIB-CSIC)**

Estudió Ciencias Biológicas en la Universidad Complutense de Madrid y se doctoró por la misma Universidad en 1999. Durante los años 2000-2002 trabajó como investigador postdoctoral en el Center for Biological Chemistry (Washington State University, Pullman, WA) y el Center for Gene Research and Biotechnology (Corvallis, OR) en Estados Unidos, donde estudió las bases moleculares del mecanismo de silenciamiento génico en plantas. En 2003 se reincorporó al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del CSIC como investigador Ramón y Cajal obteniendo la plaza de Científico Titular del CSIC en 2004. En la actualidad es Investigador Científico en el CIB donde dirige el laboratorio de Expresión génica y estrés. Su grupo estudia los procesos metabólicos y reguladores que subyacen a las infecciones por virus en plantas. (<http://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=35>)

**Dr. Rodríguez Bejarano, Eduardo (Area de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga)**

Es licenciado (1982) en Ciencias Biológicas por la Universidad de Córdoba y doctor en Biología (1988) por la Universidad de Sevilla. Es catedrático de Genética en la Universidad de Málaga, Director del área de Genética, Secretario del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología y Vicedirector del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM). Es editor adjunto de Journal of Plant Pathology y Journal of General Virology. Ha sido miembro de la comisión de agricultura de la Agencia Nacional de Evaluación y Prospectiva (ANEP) y profesor en la Universidad de Sevilla. Su carrera científica que se inició en la Universidad de Sevilla, se completó como investigador postdoctoral (EMBO y NATO) en el Biotechnology Department del Imperial College del Londres y en estancias

posteriores como profesor visitante en el Microbiology Unit de la Universidad de Cambridge, en el Department of Science del University College de Londres y en el Institute of Molecular Plant Sciences de la Universidad de Edimburgo. Su investigación actual, que lleva a cabo como miembro de la línea Interacción planta-patógeno, perteneciente al Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" – Universidad de Málaga (IHSM-UMA-CSIC), se centra en el estudio de las interacciones entre virus-plantas y sus insectos transmisores, utilizando como modelo virus de DNA transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*. (<http://www.ihsm.uma-csic.es/person.php?id=27>)

**Dr. Ruiz Albert, Javier (Area de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad Málaga)**

Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Sevilla (US), se doctoró en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología (US) por su trabajo sobre genes implicados en la biosíntesis de beta-caroteno en hongos filamentosos, con proyección a la producción biotecnológica de esta previtamina. Durante cuatro años (1999-2003) trabajó en Londres como investigador postdoctoral en el Centre for Molecular Microbiology and Infection (CMMI) del Imperial College London, analizando los mecanismos moleculares de infección de bacterias patógenas de animales como *Salmonella*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. En el 2004 se incorporó al Área de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga (UMA), donde compagina tareas de docencia e investigación como Profesor Contratado Doctor. Su investigación se desarrolla en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA-CSIC) en torno a dos líneas basadas en el análisis en la planta de procesos de interés básico y agronómico, y los mecanismos moleculares de infección de virus y bacterias fitopatógenas: (1) Interacción con la planta de la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae*, en torno a proteínas efectoras secretadas mediante T3SS al interior de la célula vegetal, así como las respuestas de la planta frente a dichos efectores, (2) Interferencia de los geminivirus con el sistema de sumoilación de la planta y su relevancia en el proceso de infección y multiplicación viral. (<http://www.ihsm.uma-csic.es/person.php?id=28>)