



Biología Molecular

Programa Analítico 2020

Tema 1: Estudio y Aplicación de Técnicas de Biología Molecular

1. Sistemas de expresión proteica y bibliotecas. Vectores para procariontes, levaduras y eucariotas superiores, sus elementos principales y su utilización. Sistemas de vectores constitutivos e inducibles. Sistemas de producción y purificación de proteínas recombinantes. Expresión de proteínas en distintos sistemas biológicos con vectores plasmídicos y virales. Vectores con genes reporteros para el estudio de funcionalidad de promotores. Vectores para clonado masivo: construcción y screening de bibliotecas de cDNA y genómicas.

2. Estrategias para evaluar la expresión génica. Métodos individuales: Northern blot, RT-PCR y RT-qPCR. Métodos globales: cDNA microarray, Affimetrix y plataformas NGS. Similitudes y diferencias. Cuando usar cada método.

3. Estrategias para la evaluación de la interacción entre proteínas. Estudios *in vitro* con proteínas purificadas. Estudios *in vivo*: inmunoprecipitación y purificación en tándem. Cuando detectar interactores por western blot o por espectrometría de masas. Métodos de screening de interacciones proteína-proteína por doble híbrido en levaduras o células de mamífero. Técnicas de Phage e Yeast display.

4. Estrategias para la evaluación de la interacción entre proteínas y DNA. Estudios *in silico* para la asociación de factores de transcripción con regiones regulatorias génicas. Metodologías *in vitro* para el estudio de la interacción DNA/proteína. EMSA y DNA footprint. Metodologías *in vivo* para el estudio de la interacción DNA/proteína. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Cuando detectar los fragmentos de DNA obtenidos de la CHIP por PCR, microarray o plataformas NGS.

5. Manipulación de la expresión génica en animales de experimentación y en células en cultivo. Introducción a la manipulación génica en animales. Integración random de vectores en el genoma de células ES para aumentar o disminuir la expresión de genes. Inserción de fragmentos de DNA en el genoma por recombinación homóloga. Noción de knock-out y knock-in. Sistemas CRE/LoxP condicionales. Obtención de células MEF a partir de animales genéticamente modificados. Sistemas de edición del genoma: TALEN y CRISPR/CAS9 y su utilización para la modificación génica de animales y células en cultivo.



Tema 2: Transcripción

1. Transcripción de RNA. Promotores (Core-promotor) y sus elementos, promotores TATA y TATA-less. Complejo de preiniciación. Etapas de la transcripción: Iniciación elongación y terminación de transcripción. Transcripción abortiva y Pausado de Pol II. Regulación de estos procesos

2. Factores de transcripción (estructura de dominios). Co-reguladores: Mediador-SAGA. Cromatina, su estructura. Posicionamiento y dinámica de nucleosomas, importancia de NFR en la regulación de transcripción.

3. Modificaciones post-transcripcionales de histonas, código de histonas. Importancia de las modificaciones post-traduccionales de histonas, y estructura de la cromatina. Remodeladores de cromatina, importancia en regulación transcripcional.

4. Estructura 3D del núcleo. Territorios cromosómicos. Posicionamiento de cromosomas y genes. Dominios topológicos, TADs, LADs. Enhancers, Superenhancers, Loops de cromatina e interacciones alto grado de cromatina. Factorías de Polimerasa. Rol de la estructura tridimensional del núcleo y cromatina en la regulación de la transcripción.

5. Transcripción de RNAs no codificantes (ncRNAs). ncRNAs cortos y largos, siRNAs, RNAs esponjas, eRNAs, ceRNAs, RNA circulares. Rol en la regulación de transcripción.

6. Memoria transcripcional. "Gene Gating": localización de genes en poro nuclear y su importancia en la expresión génica. R-loops, roles en estructura de cromatina y transcripción

Tema 3: Epigenética

1-Heterocromatina y eucromatina. Silenciamiento génico. Proteína HP1, estructura, función. Epigenética. Modificaciones post-traduccionales de histonas. Regulación. Establecimiento y Propagación de heterocromatina. Silenciamiento transcripcional por siRNA. RNA no codificantes y ensamblado de heterocromatina.

2- Metilación del ADN. DNA metiltransferasas. Proteínas de unión a citosina metilada. Mecanismos de represión de la transcripción mediados por metilación. Técnicas de estudio de cambios epigenéticos. Demetilación del ADN.

3-Memoria epigenética. Memoria epigenética en la división celular. Memoria epigenética transgeneracional. Marcas epigenéticas en el desarrollo. Reprogramación epigenética del genoma embrionario. Regulación epigenética de genes en células germinales y somáticas.



Complejos Policomb y Tritorax. Mecanismos de reclutamiento a la cromatina de los complejos Policomb. Cromatina con marcas bivalentes. Regulación de la transcripción por Policomb. Diferenciación celular. Regulación por RNAs no codificantes. Epigenética y cáncer.

Tema 4: Replicación del DNA y Mantenimiento de la Integridad Genómica

1. Características generales de la Replicación. Sitio de inicio de la replicación. Semiconservatividad. Bidireccionalidad. Semidiscontinuidad. Segregación simétrica y asimétrica del DNA. Elongación y DNA polimerasas. DNA polimerasas de procariotas y eucariotas. Mantenimiento de la fidelidad replicativa. Eficiencia catalítica. Estructura de la DNA polimerasa III y mecanismo de acción.

2. Telómeros y Telomerasas. Problema en la replicación de los extremos de los cromosomas. Estructura y mecanismo de acción de la telomerasa. Estructura del telómero. Regulación de la telomerasa y del largo del telómero. Relación entre la proliferación y los telómeros: Límite de Hayflick y senescencia replicativa. Relación entre telomerasa y cáncer. Relación entre telomerasa e inmortalidad celular

3. Replicación en eucariotas inferiores y superiores. Análisis comparativo de orígenes de replicación en levaduras y mamíferos. Identificación de orígenes. Proteínas iniciadoras. Hipótesis contrapuestas sobre la localización de orígenes. Paradoja de la especificidad del replicador. Factorías de replicación. Remodelación de la cromatina durante la replicación. Estructura de la cromatina y mecanismos epigenéticos en la especificación de orígenes de replicación.

4. Regulación de la Replicación del DNA y el ciclo celular.

Organización del ciclo celular y la maquinaria regulatoria. Acoplamiento crecimiento y división celular. Puntos de control. Control traduccional del ciclo. Modelos de transiciones interfase. Teoría del licenciamiento del origen de replicación. Proteínas involucradas en el licenciamiento. Ensamblado del complejo prereplicativo. Oncogenes y genes supresores de tumores. Inmortalización y tumorigénesis.

5. Mantenimiento de la integridad del genoma. Daños al DNA y mecanismos de reparación. Respuesta celular al estrés genotóxico. Diferentes mecanismos de muerte celular. Dinámica de la cromatina y preservación de la información genética. Integridad genómica en células totipotentes y multipotentes.

6. Senescencia celular y envejecimiento. Senescencia replicativa e inducida por estrés genotóxico y oncogenes. Senescencia en células pluripotentes. Arquitectura nuclear y senescencia. Cáncer y envejecimiento. Aspectos evolutivos y teorías acerca del envejecimiento.



Tema 5: Procesamiento del RNA

1. **Tipos de intrones.** Intrones autocatalíticos y no-autocatalíticos

2. **Splicing.** Intrones GU-AG. Señales y mecanismo del splicing de los precursores de los ARN nucleares. Spliceosoma: componentes, estructura, formación, ensamblado, ciclo y función, snurps. Complejo *Commitment*. Core catalítico del spliceosoma. Elementos enhancers y silenciadores. Proteínas SR y hnRNP. Almacenamiento de los factores de splicing, Formación de speckles. Rol de la RNA Polimerasa II en el splicing.

3. **Spliceosoma menor.** Intrones AU-AC. Mecanismo y factores involucrados.

4. **Splicing alternativo.** Modelos. Regulación. Rol de la RNA Polimerasa II en el splicing alternativo. Definición de procesos biológicos por regulación del splicing alternativo en condiciones normales y patológicas.

5. **Capping.** Síntesis 7mG, tipos y estructura. Proteínas de síntesis y de unión al CAP. Regulación entre CAP y transcripción, splicing, estabilidad, exportación, traducción y poliadenilación. Capping citoplasmático: rol en la estabilidad y traducción.

6. **Poliadenilación.** Síntesis y complejos proteicos involucrados en poliadenilación, selección de sitio acoplado a transcripción. Control del largo de la cola de poliA. Poliadenilación, transcripción y splicing. Rol sobre traducción y estabilidad. Mecanismos y rol de la poliadenilación alternativa. Poliadenilación citoplasmática. Modificación del 3' de RNA de histonas.

Tema 6: Traducción de proteínas

1-**Traducción.** Etapas de la traducción, iniciación, elongación y terminación. Diferencias entre procariontes y eucariontes. Ribosomas. tRNA. Aminoacil tRNA-sintetasas. Iniciación. Iniciación Cap dependiente y Cap independiente. Activación del RNAm. Circularización del mRNA. Escaneado y reconocimiento de AUG iniciador. Factores de iniciación.

2- **Regulación del inicio de la traducción.** Modificación post-traducciona de factores de iniciación, cascadas de señalización. Regulación mediada por la estructura de mRNA. Técnicas de estudio de traducción de proteínas. uORFs presentes en 5'UTR, "leakyscanning" y reiniciación. Regulación de la traducción por distintos estímulos de estrés. uORFs y transformación tumoral. "Shunting" de ribosomas. Iniciación en sitios no AUG. Regulación de iniciaciones por IREs. Proteínas que se unen a elementos regulatorios del mRNA. Técnica de CLIP, PAR-CLIP. Modificaciones epigenéticas del mRNA. Interacciones miRNA-mRNA.



3- Elongación y terminación de la traducción. Factores de elongación. Unión peptídica. Translocación del ribosoma. Regulación de la elongación por corrimiento del marco de lectura. Terminación de la traducción. Uso de codones, velocidad de la traducción. Regulación de la traducción por longRNA no codificantes.

4- Traducción localizada del RNAm. Distintos mecanismos de localización del mRNA y la regulación de su traducción. Métodos de visualización de la traducción localizada *in vivo*

Programa Trabajos Prácticos

CLOADO DEL PROMOTOR DEL GEN *UGA4* PARA EL ANÁLISIS DE SU REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN *Saccharomyces cerevisiae*

CLASE 1: Aislamiento de DNA genómico y amplificación por PCR

CLASE 2: Visualización del producto de PCR y digestión con enzimas de restricción

CLASE 3: Purificación del vector y el fragmento digeridos del gel de agarosa

CLASE 4: Gel analítico del producto de PCR y vector digeridos y purificados

CLASE 5: Ligación del promotor *UGA4* en el vector YEp357-LacZ y transformación de bacterias

CLASE 6: Análisis de transformantes – Repique de colonias de bacterias

CLASE 7: Análisis de transformantes (*Screening*)

CLASE 8: Elección del vector recombinantes y transformación de levaduras

CLASE 9: Estudio de la regulación transcripcional del gen *UGA4* mediante el ensayo de gen reportero utilizando la construcción pYEp-UGA4-lacZ



Condiciones de aprobación de la materia

Materia Promocional

Evaluaciones

2 exámenes parciales teóricos virtuales

1 seminario virtual

Trabajo de laboratorio virtual

Examen final (para aquellos que no promocionen)

Aprobar por Promoción

Estudiantes que aprueben los dos exámenes parciales con promedio igual o superior a 8 y aprueben con exposición de seminarios con nota igual o superior a 8 y aprueben los trabajos de laboratorio con nota igual o superior a 6, aprobarán la materia en forma de Promoción.

Aprobar con Examen Final

Estudiantes que aprueben los dos exámenes parciales con nota 6 o superior, pero sin alcanzar el promedio 8, y aprueben la exposición de seminarios con nota igual o superior a 6 pero menor a 8 y aprueben el trabajo de laboratorio con nota igual o superior a 6 deberán dar un examen final para aprobar la materia que podrá ser en modalidad virtual.

Carga horaria

Totales por semana: 12 horas

Teóricas; 6 horas

Laboratorio: 4 horas

Seminarios: 2 horas