ASIGNATURA / COURSE TITLE

Bioquímica experimental avanzada II / Experimental Advanced Biochemistry II

1.1. Código / Course number

18229

1.2. Materia / Content area

Integración Fisiológica y Biomedicina Molecular (modulo 6)/Integrative Physiology and Molecular Biomedicine

1.3. Tipo / Course type

Formación obligatoria / Compulsory subject

1.4. Nivel / Course level

Grado / Bachelor (first cycle)

1.5. Curso / Year

3º / 3rd

1.6. Semestre / Semester

2º / 2nd (Spring semester)

1.7. Número de créditos / Credit allotment

6 créditos ECTS / 6 ECTS credits

1.8. Requisitos previos / Prerequisites

Se recomienda haber cursado la asignatura de Bioquímica experimental I y II, y haberse matriculado en las asignaturas de Virología, Bases Moleculares de la Patología e Inmunología. Es muy recomendable que el alumno esté familiarizado con los conceptos tratados en Genética Molecular e Ingeniería Genética, y en las asignaturas de Estructura y Función de Macromoléculas.
Es importante disponer de un nivel de inglés que permita al alumno leer la bibliografía de consulta.

It is highly recommended to have completed the course of Experimental Biochemistry I and II, and enrollment in Virology, Molecular Basis of Pathology and Immunology subjects. It is also advisable a background in Molecular Genetics, Genetic Engineering and Structural Biology.
Students must have a suitable level of English to read references in this language.

1.9. Requisitos mínimos de asistencia a las sesiones presenciales / Minimum attendance requirement

La asistencia es obligatoria / Attendance is mandatory

1.10. Datos del equipo docente / Faculty data

Belén Pérez González, Coordinadora
Departamento de Biología Molecular/ Department of Molecular Biology
Facultad Ciencias/ Faculty of Science
Despacho – 601 Módulo 10/ Office 601- Module 10
Teléfono / Phone: 91-4974134
Correo electrónico/email: bperez@cbm.uam.es
Páginaweb/ website: http://portal.uam.es/portal/page/profesor/prof2703
Horario de atención al alumnado: previa solicitud /Office hours: previously agreed

1.11. Objetivos del curso / Course objectives

La asignatura Bioquímica Experimental Avanzada II contempla la formación en aspectos experimentales relacionados con otras asignaturas troncales del sexto semestre del grado en Bioquímica. Se fomentará la aplicación del rigor científico en el tratamiento experimental de los resultados y datos obtenidos, el fomento de la independencia del estudiante para desarrollar protocolos experimentales, y la capacidad para solucionar problemas científicos. Esta asignatura engloba la parte práctica de las asignaturas teóricas del segundo semestre del tercer curso del grado de Bioquímica: Virología, Inmunología y Moleculares de la Patología II.
La asignatura persigue el conocimiento y aplicación de algunos métodos experimentales e instrumentales utilizados en Biomedicina, con énfasis en la evaluación de procesos biológicos y sus alteraciones patológicas utilizando cultivos celulares y técnicas genómicas.

Competencias específicas:

• Manejo de líneas celulares eucarióticas en cultivo.
• Expresión de genes heterólogos en células eucariotas de forma transitoria y estable.
• Utilización de técnicas cualitativas y cuantitativas para evaluar la expresión de genes.
• Evaluación del proceso de splicing en situaciones normales y patológicas.
• Silenciamiento de la expresión génica mediante el uso de RNA interferente.
• Tráfico de proteínas y localización subcelular.
• Neutralización de infecciones virales.
• Estudio de la variabilidad genética humana para el desarrollo de pruebas diagnósticas de uso clínico y forense.
• Aplicación de técnicas genómicas para el diagnóstico de enfermedades genéticas humanas.

The Experimental Advanced Biochemistry II provides training in experimental aspects related to other subjects of the 6th semester of the course. It will promote the application of scientific rigor in handling experimental data, promoting the student´s independence to develop experimental protocols, and the skills to solve scientific problems. This course covers the experimental side of Virology, Immunology and Molecular Pathology II subjects.
The course aims the knowledge and application of some experimental methods and instruments frequently used in biomedicine, with emphasis on the evaluation of biological processes and their pathological alteration by means of cell culture and genomic techniques.

Specific skills:

• Culture of eukaryotic cells.
• Transient and stable expression of heterologous genes in eukaryotic cells.
• Evaluation of mRNA splicing in normal and pathological situations.
• Silencing gene expression by RNA interference (RNAi).
• Protein trafficking and subcellular localization.
• Neutralization of viral infections.
• Study of human genetic variability and its application in diagnostic tests for clinical and forensic use.
• Application of genomic technologies for the diagnosis of human genetic diseases.

1.12. Contenidos del progRama / Course contents

Esta asignatura experimental contempla el manejo y mantenimiento de cultivos celulares, preparación de medios, contaje y siembra de células. Se emplearán líneas celulares humanas HEK293T y HeLa.

La asignatura contempla la realización de 6 prácticas:

Práctica 1: Transfecciones transitorias del gen β-galactosidasa y evaluación *in situ* de la actividad enzimática. Se analizarán los factores que afectan a la eficiencia de transfección.

Práctica 2: Protein targeting. Localización subcelular de proteínas fluorescentes (EGFP y dsRed) en mitocondria, núcleo y retículo endoplásmico. Tinciones nucleares con DAPI. Análisis mediante microscopía de fluorescencia.

Práctica 3: Preparación de lentivirus pseudotipados y ensayos antivirales. Se usarán lentivirus no replicativos que expresan el gen EGFP para transducir células HeLa, y estimar de esta manera el título del virus (unidades formadoras de focos de EGFP/mL). Se ensayarán antisueros neutralizantes e inhibidores retrovirales (ej. AZT) para neutralizar la infección de lentivirus que expresan el gen luciferasa. Se calcularán las concentraciones efectivas de inhibición (IC_{50}).

Práctica 4: Preparación de lentivirus para el silenciamiento genético mediante interferencia con shRNA. Para ello se prepararán lentivirus anfotrópicos que expresan 2 shRNA silenciadores diferentes para el gen luciferasa. Se transducirán células HeLa que expresan el gen luciferasa de modo constitutivo, y se cuantificará el nivel de silenciamiento midiendo la actividad luciferasa. Se aplicarán test estadísticos para determinar cúal de los dos shRNA es más efectivo.

Práctica 5: Análisis funcional de mutantes de splicing. Para ello se realizará una transfección transitoria con minigenes normales y portadores de mutaciones de splicing en intrones y exones. El resultado final del proceso de splicing se analizará mediante análisis del perfil transcripcional.

Práctica 6: Identificación de mutaciones del gen PAH mediante secuenciación y restricción. Nomenclatura de mutaciones. Efecto de mutaciones. Manejo de bases de datos.Estudio de marcadores genéticos. Concepto de huella genética, haplotipo y de polimorfismos. Se estudiarán RFLP y microsatelites asociados al gen de la fenilalanina hidroxilasa (PAH).

During this practical course, the students will culture and maintain mammalian cells for transfection with plasmids encoding reporter genes and infection with viruses.

The course consists of 6 practices.

Practice 1: Transient transfections of β-galactosidase gene and *in situ* evaluation of enzymatic activity. Evaluation of parameters affecting the efficiency of transfection.

Practice 2: Protein targeting. Subcellular localization of fluorescent proteins (EGFP and dsRed) in the nucleus, mitochondria or endoplasmic reticulum. Nuclear staining with DAPI. Analysis by fluorescence microscopy.

Practice 3: Preparation of pseudotyped lentiviruses for antiviral assays. We will use amphotropic lentiviruses expressing EGFP to transduce HeLa cells, and thereby estimate the viral titre (EGFP focus-forming units per mL). In parallel, we will use neutralizing antisera and anti-retroviral drugs (e.g AZT) to block lentivirus expressing the luciferase gene. We will estimate the effective concentration (IC_{50}) of the compounds.

Practice 4: Preparation of lentivirus for gene silencing by shRNA interference. We will prepare lentiviruses expressing two different shRNAs targeted to luciferase gene. Then, we will transduce a HeLa cell line line that constitutively expresses the luciferase gene to measure the level of silencing. A statistical test will be applied to determine which of the two shRNA is more effective in silencing.

Practice 5: Functional analysis of splicing mutants. This will involve a transient transfection with artificial minigenes, and with those that carrying mutations in intronic and exonic regulatory elements. The result of splicing process will be analyzed by transcriptional profiling.

Practice 6: Identification of mutations in the PAH gene by sequencing and restriction. Mutation nomenclature. Effect of mutations. Query online databases. Study of genetic markers. Concept of genetic fingerprinting, haplotype and polymorphisms. We will study RFLP and microsatellites associated to phenylalanine hydroxylase (PAH) gene.

1.13. Referencias de consulta / Course bibliography

Libros de consulta general / Text books

• Sambrook J., Russell, D.(2006).The condensed protocols from Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Sprig Harbor.
• Human Molecular genetics. Tom Strachan and Andrew Read. 4th Edition. 2011.
• The molecular Biology of the Gene. Watson *et al*. 6th Edition. 2008
• Virus patógenos. Editores Luis Carrasco y J.Mª Almendral. Editorial Hélice. 2006
• Antibodies: A Laboratory Manual. E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988

Protocolos online /Online protocols:

http://www.currentprotocols.com/
http://www.molecularstation.com/
http://www.protocol-online.org/

Diseño de RNAi/RNAi design

http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/
http://www.sirnawizard.com/
http://www.dharmacon.com/designcenter/designcenterpage.aspx

Bases de datos/ Databases

ENSEMBL: http://www.ensembl.org/index.html
NCBI: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
OMIN: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim
HGVS: http://www.hgvs.org/
HGMD:http://www.hgmd.org/

2. Métodos docentes / Teaching methodology

Las clases prácticas se realizarán en los laboratorios del Departamento de Biología Molecular, en el edificio de Biología perteneciente a la Facultad de Ciencias. Las clases se impartirán en sesiones de mañana o tarde, de lunes a viernes, en el segundo semestre del curso. Al comienzo de la asignatura se proporcionará un guión de prácticas con los contenidos de las prácticas. Cada práctica comenzará con una explicación de la actividad a desarrollar, que incluirá:

• el objetivo de la práctica
• la metodología a seguir
• la recopilación de los resultados y su análisis posterior.

Con estas indicaciones el alumno deberá elaborar un protocolo experimental que anotará en su cuaderno de laboratorio, y que podrán consultar en los controles periódicos programados. Los laboratorios están equipados con todo lo necesario para la exposición inicial de los profesores, para la evaluación de los resultados y para la consulta online de las bases de datos y otros servidores que sean necesarios. Todos los contenidos necesarios para llevar a cabo las prácticas estarán disponibles en Moodle.
Las prácticas finalizarán con un seminario donde se discutirán los resultados obtenidos por los alumnos. Para que los alumnos se familiaricen con el tratamiento estadistico de datos, se llevará a cabo una evaluación conjunta de los resultados de todo el grupo.

Practical classes are conducted in the laboratories of the Department of Molecular Biology, in the Biology building belonging to the Faculty of Sciences. Classes are taught in morning and afternoon sessions, Monday through Friday in the second half of the course. At the beginning of the course, students will be provided with a script containing a full description of contents. Each practice begins with an explanation that includes:

• The goal of practice
• The methodology to be used
• The procedures for data collection and further analysis.

With these guidelines, the student must develop an experimental protocol to be recorded in his lab notebook, and that will be available for scheduled periodic tests. The laboratory equipment has been designed to support the teacher lectures, to evaluate the experimental results, and to query online databases and other webservers. All the material needed to carry out practices is available on “The Teacher Page" through Moodle. Practices end with a seminar to

discuss the results obtained. For students to become familiar with the statistical treatment of data, a joint evaluation of group´s results will be conducted.

3. Tiempo de trabajo del estudiante / Student workload

Bioquímica Experimental Avanzada II		Nº de horas	Porcentaje
Presencial	Clases teóricas	70 h (%)	53%
	Clases prácticas		
	Seminarios	4 h (%)	
	Test de evaluación continua	4 h (%)	
	Realización del examen final	2 h (%)	
No presencial	Elaboración de protocolos	20 h (%)	47 %
	Estudio semanal (5 horas x 4 semanas)	30 h (%)	
	Preparación del examen	20 h (%)	
Carga total de horas de trabajo: 25 horas x 6 ECTS		**150 h**	

Experimental Advanced Biochemistry II		Nº hours	Percent
In-class room activities	Lectures	70 h (%)	53%
	Practical sessions		
	Seminars	4 h (%)	
	Continuous assessment tests	4 h (%)	
	Final examination	2 h (%)	
Out of class-room classes	Development of protocols	20 h (%)	47 %
	Weekly study (5 hours x 4 weeks)	30 h (%)	
	Exam preparation	20 h (%)	
Total workload (hours)		**150 h**	

4. Métodos de evaluación y porcentaje en la calificación final / Evaluation procedures and weight of components in the final grade

Dada la naturaleza experimental de la asignatura, la asistencia a las prácticas de laboratorio es obligatoria y necesaria para la evaluación del alumno. La falta de asistencia ocasional a alguna de las prácticas deberá de ser debidamente justificada.

La calificación de la asignatura consistirá en las siguientes pruebas:

1. Evaluación continua (20% nota final). Esta evaluación consistirá en pruebas rápidas a lo largo de las prácticas. Consistirán en la elaboración de protocolos específicos para el abordaje de un objetivo, y en la evaluación y discusión de datos experimentales reales. La prueba consistirá en preguntas de respuesta breve y algunas de tipo test. Los alumnos podrán consultar su cuaderno de laboratorio.

2. Examen final (80% nota final). El examen final consistirá en un examen tipo test que abarque el contenido experimental de la asignatura. Para evitar redundancia, las preguntas se consensuarán con los profesores de las asignaturas teóricas de Virología, Inmunología y Bases Moleculares de la Patología I y II. Las preguntas se dirigirán hacia la comprensión de conceptos y la resolución de pequeños cálculos numéricos.

Se considerará "no evaluado" al alumno que no haya completado todas las prácticas de laboratorio, o que no se haya presentado al examen final en la convocatoria correspondiente.

La convocatoria extraordinaria consistirá en un único examen similar al examen final de la convocatoria ordinaria. Se conservará la puntuación obtenida en la evaluación continua (1), de modo que la nota final se calculará del mismo modo que en la convocatoria ordinaria.

Given the experimental nature of the subject, attendance to practical classes is mandatory and necessary for the evaluation of student. The occasional lack of assistance to some of the practices must be duly justified.

The final mark of the subject will be obtained as follows:

1. Continuous assessment (20%). This evaluation will consist of quick tests weekly

, where the student must show skills to make protocols to undertake specific experiments. Students will also be asked for the evaluation and discussion of real experimental data. The test will consist of both short answer and multiple-choice questions. Students may consult their notebook.

2. Final examination (80%). The final exam will consist of a multiple-choice test covering the experimental content of the course. To avoid redundancy, questions will be agreed with teachers of Virology, Immunology and Molecular Basis of Pathology subjects. The questions are directed towards understanding concepts and solving simple numerical calculations involving correct reasoning rather than memoristic skills.

The student who has not completed all the practical sessions or not submitted the final exam in the corresponding call, will be considered as "not evaluated"

The second call (extraordinary) examination will consist of a single final exam similar to the ordinary call. It kept the score on the continuous assessment (1), so that the final mark will be calculated as in the ordinary call.

Cronograma* / Course calendar

Grupos 1 y 2 (2314-2315)/ Groups 1 & 2 (2314-2315)

Semana **Week**	**Contenido** **Contents**	**Horas presenciales** **Contact hours**	**Horas no presenciales** **Independent study time**
1	práctica 6 práctica 3	20	18
2	práctica 3 práctica 4 práctica 6	20	18
3	Practica 1 práctica 3 práctica 4	20	18
4	práctica 2 práctica 4 practica 5	18	16

Grupos 3 y 4 (2316-2317) / Groups 3 & 4 (2316-2317)

Semana **Week**	**Contenido** **Contents**	**Horas presenciales** **Contact hours**	**Horas no presenciales** **Independent study time**
1	Práctica 1 Práctica 3 Práctica 4 (I) Practica 6	20	18
2	Práctica 6 (II) Práctica 1 (I) Práctica 3 Practica 4 (II)	20	18
3	Práctica 6	6	6
4	Práctica 2 Práctica 4 Practica 5 (I)	16	14
5	Práctica 4 Práctica 5	16	14