

Iniciación a la experimentación en el ámbito de la Biología Celular, Molecular, Genética y Evolutiva

Tema 7. Resultados experimentales

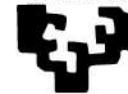


OCW
OpenCourseWare



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

NAZIOARTEKO
BIKAINASUN
CAMPUSA
CAMPUS DE
EXCELENCIA
INTERNACIONAL

Recordamos que los objetivos específicos son:

- 1.- Evaluar cómo afectan mutaciones en MC1R a la localización de la proteína en la célula
- 2.- Testar si mutaciones en MC1R resultan en alteraciones en la ruta de síntesis de melanina.
 - 2.1.- Analizar la expresión diferencial de genes implicados en la ruta de síntesis de la melanina en células portadoras de versiones WT y mutante de MC1R
 - 2.2.- Analizar la síntesis de melanina en células portadoras de versiones WT y mutante de MC1R
- 3.- Testar si mutaciones en MC1R tienen efecto en la proliferación celular
- 4.- Analizar las frecuencias de los diversos polimorfismos de MC1R en diferentes grupos humanos y testar si están bajo algún tipo de selección
- 5.- Predecir en qué regiones geográficas y/o poblaciones se espera una mayor/menor incidencia de melanoma.

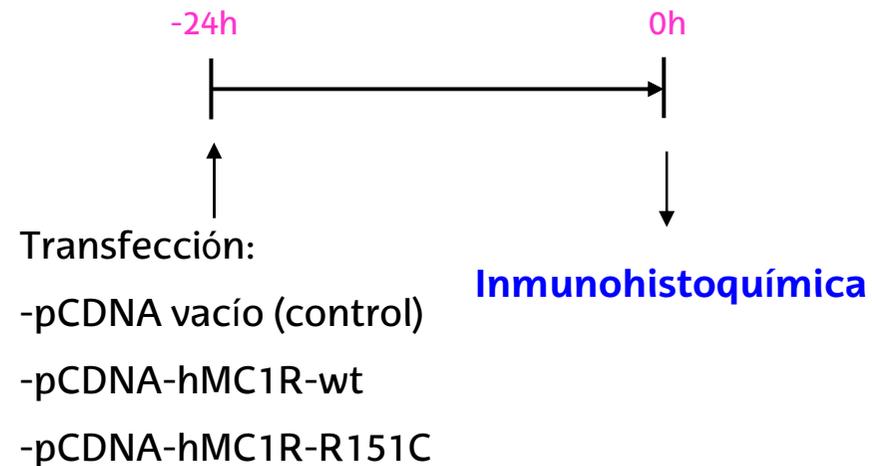


Biología Celular y Genética Molecular

Objetivo 1: Evaluar cómo afectan mutaciones en MC1R a la localización de la proteína en la célula.

Experimento: Transfectar melanocitos murinos B16-F10 con vector (pCDNA) que sobreexpresa el gen MC1R humano ancestral (hMC1R-wt) y el que porta el polimorfismo R151C (hMC1R-R151C) y analizar la localización del MC1R exógeno mediante inmunohistoquímica.

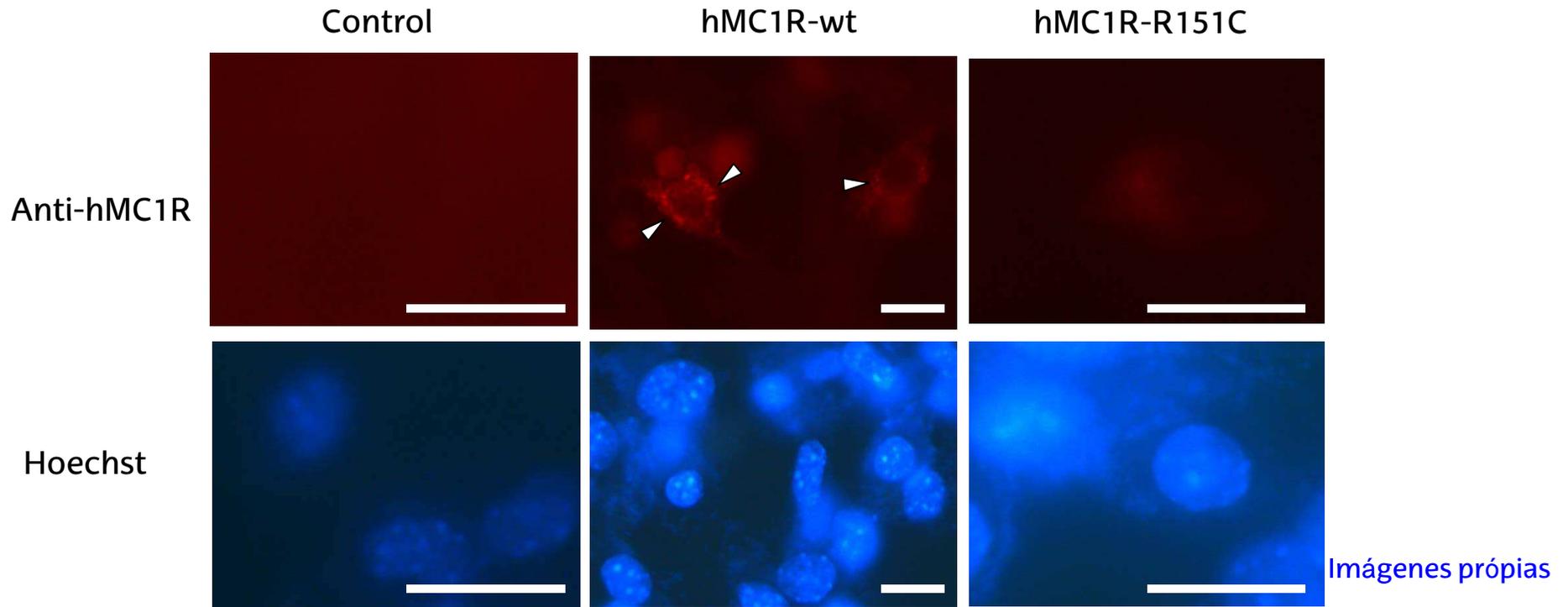
Esquema del experimento:



Biología Celular y Genética Molecular

Objetivo 1: Evaluar cómo afectan mutaciones en MC1R a la localización de la proteína en la célula.

Resultado de inmunohistoquímica:



Microfotografías de la inmunohistoquímica de MC1R humana (fila superior) y tinción Hoechst para DNA (fila inferior) en células B16-F10 transfectadas con los vectores indicados. Los triángulos blancos representan la presencia de MC1R en la membrana plasmática. Barra de escala = 25 μ m.

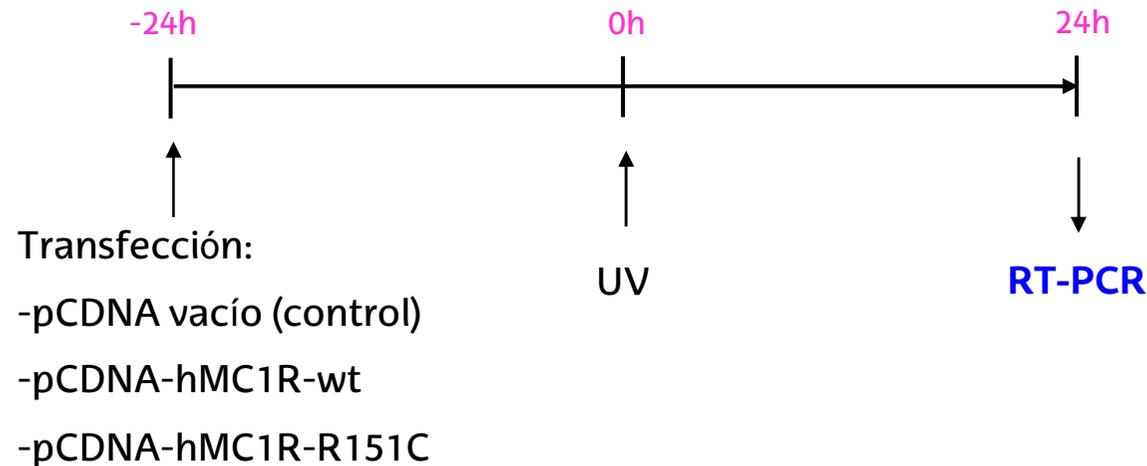


Genética Molecular

Objetivo 2.1: Testar si la mutación R151C de MC1R resulta en alteraciones en la expresión de genes que participan en la ruta de síntesis de melanina.

Experimento: Transfectar melanocitos murinos B16-F10 con vector (pCDNA) que sobreexpresa el gen MC1R humano ancestral (hMC1R-wt) y el que porta el polimorfismo R151C (hMC1R-R151C), activar la ruta de síntesis de melanina con UV y realizar análisis de expresión génica mediante RT-PCR.

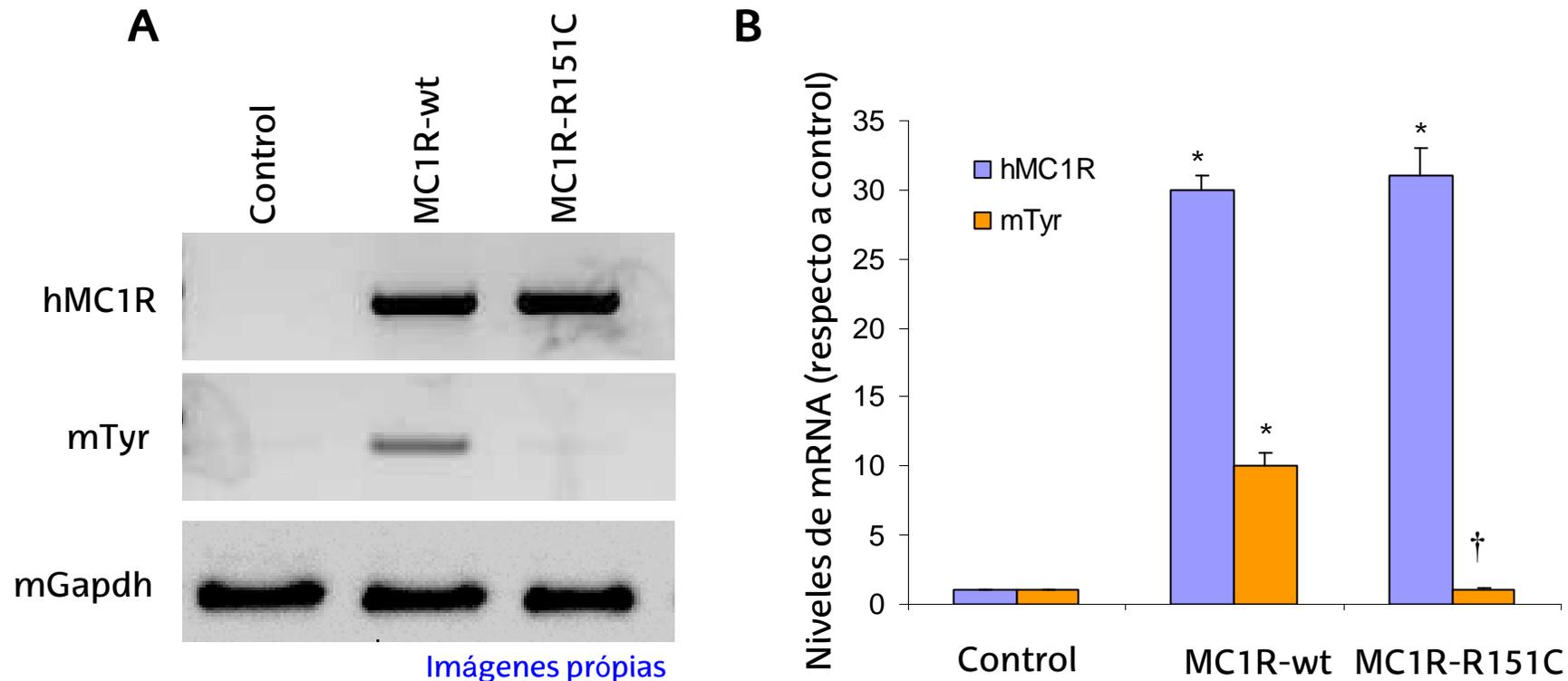
Esquema del experimento:



Genética Molecular

Objetivo 2.1: Testar si la mutación R151C de MC1R resulta en alteraciones en la expresión de genes que participan en la ruta de síntesis de melanina.

Resultado de RT-PCR:



La figura A muestra los resultados de un experimento representativo de RT-PCR a partir de RNA obtenido de células B16-F10 transfectadas con los vectores indicados y estimuladas con luz ultravioleta (UVB), empleando Gapdh como control endógeno. La figura B muestra la cuantificación de los resultados de RT-PCR. Se presentan las medias de los valores de expresión normalizados con el control endógeno y relativos a los obtenidos en células transfectadas con vector vacío en un total de 3 experimentos. Las barras de error representan la desviación estándar. Los resultados se comparan empleando la prueba T de Student. * $p < 0.002$ vs control; † $p < 0.002$ vs MC1R-wt.

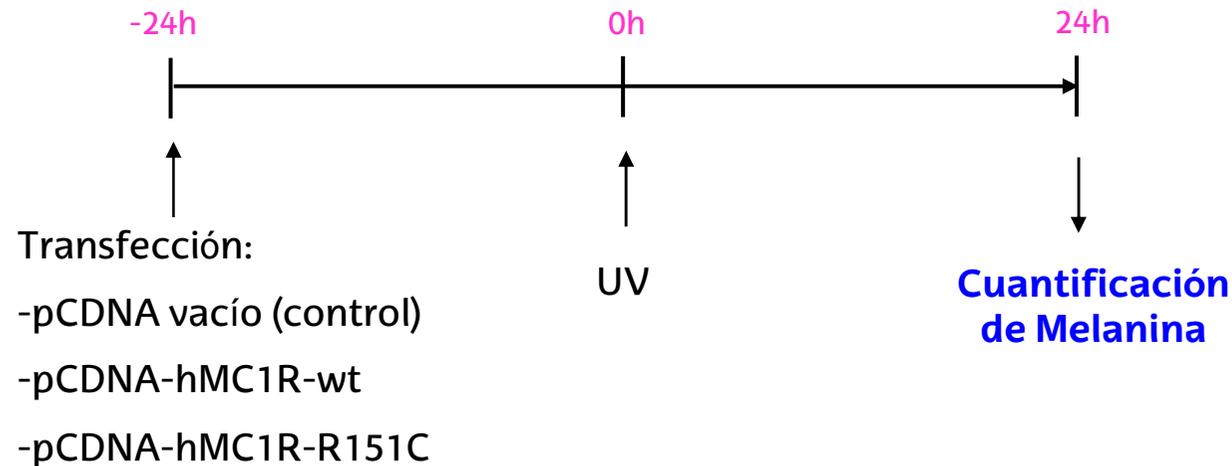


Biología Celular y Genética Molecular

Objetivo 2.2: Testar si la mutación R151C de MC1R resulta en alteraciones en la cantidad de melanina

Experimento: Transfectar melanocitos murinos B16-F10 con vector (pCDNA) que sobreexpresa el gen MC1R humano ancestral (hMC1R-wt) y el que porta el polimorfismo R151C (hMC1R-R151C), activar la ruta de síntesis de melanina con UV y cuantificar la melanina.

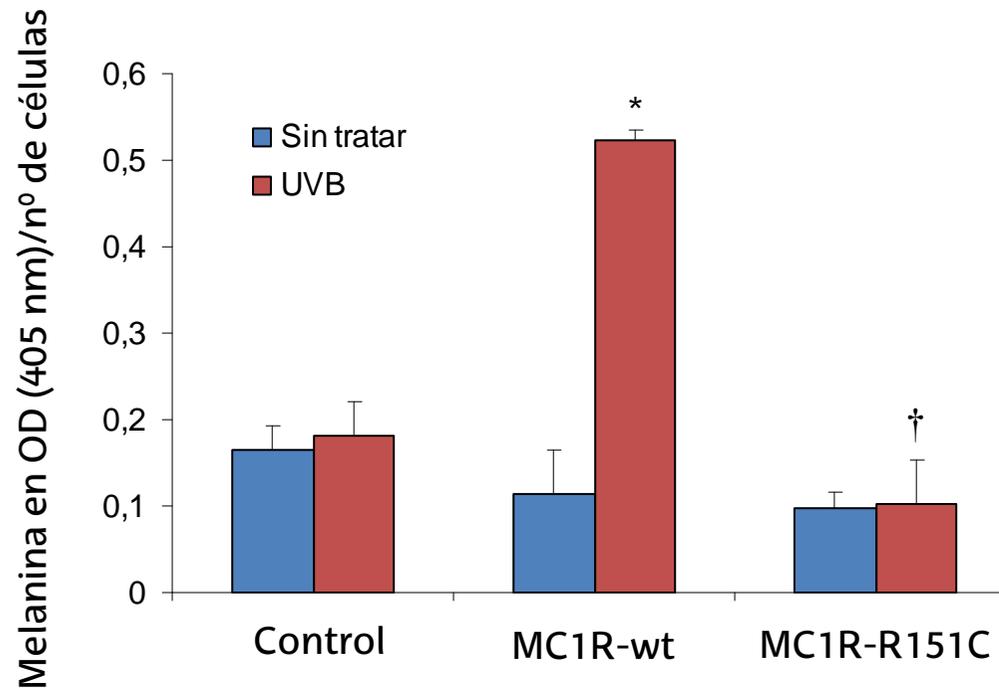
Esquema del experimento:



Biología Celular y Genética Molecular

Objetivo 2.2: Testar si la mutación R151C de MC1R resulta en alteraciones en la cantidad de melanina

Resultado de la cuantificación de melanina:



La figura muestra la cantidad de melanina, medida en absorbancias de células B16-F10 transfectadas con los vectores indicados a radiación UVB. Las células sin tratar son células transfectadas pero que no fueron expuestas a la radiación UVB. Los resultados muestran la media de las absorbancias obtenidas en un total de 3 experimentos. Las barras de error representan la desviación estándar. * $p < 0.002$ vs control UVB; † $p < 0.002$ vs MC1R-wt UVB.

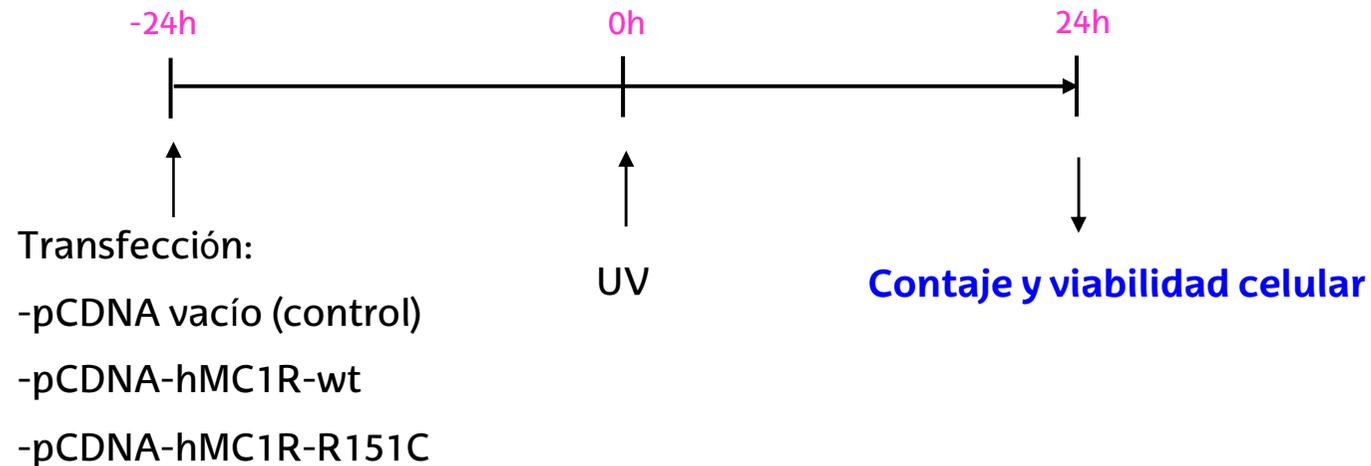


Biología Celular y Genética Molecular

Objetivo 3: Testar si la mutación R151C de MC1R resulta en alteraciones en la proliferación

Experimento: Transfectar melanocitos murinos B16-F10 con vector (pCDNA) que sobreexpresa el gen MC1R humano ancestral (hMC1R-wt) y el que porta el polimorfismo R151C (hMC1R-R151C), activar la ruta de síntesis de melanina con UV y realizar una curva de crecimiento y viabilidad celular.

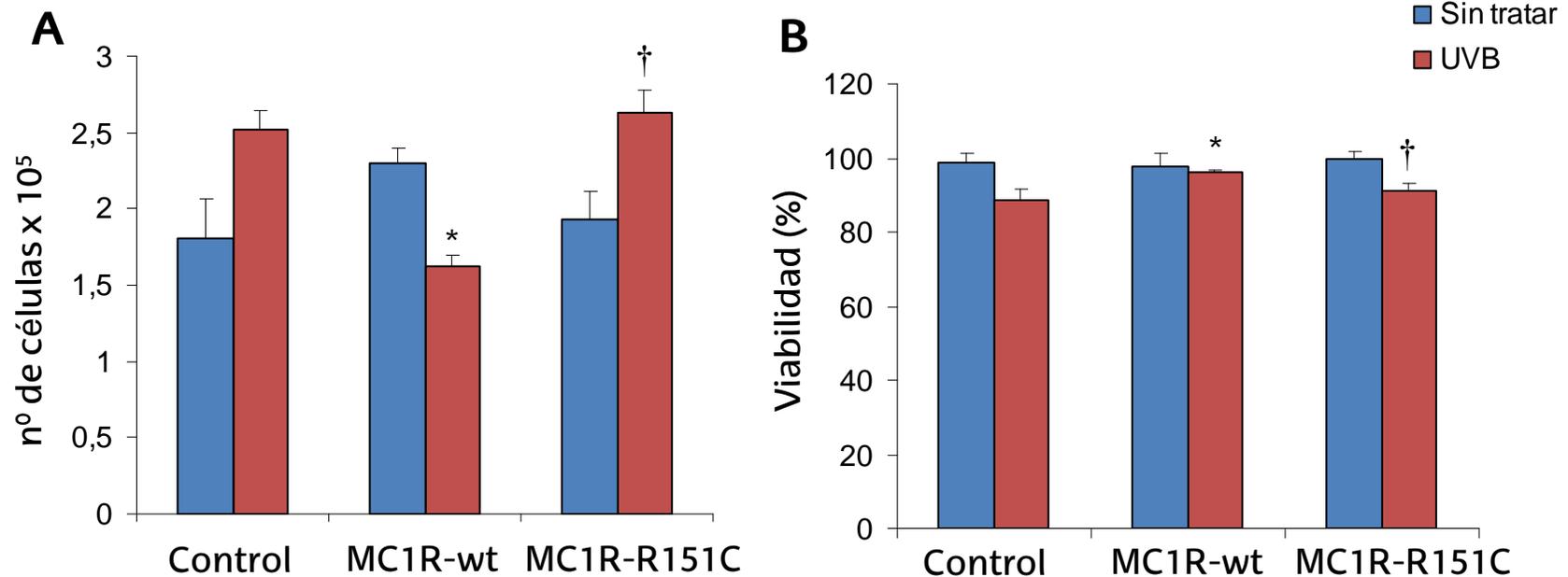
Esquema del experimento:



Biología Celular y Genética Molecular

Objetivo 3: Testar si mutaciones en MC1R tienen efecto en la proliferación y viabilidad celular

Resultado de la curva de crecimiento y viabilidad celular:



Resultados de proliferación celular (figura A) y viabilidad celular (figura B) de las células B16-F10 transfectadas con los vectores indicados y posteriormente expuestas a radiación UVB. Las células sin tratar son células transfectadas pero que no fueron expuestas a la radiación UVB. * $p < 0.002$ vs control UVB; † $p < 0.002$ vs MC1R-wt UVB.



Genética Poblacional y Bioinformática

Objetivo 4: Analizar las frecuencias de los diversos polimorfismos de MC1R en diferentes grupos humanos y testar si están bajo algún tipo de selección.

Objetivo 5: Predecir en qué regiones geográficas y/o poblaciones se espera una mayor/menor incidencia de melanoma.

Primero identificamos las coordenadas del gen MC1R usando UCSC (de la zona codificante no UTR), que son: **chr16:89985667-89986620**

Y guardamos el fichero con la secuencia de referencia en formato texto plano (MC1R_refseq_hg19.txt).

Usando estas coordenadas bajamos los datos de polimorfismos de secuencia para las poblaciones AFR (africa: LWK, YRI y ASW), SEU (TSI y IBS) y NEU (CEU, GBR, y FIN). Recordar los tutoriales: generar dos ficheros MC1R_POP_genotypes.txt y MC1R_POP_statistics.txt)

