

Bachelor's Degree Final Project Biotechnology 2024/2025



Manuel A. Ballesteros, Professor in Cell Biology

Teaching:

- Immunology (Biotechnology Degree)
- Biology (Environmental Sciences Degree)
- Forensic Sciences (Criminology Degree)
- Master of Biosanitary Biotechnology

Research activity

- FIS (Health Research Fund) Project Researcher
- Researcher in CIBER group of Rare Diseases
- More than 10 years of experience in directing Master's degree final projects
- Publications in international magazines

Preliminary analysis of the pathophysiology in fibroblasts from a patient with symptoms compatible with a defect in mitochondrial function

In this study, we propose to carry out a preliminary analysis of the pathophysiology in fibroblasts from a patient affected by a rare disease with symptoms compatible with mitochondrial dysfunction. The main objectives of this work are to determine if (i) mitochondrial dysfunction exists and (ii) molecular diagnosis of the dysfunction.

Methodology

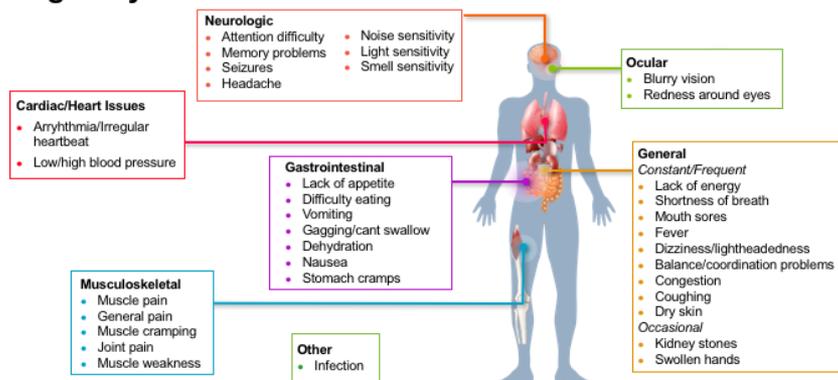
- Human cell cultures
- Western blotting
- Hybrid Clear/Blue Native Electrophoresis

Additionally, and depending on the stage of the research, other techniques such as quantitative PCR and fluorescence microscopy can be used.

Mitochondrial Rare Diseases

Mitochondrial diseases are the result of mitochondria malfunction. This can cause the cell to have less energy and severe intracellular transduction problems, which can lead to severe dysfunction and cell death. The most common organs that can suffer damage are those that have greater energy requirements such as the brain, heart, liver, muscles, kidneys and endocrine system.

Clinical Features of Mitochondrial Myopathies by Organ System



Cell Biology research group



Our research group is specialized in the study of mitochondrial diseases related to Coenzyme Q (CoQ10) deficiency. Our laboratory and the place where the experimental part of the project takes place is located in the Andalusian Center for Developmental Biology (CABD, Building 20), a joint UPO/CSIC center.

Our group also belongs to the CIBERER (Rare Diseases Network Biomedical Research Center.) and is funded by a project from The Health Research Fund (FIS)

The current Principal Investigator of the group is Carlos Santos Ocaña. In this project we will also have the help of Dr. María Victoria Cascajo, a researcher hired by CIBERER.

Just between us: great people and a good work environment in a research center which is a reference in Spain.



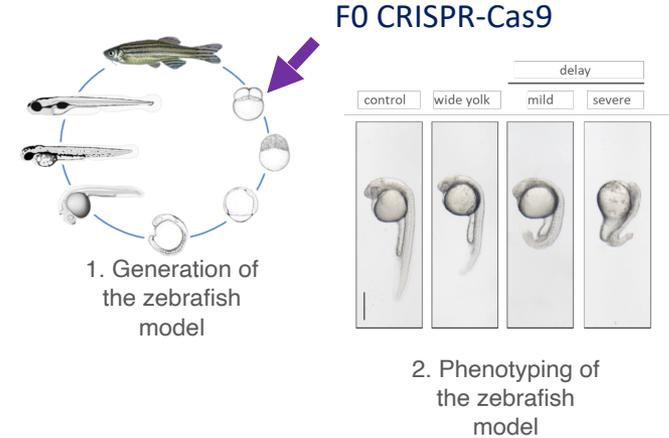
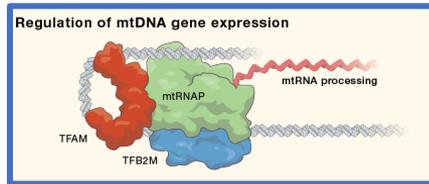
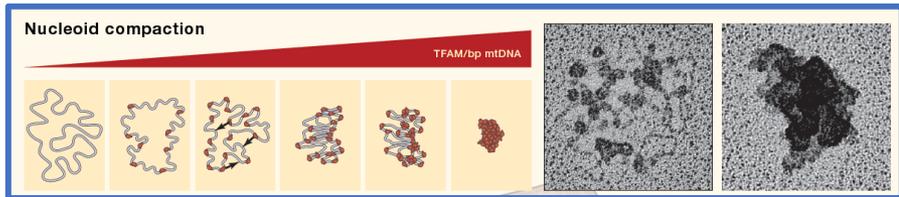
gbrecal@upo.es

DEVELOPMENTAL BIOENERGETICS USING ZEBRAFISH AS A MODEL ORGANISM



Modeling zygotic tfam deficiency *

Tfam contributes to mtDNA compaction (nucleoids) and expression:



In contrast to the nuclear genome, robust transcription in mitochondria occurs instantly after fertilization, **but when is the maternal tfam replaced by the zygotic one?**

To answer this question

Tasks for the Project:

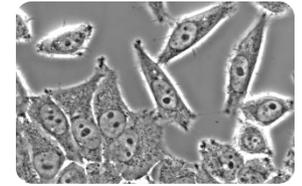
- Generation of specific guides
- Zebrafish embryos injection
- Viability analysis
- Morphological analysis during early development
- Metabolic análisis early during development

* The student will integrate into the research team and will work on the supervisor's ongoing projects

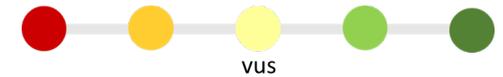
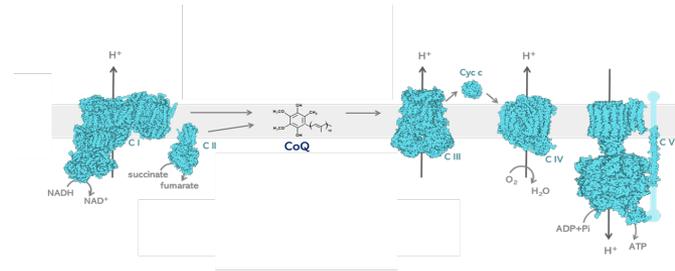
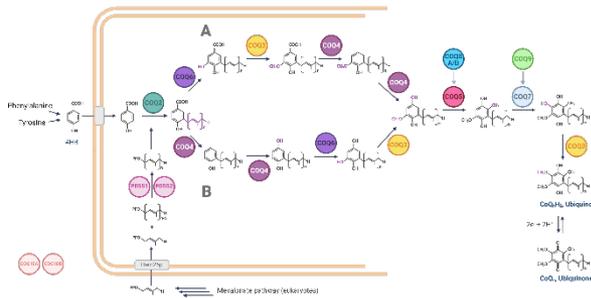


gbrecal@upo.es

PATOGÉNESIS Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PACIENTES AFECTADOS POR PATOLOGÍAS MITOCONDRIALES POCO FRECUENTES *



Modelos celulares y fibroblastos de pacientes



Las variantes identificadas por secuenciación masiva y análisis bioinformático deben ser validadas experimentalmente para un diagnóstico definitivo

Lo objetivos serán:

- 1) Generación, por **mutagénesis dirigida** de la o las variantes seleccionadas del gen COQ en cuestión (técnicas de biología molecular: mutagénesis dirigida, clonación, ligación, PCR, cultivo de bacterias, transformación)
- 2) Establecimiento de un **modelo celular estable** que exprese de forma inducible la variante generada (técnicas de cultivos celulares: mantenimiento de cultivos celulares, transfección, inducción de la expresión)
- 3) Análisis de la **capacidad de rescate del fenotipo silvestre** por parte de la variante seleccionada (técnicas de análisis bioquímico: western blot, extracción y análisis de lípidos, consumo de oxígeno)

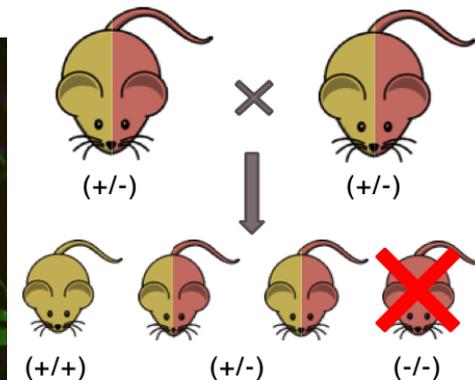
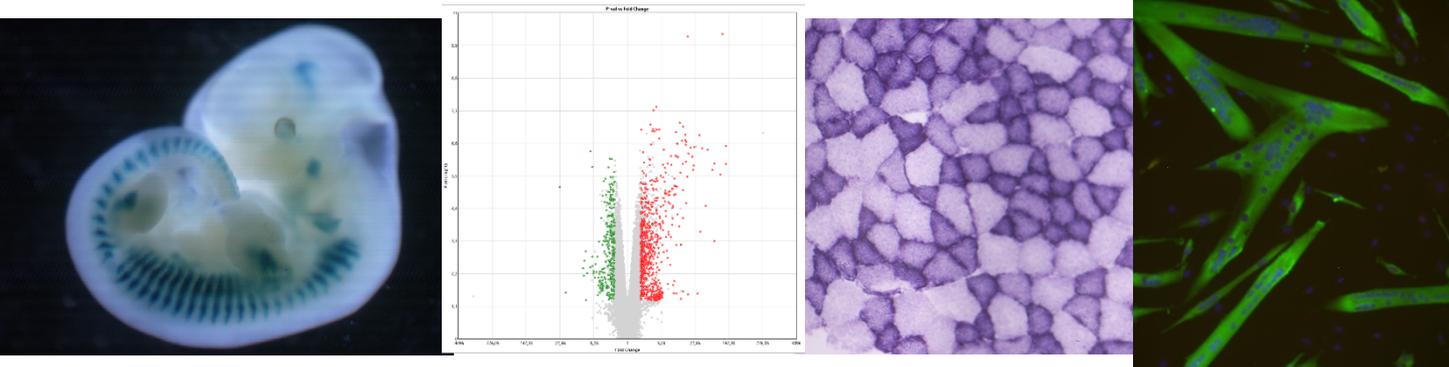
* Este TFG se enmarca dentro del proyecto de investigación de la tutora.

Estudio del desarrollo y diferenciación muscular en un modelo de enfermedad mitocondrial

1. Análisis de marcadores de la enfermedad durante el desarrollo embrionario y su relación con el fenotipo del animal adulto (**PROYECTO 1**)
 - Análisis genéticos (genotipado de animales por PCR, transcriptómica y Q-RT-PCR)
 - Análisis bioquímicos y morfológicos (histológicos e inmunohistoquímicos) en tejidos
2. Análisis de marcadores de la enfermedad en cultivos primarios de fibroblastos humanos y su relación con el fenotipo clínico de los pacientes (**PROYECTO 2**)
 - Análisis genéticos (transcriptómica y Q-RT-PCR)
 - Análisis morfológicos y bioquímicos en células

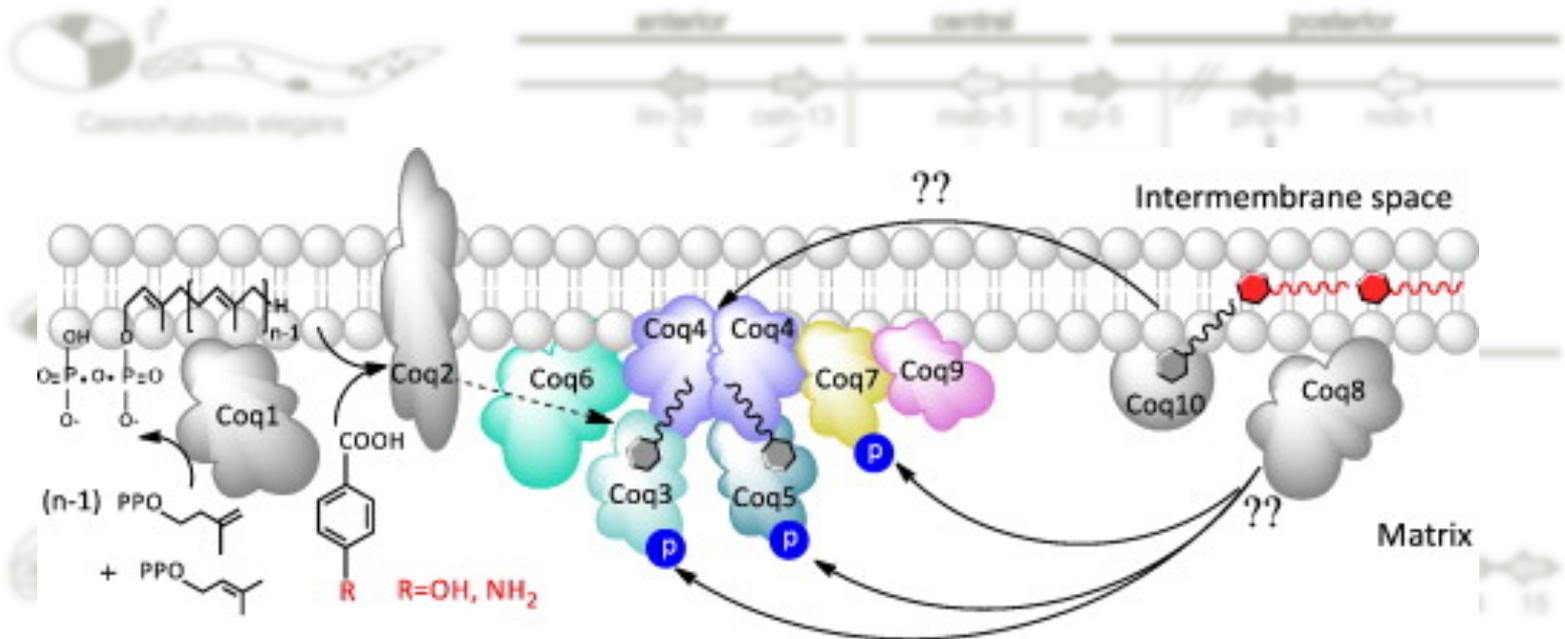
Tutor: Daniel José Moreno Fernández-Ayala (profesor de 1º BTG – Biología Animal y Vegetal)

https://www.cabd.es/es/research_groups/expresion-genica-y-desarrollo-en-deficiencia-de-coenzima-q-un-modelo-para-establecer-el-origen-de-esta-enfermedad-mitocondrial/miembros-del-laboratorio-y-colaboradores-276.html



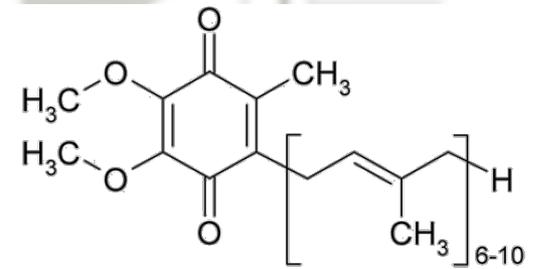
EFECTO DE INTERMEDIARIOS BENCÉNICOS DEL COENZIMA Q10 SOBRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

TUTOR: Guillermo López Lluch



TÉCNICAS:

- Determinación del efecto de intermediarios de la cabeza polar del CoQ10 sobre el crecimiento de células tumorales determinado por técnicas de imagen
- Actividad mitocondrial determinada por medición de respiración y actividad
- Capacidad antioxidante determinado por niveles de proteínas antioxidantes
- Niveles de radicales libres determinados por citómetro de flujo.



EFEECTO DE INTERMEDIARIOS BENÉFICOS DEL COENZIMA Q10 SOBRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

TUTOR: Guillermo López Lluch

Se trata de un trabajo importante para determinar los cambios fisiológicos que los intermediarios de la cabeza polar en la síntesis de coenzima Q10, probablemente deficientes en células tumorales, van a producir sobre estas células y su actividad.

Nuestro objetivo es determinar si este tratamiento puede afectar a la actividad de estas células y comprobar si podríamos utilizar este compuesto en algunos tumores.

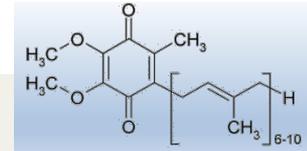
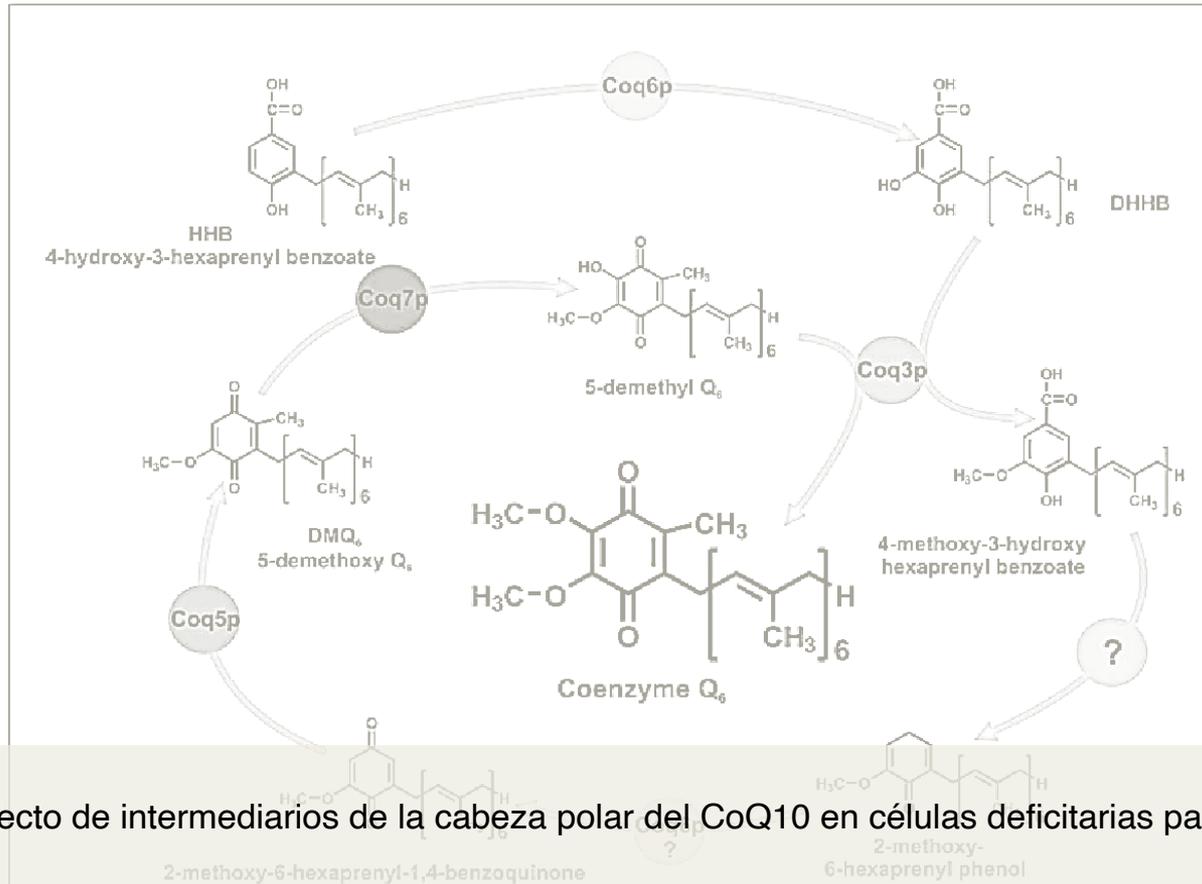
Las técnicas a utilizar son:

CULTIVOS CELULARES
ANÁLISIS DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL
DETERMINACIÓN DE CONSUMO DE OXÍGENO
CITOMETRÍA DE FLUJO

**Si quieres aprender técnicas para el análisis de actividades mitocondriales,
esta es tu OPORTUNIDAD.**

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE COENZIMA Q10 POR LOS PRECURSORES DE LA CABEZA POLAR

TUTOR: Guillermo López Lluch



Técnicas:

Determinación del efecto de intermediarios de la cabeza polar del CoQ10 en células deficitarias para determinar:

- Niveles finales de coenzima Q10
- Expresión a nivel de mRNA de los diferentes componentes implicados en la síntesis de coenzima Q10
- Comprobación de la relación entre los niveles de mRNA y los niveles de proteína.
- Posible efecto de inductores de mito/autofagia en la regulación de estos genes.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE COENZIMA Q10 POR LOS PRECURSORES DE LA CABEZA POLAR

TUTOR: Guillermo López Lluch

Se trata de un estudio que intenta establecer si existe algún mecanismo de regulación en la expresión de los genes implicados en la síntesis de coenzima Q10 y que responda a los niveles intracelulares de esta molécula. Partiendo de modelos de células que son deficitarias en su síntesis, añadiremos precursores del anillo para aumentar los niveles de coenzima Q10 y así comprobar si la expresión de los genes implicados en la síntesis se ve afectada o, por el contrario, no hay respuesta.

Las técnicas a utilizar son:

CULTIVOS CELULARES
EXTRACCIÓN DE POLINUCLEÓTIDOS
PCR CUANTITATIVA
ANÁLISIS DE CoQ10 POR HPLC

Trataremos de determinar si los niveles de CoQ en células regulan de alguna manera la expresión de los genes correspondientes a su síntesis como si de una retroalimentación negativa se tratase.



Sánchez Alcázar's lab
MEDICINA PERSONALIZADA EN
ENFERMEDADES RARAS

Proyectos de Investigación



Enfermedades neurodegenerativas



Enfermedades mitocondriales



Miopatías congénitas
Miopatía nemalínica



@sanchezalcazarlab



@BRAINCURE_CABD



www.sanchezalcazarlab.com

Medicina de Precisión en las enfermedades raras

El proyecto propone la caracterización de los mecanismos fisiopatológicos en los fibroblastos y células neuronales de pacientes con enfermedades raras y la evaluación de la eficacia de una biblioteca de compuestos farmacológicos para corregir las alteraciones patológicas.

Tareas a realizar por el alumno:

Cultivos celulares, técnicas de biología molecular y celular, cribados farmacológicos, reprogramación directa a neuronas y células musculares.

José Antonio Sánchez Alcázar

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo(CABD)-CSIC-Universidad Pablo de Olavide.Carretera de Utrera Km 1, Sevilla 41013, Spain. Phone: 34 954978071.

Email: jasanalc@upo.es;

<https://sanchezalcazarlab.com/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=sanchez+alcazar&sort=pubdate>

<https://www.researchgate.net/profile/Jose-Sanchez-Alcazar>

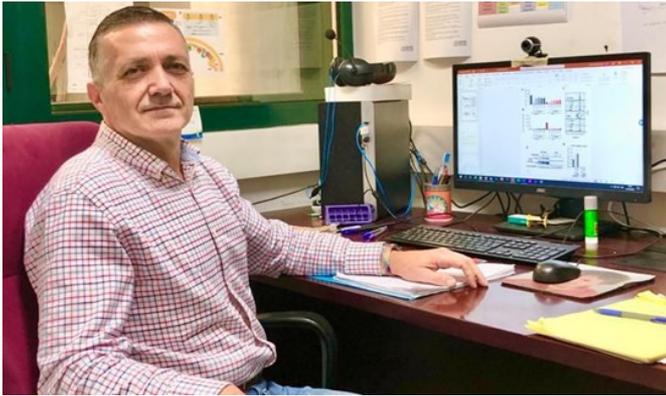
Youtube presentation about PLAN: <https://youtu.be/q7cMEBgRDsAYoutube>

Presentation about PKAN: <https://youtu.be/GyUVm9f76-w>

Presentation about mitochondrial diseases:

<https://bhttps://www.youtube.com/watch?v=bijjvtMzfV0&t=13siomedicines-1.sciforum.net/>





Carlos Santos Ocaña
Profesor Titular de Universidad

Docencia:

- Fundamentos Nutricionales en el Envejecimiento y la Longevidad (Grado de Nutrición Humana y Dietética)
- Máster de Biotecnología Biosanitaria
- Mediterranean Diet (Programa UPO estudiantes extranjeros)

Actividad Investigadora

- IP Proyecto Investigación FIS
- Investigador Principal CABD
- Director de 9 Tesis Doctorales
- Jefe de Grupo CIBER de Enfermedades Raras, y miembro de SEBBM, ASBMB e IAQ10
- 53 publicaciones en revistas internacionales

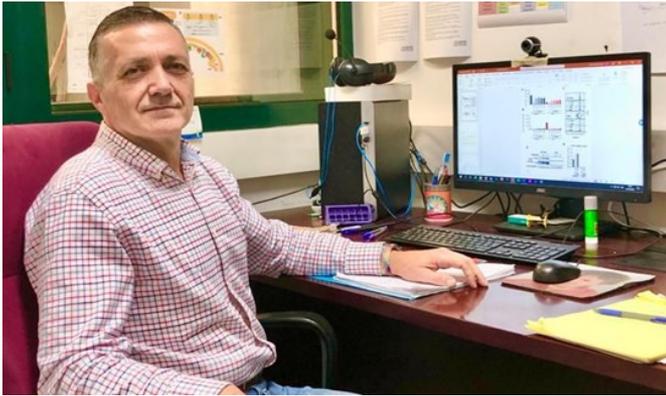
Proyecto de Fin de Grado Biotecnología 2024/2025

Generación y caracterización de fibroblastos humanos KO para el gen LPIN3

El objetivo del proyecto es obtener y caracterizar fibroblastos KO para el gen LPIN3 humano, mediante Crispr/Cas9. El gen LPIN3 codifica para una fosfatasa que cataliza la conversión de ácido fosfatídico en diacilglicerol durante la biosíntesis de triglicéridos. Pacientes con mutaciones en este gen muestra síntomas de deficiencia mitocondrial, con una disminución de la síntesis de CoQ₁₀. Las células obtenidas se utilizarán como modelo de enfermedad humana.

Metodología

- Técnicas de Crispr/Cas9
- Cultivos celulares
- Técnicas de Biología Molecular
- Técnicas de microscopía de fluorescencia
- Determinación de la función mitocondrial



Carlos Santos Ocaña
Profesor Titular de Universidad

Docencia:

- Fundamentos Nutricionales en el Envejecimiento y la Longevidad (Grado de Nutrición Humana y Dietética)
- Máster de Biotecnología Biosanitaria
- Mediterranean Diet (Programa UPO estudiantes extranjeros)

Actividad Investigadora

- IP Proyecto Investigación FIS
- Investigador Principal CABD
- Director de 9 Tesis Doctorales
- Jefe de Grupo CIBER de Enfermedades Raras, y miembro de SEBBM, ASBMB e IAQ10
- 53 publicaciones en revistas internacionales

Proyecto de Fin de Grado Biotecnología 2024/2025

Caracterización de organoides cerebrales generados desde pacientes con enfermedad mitocondrial

El objetivo del proyecto es caracterizar organoides de cerebro utilizados como modelo de enfermedad mitocondrial que afecta al sistema nervioso central. La diferenciación desde cuerpos embrionarios a organoide cortical se monitorizará mediante análisis transcriptómicos y metabolómicos, y se caracterizará mediante microscopía de fluorescencia y western blot. Soportado por un proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto Carlos III y el CiberER

Metodología

- Cultivos celulares
- qPCR y western blot
- Caracterización de la función mitocondrial
- Preparación de muestras para metabolómica