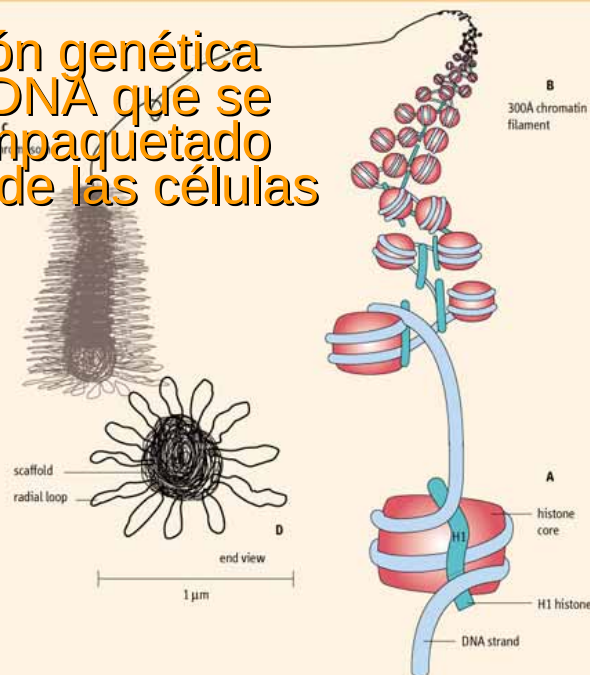
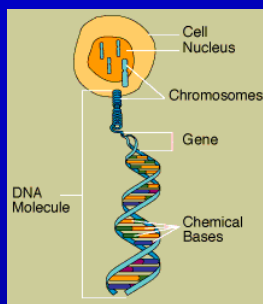


El diagnóstico genómico de las enfermedades

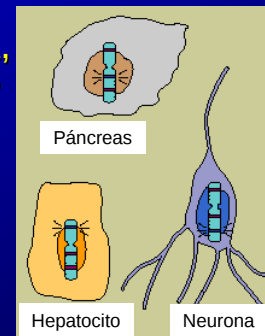
(Seminario práctico)

La información genética radica en el DNA que se encuentra empaquetado en el núcleo de las células



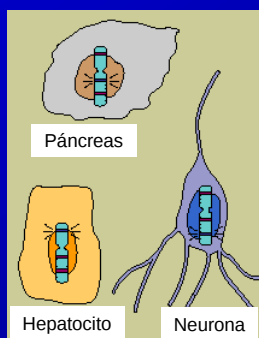


Si todas las células del organismo poseen la misma información genética, por qué tienen un fenotipo distinto...?



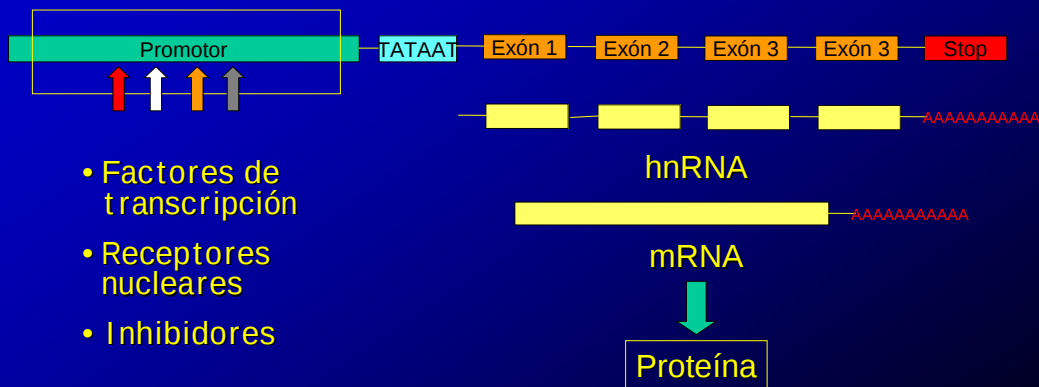
- ✓ Las células de los distintos tejidos están especializadas en llevar a cabo funciones muy diferentes.
- ✓ En última instancia esas diferencias radican en las proteínas que se expresan en cada célula, que son distintas.
- ✓ Ello es consecuencia de diferencias de expresión de los genes.

Ciertos genes se expresan en todas las células. Otros, por el contrario, solo lo hacen en células muy determinadas

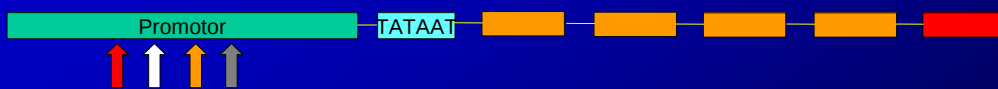


- Por qué la albúmina sérica solo se expresa en los hepatocitos...?
- Por qué la insulina solo se produce en las células beta...?
- Por qué el receptor del GABA solo se encuentra en las neuronas...?

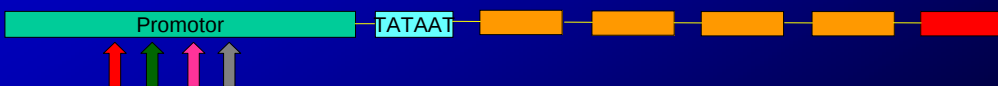
El control de la expresión génica en eucariotas



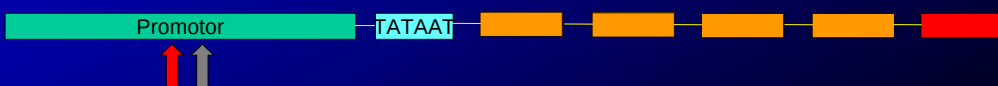
Gen 1: solo se expresa en hígado



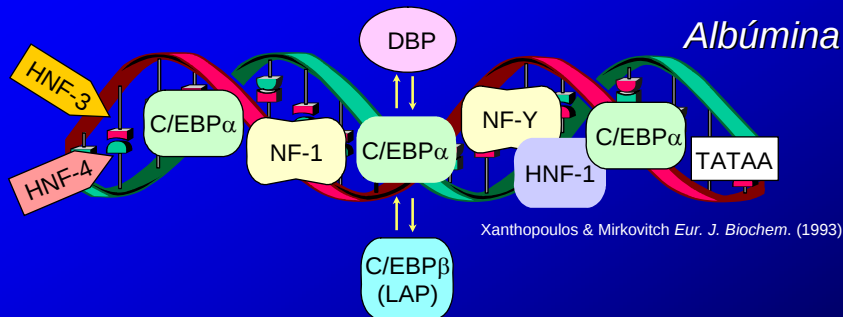
Gen 2: solo se expresa en páncreas



Gen 3: se expresa en ambas células



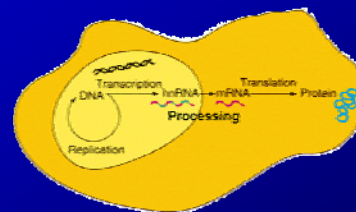
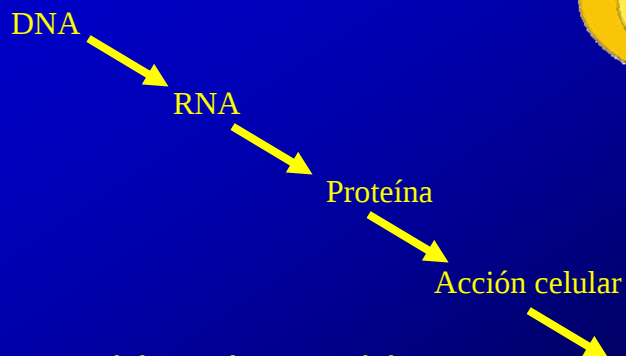
Los principios de la regulación de genes típicamente hepáticos



*Factores de transcripción
hepáticos*

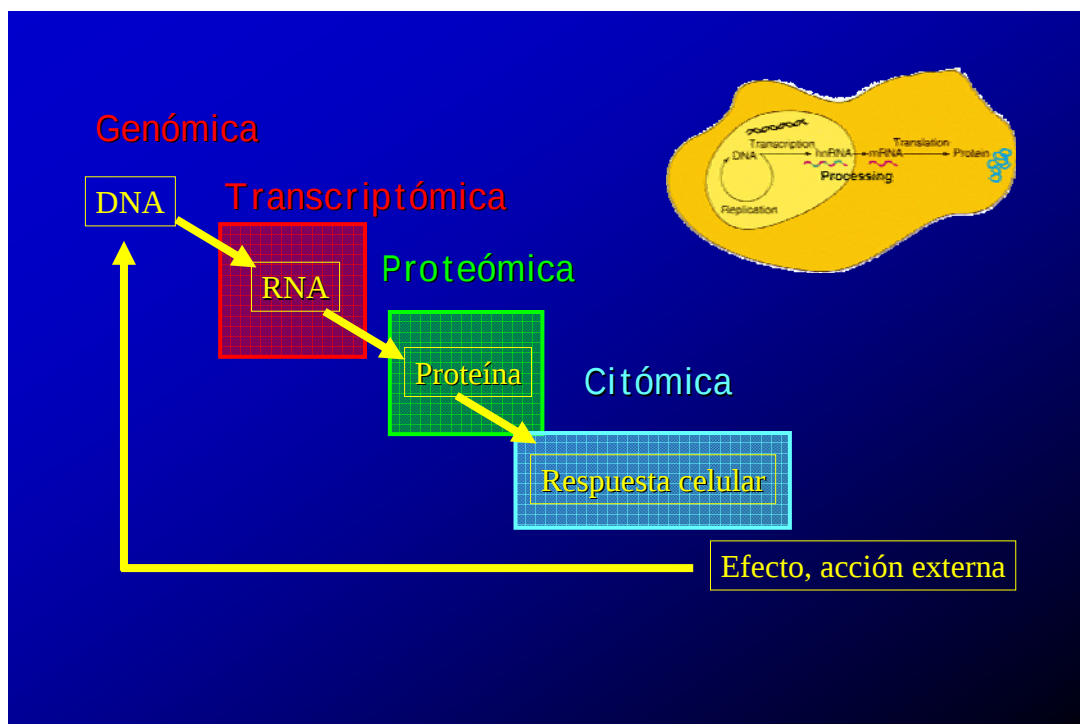
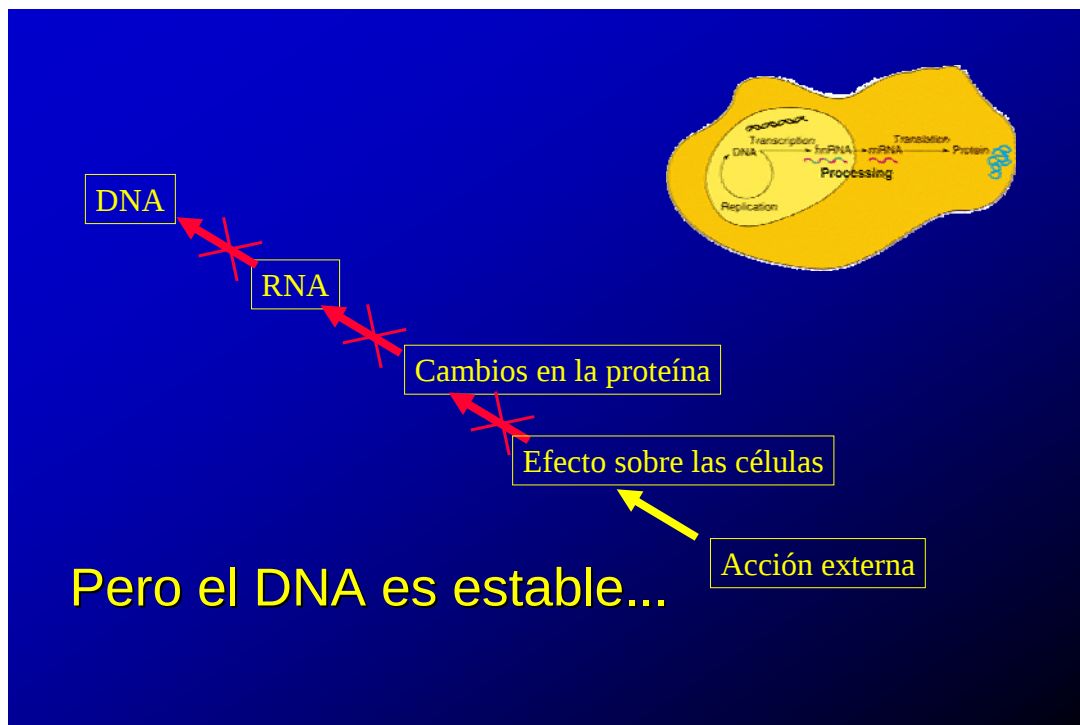
- **C/EBP**: Basic leucine zipper protein
- **HNF1**: Homeodomain homolog
- **HNF4**: Orphan nuclear receptor
- **HNF3**: Forkhead homolog

El axioma...



Los cambios observables en la célula son consecuencia de la expresión de genes...

Efecto observable

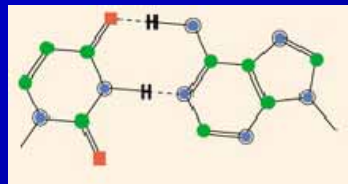
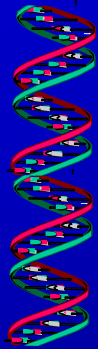


Genómica/ genómica funcional:

1. Existencia, expresión de un determinado gen
2. Identificación de polimorfismos, mutaciones, secuencias alteradas etc. (genes anormales)

Métodos basados en la hibridización:

El fenómeno de la complementariedad de las bases



Timina/
Uracilo

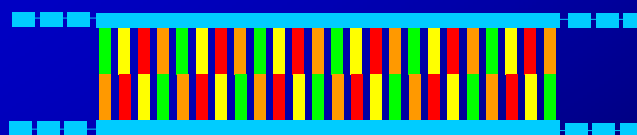
Adenina



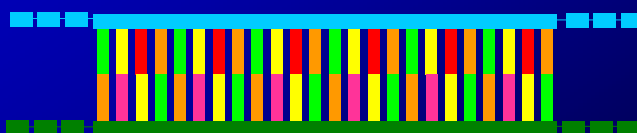
Citosina

Guanina

La hibridización DNA/RNA



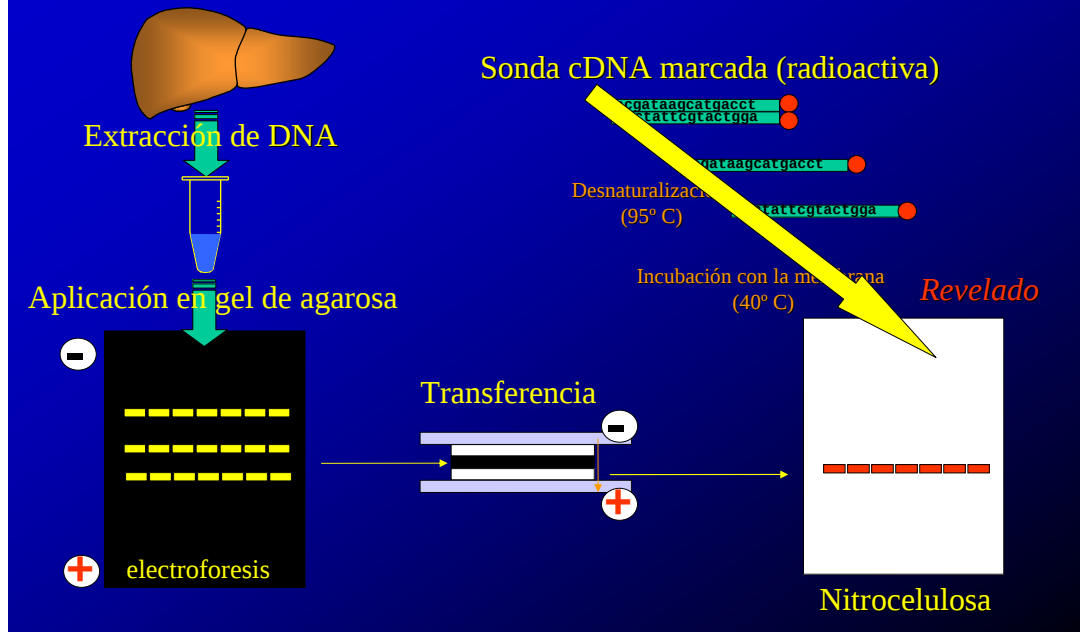
DNA/DNA



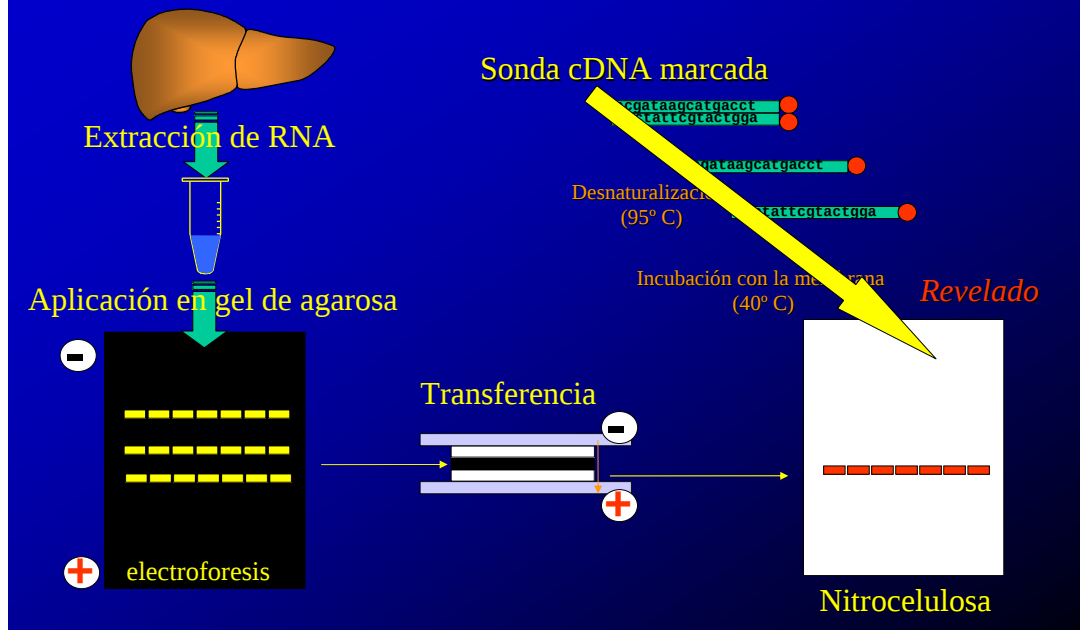
DNA/RNA

Solo secuencias complementarias hibridizan y forman complejos estables

Medida de los niveles de mRNA: "Southern Blot"



Medida de los niveles de mRNA: "Northern Blot"



Métodos basados en la amplificación:

Medida de la expresión de genes

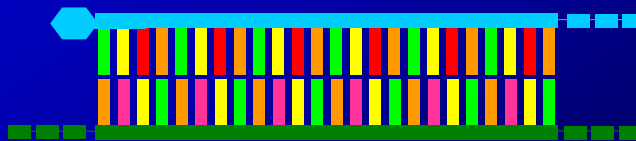
La medida de la expresión de genes se puede hacer de varias maneras:

- Midiendo cambios en los niveles de proteína (proteómica),
- Midiendo cambios en la expresión de mRNA (inestable!)
- o bien conversión del RNA a cDNA y su posterior medida

*Medida de los niveles de cDNA:
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

- Es una técnica de biología molecular desarrollada por Kary Mullis en 1985.
- Consiste en una amplificación repetida y selectiva de un fragmento de ADN (gen) específico partiendo de una mínima cantidad de muestra
- También es aplicable a la amplificación de RNA, pero requiere un paso previo de transcripción reversa (RT-PCR).

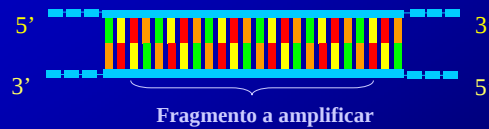
A partir de RNA es posible obtener un DNA complementario (cDNA)



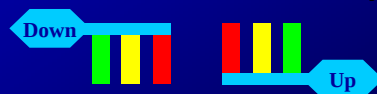
Reacción de transcriptasa reversa

La *reacción PCR* amplifica un fragmento específico de DNA. Se requiere:

- *DNA (cDNA) que contiene el fragmento a amplificar*



- *Oligos o cebadores (20 b) diseñados para hibridizar de manera selectiva con ambos extremos de la secuencia de DNA que se quiere amplificar*

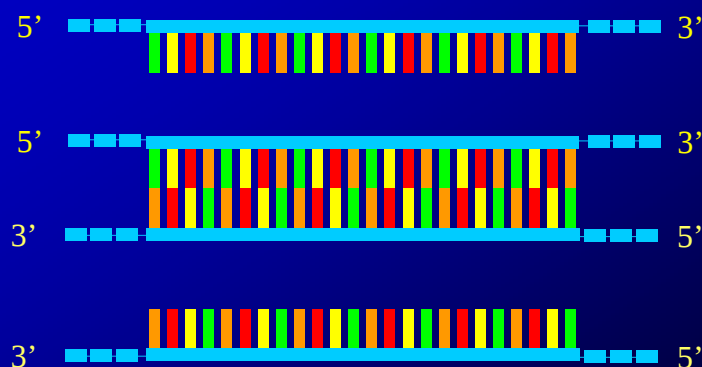


- *ADN Polimerasa termoestable ("Taq"). Actúa a una temperatura de 72 °C y resiste 95 °C.*

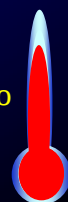
Taq

Etapas de la PCR

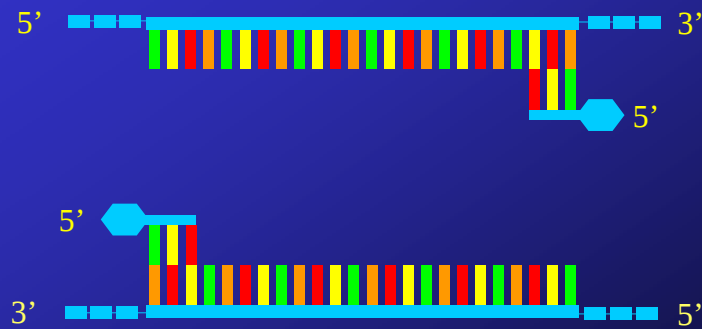
Desnaturalización: las muestras se someten a una temperatura de 95 °C para que las hebras se separen



1 minuto
95 °C



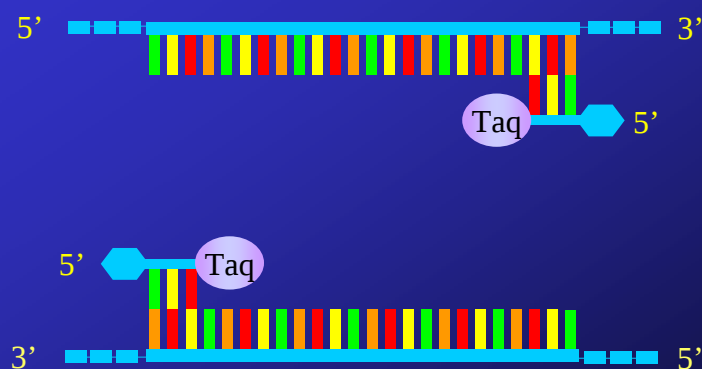
2º Hibridación: la temperatura baja rápidamente, y los primers reconocen a sus secuencias complementarias en el DNA



40-65 °C



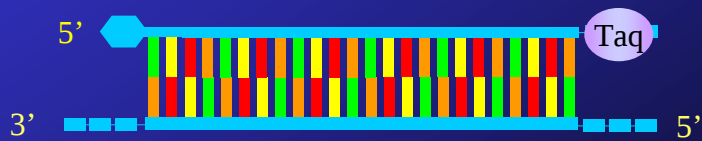
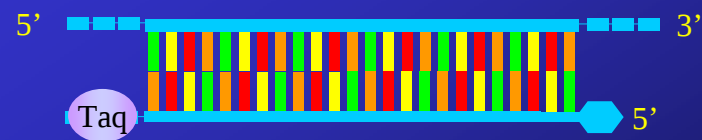
3º Elongación: la tº aumenta y la taq polimerasa adiciona nucleótidos en sentido 5' a 3'



72 °C



..... dando lugar a dos hebras dobles



72 °C



Primer ciclo

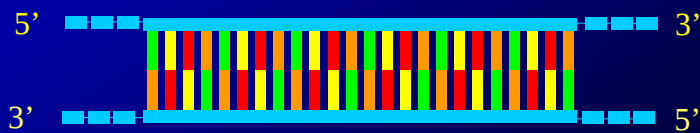
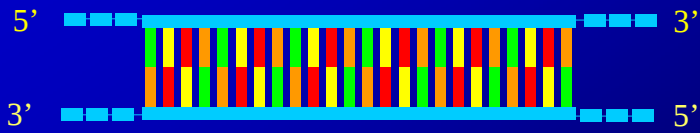


72 °C



2º ciclo

1º Desnaturalización

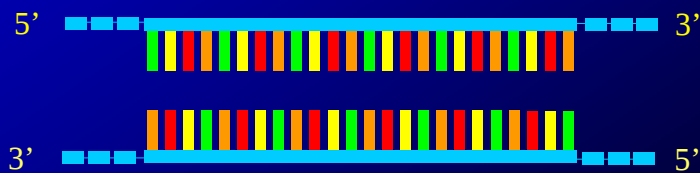
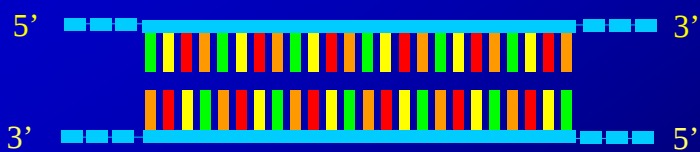


1 minuto
95 °C



2º ciclo

Desnaturalización

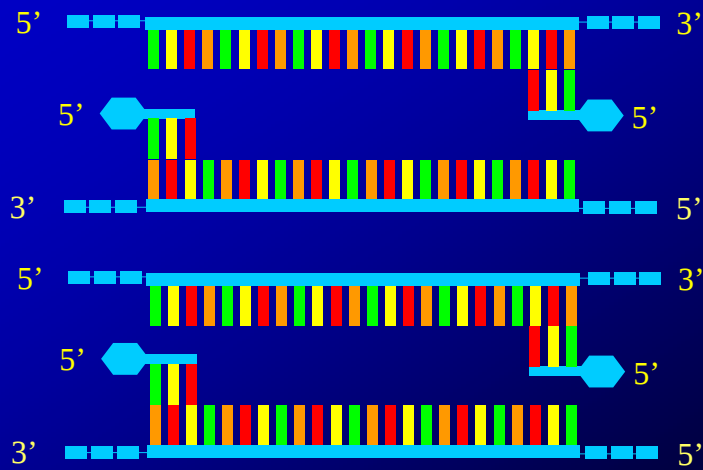


1 minuto
95 °C



2º ciclo

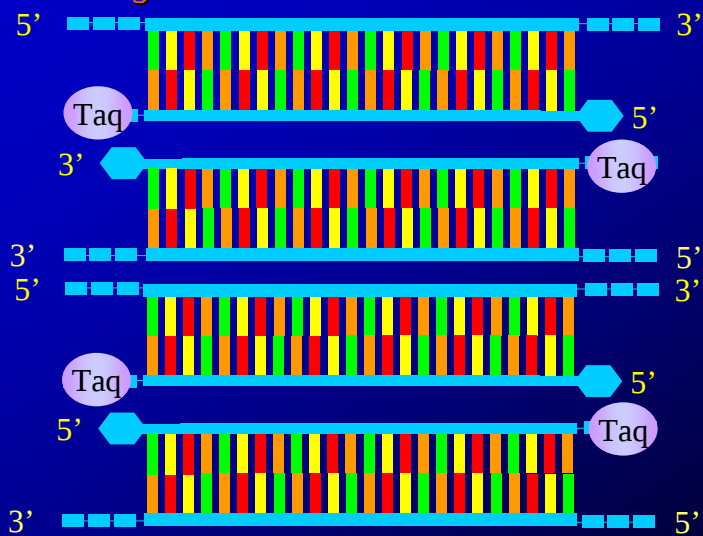
2º Hibridación



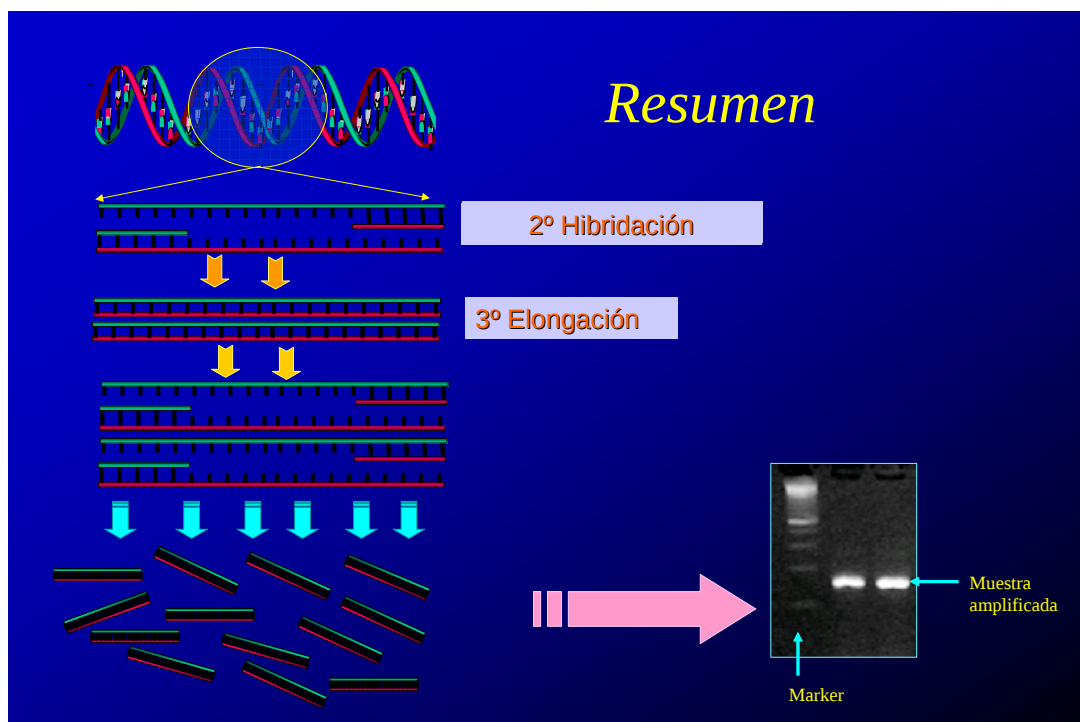
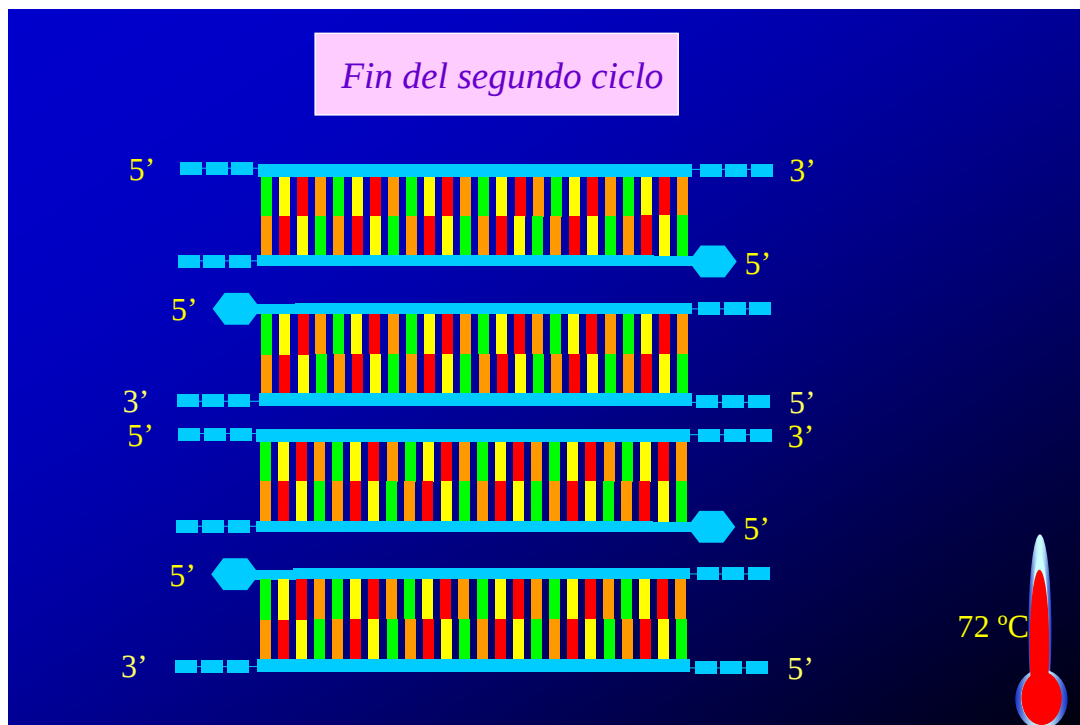
40-65 °C

2º ciclo

3º Elongación

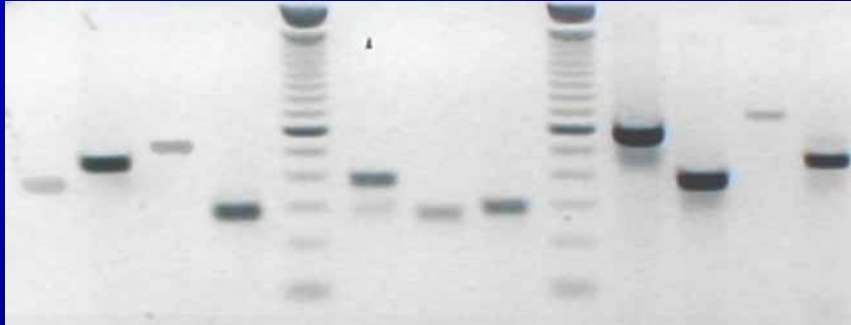


72 °C



Ejemplo de amplificación de productos por PCR

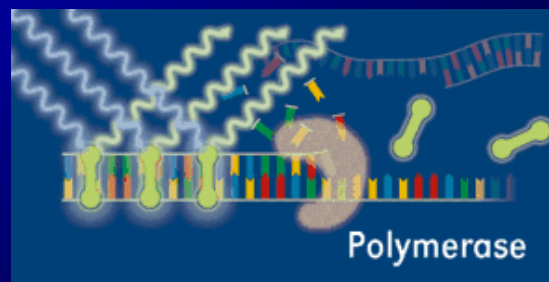
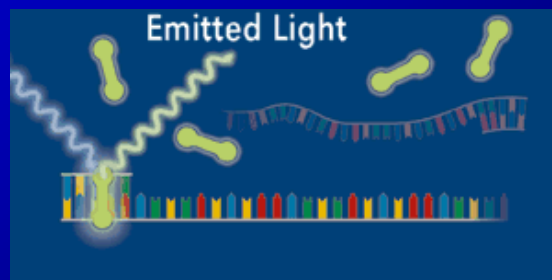
1A1 1A2 2A6 2B6 M 2C9 2C19 2D6 M 2E1 3A4 3A5 B-Act

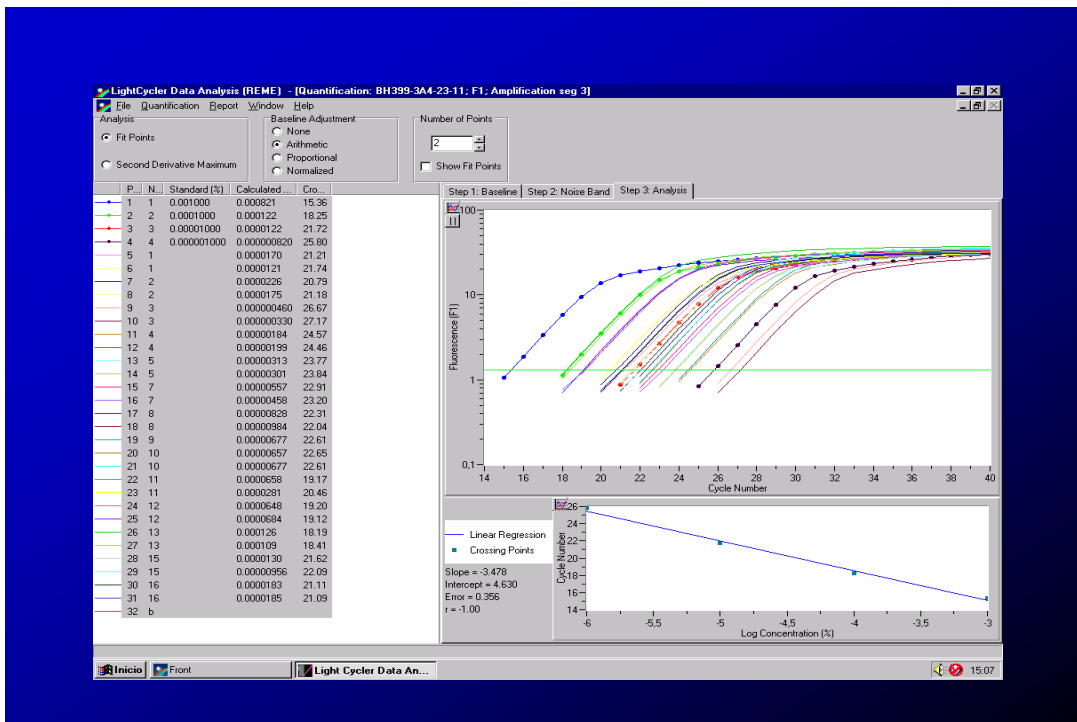
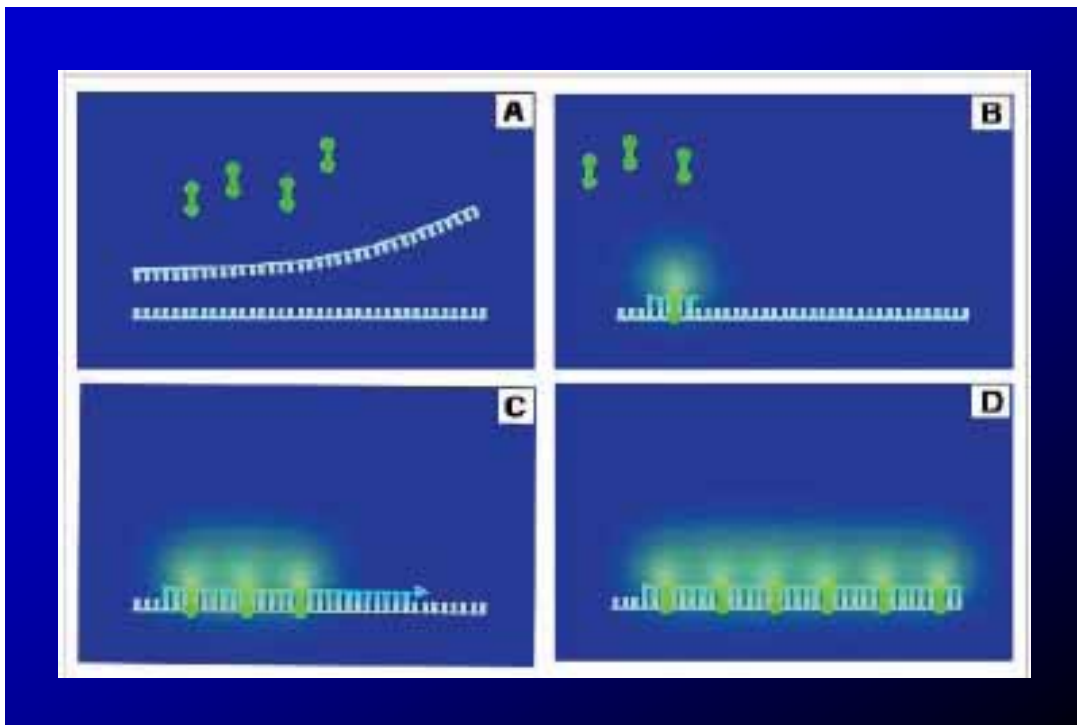


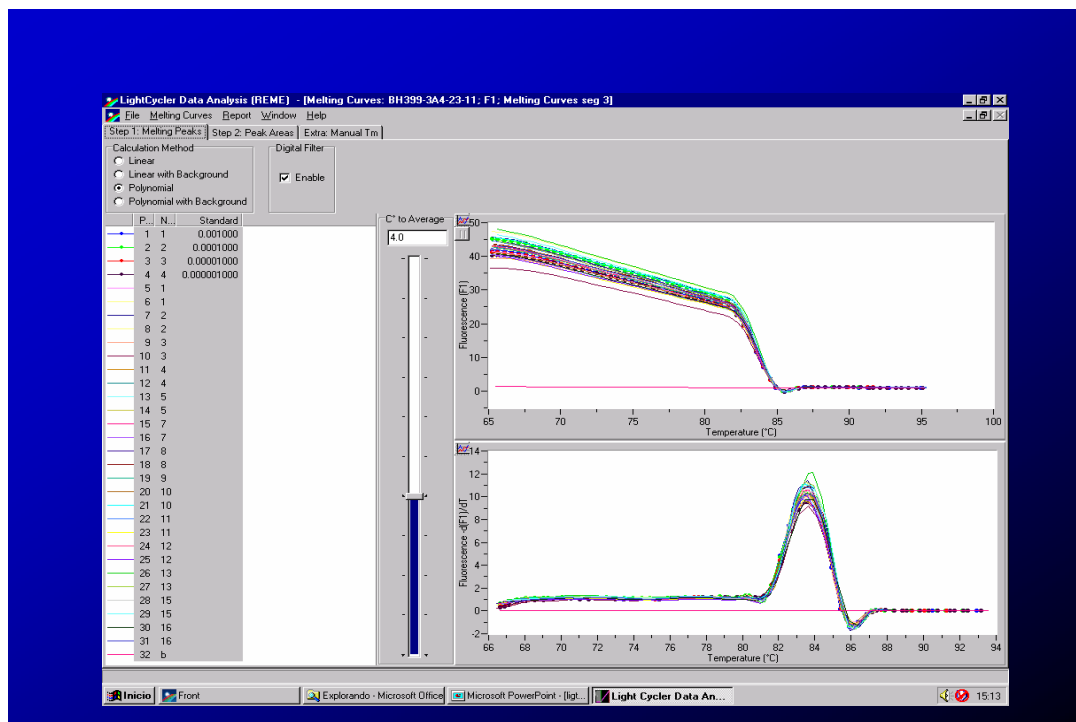
PCR en tiempo real



SYBR Green I







Aplicaciones:

- 1. *Determinación de los niveles de virus en biopsias hepáticas de pacientes hcv + mediante rt-pcr cuantitativo.*
- *El método se basa en la amplificación de una secuencia específica del genoma del virus mediante RT-PCR a tiempo real con un termociclador rápido (LightCycler®).*
- *El método puesto a punto permite la detección de secuencias de HCV-RNA en biopsias hepáticas y tiene una sensibilidad suficiente para evitar falsos negativos.*
- *Seguimiento de enfermos tratados con interferón*

PCR cuantitativo

Estrategia

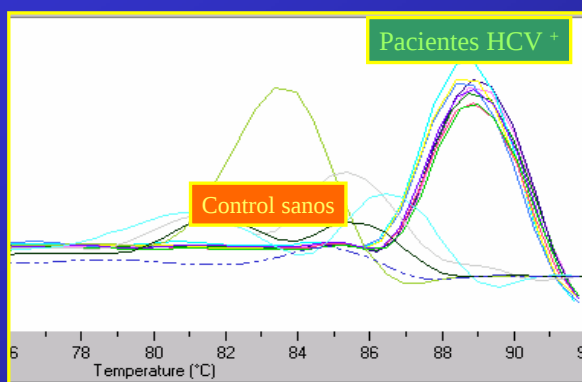
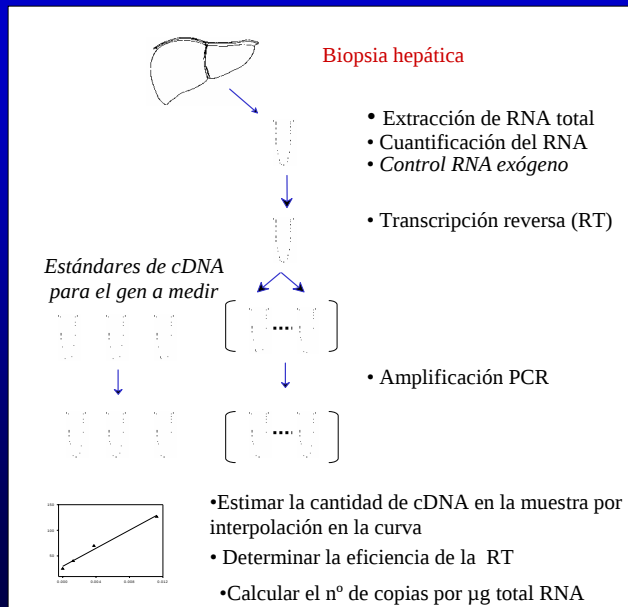
• Etapa RT estandarizada

Monitorización de la eficiencia

• Diseño de primers

• PCR standards

Medida de la fluorescencia en tiempo real de los productos de PCR

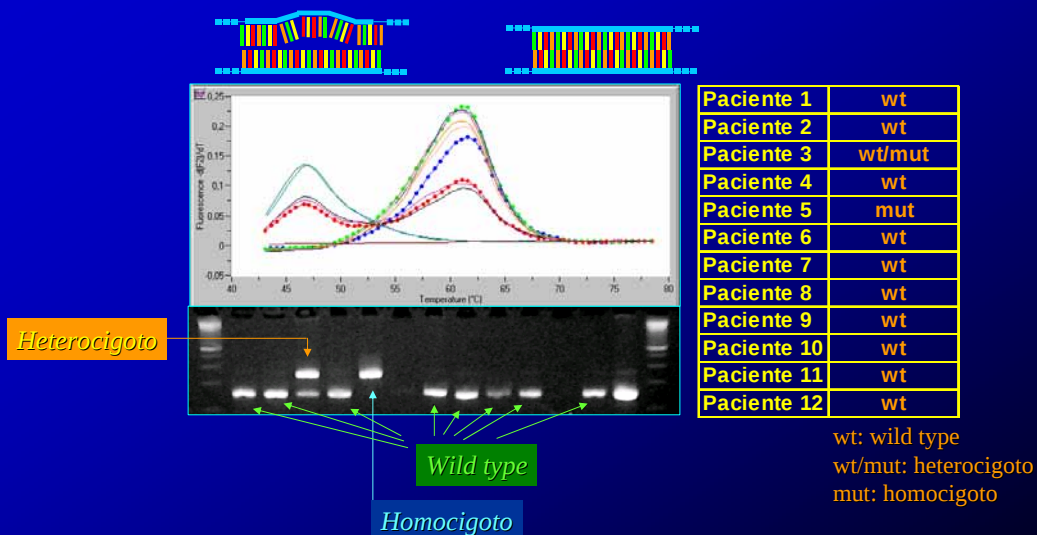


Pacientes	Copias HCV/B Actina
1	2.3
2	5.5
3	1.6
4	7.6
5	1.0
6	4.2
7	0.8
8	2.4
9	11.4
10	2.6
pool sanos	0
promedio	3.95

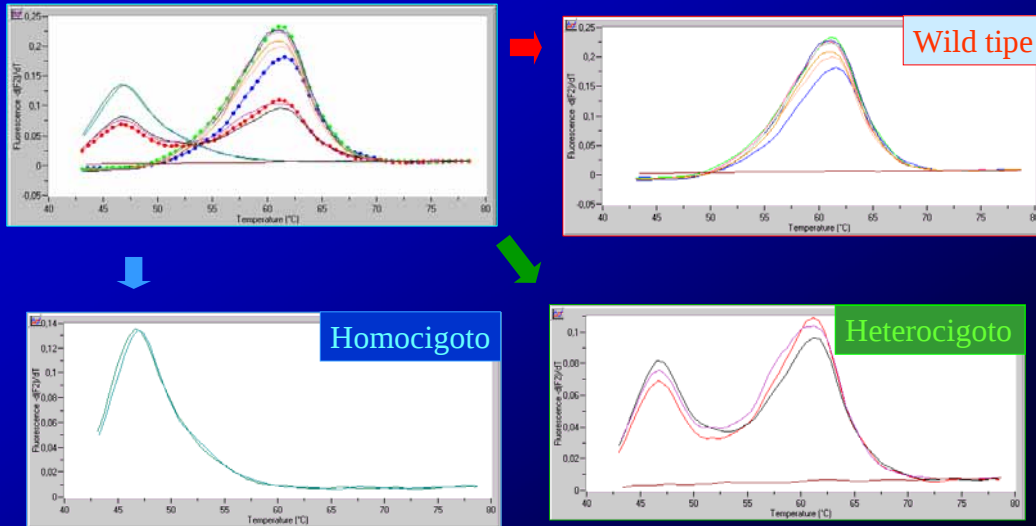
• 2. Polimorfismos génicos.

- **Método 1:** Amplificación por PCR de la región del DNA que contiene la secuencia polimórfica
- Digestión de dicho fragmento con un enzima de restricción, que reconozca la secuencia polimórfica (por ejemplo corte el DNA si tal secuencia existe)
- Electroforesis del fragmento de Dna amplificado y tratado con el enzima de restricción.
- **Método 2.** Amplificación por PCR de la región del DNA con un primer que contiene la secuencia polimórfica
- Medida de la temperatura de melting, que será menor si no existe complementariedad de bases

Genotipación CYP2D6*4



Melting curve CYP2D6*4 isoforms



Tecnología basada en
detección sobre soporte
sólido

Hay dos variantes de la tecnología:

Tipo I:

muestras de cDNA de secuencias específicas (500~5,000 bases) son depositadas en forma de microgotas sobre una superficie sólida (porta de cristal) e inmovilizadas. Este método se le conoce como "*DNA microarray*", y fue desarrollado por la Universidad de Stanford.

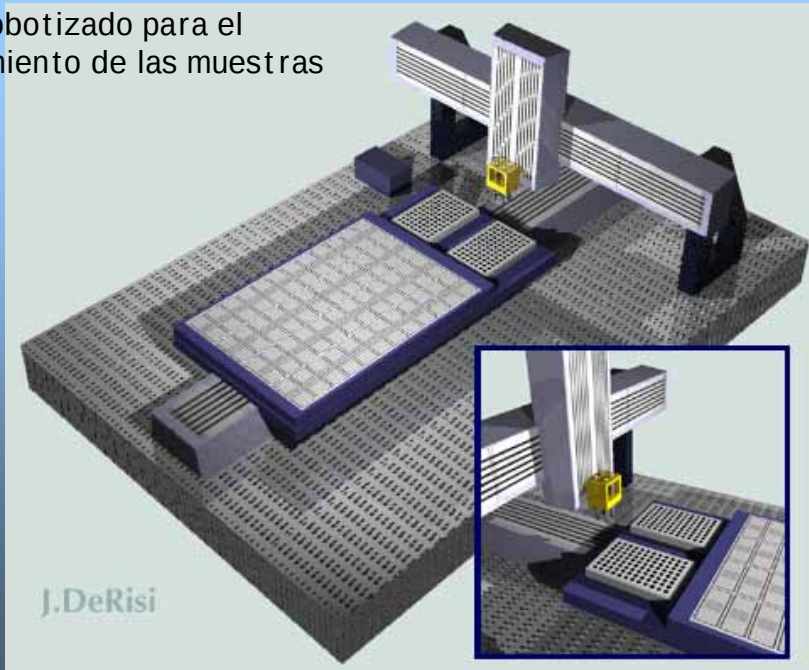


Generación de *microarrays* por impresión

- Oligos o fragmentos de PCR depositados sobre una superficie de vidrio (50-100 micras, 0,2-0,5 ng)
- Cientos a unos pocos miles de secuencias
- Se pueden crear nuevos arrays en meses



Equipo robotizado para el procesamiento de las muestras

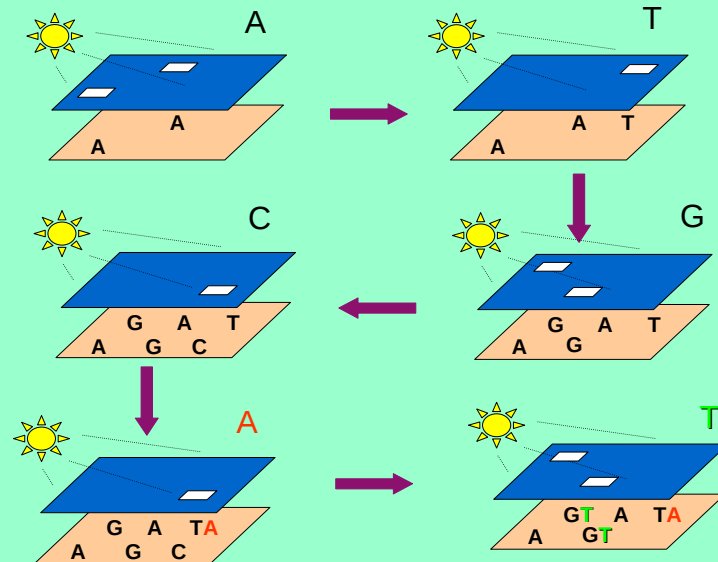


Hay dos variantes de la tecnología...

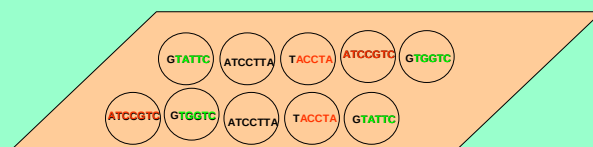
Tipo I I:

oligonucleótidos (20~80-bases) o nucleo-péptidos se sintetizan bien *in situ* (sobre el soporte) o se sintetizan de manera convencional y se inmovilizan sobre el soporte. Se hibridiza con una muestra de cDNA marcado fluorescente, y se identifica la identidad del oligonucleótido al que se une y la intensidad de la señal. Este método se le conoce como "*DNA chips*", y fue desarrollado por *Affymetrix* quien lo comercializa con el nombre de *Gene chip®*.

Chips fotolitográficos



Chips fotolitográficos

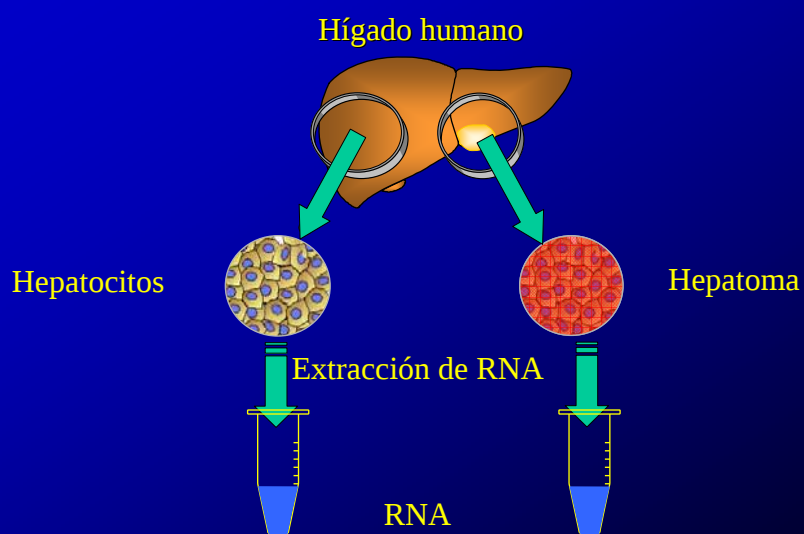


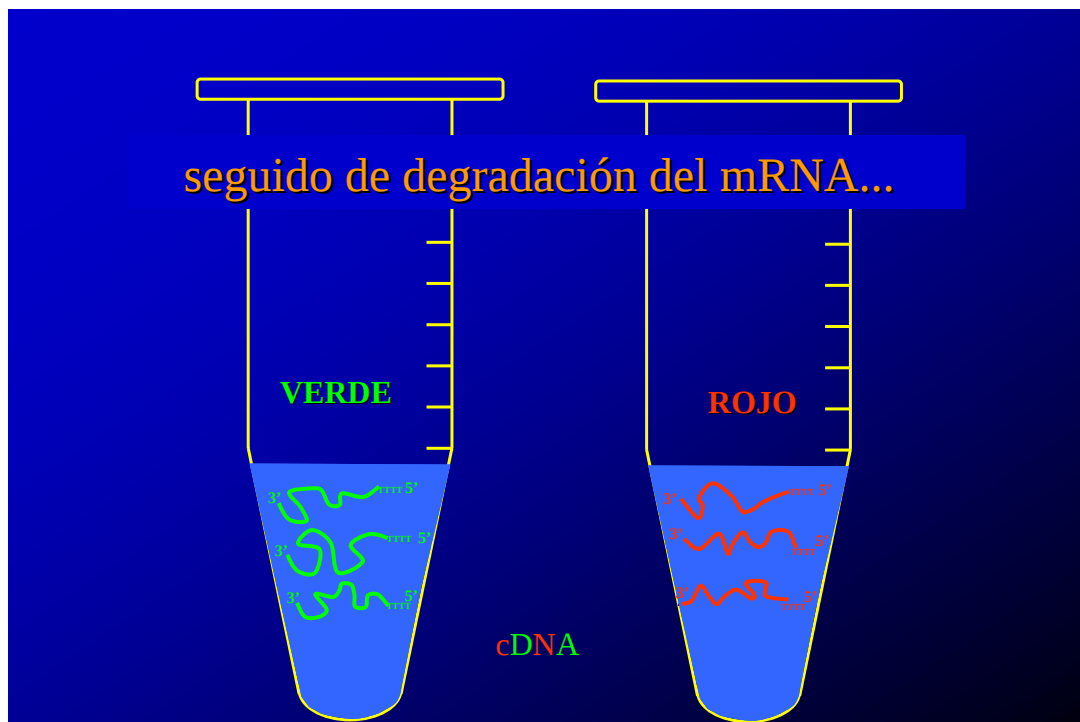
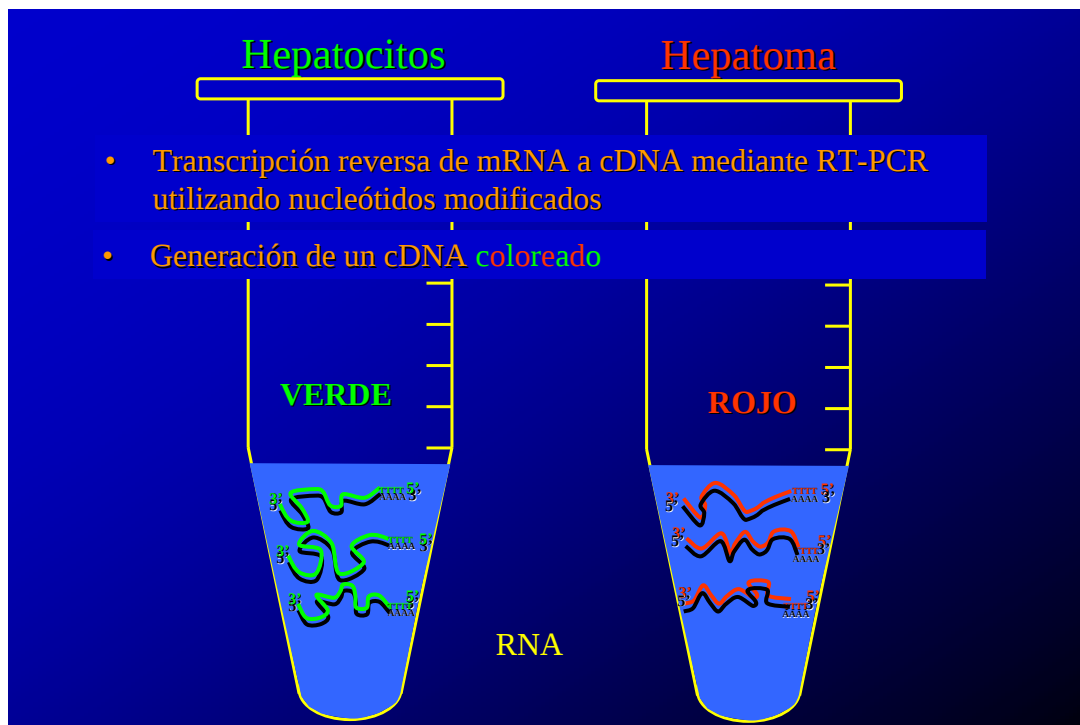
- Entre 40.000 y 400.000 secuencias equivalentes a 30.000 genes
- Deposition fotolitográfica de oligonucleótidos base a base
- El diseño y producción de nuevos chips lleva entre 1 y 2 años.

Genechip, Affymetrix

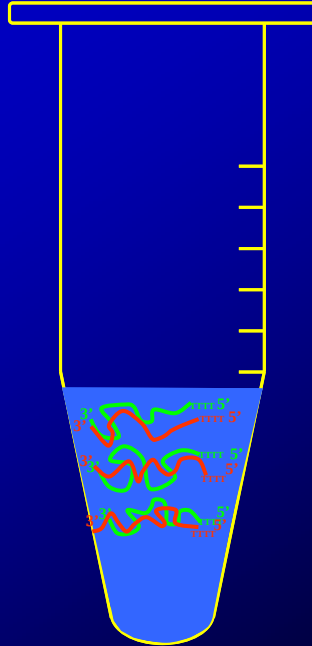


Chips de DNA (DNA Microarray)



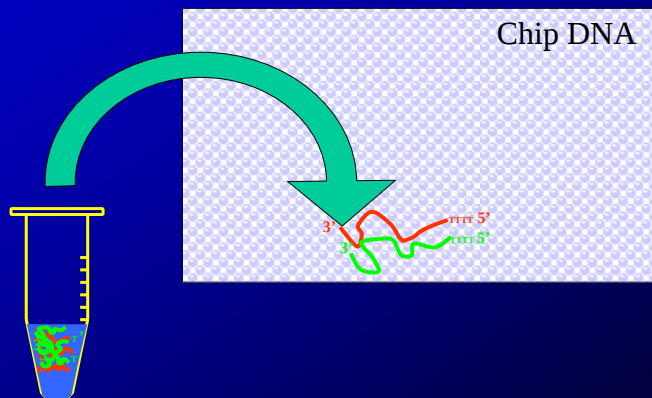


Ambos cDNA se mezclan en un eppendorf



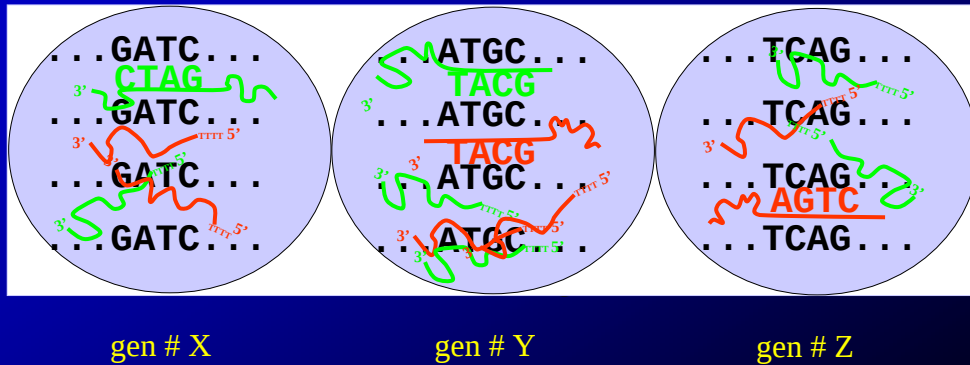
... y se aplican en el chip de DNA

- Cada punto del chip contiene una secuencia que es específica de un solo gen
- En un chip de DNA pueden alojarse hasta 30.000 genes

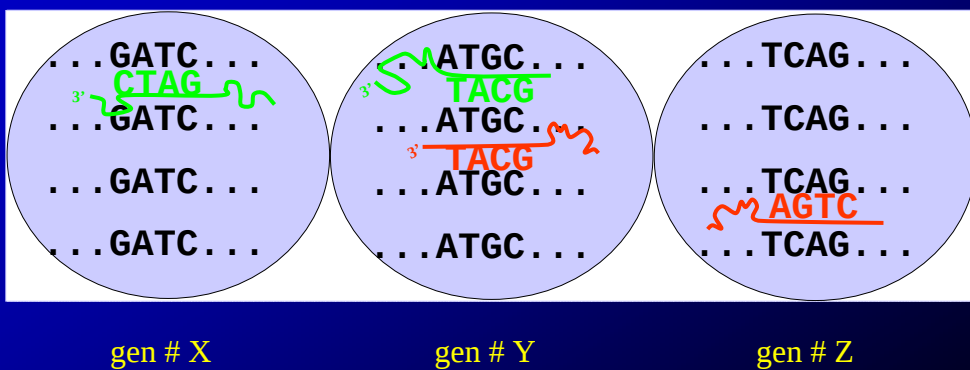


Aplicar la muestra en el chip de DNA

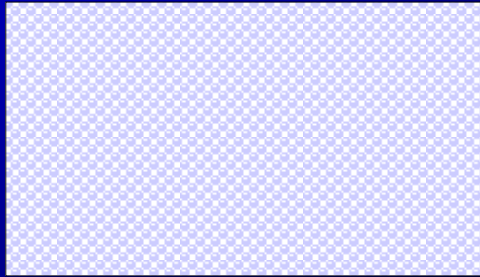
- Si existe complementariedad, el cDNA marcado se unirá al chip en un punto determinado



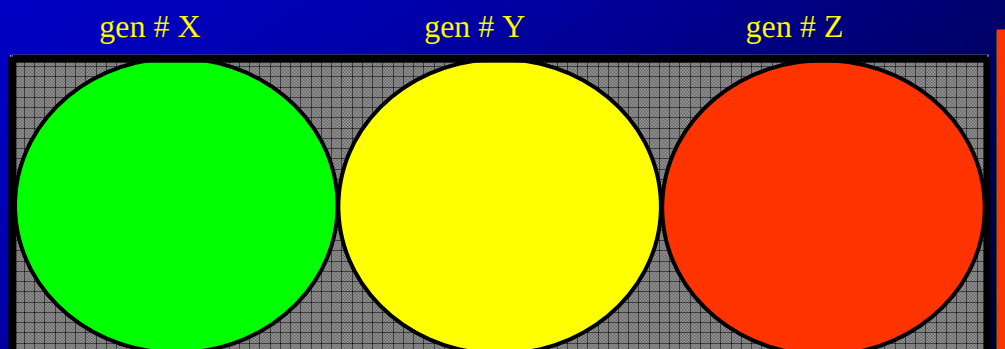
Lavado del chip para eliminar el cDNA no unido



Dicha unión no es perceptible a simple vista...

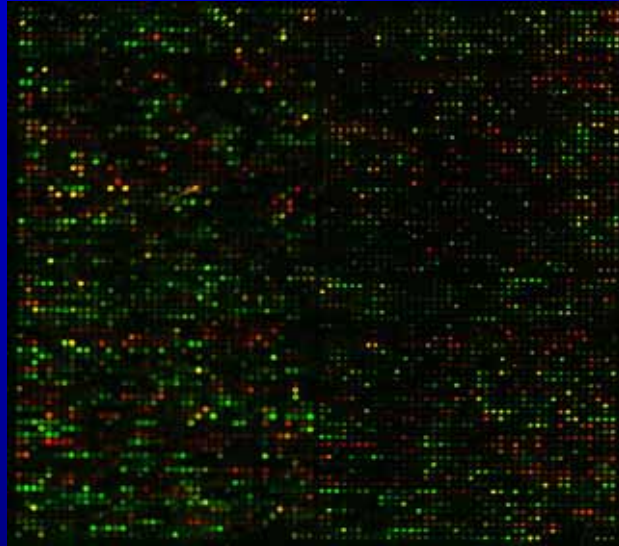


1. El chip es excitado por un haz de láser
2. La fluorescencia emitida por el cDNA unido es registrada.

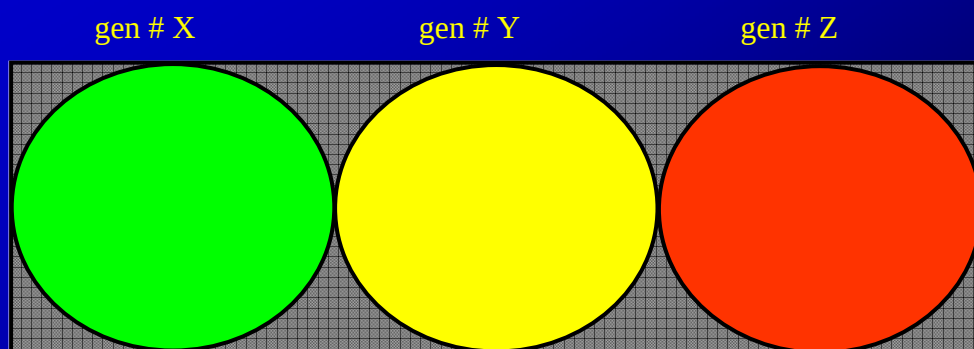


Superposición de las 2 imágenes

Imagen real de un ensayo con chip de ADN



Interpretación



- El gen X solo lo expresan las células normales (hepatocitos)
- El gen Z solo lo expresan las células tumorales (hepatoma)
- El gen Y lo expresan ambos tipos de células

Aplicaciones básicas de la tecnología de *DNA microarrays*

- Descubrimiento de nuevos genes o genes modificados (genómica funcional)
Polimorfismos, mutaciones puntuales (SNPs, *snips*), sustituciones, elecciones, inserciones
- Diagnóstico de enfermedades
Identificar patologías a través de la expresión de determinados genes.
Identificación de cambios genéticos asociados a un determinado Proceso Patológico.
- Farmacogenómica: (*análisis genómico + farmacología molecular*).
Su objetivo es establecer correlaciones entre respuestas terapéuticas a fármacos y perfil genético de los pacientes.
- Toxicogenómica: (*análisis genómico + toxicología molecular*).
Su objetivo, establecer correlaciones entre respuestas tóxicas y cambios en la expresión de genes.

DNA-chip Clasificación de leucemias y linfomas

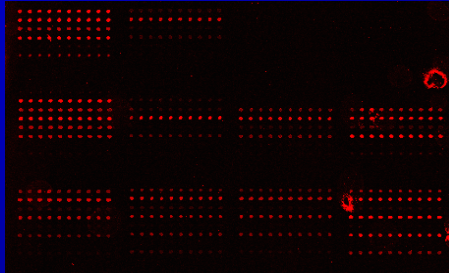
Diferencias de Expresión Génica de RNA específicos



- Representados 400 genes
- Oligos de 50 bases
- Localizados en extremo 3'
- Blast < 70 %

DNA-chip para el Diagnóstico de una enfermedad congénita

*(Polimorfismos en nucleótidos aislados (SNPs, **snips**), sustituciones, deleciones, inserciones)*



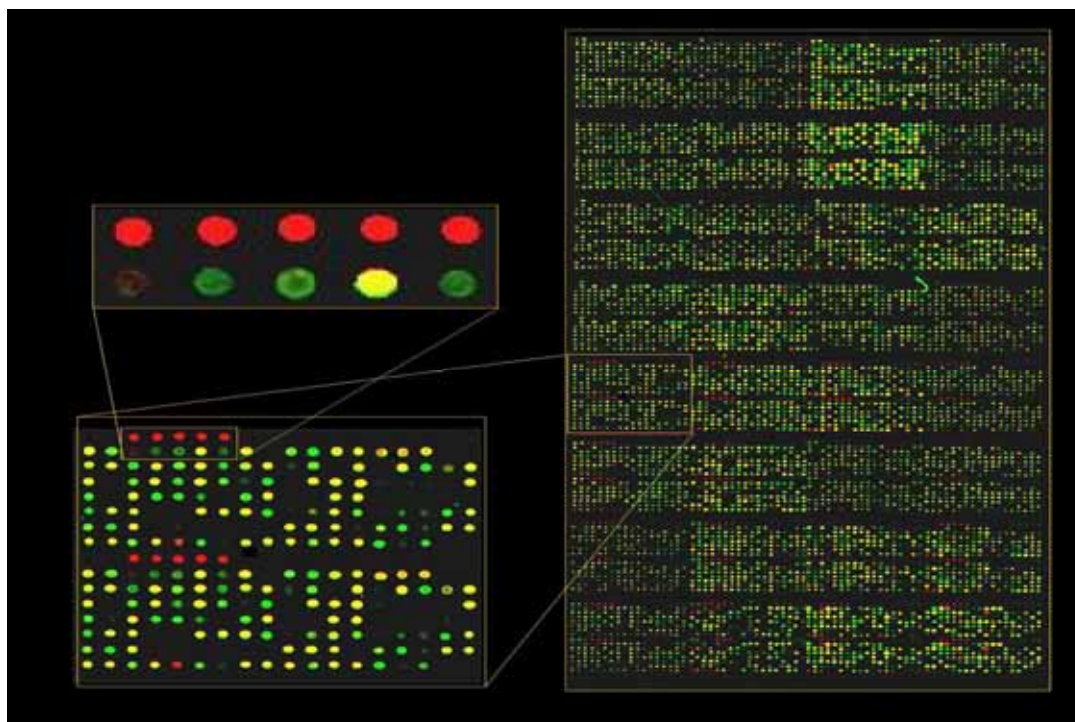
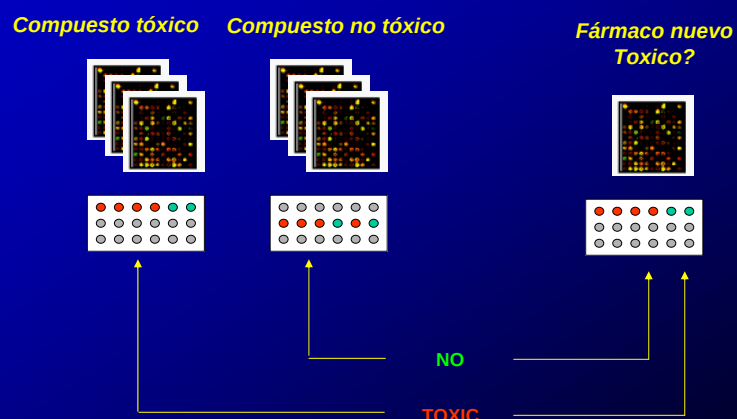
- Representadas 125 mutaciones del gen asociadas a la enfermedad, y la correspondiente secuencia wt
- 250 (x10) oligos

DNA-chip para anticipar riesgos genéticos del cáncer

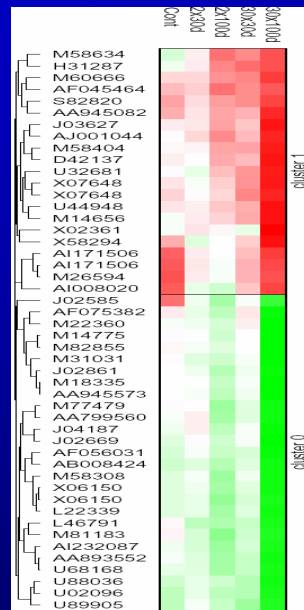
- Las enfermedades genéticas con frecuencia están originadas por genes que o bien se transcriben de manera inapropiada (o mucho, o poco) o simplemente que no se expresan.
- Este tipo de anomalías son muy frecuentes en el cáncer en donde puede haber alteraciones en la expresión de genes reguladores clave. A diferencia de otras enfermedades en las que un solo gen defectuoso es responsable de la patogenia de la enfermedad, cánceres que clínicamente parecen ser iguales, pueden ser muy genómicamente muy distintos
- Por lo general en el cáncer están implicados genes que afectan a la estimulación y al bloqueo del ciclo celular, apoptosis, angiogénesis y metastatización

TOXICOGENOMICA

Cambios en la expresión diferencial de genes identificados

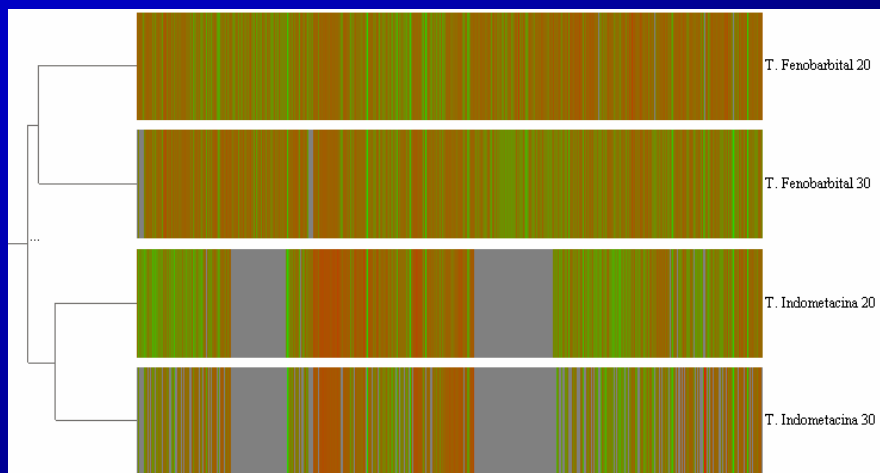


GENE-PER-GENE comparison



Gene expression TOTAL PROFILE comparison

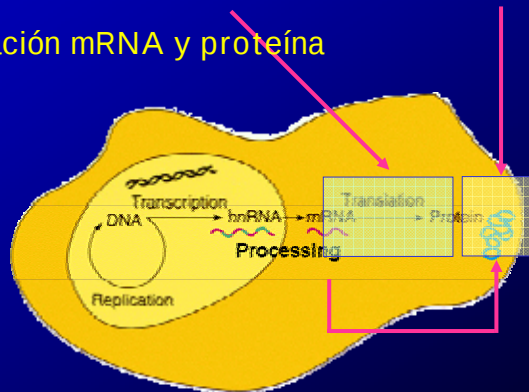
In vitro



La limitaciones del análisis genómico.

¿Qué no puede detectar el análisis genómico...?

- Cambios postranscripcionales y postranslacionales
- Correlación mRNA y proteína



Principle of PROTEIN ARRAYS

