

Genética Humana

Guía de Trabajos Prácticos

2007

Docentes

Daniel Sanchez, Profesor Asociado
Camila Scorticati, Profesor Adjunto
Valeria Tekiel, JTP
Paula Beluardi, ayudante de 1era
Gabriela Niemirowicz, ayudante de 1era
Nicolás Mendiando, ayudante de 1era
Ezequiel Nazer, ayudante de 1era
María Paula Zappia, ayudante de 1era
Guillermo Bernabó, ayudante de 2da

Web: http://genoma.unsam.edu.ar/cursos/genetica_humana

Teóricas y problemas Genética clásica

- Leyes de Mendel y extensiones.

Trabajos Prácticos

- TP 1. Extracción ADN humano.
- TP 2. Medicina forense: filiación. Detección de los alelos del locus D1S80.
- TP 3. Bases de datos. Bioinformática.
- TP 4. Diagnóstico de cáncer colorrectal humano por PCR
- TP 5. Secuenciación automática

Seminarios

- | | | |
|-----|---|--------------|
| 1. | Epigenética | (Ezequiel) |
| 2. | Aneuploidía y desbalances cromosómicos | (Nicolás) |
| 3. | Enfermedades monogénicas: Fibrosis Quística | (Paula) |
| 4. | Inestabilidad cromosómica | (Gabriela) |
| 5. | Enfermedades multifactoriales: Obesidad | (Gabriela) |
| 6. | Determinación del sexo | (M. Eugenia) |
| 7. | Enfermedades ligadas al sexo: Hemofilia | (Guillermo) |
| 8. | DNA mitochondrial | (Ezequiel) |
| 9. | Enfermedades poligénicas: Cáncer | (Nicolás) |
| 10. | Expansión de repeticiones inestables | (Paula) |
| 11. | Terapias por RNAi | (Ezequiel) |
| 12. | Terapia genéticas en enfermedades monogénicas | (Nicolás) |

Fechas de Exámen

1er Parcial Práctico: 20 de Septiembre

2do Parcial Práctico: 8 de Noviembre

Recuperatorio: 22 de noviembre

Bibliografía sugerida

- **Human molecular genetics** 2da edición (1999). Strachan, T. y Read, A. P. John Wiley and Sons Inc. NY

An Introduction to Genetic Analysis. 8th edition (2002). Griffiths, A.J. F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin y W.M. Gelbart. W.H.

Freeman & Company;

Genetics: Analysis of Genes and Genomes. 6th edition Hartl, Daniel L. and Elizabeth W. Jones.

Genes VI. Levin

Molecular Biology of the Cell, 3rd edition. Alberts, et al

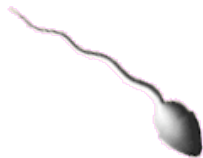
Trabajo Práctico N° 1: Extracción de ADN de sangre entera

La obtención de ADN de una persona es necesaria para realizar innumerables análisis que permiten caracterizar el genotipo de dicha persona. Ya que la mayoría de las células de cuerpo humano poseen una copia completa de ADN se puede utilizar tejido de cualquier origen (ver tabla).

Fuentes de ADN



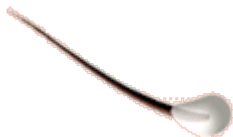
La sangre es una fuente excelente de ADN. Éste está presente en los glóbulos blancos (o leucocitos), pero no en los glóbulos rojos humanos (eritrocitos o hematíes), pues éstos carecen de núcleo. Una mancha de sangre del tamaño de una moneda pequeña, correspondiente a unos 50 microlitros, tiene suficiente ADN para un análisis típico de VNTR.



El ADN de la cabeza de los espermatozoides es habitualmente la fuente más importante de ADN como prueba del delito en casos de ataque sexual. Cinco microlitros de semen contienen aproximadamente la misma cantidad de ADN que 50 de sangre. Para liberar el ADN de las cabezas de los espermatozoides se requieren métodos de extracción especiales. En consecuencia, en las muestras de ataque sexual se puede extraer de forma diferencial: la primera extracción proporciona principalmente el ADN de células epiteliales de la víctima, mientras que la segunda extracción rinde principalmente ADN del semen.



La saliva contiene material celular. Se puede extraer ADN, para su análisis, a partir de marcas de mordisco, colillas de cigarrillo, sellos de correo pegados en el sobre o cierres engomados de sobre.



El folículo capilar de la base del cabello humano contiene material celular rico en ADN. Para poderlo usar en análisis de ADN, el cabello debe haber sido arrancado (los cabellos que caen por rotura no contienen ADN).



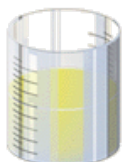
Cualquier tejido del cuerpo que no se haya degradado es una fuente potencial de ADN.



El hueso es una de las mejores fuentes de ADN a partir de restos humanos descompuestos. Incluso cuando la carne se ha descompuesto, a menudo se puede obtener ADN del hueso desmineralizado. Se ha usado ADN de hueso para identificar los huesos repatriados de soldados de los tiempos de la guerra de Vietnam y los restos de la familia rusa Romanov, que fue ejecutada durante la revolución bolchevique.



Al igual que los huesos, los dientes pueden ser también una fuente excelente de ADN, mucho después de que el resto del cuerpo se haya descompuesto.



La orina no contiene por sí misma ADN, pero puede contener células epiteliales, que sí tienen ADN. Sin embargo, la mayoría de personas sanas no excretan células epiteliales en su orina.

Generalmente es deseable que la obtención de la muestra de ADN no cause ningún tipo de daño a la persona y que sea fácil y rápidamente obtenible. Estos requisitos se cumplen en las muestras de sangre. Existen innumerables métodos que permiten obtener ADN a partir de sangre entera, estos difieren en la pureza y cantidad de muestra necesaria para realizar una extracción.

La sangre se compone de varios tipos celulares, los más importantes son los glóbulos rojos y los glóbulos blancos. Los primeros carecen de núcleo pues lo pierden durante su maduración, por lo tanto no poseen ADN. Los glóbulos blancos, en cambio, poseen núcleo y por tanto ADN. Entonces para obtener ADN a partir de muestras de sangre sólo son necesarios los leucocitos. Si bien, en un principio se purificaban primero los glóbulos blancos para luego extraer ADN a partir de ellos, el posterior avance de la técnica permite hoy en día extraer ADN a partir de sangre entera con la misma pureza, sumando rapidez y sencillez. En el trabajo práctico realizaremos dos técnicas diferentes de extracción. Estas difieren en el volumen de la muestra, en la pureza de ADN que se obtiene y en la velocidad de procesamiento. Por supuesto, también difieren en los reactivos que se utilizan.

En la mayoría de los casos después de realizar la lisis de las células, estos protocolos tienen siempre un paso de extracción con un solvente orgánico. En la mayoría de los casos se usa cloroformo o una mezcla de cloroformo/isoamílico que permiten eliminar proteínas y restos de membranas celulares que quedan en la interfase entre el solvente orgánico y la fase acuosa. Este paso es muy importante para la pureza del ADN que se quiere aislar.

Otro paso común en todos los protocolos es el agregado final de sales, como acetato de sodio, perclorato de sodio, cloruro de sodio, acetato de amonio, etc. que funcionan como quelantes del ADN. Se necesita además la presencia de alcohol (isopropanol o etanol 100%) que cambia la constante dieléctrica del agua permitiendo separar el ADN de la fase acuosa.

Nota para trabajar con sangre humana: Cuando trabajamos con muestras provenientes de seres humanos debemos extremar las precauciones para disminuir la posibilidad de contraer enfermedades. Las normas son simples y claras:

- Usar siempre guantes y guardapolvo.
- Descartar todo el material utilizado en lavandina.
- Utilizar papel absorbente sobre la mesada y descartarlo después de usarlo o limpiar muy bien la mesada.
- En caso de producirse un accidente limpiar utilizando lavandina.

Protocolo

Técnica del Perclorato

- 1- Se utilizan 5 ml de sangre entera conteniendo EDTA. La sangre se puede congelar a -20°C.
- 2- Poner la sangre en un tubo falcon de 50 ml y agregar 20 ml de solución lisante I fría.
- 3- Centrifugar 10 min a 3000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- 4- Resuspender el pellet y repetir los pasos 2 y 3.
- 5- Agregar 12,5 ml de solución lisante II fría .
- 6- Centrifugar 10 min a 3000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- 7- Añadir 1,75 ml de SEDTA, 0,55 ml de NaClO₄ 4M y 0,2 ml de SDS 10%.
- 8- Añadir 3 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1)
- 9- Agitar hasta mezclar bien las fases y centrifugar 10 min a 1000 rpm. Extraer la fase superior y pasar a un tubo falcon de 15 ml.
- 10- Repetir la extracción con cloroformo/alcohol isoamílico dos veces más o hasta que no haya interfase.
- 11- Agregar 2,5 vol de etanol frío.
- 12- Pescar el ADN con varilla de vidrio.
- 13- Lavar el ADN sumergiendo la varilla en una solución de etanol 70% en un tubo eppendorf.
- 14- Secar al aire.
- 15- Resuspender en 200 µl de agua estéril o con Tris/HCl 10mM pH 7,6. Se puede incubar toda la noche a 37 °C para una mejor resuspensión.
- 16- Correr 10 µl en un gel de agarosa 0,8% teñido con BrEt.

Técnica del CTAB (minipreparación)

- 1- Mezclar 300 µl de sangre entera con 600 µl de buffer CTAB en un tubo eppendorf de 2 ml.
- 2- Calentar 5 min a 60°C.
- 3- Incubar 10-15 min a temperatura ambiente.
- 4- Agregar 900 µl de fenol.
- 5- Mezclar por inversión 5 min.
- 6- Centrifugar a 12000 rpm 5 min.
- 7- Pasar el 750 µl del sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml.
- 8- Agregar 750 µl de cloroformo:isoamílico 24:1
- 9- Mezclar por inversión 5 min
- 10- Centrifugar a 12000 rpm 5 min
- 11- Agregar 0,6 vol de isopropanol frío.
- 12- Pescar el ADN con varilla de vidrio o un tip estéril. En caso de no ver el ADN, centrifugar 30 min a 4°C a 12000 rpm.
- 13- Lavar el pellet con 1 ml de etanol 70%.
- 14- Secar a temperatura ambiente.
- 15- Resuspender en 20 µl de agua estéril o con Tris/HCl 10mM pH7,6.
- 16- Correr 15 µl en un gel de agarosa 0,8% teñido con BrEt.

Soluciones

Lisante I: 500 μ l de 1M $MgCl_2$ en 100 ml de agua (lisis de glóbulos rojos).

Lisante II: 1 ml de 10% Nonidet P 40 en 100 ml de lisante I (lisis de glóbulos blancos).

SEDTA: 50 mM EDTA, 100 mM CNa. El pH debe ser 7,8-8,0.

Buffer CTAB: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,4 M CNa, 40 mM EDTA, 2% CTAB (disolver primero el CTAB en 20 ml de H_2O , luego agregar el resto de los reactivos). Mantener a Temperatura ambiente ya que el CTAB precipita en frío.

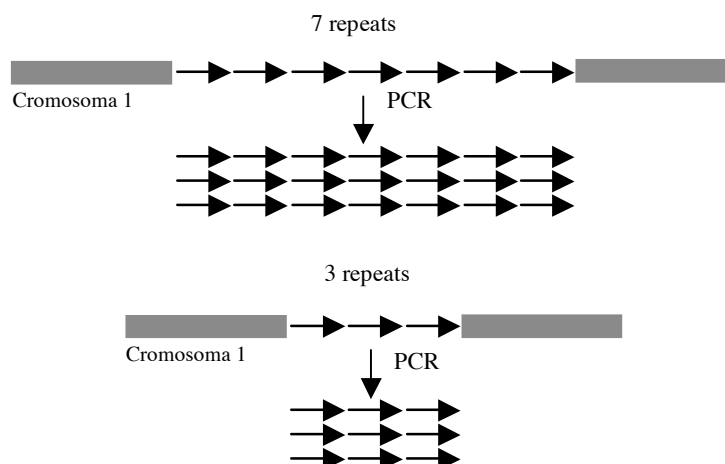
El CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) es un detergente catiónico que tiene la propiedad de precipitar ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos en soluciones de baja concentración iónica. Bajo estas condiciones, las proteínas y los polisacáridos neutros permanecen en solución. En soluciones de alta concentración iónica el CTAB forma complejos con las proteínas y polisacáridos, pero no precipita ácidos nucleicos. Es por esto que el CTAB es útil para purificar AND genómico y especialmente de organismos que producen altas cantidades de polisacáridos como plantas y algunas bacterias Gram-negativas (incluyendo algunas cepas de *E. coli*).

Trabajo Práctico N° 2: Medicina Forense y Filiación. Detección de los alelos del locus D1S80.

Las técnicas para detectar diferencias genéticas entre individuos son un método común en la actualidad para brindar evidencias objetivas en los campos de testeo de paternidad y medicina forense. La variabilidad genética se detecta analizando loci altamente polimórficos, específicamente, zonas del DNA que contienen un número variable de secuencias repetitivas cortas, conocidas como VNTR (variable number of tandem repeats). Tradicionalmente las secuencias VNTR se analizaban por RFLP, incluyendo la transferencia del DNA digerido e hibridización con sonda marcada, lo cual requería de 5-10 días para realizar un examen de paternidad, por ejemplo. En la actualidad, las secuencias VNTR se detectan por la técnica de PCR seguida de electroforesis en geles de acrilamida y tinción por plata; esta metodología se conoce en su conjunto como AMPFLP (amplified fragment length polymorphism).

El test D1S80, permite la detección de productos alélicos amplificados del locus D1S80, utilizando DNA genómico recuperado de distintas muestras biológicas. El Locus D1S80 es variable en su número de repeticiones en tandem (VNTR). Estas consisten en una secuencia de 16 pb repetidas en cantidades variables. El test utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar específicamente la región D1S80 de cada cromosoma homólogo. La región a amplificar consiste en los VNTR y las secuencias adyacentes al mismo, que están definidas por la posición del par de oligonucleótidos utilizados. Los fragmentos amplificados se resuelven en una corrida electroforética en un gel de poliacrilamida; revelándose mediante un proceso de tinción por plata. Se comparan alelos presentes en el DNA conocido y en la muestra.

Este test puede detectar diferencias de tamaño desde 369 pb (14 repeticiones) hasta más de 801 pb (41 repeticiones). Este método permite incluir o excluir un individuo como miembro de un grupo.



Materiales y métodos

Chelex Solution 5% p/v, 100ml.

Pesar 5 gr de Chelex 100 Resin (100-200 mesh, BioRad 143-2832) en una botella previamente autoclavada. Agregar 100 ml de agua estéril. Guardar a temperatura ambiente.

Primers DNA simple cadena (100 nmoles/ml)

Se requieren dos primers de DNA simple cadena para amplificar los alelos del locus D1S80. Las secuencias de los primers son las siguientes:

D1S80A-28 bases 5'-GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G

D1S80B-29 bases 5'-GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC

Protocolos

Extracción de DNA a partir de isopado de saliva

1. Utilizando un tip estéril, tomar la muestra de saliva (raspar un poco la mucosa bucal) y pasarlo a tubo estéril de 1.5 ml.
2. Agregar 200 ul de 5% de Chelex (homogenizar bien antes!) a la muestra.
3. Agitar los tubos vigorosamente durante 10 segundos.
4. Incubar a 56 °C por 30 min.
5. Agitar vigorosamente (vortex) durante 10 min.
6. Incubar en un baño de agua hirviendo durante 8 min.
7. Agitar vigorosamente 10 seg.
8. Centrifugar a máxima velocidad por 3 min.
9. Estimar la cantidad de DNA por gel de agarosa.

La muestra está lista para realizar la PCR. Almacenar a 4 °C o a -20 °C.

Amplificación de DNA, separación electroforética y detección de los alelos del locus D1S80 por tinción con plata

Las reacciones de PCR deben realizarse utilizando material de uso exclusivo para este fin.

- Determinar el número de muestras a amplificar, incluyendo los controles.
- Si las muestras a amplificar fueron guardadas a 4 °C o -20 °C agitarlas vigorosamente y centrifugarlas por 30 seg a máxima velocidad.
- Preparar la mezcla de amplificación.

Componentes	Concentración Stock	Concentración final	µl	Mix de reacción
H ₂ O	-	-		
Buffer	10 X	1X		
BSA	8 mg/ml	0.25 mg/ml		
dNTP	10 mM	0.33 mM		
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM		
Primer A	100 µM	3.3 µM		
Primer B	100 µM	3.3 µM		
TAQ 5 u/ul	5 U/ µl	0.1		
Total	-	-	30	

Agregar la TAQ una vez preparados los tubos con DNA !!!

Utilizar un tip nuevo para cada muestra!!!!

- Rotular los tubos, y agregar el DNA correspondiente. El templado de DNA no puede exceder los 20 µl y la concentración debe estar en un rango de 400 pg a 5 ng. Si el volumen de DNA no llega a 20 µl completar con agua estéril y deionizada.
- Agregar 30 µl de la mezcla de amplificación.
- Ciclo de amplificación:

Luego de una desnaturalización inicial a 94°C de 5 minutos, se realizarán 30 ciclos que incluirán los siguientes pasos: 30 seg de desnaturalización a 94 °C; 30 seg de annealing a 55 °C y una extensión de 30 seg. a 72 °C.

Las muestras pueden ser almacenadas a 4 °C por 7 días o por un período largo a -20 °C.

Separación electroforética

Los productos alélicos amplificados del locus D1S80 difieren uno de otro en tamaño. Para poder determinar la representación alélica en el DNA genómico original, los productos amplificados serán corridos electroforéticamente en un gel de poliacrilamida.

Armado del gel de poliacrilamida 5%

- Lavar los vidrios con 0.4 M NaOH, enjuagarlos con abundante agua y luego con agua deionizada
- Dejar escurrir y lavar con etanol las caras internas de los vidrios.
- Colocar los espaciadores y montar los vidrios.
- Agregar la solución de acrilamida.

Componentes	Concentración Stock	Concentración final	ml
Archilamida:bisacrilamida	(29:1)	5%	
TBE	5 X	1X	
Persulfato de amonio	10%	0.7%	
TEMED	100%	0.175	
H ₂ O	-	-	
Volumen final	-	-	100

IMPORTANTE: UTILIZAR GUANTES YA QUE LA ACRILAMIDA ES UN POTENTE NEUROTÓXICO. LA POLIACRILAMIDA (YA POLIMERIZADA) NO ES TÓXICA, SIN EMBARGO LOS GELES TAMBIEN DEBEN MANIPULARSE CON GUANTES YA QUE PUEDE QUEDAR ACRILAMIDA SIN POLIMERIZAR

Corrida electroforética

En cada tubo de muestra agregar 10 ul del DNA amplificado y 2 ul de la solución loading. Mezclar bien.

Sembrar 12 ul de cada muestra en el gel.

Buffer de corrida: TBE 0,5X.

La corrida se realiza a 100 volts constante.

La corrida se lleva a cabo, hasta que el colorante bromofenol blue (azul) y orange G llegue hasta el final del gel.

Desmontar los vidrios con extremo cuidado. El gel está listo para ser teñido.

Tinción del gel por plata

- Cubrir el gel con TCA 20% hasta que el bromofenol blue desaparezca (5 min aproximadamente) en agitación.
- Descartar el TCA y cubrir el gel con 50 ml 8,3% glutaraldehído dejar 20 min en agitación.
- Recuperar el Glutaraldehído y realizar tres lavados de 10 min con abundante agua miliq.
- Cubrir el gel con 50 ml 0.5% AgNO_3 agitar durante 15 min.
- Descartar el AgNO_3 y realizar 5 lavados de 1 min con abundante agua miliq.
- Tratar el gel con solución reveladora durante 4 minutos o hasta la aparición de bandas. Si la solución reveladora se torna marrón, cambiarla por solución nueva.
- Cubrir el gel con 5% de ácido acético y agitar durante 5 min como mínimo.
- Descartar el H_2O y cubrir el gel con 3% glicerol y agitar por 5 min.
- Sacar el glicerol del gel.
- Para levantar el gel se coloca papel Whatman 3MM sobre el mismo. Se toma el papel de un extremo y se levanta suavemente.

Solución reveladora: 40 ml de Na_2CO_3 12,5%, 105 ul formaldehído, llevar a 200 ml con agua milliq.

Cuestionario

- 1-Describa los fundamentos en que se basan las técnicas de filiación y medicina forense.
- 2-¿Qué tipo de muestras pueden ser usadas para medicina forense? ¿Y para filiación?

Preguntas sobre el trabajo práctico

- 1- ¿Cuántos alelos diferentes correspondientes al locus D1S80 se pueden distinguir en los geles? ¿Cual es el número de repeticiones de cada uno?
- 2- Estudios poblacionales han identificado 29 alelos para el locus D1S80. Se estima que el 90% de los individuos son heterocigotas para este locus. ¿Cuál es el porcentaje de heterocigotas y homocigotas en la muestra? ¿Cómo se comparan estos datos con los de la población en general? ¿Cuáles son las razones a las cuales le atribuye estas diferencias? Utilice las frecuencias detalladas en:
http://alfred.med.yale.edu/alfred/recordinfo.asp?condition=loci.locus_uid='LO000333
- 3) Basándose en los resultados obtenidos. ¿Cree que este protocolo puede ser utilizado para ligar a un sospechoso con un determinado crimen? ¿Por qué? ¿Cómo puede mejorar el experimento?.

Trabajo práctico N° 3: Bases de datos - Bioinformática

http://genoma.unsam.edu.ar/cursos/genetica_humana/bioinformatica.html

Objetivos

Bases de Datos

- Familiarizar al alumno con las distintas bases de datos disponibles online, los tipos de información almacenados y la interrelación entre bases de datos.

Requerimientos

WWW Browser.

URLs

Bases de datos – NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]

- Entrez - Secuencias de ADN y proteínas (GenBank)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>
-
- Entrez- Literatura (PubMed)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>
-
- Entrez- OMIM (NCBI) - Online Mendelian Inheritance in Man
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>
-
- EntrezGene (NCBI) (ex LocusLink)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>
-
- dbSNP (NCBI) - Single Nucleotide Polymorphism Database.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

Otras bases de datos

- GIST - Genetic Information Search Tool
(<http://genome.cwru.edu/gist/gist.html>)
- The SNP Consortium
- <http://snp.cshl.org>
- HGMD - Human Gene Mutation Database
- <http://www.gdb.org>
- HomoloGene (NCBI) - Base de datos de ortólogos y homólogos humanos en organismos modelo.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>

Bases de Datos.

En internet existen numerosas bases de datos con información genética de diversos tipos. Algunas sólo almacenan información de secuencias de ADN. Otras bases de datos guardan información acerca de las mutaciones presentes en estas secuencias de ADN, la frecuencia con la que ocurren en distintas poblaciones, etc. La información acerca de la localización de estas secuencias de ADN en cromosomas, así como también la información sobre marcadores cercanos que pueden ser de utilidad para el diagnóstico se encuentra almacenada en otro tipo de bases de datos. Citas bibliográficas acerca de estas secuencias o de las enfermedades derivadas de mutaciones en estas secuencias también están compiladas en bases de datos.

Para el investigador, o en este caso, para Uds, alumnos de un curso de genética, es imprescindible conocer estas bases de datos para poder interrelacionar los distintos tipos de información y obtener un panorama completo de la información acerca de un gen o de una enfermedad genética.

Algunas bases de datos están relacionadas, de manera que es fácil moverse de una a otra, obteniendo siempre información sobre el gen, la enfermedad o la región del cromosoma que nos interesa.

Alternativamente, uno puede realizar búsquedas en cada una de las bases de datos. Para esto, es necesario conocer que tipo de información tiene la base de datos y qué tipo de 'palabras' uno puede usar en las búsquedas. Algunas bases de datos sólo aceptan códigos de referencia o accession numbers (Por ejemplo el accession number NM_000492 es el código de acceso para el gen responsable de la fibrosis quística). Otras bases de datos permiten utilizar palabras como 'huntington' o nombres de alelos, como 'Ipl'. Si tienen dudas, siempre hay documentación disponible sobre como realizar las búsquedas y que tipo de 'palabras' pueden utilizarse.

Breve guía sobre las bases de datos que vamos a usar en el TP.

Entrez - Es el servicio del NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) que provee acceso a secuencias de ADN y proteínas almacenadas en el GenBank, así como también a citas y abstracts de trabajos científicos (PubMed).

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Es un catálogo de genes humanos y desórdenes genéticos. Hay referencias históricas y bibliográficas sobre enfermedades, referencias médicas, links a otras bases de datos, etc. Las búsquedas pueden retornar información sobre enfermedades o genes indistintamente.

EntrezGene (ex LocusLink) - Provee una manera simplificada de buscar información a través de distintas bases de datos. La visión de esta base de datos está centrada, sin embargo, en 'loci' genéticos, de manera que los resultados de cualquier búsqueda serán referencias a este tipo de entidades genéticas.

HGMD - Human Gene Mutation Database. Es un compendio de mutaciones reportadas para

distintos genes. Provee además información sobre ubicación cromosómica, mapeo (que otros genes están cercadel que uno busca), sondas y primers para amplificar regiones, detectar el gen y/o mutaciones, etc.

HomoloGene. Esta base de datos provee información sobre genes homólogos entre organismos. Actualmente sólo brinda información sobre genes humanos, de ratón, rata y zebrafish.

dbSNP. Base de datos de mutaciones de una base (single nucleotide polymorphisms). Tiene información sobre este tipo de mutaciones, asociadas a genes o loci genéticos. Las búsquedas sólo pueden hacerse utilizando códigos de acceso, ya sean de la propia base de datos (cada SNP tiene su propio numero de acceso) o de GenBank.

Para acceder utilizando nombres de 'loci', hay que realizar la búsqueda en LocusLink y seguir el link hacia esta base de datos.

Algunos Ejemplos

A continuación sigue una lista de ejemplos de búsquedas que pueden hacer. La idea es que les sirva de muestrario de qué y cómo se puede buscar información. Los ejemplos son todos utilizando Entrez (NCBI).

Búsqueda de genes codificantes de enzimas. Las enzimas están catalogadas por la Enzyme Comission (EC) con números que indican los distintos tipos de reacciones químicas que catalizan. Esta clasificación es funcional. Dos genes que codifican a una enzima catalogada bajo el mismo número de la EC no necesariamente comparten una historia evolutiva común (homología).

EC 1.1.1.37 = malate dehydrogenase (MDH). Es una oxido-reductasa, que utiliza NAD/NADH como cofactor y que reduce al oxaloacetato convirtiendolo en L-malato.

Existe otra enzima que a veces es llamada también malato dehidrogenasa (1.1.1.39), que cataliza la decarboxilación del L-malato a piruvato. Esta enzima se la llama enzima "málica" para diferenciarla de la MDH (EC 1.1.1.37), aunque puede existir literatura que la mencione indistintamente.

Como buscar en Entrez utilizando números de la EC?:

1.1.1.37[EC/RN Number] *(busca malato dehidrogenasas)*

1.1.1.39[EC/RN Number] *(busca a la enzima málica)*

"malate dehydrogenase" *(busca registros en la base de datos que contengan las dos palabras en ese orden (al encerrarlos entre comillas no hay term-expansion [uso de sinónimos o palabras asociadas]).*

Búsqueda de 'features' particulares de una secuencia.

En GenBank, las secuencias tienen en general marcadas ciertas características. En inglés se llaman features y se mapean sobre la secuencia utilizando un rango de bases (posición).

Ejemplos:

sig_peptide 33..104

CDS 33..1283

mat_peptide 105..1280

polyA_signal 1343..1348

polyA_site 1368

Para restringir las búsquedas a 'features' hay que usar los descriptores [FKEY] o [Feature Key]

sig_peptide[FKEY] *Para obtener todas los genes que codifican proteínas con péptido señal.*

Trypanosoma[Organism] AND "3'utr"[Feature Key]

Para obtener genes de cualquier especie del género Trypanosoma en los cuales hay información de secuencia de la región 3' UTR.

Búsquedas bibliográficas (PubMed)

aneuploidy AND cancer AND review [PT]

Restringe la búsqueda a publicaciones del tipo (PT = publication type) 'review'.

1- Frasch [AU] AND Sánchez [AU]

Papers en colaboración entre profesores del IIB.

"sex determination" AND (Nature[TA] OR Science[TA])

Somos elitistas ... sólo leemos lo mejor. (Noten que se pueden usar paréntesis para englobar subexpresiones y forzar a que la evaluación de las mismas sea en el orden que nosotros deseamos).

Caso 1 - Huntington

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/disease/Huntington.html>

El gen codificante de la jantingtina se encuentra ligado a la enfermedad de Huntington (o será Jantington?), una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de neuronas estriadas. Se piensa que esto se encuentra relacionado con la expansión de repeticiones inestables de un trinucleótido -CAG-, que se traducen en un tracto de poli-glutamina en el producto proteico. El locus de este gen abarca 180 kb y consiste en 67 exones. El gen es ampliamente expresado y es requerido para el desarrollo normal. Se expresa en dos formas diferentes por poliadenilación alternativa, que muestran distintas abundancias relativas en varios tejidos fetales y del adulto. El transcripto más largo es de aproximadamente 13.7 kb y se expresa predominantemente en el cerebro del adulto y feto, mientras que el transcripto más pequeño, de aproximadamente 10.3 kb se expresa menos específicamente en un número mayor de tejidos. El defecto genético que lleva a la enfermedad de Huntington puede no necesariamente eliminar la transcripción de la proteína, pero puede conferir una nueva propiedad al mRNA o alterar la función de la proteína. Un

candidato posible es la HAP1 (huntingtin-associated protein-1), altamente expresada en cerebro, que muestra mayor afinidad por la huntingtina con el tracto de poli-glutamina expandido.

Utilizando las bases de datos mencionadas:

- i) Buscar el gen de la huntingtin (secuencia de nucleótidos y de aminoácidos).
- ii) Identificar la región involucrada en el desarrollo de la enfermedad
- iii) ¿En qué cromosoma se aloja el gen?
- iv) ¿Cuál es el número normal de repeticiones del trinucleótido CAG en la población? y cuál es el rango encontrado en pacientes con la enfermedad?
- v) ¿Cómo haría para detectar la expansión de trinucleótidos en pacientes? (Tip: HGMD -> amplimers).

Caso 2 - Lipasa de lipoproteínas (Lipoprotein lipase, LPL)

La LPL se expresa en corazón, músculo y tejido adiposo. Funciona como un homodímero y tiene la función dual de hidrolasa de triglicéridos y ligando/puente para el uptake de lipoproteínas mediado por receptor. Mutaciones severas que causan deficiencias en LPL, resultan en hiperlipoproteinemias de tipo I, mientras que mutaciones menos extremas en el gen LPL están asociadas a muchos desordenes en el metabolismo de lipoproteínas.

Utilizando las bases de datos mencionadas:

- Buscar el gen codificante de la LPL (nt y aa)
- Identificar las mutaciones conocidas para la enfermedad. Cuántas son y de que tipos?
- ¿En qué cromosoma se aloja el gen?
- ¿Es posible estudiar este gen en un modelo animal diferente del humano? (sí, somos animales).
- ¿En que año se reportó la primer ocurrencia del síndrome familiar de hiperlipoproteinemia de tipo I? Y en qué año se detectaron por primera vez mutaciones en este gen?

Caso 3 - Hemofilia tipo A

Es una enfermedad hereditaria, que tiene alta incidencia en los hombres, caracterizada por la deficiencia o total carencia del factor de coagulación VIII (F8) cuyo resultado ultimo es hemorragias en articulaciones y músculos y sangrado conspicuo en caso de heridas. La severidad de la enfermedad esta determinada por el nivel de F8 en sangre.

El F8 es sintetizado principalmente en el hígado (también se detecto síntesis en leucocitos), forma un complejo con el factor de von Willebrand. Este complejo es un activador del ultimo

paso de la vía intrínseca del proceso de coagulación: la activación por clivaje del factor X. Siendo este último quien finalmente convierte la protrombina en trombina.

1. ¿Qué tipo de herencia presenta esta enfermedad?
2. Produce hemofilia la deficiencia del factor de von Willebrand? Si es así qué tipo de herencia tendría?
3. ¿Qué gen codifica para el Factor VIII? En qué cromosoma se encuentra?Cuál es la secuencia del mensajero que codifica? Solo indique el número de acceso.
4. ¿Por qué entre las mutaciones que producen hemofilia de tipo A son usuales las inversiones?
5. En la población que le tocó en suerte es muy frecuente una mutación puntual en el exon 8, que produce un cambio de la arginina 372 por un histidina. Decide estudiarla mediante amplificación de la región por PCR y secuenciación. ¿Qué primers utilizaría? (GDB->amplimers)

Caso 4 - Acondroplasia

Es un de las formas más frecuentes de enanismo, los individuos afectados son de baja estatura debido a sus brazos y piernas desproporcionadamente cortos. Tienen cabeza grande, frente prominente y tabique de la nariz delgado. Aunque esta condición puede ser heredada, el 80 % de los casos es debido a mutaciones de novo. La proteína involucrada es el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3). La función del FGFR3 es disminuir la formación de hueso mediante la inhibición de la proliferación de los condriocitos (las células que producen cartílago). La mutación más común afecta el residuo 380 de la proteína e incrementa la actividad del FGFR3, limitando severamente el crecimiento de los huesos.

1. ¿Qué tipo de herencia tiene esta enfermedad?
2. ¿Qué gen codifica para el receptor? ¿En qué cromosoma se encuentra?
3. El gen del punto anterior codifica para distintas isoformas. ¿Cuáles son las secuencias de los diferentes mensajeros que codifica? Solo indique el número de acceso.
4. ¿Cuál es la mutación mas común entre los afectados? Si decide estudiarla mediante amplificación de la región por PCR y secuenciación, que primers utilizaría? ¿Qué cambios espera encontrar y en que posición? (GDB->amplimers)
5. De acuerdo a los datos de la asociación Little People of America y la Association des Personnes de Petite Taille: la edad de los progenitores afecta la incidencia de esta enfermedad?

Caso 5 - Fragilidad del X

Este síndrome es el más común de los que producen retraso mental. Afecta mas frecuente y severamente a los hombres. Una de las causas que producen esta enfermedad es una mutación en el gen FMR1 en la región 5'UTR, producto de la amplificación del triplete CGG. La expansión de esta repetición hace que el gen no se exprese debido a que se produce hipermetilación de la región.

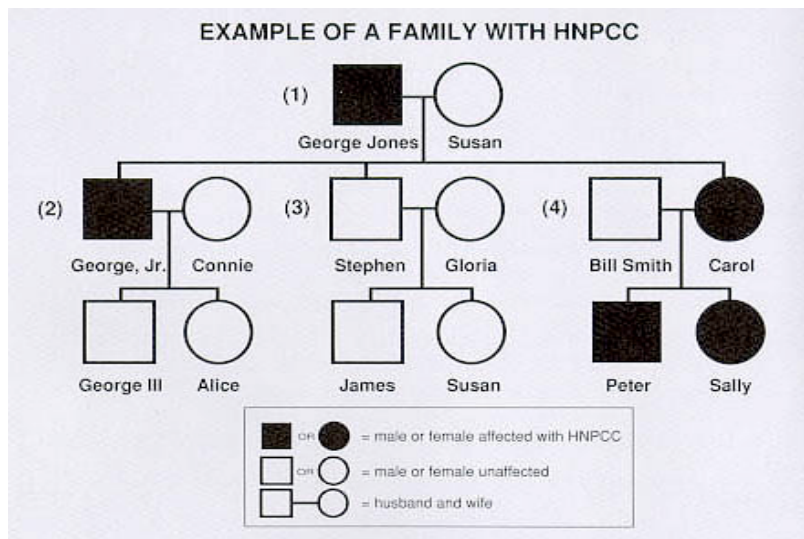
1. ¿Por qué la falta de expresión afecta severamente a los hombres?
2. Buscar el gen FMR1 y la proteína que codifica. Indicar solo el número de acceso.
3. ¿Cuál es el rango normal de repeticiones del trinucleótido CGG? ¿Y cuál el encontrado en pacientes con la enfermedad?
4. Utilizando dbSNP identifique SNPs sinónimos y no sinónimos en el gen FMR1. Indique los números de acceso, la posición en la proteína del aminoácido codificado, y además en el caso de los no sinónimos el cambio de amino ácido que producen.
5. Si decide estudiar esta mutación mediante amplificación de la región por PCR ¿Qué primers utilizaría? (GDB->amplimers)

Trabajo práctico N°4: Síndrome de Lynch – Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC, *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*).

El Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico comprende aproximadamente el 5% de los casos de cáncer colorrectal. El criterio mínimo para diagnosticar HNPCC es que el carcinoma sea diagnosticado y verificado histológicamente en al menos tres parientes que pertenezcan a dos o más generaciones sucesivas. En al menos uno de los pacientes la edad de inicio del cáncer debería ser de menos de 50 años. Además del colon, los órganos más comúnmente afectados con cáncer incluyen el endometrio, el estómago, sistemas biliar y pancreático, y el tracto urinario.

Mutaciones en los genes MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, MSH6, TFGBR2 y MLH3 han sido identificados en HNPCC, pero son los defectos de los genes MSH2 y MLH1 los que causan casi la totalidad de los casos.

El cáncer colorrectal congénito es sospechado cuando varios casos de cáncer de colon o de algunos de los tipos de cáncer asociados a éste son diagnosticados en varias generaciones de una misma familia. El síndrome del cáncer de colon congénito incluye al Cáncer de Colon Hereditario de tipo No Polipósico (HNPCC) y a la Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP).



En el HNPCC y en la FAP, se hereda un gen normal de uno de los padres y uno defectuoso por parte del otro, o bien una copia normal sufre un daño durante la concepción. De esta manera todas las células tendrán un gen normal y otro defectuoso. Con el tiempo el gen normal también puede volverse defectuoso, entonces estas células dejan de estar sometidas a un control normal y el cáncer se desarrolla.

El HNPCC (también denominado síndrome de Lynch) es causado por la mutación de uno de los varios genes reparadores de DNA llamados MMR (mismatch repair genes). La función de estos genes es la de mantener la fidelidad del DNA durante la replicación, por lo

cual son considerados genes “protectores”. A nivel molecular los genes MMR codifican proteínas responsables de corregir errores por bases mal apareadas, pequeñas deleciones e inserciones que normalmente ocurren durante la replicación del DNA. Las células haploinsuficientes poseen una actividad reparadora normal o próxima a la normalidad, pero las células que poseen ambos alelos deficientes pierden por completo esta capacidad reparadora.

1. Diagnóstico

La identificación de una mutación germinal en algunos de los genes reparadores del ADN permite confirmar el diagnóstico molecular de HNPCC. Esto se produce en la mayoría de pacientes (45-65%) que cumplen los criterios de Amsterdam (criterios clínicos). Sin embargo, en una proporción no despreciable de familias que cumplen estos criterios o que tienen una marcada historia familiar de CCR no es posible identificar la mutación causal.

2- Criterios clínicos de HNPCC

3- Criterios de Amsterdam II

- Tres o más familiares afectados por una neoplasia asociada al HNPCC (CCR, cáncer de endometrio, intestino delgado, uréter o pelvis renal), uno de ellos familiar de primer grado de los otros dos.
- Dos o más generaciones sucesivas afectadas.
- Uno o más familiares afectados de CCR diagnosticado antes de los 50 años de edad.
- Exclusión de la PAF en los casos de CCR.

El análisis de mutaciones en la línea germinal para hMSH2 y hMLH1 puede ser recomendado después de un screening inicial en pacientes sospechados de HNPCC; esto es la evaluación del DNA obtenido por biopsia de las lesiones buscando la presencia de “un alto nivel de inestabilidad de microsatélites” y/o la ausencia de la expresión de productos de los genes hMSH2, hMLH1 o hMSH6. Los microsatélites son secuencias repetitivas de DNA de 1 a 4 pb distribuidas a través de todo el genoma, siendo primariamente de ubicación intrónica. La función de estos elementos aún se desconoce. El DNA tumoral que muestra alteraciones en la región de microsatélites indica un probable defecto en genes MMR que puede deberse tanto a mutaciones germinales como somáticas. Cuando estos elementos repetitivos son replicados incorrectamente y no son reparados por las proteínas MMR aparece una inestabilidad en los microsatélites (MSI). El resultado de la inestabilidad genómica es la rápida acumulación de mutaciones somáticas en oncogenes y en genes supresores del crecimiento tumoral que juegan un papel crucial en la inicio y en el progreso tumoral.

2. Análisis genético

Muchos de los estudios genéticos para hMSH2 y hMLH1 son realizados por secuenciación de estos genes. Como el secuenciamiento falla en detectar deleciones en el genoma que son relativamente comunes en el HNPCC, también se utilizan técnicas como el Southern blot o bien MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). La presencia de mutaciones germinales en los genes reparadores del ADN ha permitido el diagnóstico molecular del HNPCC y, consecuentemente, su aplicación en el screening de esta patología. La alteración de estos genes conlleva la acumulación de múltiples mutaciones somáticas que afectan de manera preferente a fragmentos repetitivos de ADN (microsatélites) distribuidos a lo largo del genoma, lo cual constituye un marcador fenotípico de esta entidad (fenómeno de inestabilidad de microsatélites). Más del 95% de CCR en pacientes con HNPCC presentan inestabilidad de microsatélites.

La penetrancia de las mutaciones en los genes hMSH2 y hMLH1 en relación con el desarrollo de CCR es superior al 80%, mientras que tan sólo un 15% de los tumores en pacientes con CCR esporádico. Esta circunstancia apoya la conveniencia de evaluar la presencia de inestabilidad de microsatélites como procedimiento de selección previo de los individuos con una mayor probabilidad de presentar mutaciones en los genes implicados en el HNPCC, con lo que se consigue aumentar el rendimiento del análisis genético.

El análisis genético de los genes reparadores del ADN permite el diagnóstico presintomático de los familiares en riesgo. Este análisis permite la racionalización del screening familiar, de manera que el seguimiento endoscópico puede centrarse únicamente en aquellos miembros portadores de mutaciones. Por ello, el análisis genético debe ofrecerse a los familiares de primer grado (padres, hermanos e hijos) de individuos portadores de una mutación germinal en algunos de estos genes.

Diversas alteraciones se han descrito en el gen hMLH1 asociadas con HNPCC (www.nfdht.nl). Una de las más frecuentes es la “**del616**” que implica la **delección de 3 bases** (AGG) en el **exón 16** produciendo la pérdida de una lisina. Esta delección le confiere a la proteína una mayor inestabilidad en comparación con la proteína salvaje (wild type). Un estudio sencillo que se puede realizar para rastrear personas heterocigotas para la del616 es amplificar por PCR el exón 16 del gen hMLH1 (275pb).

En el trabajo práctico evaluaremos el estado de heterocigocidad del paciente mediante la amplificación del exón 16 y posterior corrida electroforética. En el gel se resolverán dos bandas: una correspondiente a WT/WT y del616/del616 y otra que corresponderá a WT/del616. En este último caso la secuencia wild type al hibridarse con la del616 formará un pequeño “loop” (le sobran tres bases) que le otorgará un patrón de migración electroforético distinto al que presenta el híbrido WT/WT o del616/del616. Esta característica conformacional nos permitirá evidenciar el estado de heterocigocidad de la muestra de una manera sencilla y por qué no, también económica.

Materiales y métodos

Los primers empleados para amplificar este exón son:

hMLH1e16sense: **CATTTGGATGCTCCGTTAAAGC**

hMLH1e16antisense: **CACCCGGCTGGAAATTTTATTTG**

Reacción de PCR

Se realizan cuatro reacciones de PCR: una con la muestra incógnita, un control que posee la delección, otro sin delección (wt), y un control negativo para la reacción de PCR.

Componentes	Concentración Stock	Concentración final	Vol /reacción (ul)	Mix
Cl ₂ Mg	50mM	1 mM		
Buffer Taq	10 X	1 X		
dNTPs mix	10mM	0.2 mM		
Primer sense	10uM	0.4 uM		
Primer antisense	10 uM	0.4 uM		
DNA molde	50 ng/ul	2 ng/ul		
H2O			25 ul	
Taq	5 U/μl	0.1		

Ciclado

95 °C 12 min (preheated, desnaturalización inicial)
 95 °C 30 seg (desnaturalización)
35 ciclos 55 °C 30 seg (annealing)
 72 °C 60 seg (extensión)
72 °C 10 min (extension final)

Geles de Poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida son utilizados como matrices de carga eléctrica neutra para poder separar DNA doble cadena de acuerdo al tamaño y DNA simple cadena de acuerdo al tamaño y a la conformación. Este tipo de geles poseen las siguientes 3 ventajas respecto a los geles de Agarosa:

(1) Poseen muy alto poder resolutivo, el cual permite separar moléculas de DNA cuyas longitudes difieren en un 0.1% (ej: 1 bp base en 1000 bp);

(2) Pueden alojar mayor cantidad de DNA. Por ejemplo, se pueden colocar hasta 10 ug de DNA en un único slot (1cm X 1cm), sin perder el poder resolutivo significativamente.

(3) El DNA recuperado a partir del gel es extremadamente puro.

A continuación se describen brevemente los dos tipos de geles de poliacrilamida más utilizados:

1- Los geles desnaturalizantes son usados para separar y purificar fragmentos de DNA simple cadena. Estos geles, son polimerizados en presencia de un agente (urea, o menos frecuentemente formamida) que suprime el apareamiento entre las bases del DNA. El DNA desnaturalizado migra a través del gel independientemente de la composición y secuencia del mismo.

2- Los geles nativos son utilizados para purificar y separar fragmentos de DNA de doble cadena. Como regla general, el DNA doble cadena migra a través de un gel nativo de manera inversamente proporcional al \log_{10} de su tamaño. Si bien la movilidad electroforética del ADN es también afectada por su composición y secuencia, la movilidad de dos fragmentos de tamaño idéntico puede diferir hasta un 10%.

Química de la poliacrilamida

En presencia de radicales libres, los cuales son usualmente generados por la reducción del persulfato de amonio (APS) por el TEMED, se promueve la polimerización de los monómeros de acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) dando como resultado cadenas lineales de poliacrilamida. Cuando en presencia de agentes que facilitan el entrecruzamientos de estas cadenas como la N-N'- metilen-bis-acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) son incluidos en la mezcla, se desarrolla la co-polimerización de estos 2 agentes, dando como resultado un entramado de acrilamida ramificada en forma de poro.

Dado que el diámetro del poro depende de la concentración tanto del monómero como del crosslinker, se puede manipular estos parámetros en virtud de poder modificar el tamaño del poro, siendo de esta manera posible expandir el rango de separación del gel.

Separación electroforética

Se correrán las muestras en un gel de Poliacrilamida nativo al 5% a 98 volts en TBE 1X junto con un marcador de peso molecular (pUC 19).

- Preparación de muestras a correr en loading buffer.
- Lavado de vidrios y ensamble de la cuba.
- Preparación del gel de poliacrilamida (ver más abajo).

- Ensamblar el gel en la cuba de corrida, llenar con el buffer de corrida (TBE 1X) la cámara de arriba y abajo.
- Sembrar las muestras y patrón de peso molecular.
- Conectar corriente = corrida (98 V).
- Desconectar la corriente cuando el frente de corrida llegue casi al final del gel.
- Teñir el gel con Br-Et (usar guantes!!!).

Reactivos (Stocks)	Concentración Final
Acrilamida/Bis-acrilamida 29:1	5%
TBE 5X	1X
APS 10%	0.04 %
TEMED 100%	0.1 %
Agua Destilada	C.S.P 10 ml

Trabajo práctico N°5: Diagnóstico de enfermedades genéticas por secuenciación automática: raquitismo y cáncer gástrico.