

## Bases Moleculares de las Enfermedades Genéticas

- a). Determinantes de la expresión fenotípica
  - i). Naturaleza de la mutación
  - ii). Fondo (Background) Genético
  - iii). Influencias ambientales
- b). Tipos de mutaciones que afectan a los genes
  - i). Mutaciones en secuencias reguladoras  
mutaciones en el promotor de factor IX
  - ii). Mutaciones que afectan a la secuencia de proteína  
mutaciones en  $\beta$ -globina
  - iii). Mutaciones en gran escala  
delecciones  $\beta$ -globina  
delecciones distrofina
  - iv). Mutaciones por expansión de repeticiones de trinucleótidos  
Trastornos neuropsiquiátricos

## Determinantes de la expresión fenotípica

- Naturaleza de la mutación  
diferentes mutaciones en el mismo gen (diferentes alelos enfermos) pueden dar fenotipos más o menos severos dependiendo de los efectos que tengan las mutaciones en la expresión del gen o en la función de la proteína
- Background genético (Fondo genético)  
dos individuos de una misma familia aún teniendo el mismo alelo enfermo, sin embargo, tendrán ciertamente un montón de genes distintos (a no ser que sean gemelos idénticos) y la expresión de estos genes de fondo puede influenciar el fenotipo enfermo manifestado.
- Factores ambientales  
Factores como el estilo de vida, la dieta, y la exposición a toxinas ambientales pueden afectar al fenotipo enfermo

## Naturaleza de la mutación

- i). Mutaciones en secuencias reguladoras  
mutaciones en el promotor de factor IX
- ii). Mutaciones que afectan a la secuencia de proteína  
mutaciones en  $\beta$ -globina
- iii). Mutaciones en gran escala  
delecciones  $\beta$ -globina  
delecciones distrofina
- iv). Mutaciones por expansión de repeticiones de trinucleótidos  
trastornos neuropsiquiátricos

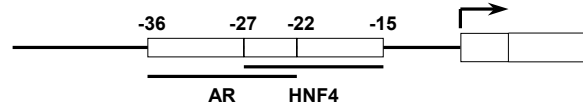
## Mutaciones reguladoras

### El gen del factor IX

- localizado en el cromosoma X
- región transcrita >32,700 bp, con 8 exones

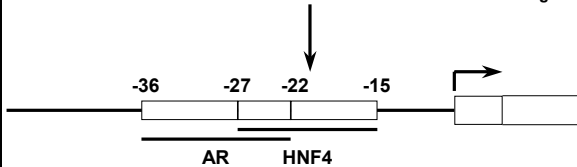
### Promotor del gen del Factor IX

- Sitios reguladores de unión de TF: receptor de andrógenos y HNF4



- AR = receptor andrógeno
  - dedos de zinc superfamilia nuclear de factores de transcripción
  - une andrógenos
  - andrógenos aumentan en la pubertad
- HNF4 = factor nuclear de hepatocitos-4
  - dedos de zinc superfamilia nuclear de factores de transcripción
  - ligando desconocido - por tanto es un receptor "huerfano"
  - HNF4 se expresa en el desarrollo temprano y en el hígado adulto

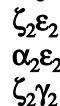
- mutación a -20 resulta en Hemofilia B Leyden en la que la hemofilia mejora en la pubertad cuando aumentan los niveles de andrógenos



- mutación a -26 resulta en Hemofilia B Brandenburg en la que los niveles de factor IX permanecen bajos incluso en la pubertad

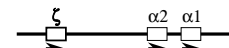
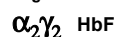
## Expresión durante el desarrollo de las hemoglobinas

- hemoglobinas embrionarias

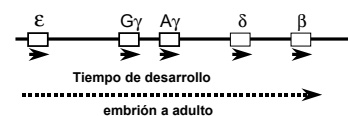
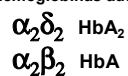


- la disposición de los genes  $\alpha$  y de los genes  $\beta$  reflejan el orden de la expresión durante el desarrollo

- hemoglobinas fetales



- hemoglobinas adulto

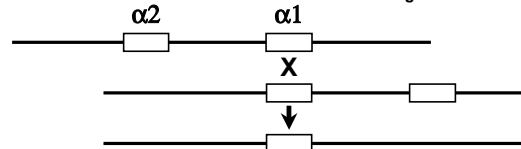


### Trastornos genéticos de las hemoglobinas

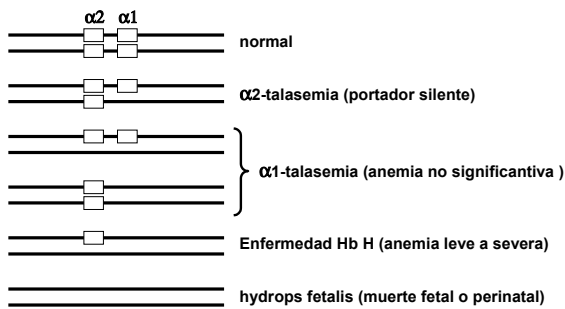
- variantes estructurales (hemoglobinopatías)
  - Anemia falciforme
    - afecta codón 6 de  $\beta$ -globin
    - GAG (glutámico) a GTG (valina)
  - anemia falciforme
  - hemoglobina C
    - afecta a codón 6 de  $\beta$ -globin
    - GAG (glutámico) a AAG (lisina)
  - anemia hemolítica poco severa
- Talasemias (disminución producción de cadenas  $\alpha$ - o  $\beta$ )
- Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH)

### Delecciones en el locus de las globinas

- sobrecruzamiento desigual
  - $\alpha$ -talasemia
  - los dos genes de  $\alpha$ -globina se originaron por duplicación génica: y son casi idénticos
  - recombinación por sobrecruzamiento desigual da lugar a la pérdida de uno de ellos
  - la herencia del cromosoma con la delección da lugar a  $\alpha$ -talasemia

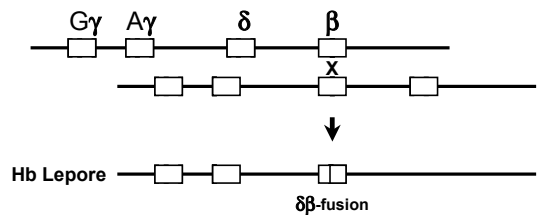


- pérdida de los genes de  $\alpha$ -globin da lugar a diferentes formas de  $\alpha$ -talasemia con diferente gravedad dependiendo del número de genes que se pierdan en la recombinación



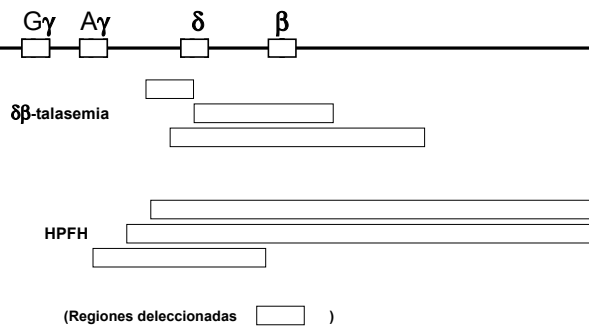
### Delecciones en el locus de las globinas

- sobrecruzamiento desigual
  - hemoglobina Lepore ( $\beta$ -talasemia)



- recombinación por sobrecruzamiento desigual da lugar a la fusión de los genes  $\delta$ - and  $\beta$ - por la alta homología de los  $\delta$  y  $\beta$ : (los genes son ~90% homólogos)
- la consecuencia es una  $\beta$ -talasemia severa por disminución de la síntesis de la proteína de fusión  $\delta\beta$  (por la debilidad del promotor de  $\delta$ -globin)

- grandes delecciones (con fenotipo escaso o nulo)
  - $\delta\beta$ -talasemia -- compensación por síntesis de cadena  $\gamma$
  - HPFH -- compensada totalmente por síntesis de cadena  $\gamma$



### Trastornos neuropsiquiátricos producidos por expansión de trinucleótidos

- Distrofia miotónica
- Síndrome de X-frágil
- Atrofia muscular espino-bulbar (Enf. de Kennedy)
- Enfermedad de Huntington

### Microsatélites

- regiones cortas y repetidas en el genoma (puesto que su contenido en G+C es usualmente mayor o menor que la media del genoma), aparecen frecuentemente como una banda de diferente densidad en gradientes de CsCl y por eso se denominan satélites
- microsatélites están frecuentemente constituidos por repeticiones de trinucleótidos

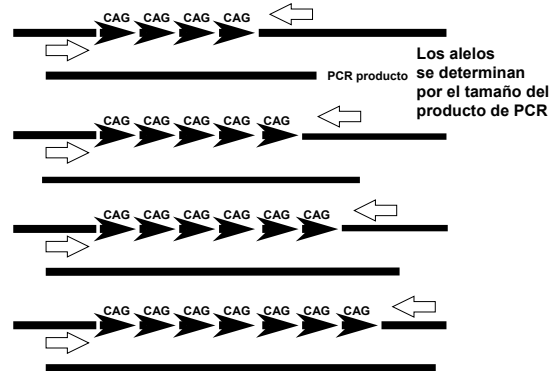
**Repeticiones de Trinucleotidos**  
(una forma de microsatelites)

- Los mas comunes en el DNA humano:  
CAG, CGG, CAA, TAA, GAG
- puesto que el DNA es de doble cadena el triplete CAG incluye:  
CAG, AGC, GCA, CTG, TGC, GCT

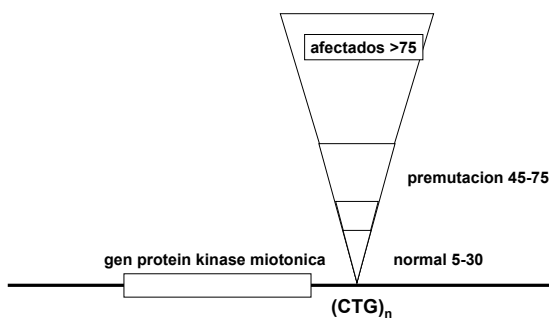
5' CAGCAGCAGCAGCAG 3'  
3' GTCGTCGTCGTCGTC 5'

- el número de repeticiones y por tanto su longitud es variable y altamente polimorfica dando lugar a VNTRs (variable number of tandem repeats)

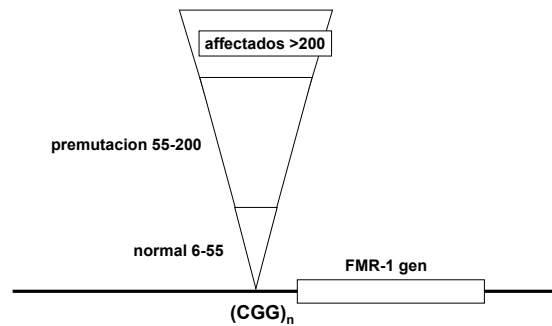
**Polimorfismo en un locus con repetición de trinucleótidos (VNTR)**



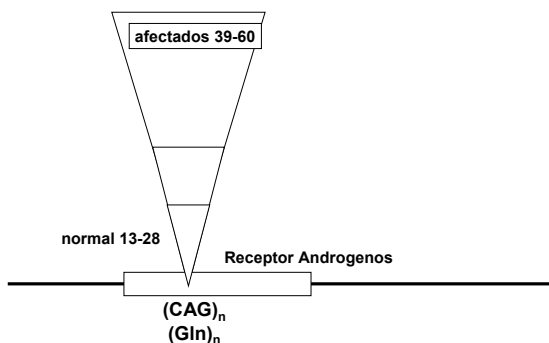
**Estructura y herencia de la expansión de trinucleótidos en la distrofia miotónica**



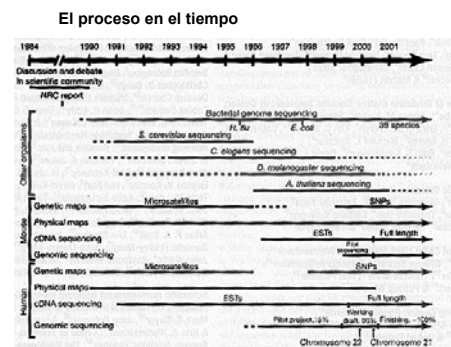
**Estructura y herencia de repeticiones CGG en el síndrome de X-frágil**



**Estructura y herencia de repeticiones CAG en la atrofia muscular espino bulbar**



**PROYECTO GENOMA HUMANO**



### Secuenciación completa del genoma humano Feb, 2001



### Fuentes para la consulta del genoma humano

Datos públicos: NCBI, NIH	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sitemap/index.html">www.ncbi.nlm.nih.gov/sitemap/index.html</a> <a href="http://www.nhgri.nih.gov/Data/">www.nhgri.nih.gov/Data/</a>
Celera (privados en parte)	<a href="http://www.celera.com">www.celera.com</a>
European Bioinformatics Institute (EBI, Sanger)	<a href="http://www.ensembl.org/genome/central/">www.ensembl.org/genome/central/</a>
Univ. California SantaCruz	<a href="http://genome.ucsc.edu">http://genome.ucsc.edu;</a>
RIKEN (Tokio)	<a href="http://www.rarf.riken.go.jp">www.rarf.riken.go.jp</a> y <a href="http://hgrep.ims.u-tokyo.ac.jp">http://hgrep.ims.u-tokyo.ac.jp</a>

### Glosario de términos genómicos

**STS (Sequence Tagged Site):** un segmento de DNA único cuya localización es conocida. Sirve como referencia para mapear y ensamblar secuencias.

**EST (Expressed Sequence Tag):** un segmento de DNA único dentro de la región codificante (mRNA-- cDNA) de un gen. Es útil para la identificación de la copia completa de un gen y para mapear.

**SNP (single nucleotide polymorphism):** posición única (un único par de bases) del genoma humano en la que hay dos o más alelos con una frecuencia significativa (al menos en el 1% de la población)

**Mapa genético de ligamiento:** Un mapa de las posiciones relativas de los genes y otras regiones en un cromosoma determinado por las frecuencias en que dos loci se heredan juntos.

**Mapa físico:** Un mapa con las distancias físicas entre genes (en pares bases de DNA) utilizando técnicas citogenéticas y moleculares

### Glosario de términos genómicos

**Ensamblaje:** Poner los fragmentos de DNA secuenciados en las posiciones cromosómicas correctas

**Anotación de un genoma:** Identificar la localización y las regiones codificantes en un genoma e identificar su función

**DNA codificante:** Secuencias de DNA que se transcriben y dan lugar a proteínas tras la traducción.

**Genómica:** Estudio comprensivo de conjuntos completos de genes y sus interacciones de un organismo en lugar de estudiar un único gen o proteína

**Genómica funcional:** El estudio de los genomas para determinar la función biológica de todos los genes y sus productos

**Genómica estructural:** Determinación de la estructura tridimensional de un vasto número de proteínas usando técnicas experimentales e informáticas

**Proteómica:** El estudio del conjunto completo de proteínas codificado por un genoma.

### Características generales del genoma humano

#### La mayor parte del genoma humano son secuencias repetidas

LINE	18.9%
SINE	12.5%
L1	15.4%
Alu	10.7%
LTR	7.9%
DNA	2.7%
otras	0.1%
<b>TOTAL</b>	<b>42.5%</b>



La mayor parte de estos elementos proceden de retrotransposición

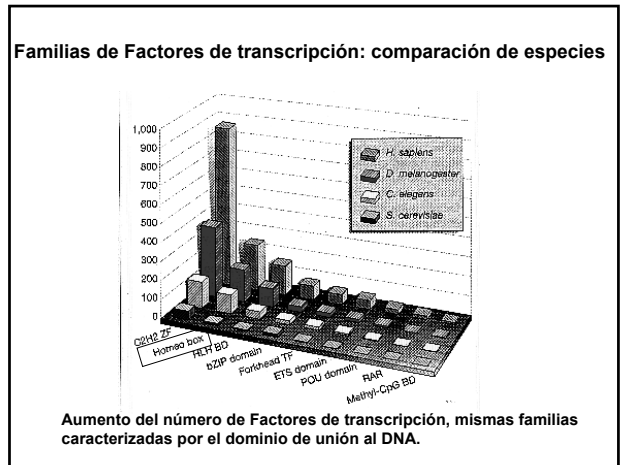
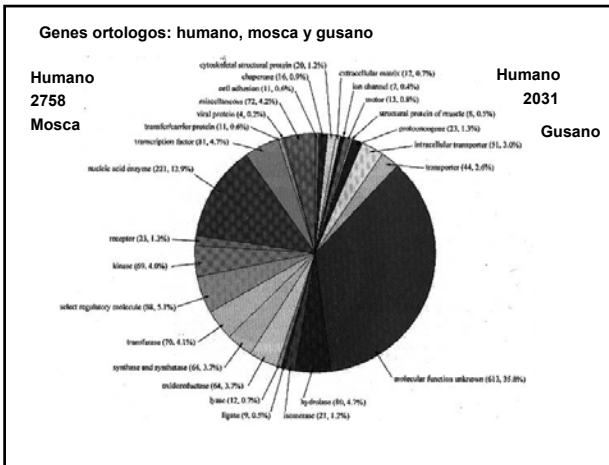
RNA  $\rightarrow$  DNA y posterior integración en el genoma  
No hay evidencia de integraciones importantes en los últimos 50.000.000 de años. Divergimos de los monos hace 25.000.000 de años. Nuestras secuencias repetidas son verdaderas secuencias fosiles.

### Características generales del genoma humano

50% de todo el genoma humano está anotado

**Nº de genes: 30.000** (C. elegans tiene 20.000, D. melanogaster 13.601)

- Pocos genes nuevos en la evolución hasta humanos
- La mayor parte de los genes se encuentran en regiones ricas en G/C
- La mayor parte de nuevas formas generadas por splicing alternativo
- No existen dominios nuevos de proteínas, las nuevas se originan por combinación de dominios preexistentes en diferentes arquitecturas.
- Grandes expansiones de determinados grupos génicos  
genes receptores de olor (hasta 1000, 2/3 son pseudogenes)
- Nobel 2004: Richard Axel  
INMUNOGLOBULINAS  
FACTORES DE CRECIMIENTO Y CITOQUINAS
- Tras las comparaciones con otros organismos 12809 genes, 41.7% no se sabe su función molecular.



Aumento del número de Factores de transcripción, mismas familias caracterizadas por el dominio de unión al DNA.

## Homeotic (Hox) Genes

Lab pb Zen Dfd Scr Antp Ubx Abd-AAbd-B

1. Imponen el programa que determina la diferenciación de cada segmento.
2. Loci complejos que se encuentran en clusters.
3. Colinearidad espacial- orden de los gene Hox corresponde estrictamente a su expresión a lo largo del embrión.

### Clusters Hox están conservados entre especies.

**Drosophila**

lab pb Dfd Scr Antp UbxAbd-AAAbd-B BX-C

ANT-C 3

**Mouse**

HoxA A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A9 A10 A11 A13 Evx1 6

HoxB B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B13 11

HoxC C4 C5 C6 C8 C9 C10 C11 C12 C13 15

HoxD D1 D3 D4 D8 D9 D10 D11 D12 D13 Evx2 2

anterior 3' ← 5' posterior

Humano y ratón: cuatro clusters de genes (A, B, C, D) organizados en 13 grupos paralogos.

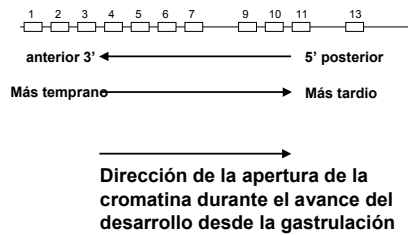
## Colinearidad Espacial en ratón

Humanos tienen el mismo numero de genes Hox en clusters y están conservados

Adaptado de Hunt et al. (1991) *Development Supp.*: 187-197.

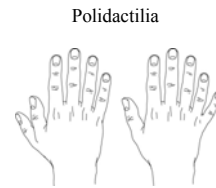
Comparación de colinearidad espacial entre Drosophila y ratón. Humanos tienen el mismo número de clusters de genes HOX que el ratón y la colinearidad espacial está conservada entre especies.

## Colinearidad Temporal en ratón



Colinearidad Temporal : Según se desarrolla el plan de formación del cuerpo en dirección antero-posterior desde la gastrulación, hay una expresión secuencial de los genes que forman parte del complejo homeótico.

## Enfermedades humanas asociadas con mutaciones en los genes Hox



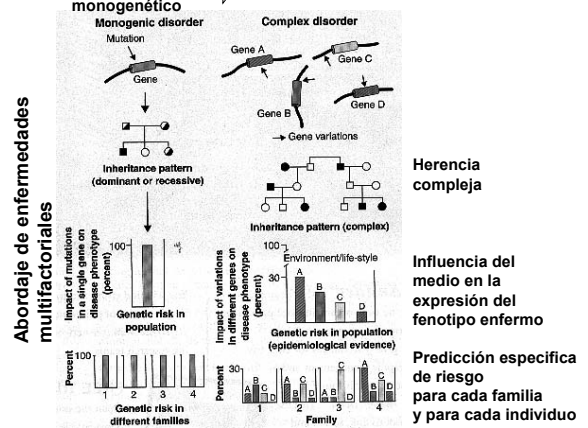
1. síndrome cabeza-pie-genitales (delección de Hoxa)
2. Sinpolidactilia (delección de Hoxd)
3. Paladar hendido
4. Anormalidades en cerebro
5. Anormalidades uterinas
6. ácido Retinoico, que causa defectos congénitos, afecta expresión de genes Hox

## Cambios en los paradigmas de la Investigación Biomédica

Genómica estructural	⇒	Genómica funcional
Genómica	⇒	Proteómica
Trastornos monogénicos	⇒	Trastornos multifactoriales
Diagnóstico por DNA específico	⇒	Monitorización de susceptibilidad
Análisis de un gen	⇒	Análisis de múltiples genes, familias de genes, vías y sistemas
Acción génica	⇒	Regulación génica
Etiología (mutación específica)	⇒	Patogénesis (mecanismo)
Una especie	⇒	Varias especies
Terapia por patología	⇒	Terapia individualizada
Millones de Datos	⇒	Conocimiento
	⇒	Aplicación práctica

La era Post-Genómica

## Mendeliano monogénico ⇒ Multifactorial



## DNA

SNP a gran escala del genoma humano

**GENOMA** El material genético completo contenido en los cromosomas de un organismo

### articles

## A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms

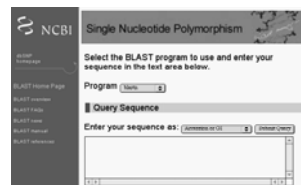
The International SNP Map Working Group\*  
\*A full list of authors appears at the end of this paper.

We describe a map of 1.42 million single nucleotide polymorphisms (SNPs) distributed throughout the human genome, providing an average density on available sequence of one SNP every 1.9 kilobases. These SNPs were primarily discovered by two projects: The SNP Consortium and the analysis of clone overlaps by the International Human Genome Sequencing Consortium. The map integrates all publicly available SNPs with described genes and other genomic features. We estimate that 60,000 SNPs fall within exon (coding and untranslated regions), and 85% of exons are within 5 kb of the nearest SNP. Nucleotide diversity varies greatly across the genome, in a manner broadly consistent with a standard population genetic model of human history. This high-density SNP map provides a public resource for defining haplotype variation across the genome, and should help to identify biomedically important genes for diagnosis and therapy.

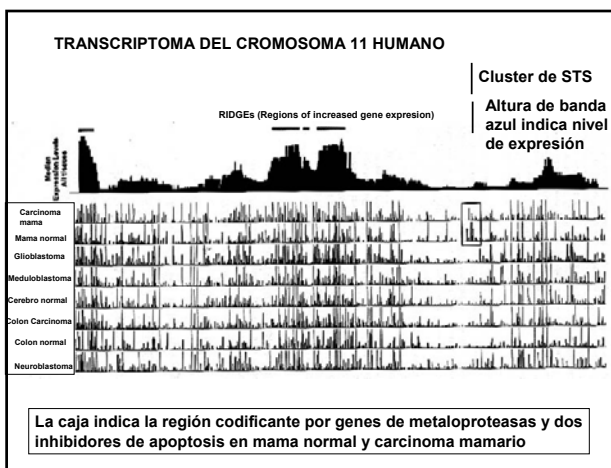
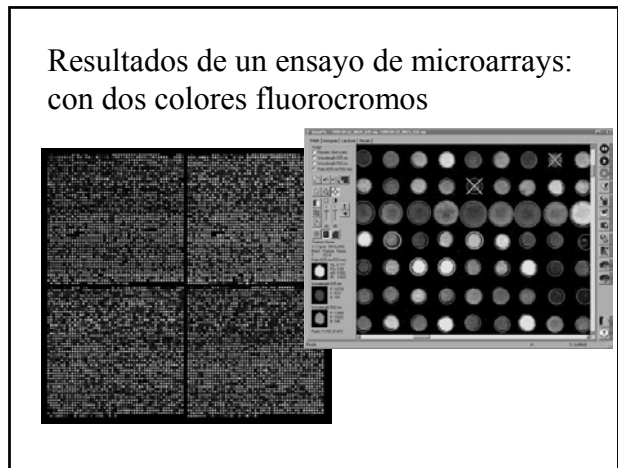
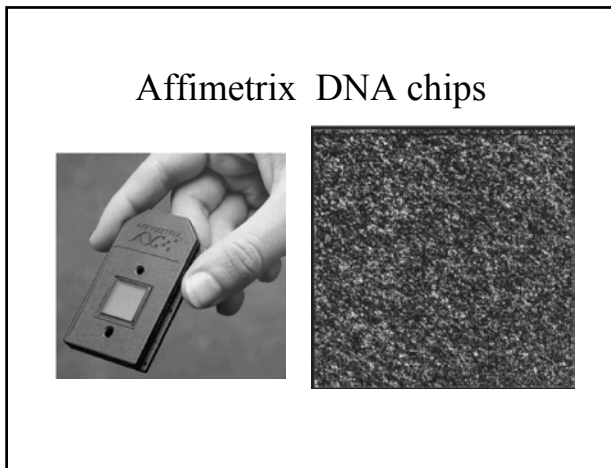
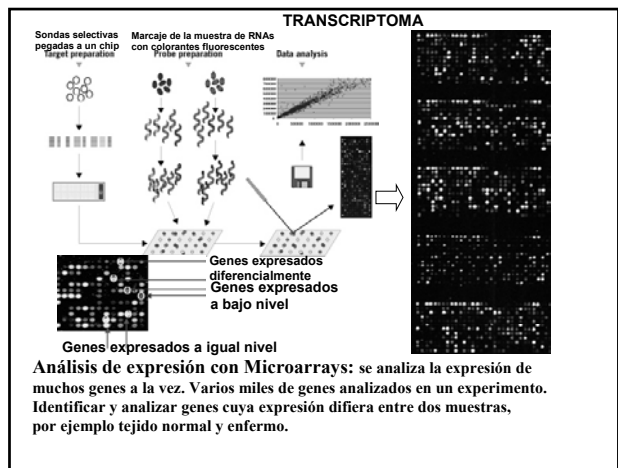
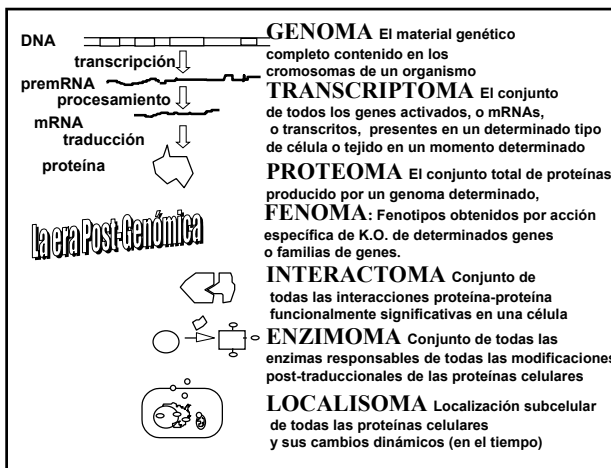
La era Post-Genómica

## GenBank tiene dbSNP

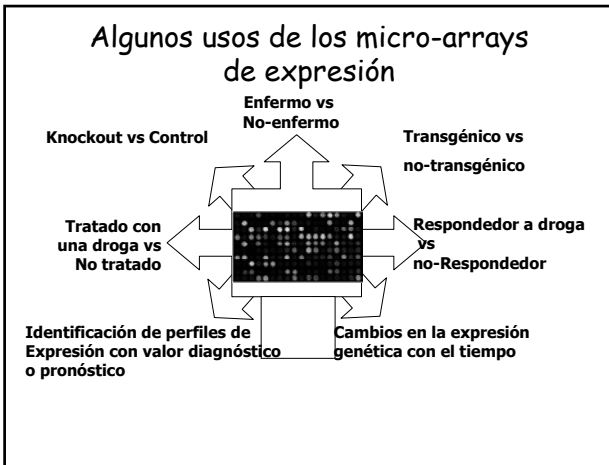
En la actualidad Oct, 2004 hay registrados 9,839,868 SNPs en humanos y validados 4,544,754



Tiene múltiples opciones de búsqueda, entre ellas: buscar en una secuencia en la que estás interesado y saber cuántos SNP y dónde están localizados



- ### Aplicaciones de poner el conocimiento del genoma a trabajar
- Genética de poblaciones: estudio de susceptibilidad en diferentes poblaciones.
  - Identificación de genes candidatos en enfermedades multifactoriales por rastreo de todo el genoma. Enf. de Crohn locus de citoquinas en Chr. 5.
  - Estudio de variantes alélicas de múltiples locos asociadas a determinadas patologías y como influyen en la severidad de la manifestación clínica.
  - Diagnostico diferencial molecular por el estudio del transcriptoma
  - Farmacogenómica. Efecto de los fármacos en base a la dotación génica individual y de célula diana a tratar.
  - PostGenómica química. Diseño de inhibidores y/o activadores específicos para cada uno de los productos génicos (30.000-40.000) sin efectos colaterales sobre otras vías

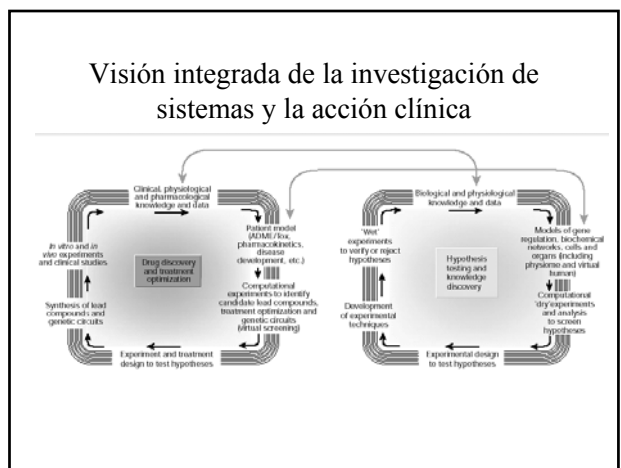
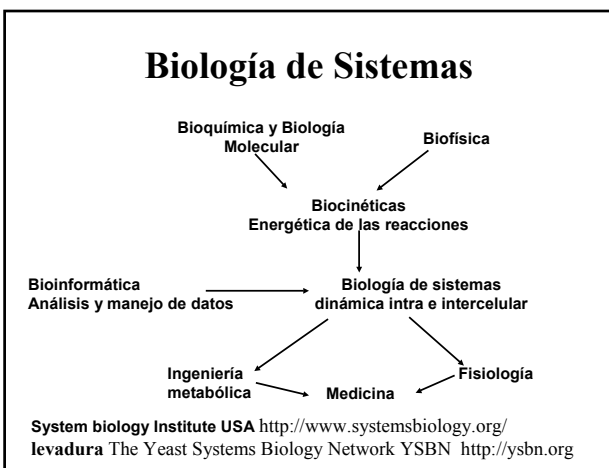
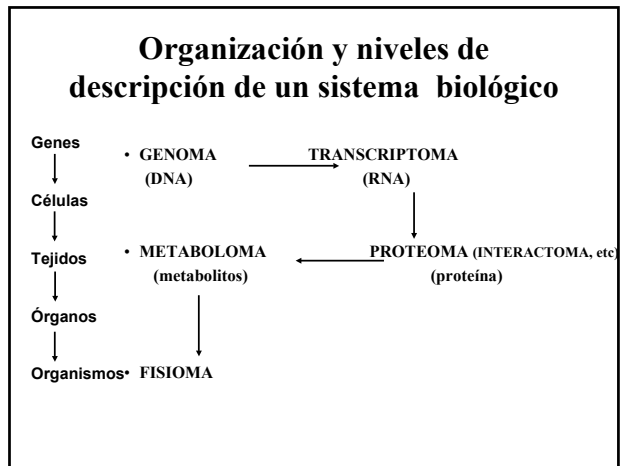


### La era post-genómica. Biología de sistemas

- **Visión cartesiana:** cualquier sistema complejo puede ser analizado por el estudio de las propiedades de cada una de sus partes.
- **Aproximación de la Biología de Sistemas:** los sistemas vivos son sistemas totales integrados cuyas propiedades no pueden reducirse a las propiedades de sus partes
- **La propiedades de un sistema se producen a partir de la configuración de una serie ordenada de relaciones que son características para una particular clase de organismos o sistemas.** Las propiedades de un sistema se destruyen cuando el sistema se descompone en sus elementos aislados

### ¿Qué es un sistema biológico?

- El rango va desde *ecosistemas* al sistema de reacciones que constituyen la *bioquímica celular*.
- Normalmente nos referimos a lo último, sistema de las reacciones químicas que permiten que las células funcionen.
- Por "*sistema*", nos referimos a un número de partes que están conectadas unas a otras y que funcionan conjuntamente.





### **Futuro de la medicina con el desarrollo de la Biología de sistemas. La medicina será:**

- **Predictiva:** basándose en el estudio de los 6 millones de SNPs de nuestro genoma. En 10-15 años se habrán identificado cientos o miles de genes que predisponen a diferentes patologías con lo que con una pequeña muestra de sangre se podrá predecir para cada individuo sus posibles enfermedades, todas a las que estamos predispuestos.
- **Preventiva:** basándose en los estudios de biología de sistemas, en unos 15-25 años, podremos poner cada uno de nuestros genes dentro del contexto funcional de nuestro organismo y poder intervenir adecuadamente: con drogas, terapia celular: células madre o modificadas genéticamente, etc de forma individualizada
- **Personalizada:** como cada uno de nosotros tiene 6 millones de variaciones, los médicos de acuerdo con nuestra dotación genética tendrán que realizar las oportunas intervenciones tratándonos individualmente para nuestras predisposiciones individualizadas

### **¿Por qué es importante la biología de sistemas para la medicina?**

- Nos permitirá saber cuál será el efecto sobre el sistema de la intervención que se realice en una parte del sistema.
- Saber qué intervención se debe hacer para obtener el resultado deseado
- Ejemplo: ¿qué proteína o proteínas hay que activar o desactivar para parar una enfermedad causando el menor daño posible al paciente?

### **Otras cuestiones “post-genómicas”**

- **Políticas**
- **Legales**
- **Comerciales**
  
- **Privacidad de los resultados**
- **Discriminación genética**
- **Comunicación y accesibilidad a los bancos de datos**
- **Segmentación del mercado de productos**

### **MODELOS ANIMALES para la patología**

### **DEFINICIONES**

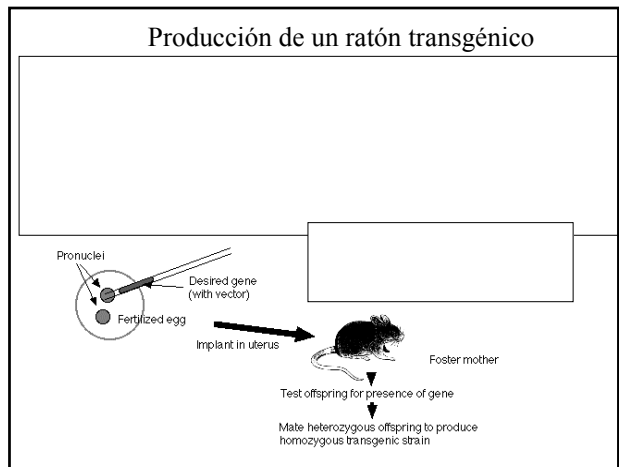
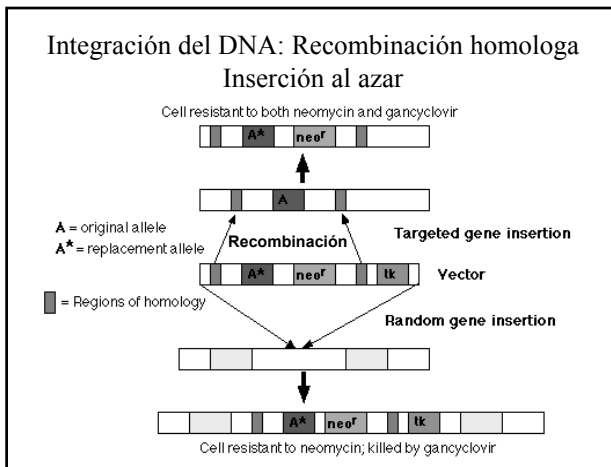
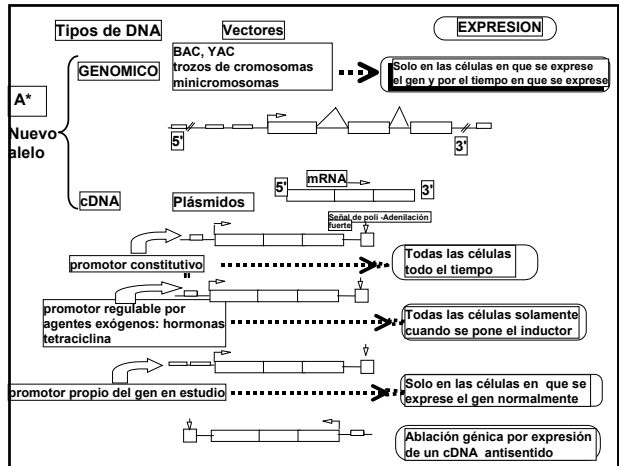
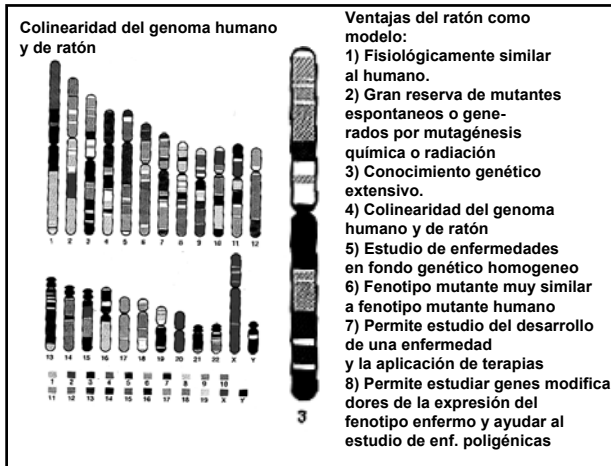
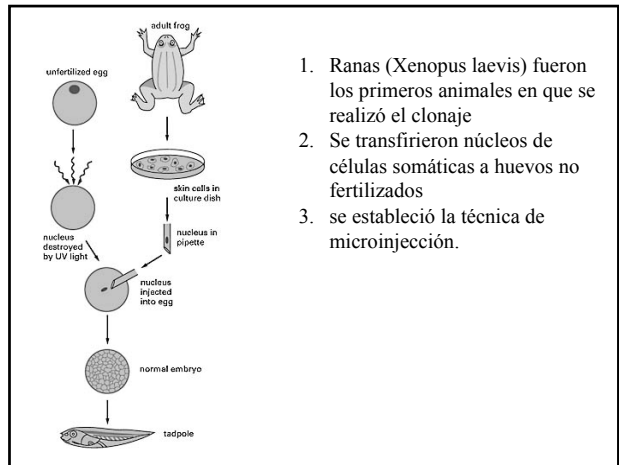
- **Animal Transgénico– ANIMAL QUE PORTA INTEGRADO EN SU GENOMA UN GEN FORÁNEO DE LA MISMA O DISTINTA ESPECIE.**
- **Animal Quimérico – Animal que porta un gen alterado introducido por manipulación de células STEM embrionarias (ES). Algunas células de este animal se derivan del blastocisto receptor y otras de las células ES inyectadas.**
- **Animal Knockout– animal en el que se ha interrumpido la función de un gen determinado por recombinación homóloga. Alelo nulo.**

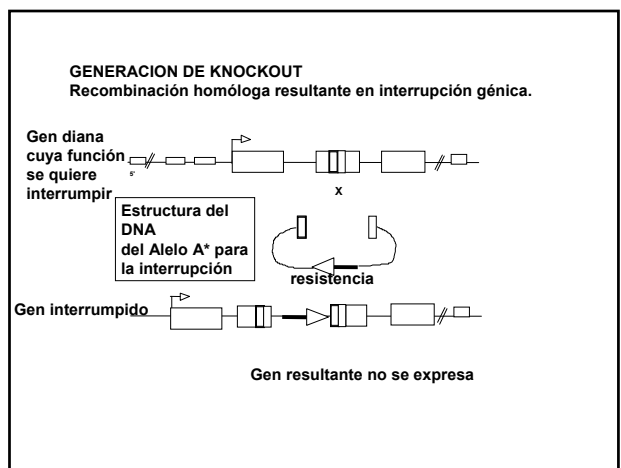
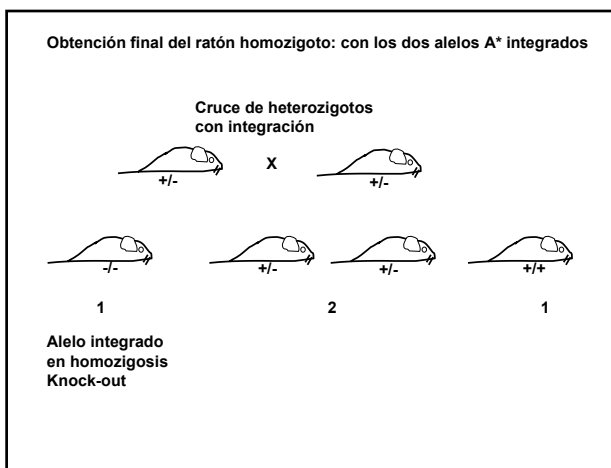
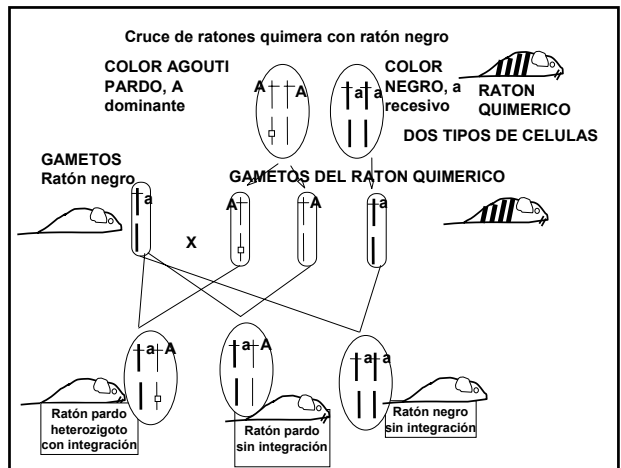
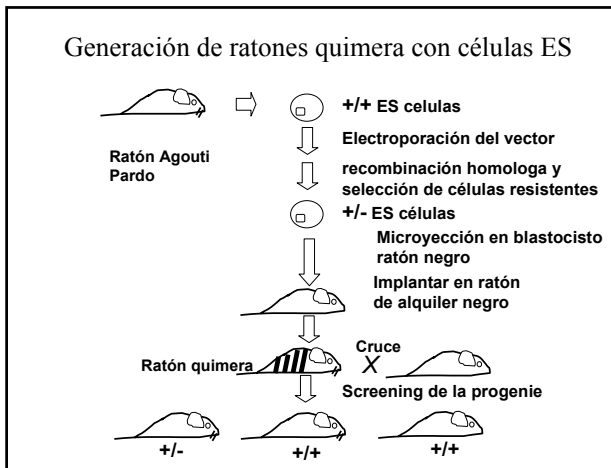
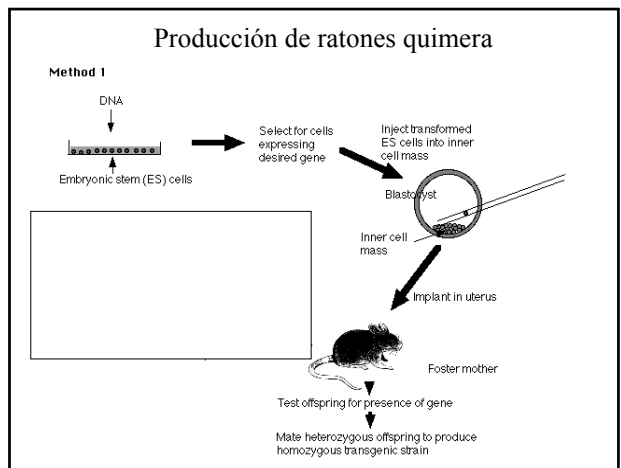
### **DEFINICIONES (continuación)**

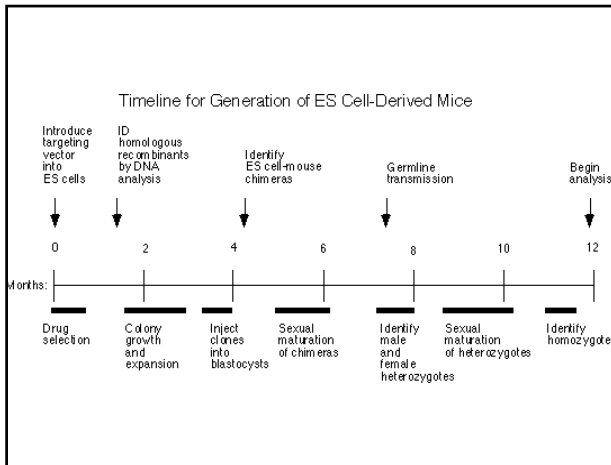
- **Animal Knock-in– similar a knockout, excepto que tiene sustituido un gen A en el locus de A , por un alelo distinto de A, o por otro gen B, y obtenido por recombinación homóloga.**
- **Transferencia nuclear– técnica utilizada para hacer “un clon.” El núcleo de una célula somática de un adulto se inserta en el citoplasma de un huevo. El huevo reprograma los genes del núcleo de la célula adulta y se comporta como una célula pluripotencial dando lugar a un nuevo individuo**

## Organismos utilizados como modelos transgenicos

- Arabadopsis (planta)
- C. elegans (gusano)
- Drosophila
- Xenopus (frog)
- Pez Zebra
- Ratón
- Ratas
- Cerdo
- Oveja
- Cabra
- Vaca
- Mono







## Ratones Knockout

- Muy útiles para el estudio de la función de un gen para el cual no existan mutantes naturales
- Generalidades:
  1. Los ratones muchas veces no se afectan fisiológicamente (K.O. De muchos genes no tienen fenotipo, cuidado!!!). Muchos genes no son indispensables
  2. La mayor parte de los genes son pleiotropicos, esto es, se expresan en diferentes tejidos en diferentes formas y a diferentes tiempos en el desarrollo.

## Estudios con ratones transgénicos

- Rescate de mutantes
- Ratones como bioreactores – síntesis de anticuerpos monoclonales humanizados
- Relaciones Estructura función
- Modelos de enfermedades humanas – Usos: análisis de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la patogénesis y para testar terapia farmacológica o génica

## Modelos de ratón listados por órgano primario o tejido o sistema afectado

- Trastornos de cresta neural y derivados – 11
- Trastornos de visión y audición – 7
- Trastornos de hueso, piel y conectivo– 16
- Trastornos Neurológicos y neuromusculares– 22
- Neoplasias – 11
- Trastornos Inmunológicos y hematológicos– 17
- Trastornos Metabólicos y hormonales– 24
- Trastornos Humanos con etiología poligénica - 6

## Ejemplos de modelos animales de enfermedades genéticas

- Anemia falciforme – combinación de knockout y transgénicos. Genes endógenos de globina anulados, genes humanos de globina introducidos como transgenes.
- Fibrosis Quística – fundamentalmente Knockout
- Enf. poliquística renal – modelos knockout.
- Narcolepsia – modelo knockout.